การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23 เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นายวรพงษ์ วงษ์ปัญญา
นางสาวอภิชญา ทองทับ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23 เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

โดย นายวรพงษ์ วงษ์ปัญญา
นางสาวอภิชญา ทองทับ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี

T 035854

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์) ประธานกรรมการ

(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

(อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35851
วัน, เดือน, ปี 7 มิ.ย. 2543

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A 23S rDNA-based PCR method for detection of *Staphylococcus aureus*

WORAPONG WONGPANYA

APHICHAYA THONGTHAP

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

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23 เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
นักศึกษา	นายวรพงษ์ วงษ์ปัญญา
	นางสาวอภิชญา ทองทับ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษ (Enterotoxin) ได้ และเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารที่สำคัญ แต่การตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีการทั่วไปนั้นมักยุ่งยากและใช้เวลานาน ดังนั้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 23S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อดังกล่าวให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ การศึกษาในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ (Primer) โดยอาศัยการค้นข้อมูลจาก GenBank และการ Alignment ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อหาไพรเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นคู่สมกับยีนของส่วน 23S rDNA ของ *S. aureus* เท่านั้น ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ (PCR) เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA) ขนาด 415 เบสแพร์ (bp) *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองให้ผลในการทำ PCR เป็นผลบวก ในขณะที่เชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่นอีก 3 สายพันธุ์ และแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 8 สายพันธุ์ให้ผลเป็นลบ ปริมาณ DNA ของเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้ คือ 10 ng เวลาที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค PCR นั้นก็เพียงประมาณ 3 ชั่วโมงเท่านั้น ข้อมูลจากการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A 23S rDNA-based PCR method for detection *Staphylococcus aureus*
Name	Mr. Worapong Wongpanya
	Miss Apichaya Thongthab
Special Project Advisor	Mr. Choowong Auesukaree
Department	Appiled Biology
Academic Year	1999

Abstract

Staphylococcus aureus is an enterotoxin producing bacteria which is a leading cause of food poisoning. The standard method for detection of bacteria is labor intensive and time consuming. A 23S rDNA-based Polymerase Chain Reaction (PCR) method was developed for the rapid and specific detection of *S. aureus* . In this study, the PCR primers were designed by a GenBank computer search and they are complementary only with the 23S rRNA gene of *S. aureus* by sequence alignment. The PCR product is a 415 bp DNA fragment. All *S. aureus* strains tested were positive in the PCR assay and 3 other species of *Staphylococcus* and 8 other tested species of other bacteria were negative. As few as 10 ng of DNA from *S. aureus* were detectable. The PCR amplification required only about 3 hours to complete. The method can be used for rapid detection of a few *S. aureus* in contaminated food and environment.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี คณะกรรมการโครงงานพิเศษ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และอาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รวมถึง รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ยิ่ง รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขรายงาน ซึ่งคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ทั้งที่อาคารสมเด็จพระเทพฯ ที่อนุเคราะห์เชื้อบางชนิดให้มาทำการทดลอง ตึกจุฬาภรณ์ฯ ที่ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ตึกวิทยาศาสตร์เก่า ที่ช่วยเหลือในการเบิกคิวเวท แม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ตึกจุฬาภรณ์ฯ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงาน เพื่อนๆนักศึกษา ที่ให้กำลังใจและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.เครือวัลย์ พลจันทร หัวหน้าหน่วยงานชีวโมเลกุลและการพัฒนาวัคซีน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และบุคลากรในหน่วยงานทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ถ่ายทอดความรู้ในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้กับผู้จัดทำตลอดระยะเวลาการฝึกงานภาคฤดูร้อนจนสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้ได้เป็นอย่างดี ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายกำลังใจตลอดมา จนโครงงานพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	29
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	33
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาและแหล่งที่มา	23
ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* เทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่น ด้วยเทคนิค PCR	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 หลักการของ Polymerase Chain Reaction	9
รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมเจลเพื่อการแยกดีเอ็นเอ โดยวิธี Agarose gel electrophoresis	19
รูปที่ 3 ตำแหน่ง primerที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ขนาด 415 bpของยีน 23S rRNA ของเชื้อ *S. aureus*	25
รูปที่ 4 ไพร์เมอร์ทั้ง 2 ชนิด (SA-1 และ SA-2) และลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของเชื้อ *S. aureus* เฉพาะบริเวณที่เป็นคู่สมกับไพร์เมอร์	26
รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิค PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis	30
รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหาร (Enteric desease) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบบ่อยในประเทศไทย สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะของโรคมีด้วยกันหลายสาเหตุ แต่สาเหตุหนึ่งที่มีความสำคัญมากคือ สาเหตุที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ดี และมีโอกาสสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมต่างๆอยู่ตลอดเวลา ซึ่งการก่อให้เกิดโรคอาจมาจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ หรือมาจากตัวเซลล์ของจุลินทรีย์เอง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีความสำคัญมากในการทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหารตัวหนึ่งคือ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะทรงกลมจับกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น และสามารถสร้างสารพิษได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539) เป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง ทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน ลำไส้เล็กอักเสบ ถ้าเกิดอาการในเด็กเล็กอาจทำให้เสียชีวิตได้ มักพบปนเปื้อนได้ทั่วไปในอาหาร สิ่งอุปโภค บริโภค และในสิ่งแวดล้อมต่างๆ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

การป้องกันและแก้ไขอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากเชื้อ *S. auerus* ทางหนึ่งที่ได้ผลเป็นอย่างดี คือ การที่สามารถตรวจสอบพบเชื้อนี้ก่อนที่จะถูกนำเข้าสู่ร่างกาย ในเวลาที่ผ่านมาหลายประเทศได้ศึกษาหาวิธีที่จะสามารถตรวจสอบหาเชื้อชนิดนี้ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ซึ่งแต่เดิมวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์มีอยู่หลายวิธีและในปัจจุบันก็ยังมีการใช้กันอยู่ เนื่องจากมีราคาถูก ไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารคัดเลือกเฉพาะ (Selective medium) เทคนิคการ Spread plate แล้วทำการย้อมโคโลนีเพื่อตรวจสอบเชื้อ การตรวจสอบลักษณะของจุลินทรีย์ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539) แต่วิธีดังกล่าวไม่ค่อยสะดวกนัก ถ้าเชื้อมีปริมาณน้อยมากจะทำให้ผลการตรวจสอบคลาดเคลื่อน หรือตรวจสอบไม่ได้เลย และที่สำคัญคือ เสียเวลาในการตรวจสอบมาก

เทคนิคหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง และมีผู้นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์กันมากคือ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพ สะดวก ใช้เวลาสั้นในการตรวจสอบ และสามารถตรวจสอบได้แม้มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย PCR เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต และนำมาทำให้ปฏิกิริยาต่างๆเกิดขึ้นในหลอดทดลอง โดยมีการควบคุมสารเคมีต่างๆ และอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง DNA Thermal cycle (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536) ที่ผ่านมาได้มีผู้เคยศึกษาเทคนิคการตรวