สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

นางสาวนันทวัน ศรีกาฬสินธุ์
นางสาวพรรณสิทธิ์ ภูวสรรเพชร
นางสาวอัญชลี เพ็งสาธร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่ ว.ท. วส425ก 2543
เลขทะเบียน 39885
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544
.b.....
.i.....

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# A 23S rDNA-based PCR method for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples

NANTAWAN SRIGARASIN
PHANASIT POOWASANPETCH
ANCHALEE PENGSATORN

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหารโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)


โดย นางสาวนันทวัน ศรีกาฬสินธุ์

นางสาวพรรณสิทธิ์ ภูวสรรเพชร

นางสาวอัญชลี เพ็งสาธร

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี


ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

( ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

( รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ) ประธานกรรมการ

( ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ) กรรมการ

( อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงงานพิเศษ | การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหารโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) |
| นักศึกษา | นางสาวนันทวัน ศรีกาฬสินธุ์ |
| | นางสาวพรรณสิทธิ์ ภูวสรรเพชร |
| | นางสาวอัญชลี เพ็งสาธร |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี |
| ภาควิชา | ชีววิทยาประยุกต์ |
| ปีการศึกษา | 2543 |


## บทคัดย่อ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งของโรคอาหารเป็นพิษในคน แต่วิธีการตรวจสอบโดยทั่วไปนั้นมักยุ่งยาก และใช้เวลานาน ดังนั้นเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อดังกล่าวได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ (Primer) SA-1 และ SA-2 ที่มีคุณสมบัติเป็นคู่สมกับยีนในส่วน 23S rDNA ของเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA) ขนาด 415 คู่เบส จากผลการทดลองความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้พบว่า *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองให้ผลในการทำพีซีอาร์เป็นผลบวก ในขณะที่เชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่นอีก 2 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 8 สายพันธุ์ให้ผลเป็นลบ และจากการทดลองปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์โดยเปลี่ยนจำนวนรอบจากขั้นตอน denaturation ถึงขั้นตอน extension จากเดิมที่ใช้ 30 รอบ เป็น 40 รอบ พบว่าปริมาณ ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ในสภาวะนี้ คือ 1 นาโนกรัม ซึ่งดีกว่าผลการทดลองก่อนหน้านี้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดอื่นๆ และสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ แม้จะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| Special Project Title | A 23S rDNA-based PCR method for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples |
| Name | Miss.Nantawan Srigarasin |
| | Miss.Phanasit Poowasanpetch |
| | Miss.Anchalee Pengsatorn |
| Special Project Advisor | Mr. Choowong Auesukaree |
| Department | Appiled Biology |
| Academic Year | 2000 |


## Abstract

*Staphylococcus aureus* is the leading cause of food poisoning in human. The standard method for detection of bacteria is labor intensive and time consuming. Polymerase Chain Reaction (PCR) was developed for rapid, specific and highly sensitive detection of *S. aureus*. In this study, primer SA-1 and SA-2 which are specific to 23S rDNA of *S. aureus* were used. The PCR product is a 415 bp fragment. All *S. aureus* strains tested were positive and 2 other species of *Staphylococcus* and 8 other species of bacteria tested were negative in the PCR assay. In the PCR sensitivity test, the cycle number from denaturation to extension step was changed from 30 to 40 cycles, and found that as few as 1 ng of DNA from *S. aureus*, which was less than that in previous study, could be detected by PCR. This method can be used for rapid detection of a few *S. aureus* in contaminated foods and clinical samples.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี คณะกรรมการโครงงานพิเศษ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ รวมถึง นายวรพงษ์ วงศ์ปัญญา และ นางสาวอภิชญา ทองทับ ที่ช่วยออกแบบไพรเมอร์ และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ นายเชฏฐ รัตนาจารย์ และ นางสาวพรทิพย์ พงษ์พรเชษฐา ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา ความรู้ทางวิชาการ เทคนิคต่างๆ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ซึ่งคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ทั้งที่อาคารสมเด็จพระเทพฯ ที่อนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดให้มาทำการทดลอง อาคารจุฬาภรณฯ และอาคารวิทยาศาสตร์เก่าที่ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ แม่บ้านประจำภาควิชีวิทยาประยุกต์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงาน และขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาที่ได้ให้กำลังใจ ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนาม ณ ที่นี้ได้ทั้งหมดที่มีส่วนช่วยเหลือเป็นกำลังใจตลอดมา จนโครงงานพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญตาราง | ง |
| สารบัญรูปภาพ | จ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย | 25 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 35 |
| บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 42 |
| ภาคผนวก | |
| เอกสารอ้างอิง | |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1 | สมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่พบในคนและสัตว์ต่างๆ | 4 |
| ตารางที่ 2 | ชนิดของ Electrophoresis จำแนกตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน | 22 |
| ตารางที่ 3 | สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา และแหล่งที่มา | 25 |
| ตารางที่ 4 | ผลการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* เทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ | 36 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 1 | หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) | 11 |
| รูปที่ 2 | ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคพีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis | 37 |
| รูปที่ 3 | ผลการตรวจสอบการปรับปรุงประสิทธิภาพการทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 | 39 |
| รูปที่ 4 | ผลการทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในตัวอย่างอาหาร | 41 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

โรคในระบบทางเดินอาหารเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่พบบ่อยในประเทศไทย ซึ่งสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรค คือ การปนเปื้อนของอาหารจากสารปนเปื้อน 2 กลุ่ม ได้แก่ สารเคมี เช่น สารพิษจากเชื้อรา สารกำจัดศัตรูพืช และการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยเอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ดี และอาหารมีโอกาสสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมต่างๆ อยู่ตลอดเวลา จึงเป็นเหตุให้การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคนี้ (วารี วัลยะเสรี และคณะ, 2536)

แบคทีเรียที่มีความสำคัญมากในการก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหารชนิดหนึ่ง คือ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมโครเมตร แกรมบวก ส่วนใหญ่เป็นพวก aerobes หรือ facultative anaerobes ผลิตเอนไซม์ catalase การแบ่งตัวจะแบ่งทั้งตามยาว และตามขวาง เรียงตัวกันเป็นคู่สอง หรือคู่สี่ บางครั้งพบอยู่รวมเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น และสามารถสร้างสารพิษที่เป็น enterotoxin ได้ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) เป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง ทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน ลำไส้อักเสบ มักพบปนเปื้อนได้ทั่วไปในอาหาร สิ่งอุปโภค บริโภค และในสิ่งแวดล้อมต่างๆ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

การป้องกัน และแก้ไขอันตรายที่เกิดขึ้นจากสารพิษของเชื้อ *S. aureus* ทางหนึ่งที่ได้ผลเป็นอย่างดี คือการที่สามารถตรวจสอบเชื้อนี้ก่อนจะเข้าสู่ร่างกาย ที่ผ่านมาวิธีการตรวจสอบหาเชื้อชนิดนี้มีอยู่หลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารคัดเลือกเฉพาะ (selective medium) การ spread plate แล้วนำโคโลนีมาทำการทดสอบ coagulase การตรวจสอบลักษณะของจุลินทรีย์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่ยุ่งยาก และเสียเวลามาก หากเชื้อที่ปนเปื้อนมีปริมาณน้อยก็จะทำให้ได้ผลการตรวจสอบที่คลาดเคลื่อน หรือทำการตรวจสอบไม่ได้

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นเทคนิคหนึ่งที่อาศัยหลักการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องซ้ำๆกันหลายๆรอบ มีการควบคุมสารเคมีต่างๆ และอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง DNA Thermal Cycle (Anthony และคณะ, 2000; Anthony และคณะ, 1999; Becker และคณะ, 1998; Belkum และคณะ, 1993; Flower และ Martin, 1980; Gouws และคณะ, 1998; Johnson และคณะ, 1991) เทคนิคนี้มีผู้ยอมรับและนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์กันมาก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงในการตรวจสอบ และสามารถทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ และสามารถตรวจสอบได้แม้มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อจากโครงงานพิเศษของ นายวรพงษ์ วงศ์ปัญญา และนางสาวอภิชญา ทองทับ ซึ่งได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ 23S rDNA ของเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากยีนบริเวณนี้เป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความเหมือนกันมากในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบในปริมาณมาก และในหนึ่งเซลล์ยังมีหลาย copies ซึ่งช่วยให้การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และใช้ไพร์เมอร์ SA-1 และ SA-2 เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะสูงกับเชื้อ *S. aureus* โดยเฉพาะกับส่วน 23S rDNA และไม่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่น รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ ตั้งแต่ 10 นาโนกรัมขึ้นไป ซึ่งประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ตามสภาวะที่ใช้นั้นยังไม่สูงนัก นอกจากนี้ยังไม่มีการทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบหาเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการปรับปรุงเทคนิค และสภาวะในการทำพีซีอาร์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และได้ทำการทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบหาเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารอีกด้วย

**วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ**

1. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ของการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ให้สูงขึ้นโดยการปรับปรุงขั้นตอนการทำพีซีอาร์
2. เพื่อทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

## เชื้อ *Staphylococcus*

สกุล *Staphylococcus* จะเป็นเซลล์ทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เป็น aerobes หรือ facultative anaerobes มีทั้งออกซิเดทีฟ (oxidative)และเฟอร์เมนเททีฟเมตาบอลิซึม (fermentative metabolism) การแบ่งตัวแบ่งได้ทั้งตามยาวและตามขวาง เรียงตัวจับกันเป็นคู่สอง (pairs) หรือเป็นคู่สี่ (tetrad) บางทีอยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เรียกว่า staphyle ลักษณะโคโลนีกลมนูน เป็นมัน อาจมีสีขาวหรือสีครีม บางครั้งอาจมีสีเหลืองถึงสีส้ม เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาทุกชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8-7.4 เชื้อสร้างรงควัตถุได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส และในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ แต่จะไม่สร้างรงควัตถุในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

โดยทั่วไป Staphylococci ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆได้ดี เช่น ทนทานต่อความร้อนถึง 60 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 30 นาที และมีชีวิตอยู่ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานหลายเดือน นอกจากนี้ยังทนต่อฟีนอล และเมอคูริคคลอไรด์มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น *Staphylococcus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ penicillinase ($\beta$-lactamase) ซึ่งทำให้ดื้อต่อยา penicillin ได้

สกุล *Staphylococcus* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 20 ชนิด พบว่าเกี่ยวข้องกับมนุษย์ 12 ชนิด (ตารางที่ 1) แต่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทั้งหมด เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* เชื้อเหล่านี้มักพบบริเวณผิวหนัง เยื่อบุเมือก หรือบริเวณลำคอส่วน oropharynx และส่วน nasopharynx ส่วนที่เหลืออีก 8 ชนิด พบอยู่ร่วมกับสัตว์ และผลผลิตจากสัตว์ เช่น นม และเนื้อสัตว์ เป็นต้น โดยปกติ Staphylococci มักเป็น normal flora อยู่ที่ผิวของสัตว์ชั้นต่ำ และชั้นสูง แต่จุลินทรีย์เหล่านี้มักฉวยโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในสภาวะที่เจ้าบ้านอ่อนแอ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่พบในคนและสัตว์ต่างๆ

| เชื้อสายที่พบในคนและสัตว์ | เชื้อสายที่พบแต่ในสัตว์หรือผลผลิตจากสัตว์ |
|---|---|
| **Coagulase-positive** | **Coagulase-negative** |
| *S. aureus* | *S. intermedius* - cats, dogs, carnivores |
| **Coagulase-negative** | *S. caprae* – goats (milk) |
| *S. epidermidis* | *S. lentus* – sheep |
| *S. saprophyticus* | *S. hyicus* – cattle, pigs |
| *S. hominis* | *S. sciuri* – small mammals |
| *S. haemolyticus* | *S. gallinarum* – poultry |
| *S. warneri* | *S. caseolyticus* – cows, dairy products |
| *S. capitis* | *S. carnosus* – processed meats, beef |
| *S. saccharolyticus* | |
| *S. auricularis* | |
| *S. simulans* | |
| *S. cohnii* | |
| *S. xylosus* | |

(จาก Koneman, E.W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology; 1988:313)

*Staphylococcus* สามารถหมักย่อยน้ำตาลได้หลายชนิดเกิดเป็นกรดแลกติก แต่ไม่เกิดก๊าซ เชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอลและเกิดกรดได้แก่ เชื้อ *S. aureus* ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล ได้แก่ *S. epidermidis*

**เชื้อ *Staphylococcus aureus***

แบคทีเรียก่อโรคในคนในกลุ่ม *Staphylococcus* คือ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีทอง ให้ผลการทดสอบโคแอกลูเลส (coagulase) เป็นบวก และทำให้พลาสมาเกิดเป็นลิ่ม เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากโดยสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุกๆ บริเวณของร่างกาย การติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง รวมทั้งการเกิดหนอง และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง การติดเชื้อในกลุ่ม Staphylococci จะเรียกว่า “scalded-skin syndrome” นอกจากนี้ *S. aureus* อาจพบจากการติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ และสามารถก่อให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การติดเชื้อในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ การติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *S. aureus* มักพบเสมอ และอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ และเป็นหนอง เป็นต้น *S. aureus* บางสายพันธุ์ก่อให้โรคเกิดอาหารเป็นพิษ ซึ่งเป็นผลจากสารเอนเทอโรทอกซินที่ *S. aureus* สร้างขึ้น โดยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ กล้ามเนื้อเป็นตะคริว อ่อนเพลีย ท้องเสีย อุจจาระเป็นมูกเลือด มีไข้ต่ำ หนาวสั่น และอาจมีอาการช็อคได้

**การทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus*** (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

*S. aureus* ทำให้เกิดโรคโดยการบุกรุก แพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกาย และสามารถสร้างสารพิษ และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้แก่

1. Hemolysins (Staphylolysins) เป็นสารประกอบที่เชื้อปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน

   Alpha hemolysin มีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือดแดงกระต่าย และทำลายเกล็ดเลือดได้ ทำให้เกิดอาการอักเสบอย่างรุนแรงและทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าตาย หากฉีดเข้ากระแสเลือดจะทำให้สัตว์ทดลองนั้นตายได้

   Beta hemolysin สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแกะ แต่ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงกระต่าย จะเห็นคุณสมบัตินี้เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบน Blood agar

   Delta hemolysin มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาว และต่อเนื้อเยื่ออีกหลายชนิด

   Gamma hemolysin มีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่น ไม่ค่อยมีความสำคัญในการทำให้เกิดโรค
2. Leukocidin ออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวของสัตว์หลายชนิด ละลายน้ำได้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายกว่า exotoxin
3. Enterotoxins เป็นสารที่ *S. aureus* สร้างขึ้นสามารถละลายน้ำได้มี 6 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ A, B, C, $C_2$, D และ E เชื้อจะสร้างสารดังกล่าวได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง สารนี้ทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร และเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน
4. Coagulase เอนไซม์นี้ทำให้พลาสมาแข็งตัวได้ มี 2 ชนิด คือ

   Bound coagulase (clumping factor) เป็น receptor ที่จะมีปฏิกิริยากับ fibrinogen ในพลาสมา ทำให้เลือดแข็งตัว

   Free coagulase เอนไซม์นี้ทำให้พลาสมาแข็งตัว ทำให้ร่างกายของเซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถกำจัดโดยเม็ดเลือดขาวได้ โดยเอนไซม์จะไปจับกับ coagulase reacting factor (CRF) ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมาทำให้โปรทรอมบิน (prothrombin) เปลี่ยนไปเป็นทรอมบิน (thrombin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) เปลี่ยนเป็นไฟบริน (fibrin) ทำให้เลือดแข็งตัว ทำให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถจับทำลายเชื้อได้

5. Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเรื่องของการบุกรุกของเนื้อเยื่อได้ดี (spreading factor) เนื่องจากเอนไซม์จะไปทำลาย hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารที่เชื่อมทำให้เซลล์ติดกันเป็นเนื้อเยื่อได้
6. Exfoliatin (Epidermolysin) ส่วนใหญ่สร้างโดย *S. aureus* phage type 2 สารพิษดังกล่าวทำให้เกิดอาการหลุดลอกของหนังกำพร้าทั่วร่างกาย (scalded skin syndrome) โรคนี้มักพบในเด็ก สำหรับผู้ใหญ่ที่มีภูมิต้านทานต่ำก็สามารถพบได้เช่นกัน
7. Penicillinase (Beta-lactamase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ดื้อยากลุ่มเพนนิซิลลิน โดยที่เอนไซม์จะทำลาย beta-lactam ring

นอกจากนี้ *S. aureus* ยังสามารถสร้างเอนไซม์พวก lipase, proteinase และ DNase ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อโรคเป็นไปได้มากขึ้นอีกด้วย

**เชื้อ *Staphylococcus* อื่นๆ**

*S. epidermidis* เป็นพวกที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase ปกติพบทั่วไปในอากาศ และในสิ่งแวดล้อม พบอยู่ตามผิวหนัง บน mucous membrane ของระบบทางเดินหายใจส่วนบน และระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ แม้ว่าปกติเชื้อนี้ไม่เป็นอันตราย แต่ก็อาจทำให้เกิดโรคได้หากเข้าไปอยู่ใต้ผิวหนังลึกๆ เข้าไปในหลอดเลือด หรือติดเชื้อจากการผ่าตัดหัวใจ เชื้อ *S. epidermidis* บางสายพันธุ์สามารถสร้าง hemolysin ได้ นอกจากนั้นพบว่าดื้อต่อยาหลายชนิด เช่น เมทิซิลลิน เซฟาโลสปอริน และอะมิโนไกลโคไซด์ ดังนั้นจึงควรทำการตรวจสอบความไวก่อนการเลือกใช้ยา

*S. saprophyticus* เป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase เช่นกัน พบอยู่ตามผิวหนัง เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของผู้หญิง รองจากการติดเชื้อ *Escherichia coli*

**อาการอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *Staphylococcus aureus***

โรคนี้มักเกิดขึ้นเสมอโดยมีสาเหตุมาจากการย่อยสารพิษ (enterotoxin) ของ *S. aureus* ที่เจริญในอาหาร สารพิษนี้ทำให้กระเพาะและลำไส้อักเสบ *S. aureus* ที่สามารถผลิตสารพิษมักเป็นพวกที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ coagulase ได้ แต่ไม่จำเป็นต้องทุกสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ผลิตเอนไซม์ coagulase ต้องผลิตสารพิษ บางสายพันธุ์สามารถทนเกลือที่มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นได้สูงถึงร้อยละ 10-20 และยังสามารถทนไนไตรท์ได้ค่อนข้างดี ดังนั้นเชื้อนี้จึงสามารถเจริญได้ดีในเนื้อเค็ม นอกจากในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือสูงเชื้อยังเจริญได้ดีในที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึงร้อยละ 50-60 ยังมีความสามารถในการย่อยโปรตีนแต่ไม่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น

*S. aureus* สามารถผลิตสารพิษได้ 6 ชนิด ซึ่งแยกโดยวิธีทางซีโรโลยี ได้แก่ A, B, C, $C_2$, D และ E ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A โดยทั่วๆไปถ้าอาหารเหมาะสมกับการเจริญ เชื้อจะสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ พีเอช และ การต้องการความชื้น ($a_w$) ที่กว้างขึ้น ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ และสร้างสารพิษจะอยู่ระหว่าง 4-46 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อจะมีพีเอชขั้นต่ำสำหรับการเจริญที่ต่ำกว่าในสภาวะไร้ออกซิเจน

*S. aureus* จะเจริญได้ช้าลงถ้ามีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญร่วมอยู่ด้วย และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเสียจนสังเกตได้ก่อนที่ *S. aureus* จะผลิตสารพิษถึงระดับที่เป็นอันตราย แต่การแข่งขันนี้จะไม่เกิดขึ้นถ้าหากอาหารนั้นได้รับความร้อนมาก่อน *S. aureus* จะถูกทำลายที่ความร้อน 66 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 83 นาที ทั้งนี้การทนความร้อนของเชื้อจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร และสายพันธุ์

**อาการของโรคอาหารเป็นพิษ**

จะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล บางคนพบว่ามีอาการรุนแรง บางคนพบว่ามีอาการไม่รุนแรง หรือบางคนไม่พบอาการเลย ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลา 2-4 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากอาหารเป็นพิษ หรือโรคติดเชื้ออื่นๆที่มีระยะฟักตัวนานกว่านี้

อาการขั้นแรกที่พบอยู่เสมอคือ ผู้ป่วยจะมีน้ำลายออกมามากผิดปกติ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย บางรายมีอาการมากอาจพบเลือด และมูกเลือดในอุจจาระด้วย บางรายปวดศีรษะ กล้ามเนื้อเป็นตะคริว เหงื่อออก หนาวสั่น อ่อนเพลีย ชีพจรอ่อน และช็อค มักพบว่ามีไข้ต่ำๆมากกว่าไข้สูง อาการจะคงอยู่ 1-2 วันก็หายโดยไม่ต้องรักษา อัตราการตายต่ำในรายที่มีอาการมากอาจต้องให้น้ำเกลือ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

**ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ**

การที่เชื้อ *Staphylococcus* ชนิดที่สร้างสารพิษจะเจริญในอาหารนั้นๆ อาหารต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญด้วย คือ มีพีเอช 4.8 - 7.4 และอุณหภูมิ 15.6 - 46.6 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของการเจริญของเชื้อนี้ในอาหาร คือ 40 องศาเซลเซียส และเชื้อนี้จะใช้เวลานานในการสร้างสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การป้องกันโรคอาหารเป็นพิษ**

1. ป้องกันการปนเปื้อนของอาหารจากเชื้อ *Staphylococcus*
2. ป้องกันการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus*
3. ทำลายเชื้อ *Staphylococcus* ในอาหารก่อนการบริโภค

**การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร**

ในบรรดาสิ่งที่ไม่ใช่อาหารแต่อาจตรวจพบได้ในอาหารทั่วไปได้แก่ สารเจือปนอาหาร (food additive) เช่น สารกันบูด สิ่งปลอมปนในอาหาร (food adulterant) เช่น การผสมผงใบไม้แห้งในพริกป่น สิ่งแปลกปลอมในอาหาร (extraneous matter) เช่น ดิน ทราย และการปนเปื้อนอาหาร (food contaminant) ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ใช่สารอาหารมักตรวจพบเสมอในอาหาร และเป็นสิ่งที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคบ่อยที่สุด การปนเปื้อนของอาหารที่สำคัญที่สุด คือการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ทั้งจากสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และจากสารเคมี เช่น สารพิษจากเชื้อรา สารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น

ในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร อาจมีสาเหตุมาจากติดปนมาจากวัตถุดิบ จากผู้สัมผัสอาหารระหว่างการผลิตหรือจำหน่าย จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารมีตั้งแต่ ไวรัส แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่เนื่องจากตามธรรมชาติของไวรัสจะเจริญได้ดีเมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน การตรวจหาเชื้อไวรัสในอาหารจึงทำได้ยากมาก ดังนั้นการวิเคราะห์การปนเปื้อนของอาหารจึงเน้นที่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ เชื้อที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคอาหารเป็นพิษ และเชื้อที่แสดงถึงดัชนีของสุขลักษณะของอาหาร เช่น การตรวจหา Coliform bacteria

ตามปกติเราพบว่า อาหารปรุงสำเร็จและอาหารทั่วไปที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดเป็นกลุ่มอาหารที่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูง ชนิดของเชื้อโรคที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษที่พบบ่อย คือ *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Vibrio parahae molyticus, Salmonellae* และในอาหารทั่วไปยังพบ *Clostridium botulinum* อีกด้วย (วารี วัลยะเสรี และคณะ, 2536) (ภาคผนวก ก)

ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารหลายประเภท เช่น นม อาหารทารก น้ำหวานเข้มข้น น้ำบรรจุขวด น้ำแข็ง ฯลฯ โดยเฉพาะในนม และผลิตภัณฑ์นม (Khan และคณะ, 1998; Straub และคณะ, 1999) เนื่องจากในนมมีความชื้นสูง มีค่าพีเอชประมาณ 6.5 มีสารอาหารครบถ้วน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ถือเป็นอาหารตามธรรมชาติที่สมบูรณ์มากที่สุดเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข)

**เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

**หลักการและวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)**

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction หรือเรียกย่อๆว่า PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเป็นวงจรในหลอดทดลองโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อน เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ค้นพบโดย Karry Mullis ในปี 2528 ทำให้เกิดวิธีใหม่ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆเท่าในเวลาอันสั้น ปัจจุบันเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ได้รับการนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการค้นหายีนในการวินิจฉัยโรค และเพื่อการศึกษาความรู้พื้นฐานทางด้านต่างๆ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2539)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่างๆดังนี้

1. ดีเอ็นเอแม่แบบหรือดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ที่ต้องการศึกษา
2. ดีเอ็นเอตั้งต้น (oligonucleotide primer) 2 สาย เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับคู่เบสเป็นคู่สม (complementary sequence) กับดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3. เอนไซม์ ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP ซึ่งใช้เป็น substrate สำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่
5. อื่นๆ เช่น เกลือ และบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม

**ขั้นตอนการทำพีซีอาร์**

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อเนื่องกันดังนี้

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการศึกษา ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

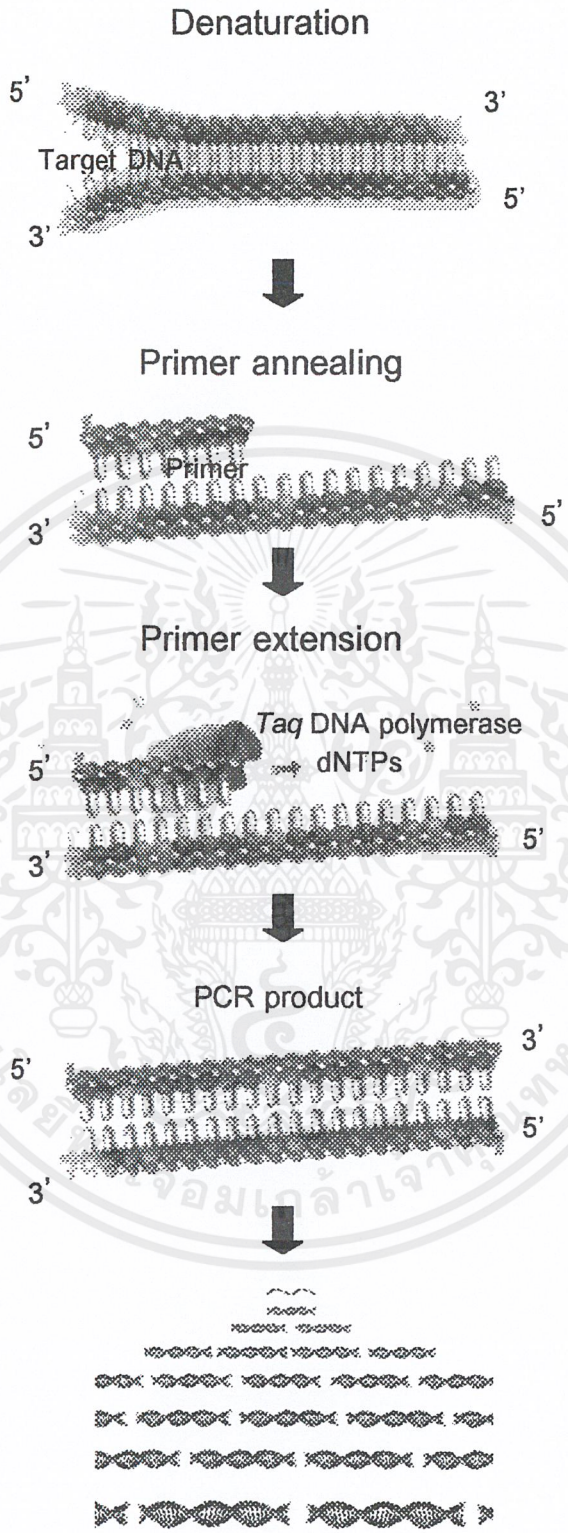
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอตั้งต้น (DNA primer) ทั้งสองสายเข้าจับอย่างจำเพาะ (anneal) กับปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ที่ปลาย 3'-OH ของสายดีเอ็นเอตั้งต้น (primers) ด้วย dNTPs ทั้ง 4 ชนิด ไปในทิศทาง 5' → 3' ของสายดีเอ็นเอตั้งต้น โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ลำดับของสายดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้อยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนเสร็จสิ้น นับเป็น 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เรียกว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) เกิดขึ้น จากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ซึ่งจะมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) คือ ได้ 2n เท่า (n=จำนวนรอบ) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1-10 ล้านเท่า (รูปที่ 1) โดยหลังจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการในรอบแรกแล้ว ในรอบต่อมาดีเอ็นเอต้นแบบที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะถูกใช้เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบต่อไป ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการลดปริมาณของไพรเมอร์ และ substrate ลง นั่นคืออัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์เมื่อมีปริมาณมากขึ้นย่อมเข้าจับคู่กันเองทำให้เหลือดีเอ็นเอต้นแบบที่จะจับคู่กับไพรเมอร์น้อยลงอันจะทำให้การเพิ่มมิได้เป็นไปตามอัตรา $2^n$ แต่จะมีอัตราที่ลดน้อยลง จนในที่สุดไม่มีการเพิ่มเกิดขึ้น เรียกว่าเกิด "plateau" จะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในขอบเขตจำกัด

การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็วตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย การดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานได้ก่อให้เกิดเทคนิคชั้นสูง (Advance PCR techniques) จำนวนมาก ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ศักยภาพ และลดปัญหาอุปสรรคต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่แต่ละเทคนิคมีหลักการและประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันเทคนิคเหล่านี้มีประโยชน์ครอบคลุมวัตถุประสงค์ต่างๆ ในงานวิจัยอย่างครบถ้วน ขึ้นอยู่กับการเลือกนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 1** หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่โดยทั่วไป** (standard PCR protocol)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โดยทั่วไปกำหนดให้มีส่วนผสมต่างๆ รวมอยู่ในปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA ) $10^5$-$10^6$ โมเลกุล

dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) แต่ละชนิด 50 μM

ไพรเมอร์แต่ละชนิด 20 pM

20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3

25 mM KCl

1.5 mM $MgCl_2$

*Taq* DNA polymerase 2 units

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย (amplification) เกิดขึ้นโดยกระบวนการหลัก 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ และเวลาตามที่กำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ ตั้งเครื่องให้มีสภาวะการทำงานดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Denaturation | 90-95 องศาเซลเซียส | 30-60 วินาที |
| Primer annealing | 40-60 องศาเซลเซียส | 30-60 วินาที |
| Primer extension | 72 องศาเซลเซียส | 1-2 นาที |

ทำซ้ำจำนวน 25-30 รอบ ส่วนรอบสุดท้ายทำ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการลดอุณหภูมิลงจนเหลือ 4 องศาเซลเซียส หรือเติม 10 mM EDTA วิธีมาตรฐานดังกล่าวสามารถใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มีขนาดความยาวตั้งแต่ 150-2,951 คู่เบส ได้ผลที่ดีและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามสำหรับบางดีเอ็นเอต้นแบบอาจใช้วิธีการมาตรฐานไม่ได้ผลดี กรณีเช่นนี้จำเป็นต้องปรับสภาวะการทำงานให้เหมาะสม เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำพีซีอาร์เกิดขึ้นได้สูงสุด ป้องกันปัญหาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น เช่น ไม่เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือเกิดน้อย หรือเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะ เป็นต้น

**การปรับสภาวะการทำงาน** ควรพิจารณาถึงปัจจัยต่อไปนี้คือ

1. **การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์** (Primer)

ข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ที่สำคัญควรพิจารณา คือ

1.1 ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสหลากหลาย และมีปริมาณเบส GC ใกล้เคียงกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยายควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurines, polypyrimidines หรือลำดับเบสที่มีการเรียงตัวที่ไม่ปกติ (unusual sequence) และควรให้มีปริมาณเบส GC อยู่ระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์

1.2 หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มีโครงสร้างทุติยภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ถ้ายังคงมี secondary structure ควรแทนที่ dGTP ด้วย 7-deaza-2-dGTP

1.3 ตรวจสอบการเรียงลำดับของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementary)โดยเฉพาะต้องไม่มีการซ้อนทับกันที่ปลาย 3' ในคู่ไพรเมอร์ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเกิด primer dimer

1.4 ควรกำหนดความยาวของไพรเมอร์ให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ 3'-end ของดีเอ็นเอต้นแบบ

1.5 มี Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน (balanced) อยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส

1.6 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 M ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้เกิดการจับคู่ที่ผิดพลาด (mispriming) และจะมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (nonspecific product) มากขึ้น และอาจมีโอกาสการเกิด primer dimer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่ถูกต้อง ทั้งผลผลิตที่ไม่จำเพาะและ primer dimer ต่างก็แย่งกันใช้เอนไซม์ dNTPs และ ไพรเมอร์ทำให้ผลผลิตที่ต้องการมีปริมาณที่ลดลง

**2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase**

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ซื้อได้จากหลายบริษัทผู้ผลิต ซึ่งอาจมาความแตกต่างในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสม (assay conditions) และคำนิยามกำหนดหน่วยวัดแอคติวิตี (unit definitions) ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นใช้ควรจะทดสอบหาความเข้มข้นที่พอเหมาะของเอนไซม์ ในช่วงตั้งแต่ 0.5-5 units ต่อ 100 µl และตรวจหาผลโดยวิธี Agarose gel electrophoresis ในการทำพีซีอาร์ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาลูกโซ่สูงเกินไปจะมีผลทำให้มีการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เป็น nonspecific background เกิดขึ้นมาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย เกณฑ์มาตรฐานกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ประมาณ 1-2.5 units ต่อ 100 µl ของปฏิกิริยาลูกโซ่ในกรณีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขยายตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซับซ้อนมาก เช่น genomic DNA ปกติควรจะใช้เอนไซม์ 1-4 units ต่อ 100 μl

3. **ความเข้มข้นของ** Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ปกติจะมีความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 50-200 μm โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่พีเอช 7.0 และวัดความเข้มด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น primary stock solution ที่มีความเข้มข้น 10 mM แล้วเจือจางเป็น working stock solution ที่มีความเข้มข้น 1 mM แบ่งใส่หลอดแล้ว เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ $Mg^{2+}$ ได้ ดังนั้นถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของ dNTPs มากๆ ควรจะต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ ให้พอเหมาะด้วย dNTPs ทั้ง 4 ชนิดที่มีอยู่ในปฏิกิริยาควรจะมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดอย่างสมดุลกัน เพื่อให้ปฏิกิริยาลูกโซ่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ปริมาณผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงต่อลำดับของเบสคู่สม

4. **ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน** (Magnesium ion)

ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ขึ้นกับความเข้มข้นของ magnesium ion ($Mg^{2+}$) ถ้ามีความเข้มข้นในปฏิกิริยามากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่ทำดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่แยกออกจากกันได้เป็นสายเดี่ยว และความจำเพาะของผลผลิตจากต้นแบบ (product specificity) การเกิดการจับซึ่งกันและกันระหว่างไพรเมอร์และไพรเมอร์เอง และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปในปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งใช้ dNTPs ปริมาณ 200 μM ต้องการความเข้มข้นของแมกนีเซียมอยู่ระหว่าง 0.5-2.5 mM

5. **ความสำคัญขององค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่**

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่คือ 10-15 mM Tris-HCl พีเอช 8.3-8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส แต่พีเอชที่แท้จริงในสภาวะการทำพีซีอาร์ (thermal cycling conditions) เปลี่ยนแปลงจาก 20 mM Tris พีเอช 8.3 ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นพีเอช 6.8-7.8 ในส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่มี 50 mM KCl เพื่อเร่งการยึดจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ ถ้ามีความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ KCl หรือ NaCl สูงกว่า 50 mM จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase นอกจากนี้ gelatin และ bovine serum albumin (BSA) และ nonionic detergent เช่น Tween 20 หรือ Laureth 12 (0.05-0.1% v/v) ที่ใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ด้วย

**6. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอน** Denaturation

ความล้มเหลวของปฏิกิริยาลูกโซ่ส่วนมากเกิดจากการเสียสภาพ (denaturation) ของดีเอ็นเอต้นแบบที่สนใจ รวมทั้งความไม่สมบูรณ์ของผลิตผลที่ได้ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว คือที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที หรือ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที อย่างไรก็ตามอาจกำหนดอุณหภูมิสูงขึ้นกว่านี้ก็ได้ การแยกของดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวที่ไม่สมบูรณ์เป็นผลให้สายดีเอ็นเอกลับมาจับกันดังเดิม ทำให้ได้ผลผลิตลดลง ในทางตรงกันข้ามถ้าขั้นตอน denaturation กำหนดอุณหภูมิสูงเกินไป หรือเวลาที่นานเกินไป จะนำไปสู่การสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

**7. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอน** Primer annealing

อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับอุณหภูมิในการ annealing นั้นควรเลือกที่อุณหภูมิต่ำกว่า Tm ของไพรเมอร์ เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่อยู่ระหว่าง 20-85 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ที่ให้ผลดีที่สุดคือ 72 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ช่วยทำให้ไม่เกิดการจับคู่ที่ผิดพลาด และลดการเกิด misextension ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องที่ 3'-end ของไพรเมอร์ ฉะนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรอบแรกๆ ของการทำพีซีอาร์จะยิ่งช่วยเพิ่มความจำเพาะให้มีมากขึ้น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ควรจะเติมลงไปภายหลังขั้นตอนการ denaturation ของรอบแรกซึ่งอยู่ในขั้นตอน primer annealing จะทำให้ได้ความจำเพาะที่สูงขึ้น อุณหภูมิต่ำในขั้นตอน extension กับความเข้มข้นสูงของ dNTPs จะช่วยเสริมให้เกิด misextension ของไพรเมอร์ที่มีขนาดยาว

**8. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอน** Primer extension

เวลาที่ใช้ในขั้นตอน extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิที่เลือกใช้ในการต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยทั่วไปควรทำที่อุณหภูมิ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส อัตราการต่อลำดับเบสที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นกับพีเอชของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเกลือ และลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ เวลาในขั้นตอน extension 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียสนั้นเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ผลผลิตที่มีความยาวถึง 2 Kb อย่างไรก็ตามเวลาที่ยาวขึ้นในการเกิด extension ในรอบแรกจะมีประโยชน์ถ้ามีความเข้มข้นของ substrate ต่ำ และในรอบหลังของพีซีอาร์เมื่อความเข้มข้นของผลผลิตสูงเกินความเข้มข้นของเอนไซม์

**9. จำนวนรอบ** (cycle number)

จำนวนรอบที่เหมาะสมขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาคผนวก ค) เมื่อปรับองค์ประกอบอื่นๆของพีซีอาร์ให้เหมาะสมแล้ว ความผิดพลาดที่พบได้บ่อย คือ ทำจำนวนรอบที่มากเกินไป ซึ่งเป็นผลให้เกิดปริมาณ และความยุ่งยากของผลผลิตที่เป็น nonspecific background และถ้าทำจำนวนรอบน้อยเกินไปจะสังเคราะห์ผลผลิตออกมาน้อย ดังนั้นในการกำหนดจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่จึงควรพิจารณาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบควบคู่ด้วย

**10. ปัจจัยอื่นๆ**

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะที่ใช้งาน ควรล้างให้สะอาดปราศจากผลซักฟอก น้ำที่ใช้ควรสะอาด และปราศจากเอนไซม์ nuclease เป็นต้น

## การปนเปื้อน

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมาก ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงไม่กี่โมเลกุลสามารถถูกเพิ่มจำนวนเป็นล้านๆ โมเลกุลได้เพียง 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นแม้เพียงเล็กน้อย สามารถทำให้เกิดผลผิดพลาด ( false positive) ได้ง่าย การปนเปื้อนอาจเกิดจาก

1. การปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง (cross-contamination) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงการเก็บ การเตรียมหรือการแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง
2. การปนเปื้อนแบบ carry-over contaminate เป็นการปนเปื้อนโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของหลอดหนึ่งข้ามไปอีกหลอดหนึ่ง วิธีการแพร่กระจายจะเกิดจากละอองลอย (aerosal) เช่น จากการ vortex การเปิดฝาหลอด และการปั่นหลอด การดูดถ่ายสารละลายโดยใช้ปิเปตต์ (pipette) เป็นต้น การปนเปื้อนส่วนใหญ่ในการทำพีซีอาร์เกิดจาก carry over contamination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



**มาตรการในการป้องกันการปนเปื้อน**

1. แบ่งพื้นที่ หรือห้องสำหรับงานก่อนและหลังการทำพีซีอาร์ และจำเป็นต้องแยกวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องใช้ในการทำงานก่อนและหลังทำพีซีอาร์อย่างเด็ดขาด
2. การป้องกันก่อนทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Pre-PCR sterilization) ซึ่งทำได้หลายวิธี
   2.1 การใช้แสง ultra violet (UV sterilization)
   2.2 การใช้รังสีแกมมา
   2.3 การใช้เอนไซม์ Uracil DNA glycoxylase (UDG)
3. การป้องกันหลังการทำพีซีอาร์ (Post-PCR sterilization) ทำโดยใช้กระบวนการ photochemical reaction ไปทำให้ผลผลิตของพีซีอาร์สูญเสียสภาพการเป็นต้นแบบ สารเคมีที่นิยมใช้จัดอยู่ในกลุ่ม furocuomarines ได้แก่ psoralen และ isopsoralen เป็นต้น
4. การใช้ positive displacement pipette หรือการใช้ aerosal resistant tip เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก aerosal
5. การแบ่งน้ำยาลงขวดหรือหลอดเล็กๆ
6. การใช้ตัวควบคุมที่เหมาะสมร่วมในการทำพีซีอาร์ตัวควบคุมประกอบด้วย ตัวควบคุมชนิดบวก (positive control) และตัวควบคุมชนิดลบ (negative control)
7. การปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง เช่น การสวมและเปลี่ยนถุงมือในระหว่างการเตรียมสารละลายที่ใช้ทำพีซีอาร์ การเปิด-ปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวัง การเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่ปฏิบัติงาน

**ข้อดีของเทคนิคพีซีอาร์**

1. ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (target DNA) ไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมาก หรือบริสุทธิ์มาก อาจอยู่ร่วมกับดีเอ็นเออื่น และสามารถใช้ดีเอ็นเอจาก เส้นผม 1 เส้น ตัวอสุจิ 1 ตัวหรือเซลล์ 1 เซลล์ เป็นต้น เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้
2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้รวดเร็วมาก ประมาณ 1 ล้านเท่าภายใน 1 ชั่วโมง และสามารถนำดีเอ็นเอนั้นไปศึกษาต่อได้โดยตรง เช่น นำไปใช้เป็น DNA probe
3. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดยาวตั้งแต่ 50 คู่เบสถึง 2,000 คู่เบส
4. เป็นปฏิกิริยาในหลอดทดลอง จึงไม่ต้องเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้ยุ่งยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39885

**ข้อจำกัดของเทคนิคพีซีอาร์**

1. ต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา
2. ต้องสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ
3. อาจเกิดผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อน

**ประโยชน์ของพีซีอาร์**

1. ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยไม่ต้องแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นออกมาให้บริสุทธิ์ก่อน และไม่ต้องใช้ปริมาณมาก เพียงดีเอ็นเอจากหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอก็สามารถทำได้
2. เพิ่มความไวของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และทำให้ตรวจได้ง่ายขึ้น เพราะดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถตรวจดีเอ็นเอจากสิ่งตัวอย่างปริมาณน้อยมาก ซึ่งไม่เคยทำได้มาก่อน
3. ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว สามารถนำมาตรวจหรือศึกษาต่อด้วยวิธีง่ายๆ เช่น การทำ Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอโดยตรงแทนวิธีที่ใช้ DNA probe ซึ่งสามารถใช้แทนวิธี Dot blot และ Southern blot hybridization ได้ เนื่องจากดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามีปริมาณเพิ่มขึ้นมาก จนสามารถมองเห็นได้โดยตรงโดยการย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โดยไม่ต้องอาศัย DNA probe และสารกัมมันตภาพรังสี หรือการติดฉลาก DNA probe ด้วยวิธีอื่นๆ ทำให้สะดวก ประหยัด และได้ผลเร็วขึ้น นอกจากนี้ในกรณีที่มีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการผ่าเหล่าที่ตรวจแล้วไม่ทราบชนิด ก็สามารถนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์แล้วไปตรวจหาลำดับของเบสได้โดยตรง โดยทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวก่อน โดยใช้ NaOH หรือความร้อน หรืออาจใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค Unbalance PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการขึ้นเป็นสายเดี่ยว ซึ่งทำได้โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ เช่น เป็น 1:50 หรือ 1:100 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีนี้สามารถนำไปศึกษาลำดับของเบสได้เลย ซึ่งดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ตามปกติที่จะได้ดีเอ็นเอสายคู่ และบางครั้งอาจเกิดการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบเอง ภายหลังจากที่ทำให้เป็นสายเดี่ยวแล้วแทนที่จะจับกับ internal primer ที่ใช้ช่วยในการหาลำดับเบส ทำให้การศึกษาลำดับของเบสไม่ค่อยได้ผลนัก
4. เป็นการทำ DNA cloning โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ตามวิธีปกติ (cell free molecular cloning)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากพีซีอาร์สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างจำเพาะและเพิ่มได้มากตามต้องการ

5. มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ใช้ช่วยในการตรวจวิเคราะห์การผ่าเหล่า (mutation) ของยีนอันเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง และใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม และโรคติดเชื้อจากทั้งไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว รวมทั้งทางด้านนิติเวชวิทยา เพื่อพิสูจน์ว่ามีดีเอ็นเอตามลำดับเบสที่สงสัยอยู่ในหลักฐานที่เก็บได้หรือไม่ เช่น จากคราบเลือด ขน ผม หรืออสุจิ เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ยังมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมก่อนคลอด การตรวจหาเพศของ embryo ในคนก่อนการทำ *in vitro* fertilization และการวิเคราะห์ HLA และ ชนิดของเนื้อเยื่อก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะ ตัวอย่างที่ดีสำหรับการใช้พีซีอาร์ในการประเมินผลคือ การตรวจจีโนมของภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากติดเชื้อไวรัส HIV ในบุคคลที่ไม่สามารถตรวจพบ HIV-positive โดยวิธีการตามปกติ เช่น ทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV และบุคคลที่มีลักษณะเป็น seronegative ต่อการทดสอบ anti-HIV แต่มีอัตราการเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคเอดส์

**หลักการของเทคนิค Electrophoresis** (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2536)

วิธีการแยกสารชีวโมเลกุลโดยทั่วๆไปมักอาศัยความแตกต่างของขนาด ประจุและคุณสมบัติจำเพาะทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารนั้น Electrophoresis เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันแพร่หลาย หลักการพื้นฐานทั่วๆ ไปของ Electrophoresis โดยเฉพาะ Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และใช้มากในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิค

Electrophoresis เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ในบางกรณีก็รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (migrating rate) ของสารในการทำ Electrophoresis อีกหลายประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ปัจจัยที่มีผลต่อการทำ Electrophoresis**

**1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง**

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เช่น โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และในทางตรงกันข้าม โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ปริมาณของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าด้วย กล่าวคือ โมเลกุลที่มีประจุบวกมาก เช่น -3 จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุ -1 เป็นต้น ชนิดและปริมาณของประจุสารนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของบัฟเฟอร์ (buffer)

1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน (friction) และ electrostatic force ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก (ภาคผนวก ง)

1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (spherical หรือ globular shape) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี หรือ fibrous shape ทั้งนี้เนื่องจากแรงเสียดทานและ electrostatic force ที่เกิดกับสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกันจะต่างกันนั่นเอง

**2. สนามไฟฟ้า**

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์และระยะเวลาในการทำ Electrophoresis แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า ถึงแม้อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับความแรงของสนามไฟฟ้าที่ใช้ แต่การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปในการทำ Electrophoresis จะทำให้เกิดผลเสียได้หลายประการ คือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลายและทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างทำ Electrophoresis ซึ่งทำให้เกิดการแพร่ของโมเลกุลและผลของการแยกสารจะไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะในกรณีที่ทำ Electrophoresis ของสารที่เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ ก็อาจทำให้เอนไซม์นั้นเสียสภาพและหมดประสิทธิภาพในการทำงาน (enzyme activity) ได้ ในทางตรงกันข้ามหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไป ถึงแม้จะช่วยลดปัญหาเรื่องความร้อนที่เกิดขึ้น แต่ผลของการทำ Electrophoresis จะไม่ดี เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำ Electrophoresis นานขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิดการแพร่ของสารเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผล Electrophoresis ที่ได้ดีนั้นควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. บัฟเฟอร์**

บัฟเฟอร์นอกจากทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้วบัฟเฟอร์ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วย คือ

3.1 **ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์** เนื่องจากชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของสารละลายนั้น ดังนั้นค่าพีเอชของบัฟเฟอร์จึงมีบทบาทสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณประจุของกรดนิวคลิอิค

3.2 **Ionic strength ของบัฟเฟอร์** สารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength ต่ำได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength สูง แต่ในขณะเดียวกันการทำ Electrophoresis ในบัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength สูงจะได้แถบ (band) ของสารที่แยกคมชัดกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength ต่ำ Ionic strength ของบัฟเฟอร์นอกจากมีความสำคัญดังกล่าวแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำ Electrophoresis ด้วย คือ ถึงแม้การใช้บัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength สูงจะทำให้ได้การแยกตัวของสารที่คมชัดก็ตาม แต่ก็ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำ Electrophoresis เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้นนี้จะเพิ่มการ diffusion และลดความหนืดของตัวค้ำจุน ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลให้กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นต่อเนื่องกันไปอีก ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง Ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ด้วย โดยปกติจะใช้บัฟเฟอร์ที่มี Ionic strength ระหว่าง 0.05 - 0.10 โมลต่อลิตร

**4. ตัวกลางค้ำจุน**

การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธี Electrophoresis มีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวค้ำจุนก็ได้ รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneities) ของตัวค้ำจุน สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการแยกของสารโดยวิธีนี้ทั้งสิ้น ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้ ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ยอมให้สารตัวอย่างผ่านไปได้อย่างรวดเร็ว สามารถแยกสารตัวกลางได้อย่างชัดเจนและสามารถถูกแยกออกเป็นส่วนๆได้ง่าย (ตารางที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ชนิดของ Electrophoresis จำแนกตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน

| ชนิดของ Electrophoresis | ความเหมาะสมของงานในการใช้แยกสาร | หมายเหตุ |
|---|---|---|
| Paper | กรดอะมิโน, เปปไทด์, นิวคลีโอไทด์ | ถูก แต่ไม่สามารถทนต่อกรด หรือด่างที่แรงๆ |
| Cellulace acetate | ใช้แยกสารในซีรัม เช่น ไกลโคโปรตีน, ไลโปโปรตีน, ฮีโมโกลบิน และแอนติบอดี | ดูดซึมสารตัวอย่างได้ปริมาณน้อย การแยกค่อนข้างแน่นอน และชัดเจน ทนต่อกระแสไฟฟ้าสูง นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วๆไป และนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล |
| Thin-layer | ใช้แยกสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่นเดียวกับ paper Electrophoresis รวมทั้งใช้แยกสารประกอบเอมีน (amines), แนพทอล (napthols) และสารอินทรีย์ | เป็นแผ่นแก้วเคลือบด้วย silica, alumina หรือ cellulose ทนต่อกระแสไฟฟ้าสูงๆได้ เหมาะสำหรับการทำ high-voltage Electrophoresis |
| Starch gel | เหมาะสำหรับแยกสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน, เอนไซม์, กรดนิวคลีอิก เป็นต้น | เป็น polysaccharide ที่มีลักษณะเป็นสายแตกแขนง สามารถเตรียมให้มีความเข้มข้น (%w/v) ต่างๆกันได้ |
| Agar หรือ Agarose gel | ใช้ในการแยกสารจำพวก, แอนติเจน, แอนติบอดี, DNA, RNA เป็นต้น | เป็นสารประเภท galactose polymer |
| Polyacrylamide gel | ใช้แยกสารชีวโมเลกุลเช่นเดียวกับ starch gel และ Agarose gel นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการหาน้ำหนักของโมเลกุลสารอีกด้วย | ใช้กันแพร่หลายในห้องปฏิบัติการต่างๆ ใช้แยกสารได้แน่นอนชัดเจน และสามารถปรับขนาดของรูเจลได้ตามความต้องการ มีความเหนียวและยืดหยุ่นได้ดี สามารถทำให้แห้งเป็นแผ่นได้เพื่อทำ autoradiography และ fluorography ได้ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด จะเลือกใช้ชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของการทดลองและชนิดของสารที่ต้องการแยก พื้นฐานของเทคนิค Electrophoresis ค่อนข้างง่ายแต่ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในตัวกลางค้ำจุนนั้นมีค่อนข้างมาก ดังนั้นเพื่อการศึกษาสารต่างๆ โดยวิธี Electrophoresis ได้ผลดี ผู้ทดลองจึงควรเลือกปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวให้เหมาะสมกับงานหรือสารที่ต้องการศึกษา

**อุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในการทำ Electrophoresis**

1. **เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)**

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ใช้ใน Electrophoresis เป็นชนิดกระแสตรง (direct current, D.C) ซึ่งมีทั้งแบบความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ (100-500โวลต์) และ ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง (500-10,000 โวลต์)

2. **กล่องใส่ บัฟเฟอร์ และขั้วไฟฟ้า**

กล่องใส บัฟเฟอร์ จะมีอยู่ 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสำหรับขั้วไฟฟ้าบวก (cathode) และอีกส่วนสำหรับขั้วไฟฟ้าลบ (anode) กล่องใส่ บัฟเฟอร์ จะลักษณะที่แตกต่างกันตามชนิดของ Electrophoresis ซึ่งมีอยู่หลายชนิด เช่น ชนิดแนวราบ และแบบแผ่น (slab)

**การติดตามสารตัวอย่างหลังจากทำ Electrophoresis**

เมื่อพิจารณาชนิดของ Electrophoresis และทำการแยกสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ก็ถึงขั้นตอนที่เราจะต้องมาศึกษาว่าสารนั้นอยู่ที่ตำแหน่งใด ซึ่งมีวิธีการต่างๆมากมาย ซึ่งจะขอกล่าวถึงแบบการย้อมสีเท่านั้น

**การย้อมสี (staining)** สีที่ใช้ย้อมหลังการทำ Electrophoresis มีหลายชนิด ตั้งแต่สีธรรมดาไปจนถึงสีที่มีความจำเพาะกับสารชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ สีที่ใช้ย้อมอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันคือ Stain-All ซึ่งจะใช้ย้อมอาร์เอ็นเอแล้วติดสีน้ำเงินม่วง แต่วิธีที่นิยมแพร่หลายมากที่สุดคือ การใช้สาร fluorescent ethidium bromide ซึ่งย้อมติดทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในปริมาณน้อยๆเพียง 0.05 ไมโครกรัมเท่านั้น โดย ethidium bromide จะไปสอดแทรก (interacalate) อยู่ระหว่างคู่เบสซึ่งเราสามารถติดตามได้โดยการส่องด้วยหลอดเรืองแสงอุลตร้าไวโอเลตชนิดช่วงคลื่นสั้น (short-wavelength UV lamp)

**Agarose gel electrophoresis**

Agarose gel electrophoresis เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลมาก ๆ ซึ่งไม่สะดวกหรือไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย polyacrylamide gel ได้ ปัจจุบัน Agarose gel เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ทาง immunoelectrophoresis ซีรัมไลโปโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัส และโดยเฉพาะการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งนี้เนื่องจาก Agarose gel มีรูตาข่ายที่ค่อนข้างใหญ่ และการเตรียมก็ง่ายกว่า polyacrylamide gel

Agarose เป็น subfraction ของ Agar ซึ่งได้จากส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ (cell wall) หรือส่วน intercellular matrix ของ red algae (Rhodophyta) เมื่อเริ่มแรกมีการนำ Agar มาใช้เป็นตัวค้ำจุนในการทำ Electrophoresis แต่เนื่องจากตัว Agar มีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟต กลูโคเนต เป็นต้น จึงเกิดปัญหาของ electroendosmosis ดังนั้นจึงมีการเตรียม Agar ที่ปราศจากประจุลบเหล่านี้ เรียกว่า Agarose มาใช้แทน Agar ในงานวิเคราะห์ต่างๆอีกมากมาย

Agarose gel electrophoresis สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่มีลักษณะต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง วงเปิด วงปิด หรือ เชื่อมไขว้ (cross linked) ออกจากกันได้ และผู้ใช้สามารถปรับขนาดของรูตาข่ายของเจลให้เหมาะสมกับงานได้โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเจลได้

**ประโยชน์ของ** Electrophoresis

1. ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบสารตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน
2. ใช้พิสูจน์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือ โปรตีน ในระหว่างการสกัดให้บริสุทธิ์
3. ทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# การดำเนินงานวิจัย

## 1. เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 3 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา และแหล่งที่มา

| สายพันธุ์จุลินทรีย์ | แหล่งที่มา |
|---|---|
| 1.1 *Staphylococcus aureus* | ATCC 13565 |
| 1.2 *Staphylococcus aureus* | ATCC 14458 |
| 1.3 *Staphylococcus aureus* | ATCC 25923 |
| 1.4 *Staphylococcus aureus* | ● |
| 1.5 *Staphylococcus aureus* | ATCC 6538 - P |
| 1.6 *Staphylococcus aureus* | TISTR 746 |
| 1.7 *Staphylococcus aureus* | ATCC 13150 |
| 1.8 *Staphylococcus capitis* | ATCC 27840 |
| 1.9 *Staphylococcus saprophyticus* | ATCC 15305 |
| 1.10 *Bacillus subtilis* | ● |
| 1.11 *Pseudomonas aeruginosa* | TISTR 357 |
| 1.12 *Proteus vulgaris* | ● |
| 1.13 *Seratia* sp. | ● |
| 1.14 *Escherichia coli* | ● |
| 1.15 *Micrococcus* sp. | ● |
| 1.16 *Mycobacterium* sp. | ● |
| 1.17 *Salmonella typhimurium* | ● |

● เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ATCC : American Type Culture Collection

TISTR : Thailand Institute of Scientific and Technological Research

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ agarose gel electrophoresis
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
3. UV transilluminator
4. Spectrophotometer
5. เครื่อง DNA thermal cycle
6. vortex mixer
7. microcentrifuge tube
8. micropipette
9. magnetic stirrer
10. ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven)
11. hot plate
12. ตู้บ่ม (incubator)
13. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
14. เครื่องเขย่า (shaker)
15. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)
16. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส, -20 องศาเซลเซียส และ –70 องศาเซลเซียส
17. เครื่องชั่ง
18. จานเพาะเชื้อ
19. ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพ DNA

## 3. สารเคมี

1. Nutrient broth (Beef Extract 3.0 กรัม Peptone 5.0 กรัม Agar 15.0 กรัม Distilled Water 1.0 ลิตร)
2. Nutrient agar (Beef Extract 3.0 กรัม Peptone 5.0 กรัม Distilled water 1.0 ลิตร)
3. Extraction buffer pH 8.0 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.7 M NaCl, 0.5% Sodium dodesylsulfate (SDS)
4. Isopropanol
5. 70% ethanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)
7. สารละลาย dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 1.25 mM ใน 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 mM EDTA (Promega))
8. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
9. สารละลาย 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 500 mM KCl, 0.1% TritonX-100 (GIBCOBRL))
10. 25 mM $MgCl_2$ (Promega)
11. Primer 100 pM/μl

    SA-1 primer: 5'-ATCAAAGAAGGTAATAATCC-3'

    SA-2 primer: 5'-CCTCCATTCAGTGTTACCTG-3'
12. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Promega)
13. สารละลาย 10X TAE buffer (40 mM Tris Acetate, 2 mM EDTA)
14. DNA size marker

    Lambda DNA/ *Hind* III Marker (Promega)

    100 bp Marker (BIORAD)
15. Loading dye (6X G188A blue orange loading dye) (Promega)
16. สารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
17. Agarose (Promega)

**4. ตัวอย่างอาหารที่เลือกใช้ในการทดลอง**

1. นมสด UHT (โฟร์โมสต์)
2. น้ำแครอท 100 เปอร์เซ็นต์ (มาลี)
3. เนื้อหมูสด (ที่วางขายตามท้องตลาด)

**วิธีดำเนินงานวิจัย**

**1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์**

สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 17 สายพันธุ์ ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 นำเชื้อทุกสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth โดยใช้ loop ลนไฟให้ร้อนแดง ทิ้งให้เย็น เขี่ยเชื้อทั้ง 17 สายพันธุ์จาก stock ใส่ลงในอาหาร โดยใช้ 1 หลอดต่อ 1 เชื้อ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 คืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **การสกัดดีเอ็นเอ**

2.1 ดูด culture ของเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์จุลินทรีย์

2.3 เติม Extraction buffer 400 ไมโครลิตร แล้วใช้ vortex mixer ผสมให้เข้ากันเพื่อทำให้เซลล์แตก

2.4 เติมสารละลาย 3 M Potassium acetate 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมา แช่น้ำแข็งไว้ 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

2.5 นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นดูดส่วนใสใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ (ไม่ควรให้ตะกอนโปรตีนติดมา)

2.6 เติม Isopropanol ปริมาตร 420 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

2.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอ

2.8 ดูดส่วนใสออกทิ้งไปให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ

2.9 ล้างตะกอนดีเอ็นเอให้ท่วมด้วย 70% ethanol แล้วดูด 70% ethanol ออกให้หมด

2.10 คว่ำหลอด และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง

2.11 เติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

2.12 นำดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทำ Agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหา genomic DNA ของจุลินทรีย์แต่ละตัวเทียบกับ DNA size marker คือ Lambda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III Marker (Promega)

2.13 เก็บดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส

3. **การตรวจสอบ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis**

เพื่อตรวจสอบการมี genomic DNA สำหรับขั้นตอนพีซีอาร์

3.1 เตรียมเจล Agarose ความเข้มข้น 2 % (w/v) ในสารละลาย 1X TAE (Agarose 1.2 กรัม ใน 1X TAE 60 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนจนละลายใช้แท่งแก้วคนให้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเดียวกันและเทลงใน electrophoresis chamber

3.2 รอจนวุ้นแข็งตัว จากนั้นเทสารละลาย TAE buffer ลงใน chamber ให้ท่วมผิวหน้าวุ้น

3.3 หยอด DNA size marker 300 นาโนกรัม ลงในแผ่นเจลช่องแรก

3.4 ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ หยอดลงไปแต่ละช่อง

3.5 ใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ที่ 60 – 100 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ loading dye เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.6 นำเจลไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย TAE เป็นเวลา 20 นาที

3.7 ตรวจดูแถบของ genomic DNA โดยสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV-transilluminator

3.8 ถ้าพบ band ของ genomic DNA ก็สามารถนำไปทำพีซีอาร์ซึ่งเป็นขั้นตอนต่อไปได้

**4. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

ในการทำพีซีอาร์ทุกขั้นตอน ก่อนนำเข้าเครื่อง DNA Thermal Cycle ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาประสิทธิภาพของสารเคมีและเอนไซม์ต่าง ๆ ให้ทำงานได้ดี

4.1 การเตรียม PCR mixture ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ

| | |
|---|---|
| 10X PCR buffer | (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 ที่ 25 องศาเซลเซียส), 15 mM $MgCl_2$, 0.1 % TritonX-100) |
| $MgCl_2$ | 1.5 mM |
| DNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) | 0.1 mM |
| *Taq* DNA polymerase | 0.25 ยูนิตต่อไมโครลิตร |
| Primer SA-1 | 100 pM |
| 5'-ATCAAAGAAGGTAATAATCC-3' | |
| Primer SA-2 | 100 pM |
| 5'-CCTCCATTCAGTGTTACCTG-3' | |

แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 เริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในช่วง 80-494 คู่เบส ของยีน 23S rDNA ของเชื้อทั้งหมดในตารางที่ 3 ดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 95°C | 5 นาที | 1 รอบ |
| Denaturation | 95°C | 45 วินาที | 30 รอบ |
| Annealing | 55°C | 45 วินาที | |
| Extension | 72°C | 45 วินาที | |
| Final extension | 72°C | 7 นาที | 1 รอบ |

**5. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) โดยวิธี Agarose gel electrophoresis**

5.1 เตรียมเจล Agarose ความเข้มข้น 2 % (w/v) ในสารละลาย 1X TAE ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในขั้นตอนการเตรียมเจลในหัวข้อการตรวจสอบ genomic DNA ที่สกัดได้

5.2 หยอด DNA size marker 300 นาโนกรัม ลงในแผ่นเจลช่องแรก

5.3 ดูดสารละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ หยอดลงไปแต่ละช่อง

5.4 ใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ที่ 60 volts จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ loading dye เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

5.5 นำเจลไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที

5.6ตรวจดูแถบของสารพันธุกรรมโดยสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV-transilluminator เปรียบเทียบกับ DNA size marker

**6. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์**

เป็นการทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหาได้ด้วยการเพิ่มชิ้นส่วน 23S rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 มาใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบ

6.1 เตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ตามหัวข้อการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ตามวิธีการสดัดดีเอ็นเอในหัวข้อการสกัดดีเอ็นเอ

6.3 นำดีเอ็นเอที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ (1 $OD_{260}$ = ปริมาณดีเอ็นเอ 50 μg/ml)

6.4 ละลายสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (pH 8.0) ให้มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg และ 10 pg ตามลำดับ

6.5 นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากข้อ 4 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่ตามขั้นตอนที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

6.6 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

**7. การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร**

ในการทดลองนี้เลือกใช้นม น้ำแครอท และเนื้อหมูเป็นตัวอย่างอาหาร

7.1 การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ที่ปนเปื้อนในนม

7.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในอาหารเหลว (NB) ที่ 37 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.1.2 ดูดนมสด UHT ใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร

7.1.3 ใส่เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 1 ลงในนมสด โดยมีปริมาณเซลล์ที่เติมลงไปคือ 10, $10^2$, $10^3$ และ $10^4$ เซลล์ ในนมสดแต่ละหลอดตามลำดับ ทำเช่นนี้ 2 ชุดการทดลอง

7.1.4 นำหลอดนมสดที่ใส่เชื้อชุดการทดลองที่ 1 ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งสองชุดการทดลองทำการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

7.1.5 นำหลอดนมสดที่ผ่านการบ่ม 18 ชั่วโมง ทั้งสองชุดมาสกัดดีเอ็นเอ โดยดูดนมสด 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

7.1.6 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น โดยการเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงใน Microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 1 นาที

7.1.7 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยวิธีเดียวกันนี้อีก 1 ครั้ง

7.1.8 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอ

7.1.9 นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.1.10 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำพีซีอาร์ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อที่ 4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

7.1.11 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.2 การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ที่ปนเปื้อนในน้ำผลไม้กระป๋อง ในการทดลองนี้เลือกทำการตรวจสอบเชื้อในน้ำแครอทกระป๋อง 100 เปอร์เซ็นต์

7.2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในอาหารเหลว (NB) ที่ 37 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.2.2 ดูดน้ำผลไม้ (น้ำแครอทกระป๋อง 100 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลอด

7.2.3 ใส่เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 1 ลงในหลอดน้ำแครอท โดยมีปริมาณเชื้อที่เติมลงไป คือ 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$, $10^5$ และ $10^6$ เซลล์ ในน้ำแครอทแต่ละหลอด ตามลำดับ ทำเช่นนี้ 2 ชุดการทดลอง

7.2.4 นำหลอดน้ำแครอทที่ใส่เชื้อแล้วหนึ่งชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำหลอดน้ำแครอทที่ใส่เชื้อแล้วอีกชุดการทดลองไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง และบ่มชุดการทดลองทั้งสองเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

7.2.5 นำหลอดน้ำแครอทที่บ่มครบ 18 ชั่วโมงจากข้อ 7.2.4 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยเทน้ำแครอททั้ง 10 มิลลิลิตรลงใน Centrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

7.2.6 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น โดยการเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงใน Centrifuge tube จากข้อ 7.2.5 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2.7 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นในหัวข้อการสกัดดีเอ็นเอ

7.2.8 ตรวจสอบ genomic DNA ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.2.9 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำพีซีอาร์ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

7.2.10 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.3 การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมู

7.3.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในอาหารเหลว (NB) ที่ 37 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3.2 ตัดชิ้นเนื้อหมูให้มีขนาดชิ้นละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7.3.3 ใส่เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 1 ลงบนเนื้อหมู โดยมีปริมาณเซลล์ที่ใส่ลงไป คือ 0, 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$ และ $10^5$ เซลล์ตามลำดับ ทำเช่นนี้ 2 ชุดการทดลอง

7.3.3.1 ชุดการทดลองที่ 1

(1) นำจานเพาะเชื้อชุดการทดลองที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

(2) นำชิ้นหมูที่บ่มครบ 30 นาที ใส่ลงในถุงน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำถุงน้ำกลั่นไปเขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 นาที

(3) เทน้ำกลั่นทั้งหมดลงใน Centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป

(4) นำอาหารเหลว (NB) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Centrifuge tube แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

(5) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

(6) นำเชื้อที่บ่มครบ 18 ชั่วโมงไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งไป

7.3.3.2 ชุดการทดลองที่ 2

(1) นำจานเพาะเชื้อชุดการทดลองที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

(2) นำชิ้นหมูที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง ใส่ลงในถุงน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) เทน้ำกลั่นทั้งหมดลงใน Centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป

7.3.4 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นในหัวข้อการสกัดดีเอ็นเอ

7.3.5 ตรวจสอบ genomic DNA ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.3.6 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำพีซีอาร์ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

7.3.7 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 1. การทดลองความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคพีซีอาร์

จากการทดลองทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 17 สายพันธุ์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) และใช้ Primer SA-1 และ SA-2 เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิดังกล่าวที่ได้กล่าวมาข้างต้น ปรากฏว่าทั้ง 7 สายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 25923, สายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยาอาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, ATCC 6538-P, TISTR 746 และ ATCC 13150 ให้ผลบวก (ตารางที่4 และรูปที่ 2 Lane 1-7) และได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบส ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งหมดให้ผลลบ (ตารางที่ 3, รูปที่2 Lane 8-14 และ 16-18) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิคพีซีอาร์มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้นโดยจะเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ ที่ตำแหน่ง 415 คู่เบส และไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่นอีก 2 สายพันธุ์ที่นำมาทำการทดลอง ได้แก่ *S. capitis* และ *S. saprophyticus* รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาทำการทดสอบอีก 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* เทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

| สายพันธุ์จุลินทรีย์ | | ผลการตรวจสอบ |
|---|---|---|
| 1.1 *Staphylococcus aureus* | ATCC 13565 | + |
| 1.2 *Staphylococcus aureus* | ATCC 14458 | + |
| 1.3 *Staphylococcus aureus* | ATCC 25923 | + |
| 1.4 *Staphylococcus aureus* | ● | + |
| 1.5 *Staphylococcus aureus* | ATCC 6538-P | + |
| 1.6 *Staphylococcus aureus* | TISTR 746 | + |
| 1.7 *Staphylococcus aureus* | ATCC 13150 | + |
| 1.8 *Staphylococcus capitis* | ATCC 27840 | - |
| 1.9 *Staphylococcus saprophyticus* | ATCC 15305 | - |
| 1.10 *Bacillus subtilis* | ● | - |
| 1.11 *Pseudomonas aeruginosa* | TISTR 357 | - |
| 1.12 *Proteus vulgaris* | ● | - |
| 1.13 *Seratia* sp. | ● | - |
| 1.14 *Escherichia coli* | ● | - |
| 1.15 *Micrococcus* sp. | ● | - |
| 1.16 *Mycobacterium* sp. | ● | - |
| 1.17 *Salmonella typhimurium* | ● | - |

● เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ATCC : American Type Culture Collection

TISTR : Thailand Institute of Scientific and Technological Research

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Lane 1 | *Staphylococcus aureus* | ATCC | 13565 | Lane 10 | *Bacillus subtilis* | ● |
| Lane 2 | *Staphylococcus aureus* | ATCC | 14458 | Lane 11 | *Pseudomonas aeruginosa* | TISTR 357 |
| Lane 3 | *Staphylococcus aureus* | ATCC | 25923 | Lane 12 | *Proteus vulgaris* | ● |
| Lane 4 | *Staphylococcus aureus* | ● | | Lane 13 | *Seratia* sp. | ● |
| Lane 5 | *Staphylococcus aureus* | ATCC | 6538-P | Lane 14 | *Escherichia coli* | ● |
| Lane 6 | *Staphylococcus aureus* | TISTR | 746 | Lane 15 | *Staphylococcus aureus* | ATCC 13150 |
| Lane 7 | *Staphylococcus aureus* | ATCC | 13150 | Lane 16 | *Micrococcus* sp. | ● |
| Lane 8 | *Staphylococcus capitis* | ATCC | 27840 | Lane 17 | *Mycobacterium* sp. | ● |
| Lane 9 | *Staphylococcus saprophyticus* | ATCC | 15305 | Lane 18 | *Salmonella typhimurium* | ● |

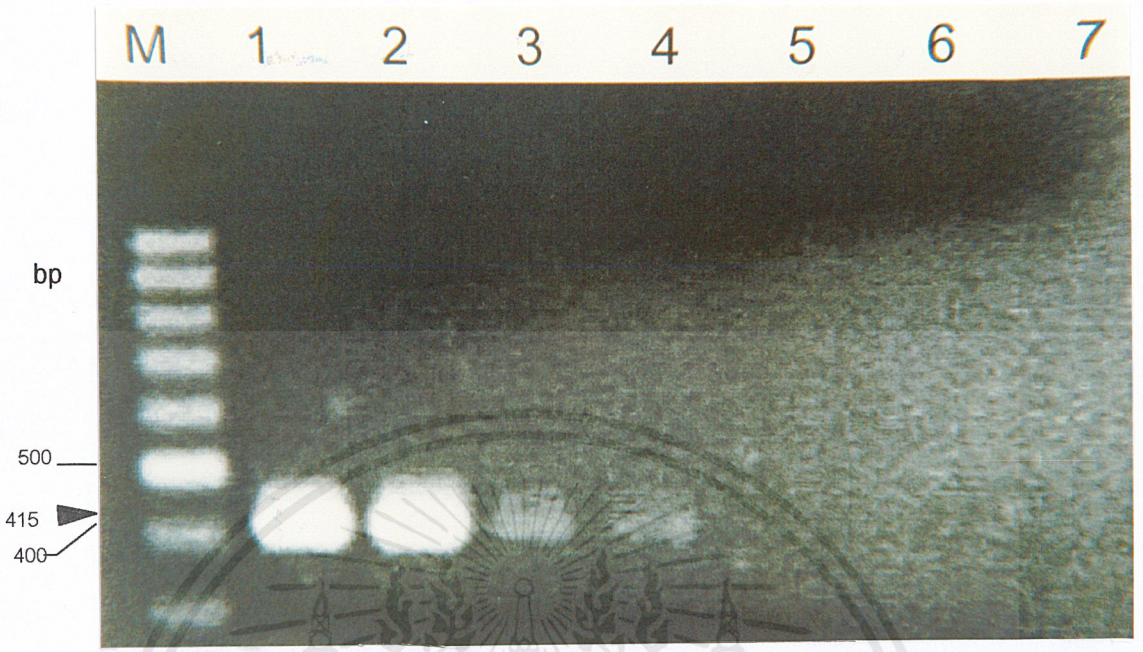
**รูปที่ 2** ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคพีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis การวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคพีซีอาร์ในเชื้อทั้ง 17 สายพันธุ์ โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23S rDNA จะถูกแยกใน 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ใน Lane M คือ Bio Ladder 100 คู่เบส Lane ที่ 1-7 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อ *S. aureus* 7 สายพันธุ์ ส่วนใน Lane ที่ 8-14 เป็นผลของการทำพีซีอาร์ของเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่นอีก 2 สายพันธุ์ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาทำการทดสอบอีก 5 สายพันธุ์ ส่วนใน Lane ที่ 15 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 13150 ซึ่งใช้เป็น positive control Lane ที่ 16-18 เป็นผลของการทำพีซีอาร์ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่นำมาทำการทดสอบอีก 3 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. ผลการปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์**

การทดลองปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 เพื่อให้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้มีปริมาณน้อยกว่าการทดลองที่ผ่านมา โดยการทดลองที่ผ่านมาได้มีการทำพีซีอาร์ตั้งแต่ขั้นตอน denaturation จนถึงขั้นตอน extension เป็นจำนวน 30 รอบ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยสภาวะการทำพีซีอาร์ดังกล่าว คือ 10 นาโนกรัม ในการทดลองนี้จึงเปลี่ยนสภาวะการทำพีซีอาร์ตั้งแต่ขั้นตอน denaturation จนถึงขั้นตอน extension จาก 30 รอบ เป็น 40 รอบ เพื่อต้องการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยพบว่าเกิดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ ที่ตำแหน่ง 415 คู่เบส ใน Lane ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม 100 นาโนกรัม 10 นาโนกรัม และ 1 นาโนกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 3 Lane 1-4 ตามลำดับ) โดยจะสังเกตได้ว่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอจะลดลงตามปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยลง ส่วนใน Lane ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 100 พิโคกรัม 10 พิโคกรัม และ 1 พิโคกรัม จะไม่เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว (รูปที่ 3 Lane 5-7) อาจเนื่องมาจากมีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยเกินไปจนไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากพอที่จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้น ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามการทดลองนี้ คือ 1 นาโนกรัม กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบน้อยกว่านี้จะไม่สามารถพบแถบของดีเอ็นเอหลังการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ได้ ซึ่งผลที่ได้ในการทดลองนี้มีความไวมากกว่าการทดลองที่ผ่านมาที่พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ คือ 10 นาโนกรัม ซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มากกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในสภาวะการทำพีซีอาร์ของการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




Lane 1 ปริมาณ DNA$10^{-6}$ g

Lane 2 ปริมาณ DNA$10^{-7}$ g

Lane 3 ปริมาณ DNA$10^{-8}$ g

Lane 4 ปริมาณ DNA$10^{-9}$ g

Lane 5 ปริมาณ DNA$10^{-10}$ g

Lane 6 ปริมาณ DNA$10^{-11}$ g

Lane 7 ปริมาณ DNA$10^{-12}$ g

**รูปที่ 3** ผลการตรวจสอบการปรับปรุงประสิทธิภาพการทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบส จะถูกแยกใน 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ใน Lane M คือ Bio Ladder 100 คู่เบส ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอทางด้านซ้าย Lane ที่1-7 จะมีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg และ 1 pg ตามลำดับ

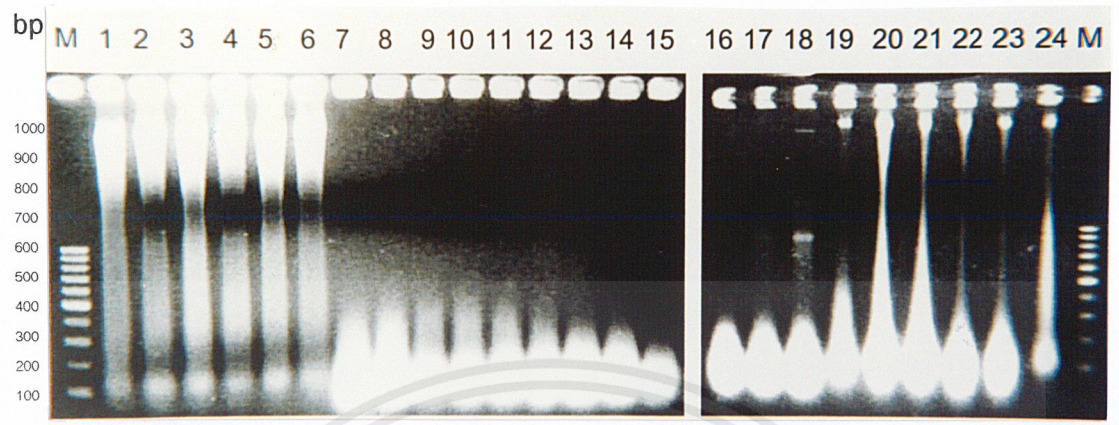
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. ผลการทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในตัวอย่างอาหาร**

จากการทดลองใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในตัวอย่างอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อนโดยเชื้อนี้ ซึ่งตัวอย่างอาหารที่เลือกใช้ได้แก่ นม เนื้อหมู และน้ำแครอท โดยการทดสอบในนมนั้นได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ปริมาณ 10, $10^2$, $10^3$ และ $10^4$ เซลล์ ตามลำดับ ลงในนม 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเช่นกัน จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าไม่มีแถบของ genomic DNA เกิดขึ้น ส่วนในการทดลองกับเนื้อหมูนั้นจะแบ่งเนื้อหมูออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ปริมาณ 0, 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$ , $10^5$ และ $10^6$ เซลล์ ตามลำดับ ลงบนชิ้นหมูแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ปนเปื้อนบนชิ้นหมูไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว (NB) บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เนื้อหมูชุดการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงเชื้อในปริมาณเดียวกันกับในเนื้อหมูชุดการทดลองที่ 1 แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำทั้งสองชุดการทดลองมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำ genomic DNA ที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่ามีแถบของ genomic DNA เกิดขึ้น ดังรูปที่ 4 (Lane 1-6 และ 19-24) ส่วนการทดลองในน้ำแครอท โดยเติมเชื้อ *S. aureus* ปริมาณ 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$, $10^5$ และ $10^6$ เซลล์ ตามลำดับในน้ำแครอท 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเช่นกัน แล้วจึงนำเชื้อที่ได้จากสองชุดการทดลองมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำ genomic DNA ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่ามีแถบจาง ๆ ของ genomic DNA เกิดขึ้น เฉพาะใน Lane ที่ 18 (รูปที่ 4) เท่านั้น คือ Lane ของน้ำแครอทที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $10^6$ เซลล์และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำ genomic DNA ที่ได้ทั้งหมดนี้ไปทำพีซีอาร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้มากพอที่จะทำการตรวจสอบได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างอาหารที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ คือ นม เนื้อหมู และน้ำแครอท มิได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนทำการทดลอง จึงเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจไม่ใช่ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมดดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นของเชื้อ *S. aureus* ในการทำพีซีอาร์ จึงมีน้อยเกินไปทำให้ไม่สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีปริมาณมากพอจนสามารถตรวจสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Lane 1 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 0 | เซลล์ | Lane 13 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 10 | เซลล์ |
| Lane 2 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 10 | เซลล์ | Lane 14 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^2$ | เซลล์ |
| Lane 3 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^2$ | เซลล์ | Lane 15 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^3$ | เซลล์ |
| Lane 4 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^3$ | เซลล์ | Lane 16 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^4$ | เซลล์ |
| Lane 5 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^4$ | เซลล์ | Lane 17 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^5$ | เซลล์ |
| Lane 6 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^5$ | เซลล์ | Lane 18 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^6$ | เซลล์ |
| Lane 7 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 10 | เซลล์ | Lane 19 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 0 | เซลล์ |
| Lane 8 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^2$ | เซลล์ | Lane 20 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น 10 | เซลล์ |
| Lane 9 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^3$ | เซลล์ | Lane 21 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^2$ | เซลล์ |
| Lane 10 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^4$ | เซลล์ | Lane 22 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^3$ | เซลล์ |
| Lane 11 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^5$ | เซลล์ | Lane 23 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^4$ | เซลล์ |
| Lane 12 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^6$ | เซลล์ | Lane 24 | ปริมาณเชื้อ *S. auerus* เริ่มต้น $10^5$ | เซลล์ |

□ เนื้อหมูบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงใน NB บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

■ เนื้อหมูบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

△ น้ำแครอทบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

▲ น้ำแครอทบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

**รูปที่ 4** ผลการทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในตัวอย่างอาหาร ตรวจสอบ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดย genomic DNA จะปรากฏขึ้นใน 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ซึ่งถูกย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ ใน Lane M คือ Bio Ladder 100 คู่เบส Lane ที่ 1-7 คือ ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ลงบนเนื้อหมูแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเนื้อหมูไปล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำเชื้อที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อใน NB ใน Lane ที่ 19-24 คือ ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ลงบนเนื้อหมูแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน Lane 7-12 คือ ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ลงในน้ำแครอทแล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และ Lane ที่ 13-18 คือ ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ลงในน้ำแครอทแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 23S rDNA โดยอาศัย Primer 2 ชนิด คือ

SA-1 primer: 5'-ATCAAAGAAGGTAATAATCC-3'

SA-2 primer: 5'-CCTCCATTCAGTGTTACCTG-3'

ซึ่ง นายวรพงษ์ วงษ์ปัญญา และ นางสาวอภิชญา ทองทับ ได้ทำการออกแบบเพื่อให้เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 23S rDNA โดย Primer SA-1 จะจับที่ตำแหน่ง 99-80 คู่เบส และ Primer SA-2 จะจับที่ตำแหน่ง 475-494 คู่เบส ในส่วนของ 23S rDNA ของเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบส ภายใต้สภาวะการทำพีซีอาร์ที่กำหนดโดยเครื่อง DNA thermal cycle เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ได้ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอของเชื้อทั้งหมด 17 สายพันธุ์ที่ถูกนำมาทำพีซีอาร์ ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบส เฉพาะเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 25923, สายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, ATCC 6538-P, TISTR 746 และ ATCC 13150 เท่านั้น โดยสังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบบนแผ่น Agarose gel ที่อยู่สูงจากตำแหน่ง 400 คู่เบส เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ Bio Ladder 100 คู่เบสคาดว่าน่าจะเป็นตำแหน่งที่ 415 คู่เบส ส่วนเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่นำมาทำการทดลองไม่เกิดแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่งดังกล่าว ทำให้สรุปได้ว่า Primer SA-1 และ SA-2 มีความจำเพาะกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น โดยจะไม่จับกับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รวมถึงสภาวะในการทำพีซีอาร์สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ได้จริงทั้งยังให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำ สามารถตรวจสอบได้ในเวลาอันสั้น เพียงประมาณ 3 ชั่วโมงอีกด้วย

การปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะเพิ่มความไว (sensitivity) ของเทคนิคนี้เพื่อต้องการลดปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ โดยในการทดลองครั้งนี้ได้เปลี่ยนแปลงจำนวนรอบในสภาวะการทำพีซีอาร์ตั้งแต่ขั้นตอน denaturation จนถึงขั้นตอน extension จากเดิม 30 รอบ เป็น 40 รอบ โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ทำเจือจางให้มีปริมาณ 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg และ 1 pg แล้วนำดีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้นไปทำพีซีอาร์ตามขั้นตอนข้างต้น แล้วนำผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นมาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอ 1 μg, 100 ng, 10 ng และ 1 ng สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้ โดยจะพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 415 คู่เบสบนแผ่น Agarose gel ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อเปลี่ยนจำนวนรอบในขั้นตอน denaturation จนถึงขั้นตอน extension จาก 30 รอบ เป็น 40 รอบแล้วปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ที่จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธีนี้อย่างน้อยต้องมีปริมาณ 1 ng จึงสามารถตรวจสอบได้ (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีนี้มีความไวและประสิทธิภาพสูงขึ้นกว่าการทดลองที่แล้ว โดยมีปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ($\geq$1 ng) ก็สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ หรือการเพิ่มปริมาณสารที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์อีกเล็กน้อยก็อาจช่วยให้ประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์สูงขึ้นอีกได้

การทดสอบการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ในตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอาหารที่ใช้ คือ นม เนื้อหมู และน้ำแครอท โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ปริมาณ 0, 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$ และ $10^5$ เซลล์ ลงบนเนื้อหมู 2 ชุด ชุดที่ 1 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดที่ 2 นำเนื้อหมูที่ใส่เชื้อปริมาณดังกล่าวบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจากเนื้อหมูทั้งสองชุดมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าสามารถสกัด genomic DNA ของเชื้อ *S. aureus* จากเชื้อที่ปนเปื้อนบนเนื้อหมูทั้งสองชุดได้ แต่เมื่อนำมาทำพีซีอาร์พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จนสามารถตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ได้ คาดว่าเป็นเพราะดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่ใช่ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* จึงไม่มีความจำเพาะกับไพรเมอร์ SA-1 และ SA-2 หรือ genomic DNA ของเชื้อ *S. aureus* ที่สกัดได้มีน้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ส่วนการทดลองในน้ำแครอทนั้นได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 14458 ปริมาณ 10, $10^2$, $10^3$, $10^4$, $10^5$ และ $10^6$ เซลล์ ลงในน้ำแครอท 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดที่ 2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเช่นกัน จากนั้นนำเชื้อในน้ำแครอทมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าสามารถสกัด genomic DNA ได้เฉพาะเชื้อในน้ำแครอทบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $10^6$ เซลล์เท่านั้น เมื่อนำ genomic DNA ที่สกัดได้มาทำพีซีอาร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มากพอจนสามารถตรวจสอบได้เช่นเดียวกับการทดลองในเนื้อหมู คาดว่าเนื่องมาจากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีน้อยเกินไปเนื่องจากเชื้อ *S. aureus* อาจจะไม่สามารถเจริญได้ดีในน้ำแครอทเพราะในน้ำแครอทอาจมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

เชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบในอาหาร

| ชนิดอาหาร | ปี พ.ศ. | ตรวจ / พบ | จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *C. perfringens* | ***S. aureus*** | *B. cereus* | *E. coli* | *V. parahaemolyticus* | *Salmonella* | *C. botulinum* | *Parasite* |
| อาหารควบคุมเฉพาะ | 2533 | 157/65 | 16 | **4** | 38 | 12 | - | 1 | - | - |
| | | 4.1% | | | | | | | | |
| | 2534 | 629/40 | 18 | **6** | 17 | 8 | - | - | - | - |
| | | 5.8% | | | | | | | | |
| อาหารทั่วไป | 2533 | 791/119 | 43 | **51** | 16 | 25 | 12 | 10 | - | - |
| | | 15.0% | | | | | | | | |
| อาหารปรุงสำเร็จ | 2531 | 885/114 | 48 | **45** | 4 | 41 | 9 | 12 | 1 | 4 |

- หมายถึง การตรวจไม่พบ

อาหารควบคุมเฉพาะ : อาหารกึ่งสำเร็จรูป ซอส ซีอิ๊ว ไอศกรีม น้ำบริโภคบรรจุขวด น้ำแข็ง น้ำหวานเข้มข้น เครื่องดื่มผง เป็นต้น

ที่มา : กองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (วารี วัลยะเสรี และคณะ, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

รายการอาหาร เครื่องดื่ม และน้ำ ที่ไม่ได้คุณภาพด้านจุลชีววิทยา (2532-2534)

| ชนิดอาหาร | ร้อยละของอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ | | | จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ต่อปี | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2532 | 2533 | 2534 | 2532 | 2533 | 2534 |
| อาหาร | | | | | | |
| อาหารในภาชนะปิดสนิท | 20 | 17 | 10 | 235 | 250 | 287 |
| อาหารกระป๋อง | 4 | 1 | 1 | 472 | 755 | 748 |
| อาหารกึ่งสำเร็จรูป | 23 | 6 | 16 | 60 | 33 | 75 |
| **นมและผลิตภัณฑ์** | **1** | **13** | **2** | **174** | **313** | **281** |
| ไอศกรีม | 5 | 8 | 11 | 158 | 134 | 79 |
| ช็อกโคแลต | 3 | 8 | 6 | 78 | 63 | 30 |
| น้ำเกลือปรุงรสอาหาร | 2 | 0 | 0 | 41 | 24 | 21 |
| ซอส | 12 | 7 | 8 | 73 | 63 | 30 |
| ซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว | 11 | - | 28 | 151 | - | 174 |
| เครื่องดื่ม | | | | | | |
| น้ำอัดลม | 15 | 2 | 1 | 20 | 48 | 89 |
| น้ำหวานเข้มข้น | 7 | 26 | 27 | 108 | 109 | 120 |
| **น้ำผลไม้** | **8** | **1** | **39** | **48** | **144** | **260** |
| เครื่องดื่มผง | 23 | 14 | 21 | 52 | 52 | 52 |
| เครื่องดื่มเกลือแร่ | 5 | 0 | 0 | 39 | 50 | 13 |
| เครื่องดื่มผสมคาเฟอีน | 0 | 13 | 0 | 8 | 40 | 76 |

ที่มา : รายงานประจำปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2532,2533,2534 (วารี วัลยะเสรี และคณะ, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์และจำนวน target molucules ที่มีอยู่

| จำนวน target molecules | จำนวนรอบ |
|---|---|
| $3x10^5$ | 25-30 |
| $1.5x10^4$ | 30-35 |
| $11x10^3$ | 35-40 |
| 50 | 40-45 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุล DNA (Kb) กับเปอร์เซ็นต์ของ Agarose gel ที่เหมาะสมในการทำ Electrophoresis

| เปอร์เซ็นต์ (%) Agarose ในเจล | ขนาดของโมเลกุล DNA ที่ต้องการแยก (Kb) |
|---|---|
| 0.6 | 20-1 |
| 0.7 | 10-0.8 |
| 0.9 | 7-0.5 |
| 1.2 | 6-0.4 |
| 1.5 | 4-0.2 |
| 2.0 | 3-0.1 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

นันทนา อรุณฤกษ์, 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบ์, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 157-168, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

วารี วัลยะเสรี, ประภาศรี ภูวเสถียร, ประไพศรี ศิริจักรวาล, อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์, 2536. อาหารและโภชนาการเพื่อสุขภาพ, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 19-78, สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

สุมาลี เหลืองสกุล, 2539. จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology), พิมพ์ครั้งที่ 3 หน้า 220-227, โรงพิมพ์ชัยเจริญ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน, สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, ศูนย์อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมมหาวิทยาลัยมหิดล และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2539. การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องเทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 122-137.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, โครงการวิจัยอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์, สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536. เทคนิคพีซีอาร์ในการวินิจฉัยโรคและการแยกวิเคราะห์ยีน การประชุมเชิงปฏิบัติการ, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 1-112, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์

Anthony, R.M., Brown, T.J. and French, G.L. (2000) Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA follow by hybridization to an oligonucleotide array. Journal of Clinical Microbiology 38, 781-788.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anthony, R.M., Connor, A.M., Power, E.G. and French, G.L. (1999) Use of the polymerase chain reaction for rapid detedtion of high-level mupirocin resistance in Staphylococci. European Journal of Clinical Microbiology infection disease 18, 30-34.

Becker, K., Roth, R. and Peters, G. (1998) Rapid and specific detection of toxigenics *S. aureus* : use of two multiplex PCR enzyme immonoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. Journal of Clinical Microbiology 36, 2548-2553.

Belkum, A.V., Bax, R., Peebooms, P. G. W. H. F., Leeuwen, N. V. and Quint, W. G. V. (1993) Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology 31, 798-803.

Flowers, R. S. and Martin, S. E. (1980) Ribosome samebly during recovery of heat injured *Staphylococcus aureus* cells. Journal of Bacteriology 141, 645-651.

Gouws, P.A. Visser, M. and Brozel, V.S. (1998) A polymerase Chain Reaction procedure for detection of *Salmonella* spp. Within 24 hours. Journal of Food Protection 61, 1039-1042.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A. and Leong, D. (1994) PCR primers and probes for the 16S rDNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. Journal of Microbiology 32, 335-351.

Johnson, W. M., Tyler, J.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R. and Rozee, K.R. (1991) Detection of gene for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 29, 426-430.

Khan, M.A., Kim, C.H., Kakoma, I., Morin, E., Hanesen, R.D., Hurley, W.L., Tripathy, D.N. and Beak, B.K. (1998) Detection of *S. aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. American Journal of Vet Research 59, 807-813.

Koneman, E.W. (1998) Color Atias and Textbook of Diagnostic Microbiology 313.

Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S. and Carrasco, G.N. (1999) Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. Journal of Clinical Microbiology 37, 570-574.

Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W.M. (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicilin resistance. Journal of Clinical Microbiology 38,1032-1035.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Melchers, W.J.G., Verweij, P.E., Hurk, P.V.D., Belkum, A.V., Pauw, B.E.D.E., Hoogkamp, K.J.A.A. and Meis, J.F.G.M. (1994) General Primer mediated PCR for detection of *Aspergillus* sp. Journal of Clinical Microbiology 32, 1710-1717.

Preheim, L., Pitche, D., Owen, R. and Cookson, B. (1991) Typing of methicillin resistant and susceptible *S. aureus* strains by ribosomal RNA gene restriction patterns using a biotinylated probe. European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease 10, 428-436.

Saruta, K., Matsunaga, T., Kono, M., Hoshina, S., Ikawa, S., Sakai, O. and Machida, K. (1997) Rapid identification and typing *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiology Letter 146, 271-278.

Schmitz, F.J., Steiert, M., Hofmann, B., Fluit, A.C., Verhoef, J., Heinz, H.P. and Jones, M.E. (1998) Detection of staphylococcal genes directly from cerebrospinal and peritoneal fluid samples using a multiplex polymerase chain reaction. European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease 17, 272-274.

Schmitz, F.J., Steiert, M., Hofmann, B., Verhoef, J., Hadding, U., Heinz, H.P. and Kohrer, K. (1998) Development of a multiplex PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C and toxic shock syndrome toxin-1 in *S. aureus* isolates. Journal of Medical Microbiology 47, 335-340.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Straub, J.A., Hestel, C. and Hammes, W.P. (1999) A 23S rDNA targeted polymearse chain reaction based system for detection of *S. aureus* in meat starter culture and dairy product. Journal of Food Protection 62. 1150-1156.

Towner, K.J., Talbot, D.C., Curran, R., Webster, C.A. and Humphreys, H. (1998) Development and evalution of a PCR-based immunoassays for rapid detection of methicillin resistant *S. aureus.* Journal of Medical Microbiology 47, 607-613.

Uzal, F.A., Plumb, J.J., Blackall, L.L. and Kell, W.R. (1996) Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. Letter in Applied Microbiology 23,13-17.

Uzal, F.A., Plumb, J.J., Blackall, L.L. and Kell, W.R. (1997) PCR detection of *Clostridium perfringens* different toxins in faeces of goats. Letter in Applied Microbiology 25, 334-339.

Wang, P.F., Cao, W.W. and Cerniglia, C.E. (1999) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborn pathogens in food. Journal of Applied Microbiology 83, 727-736.

Wang, P.F., Cao, W.W., Frankin, W., Campbell, W. and Cerniglia, C.E.A. (1994) A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. Molecular and Cellular Probes 8, 131-138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้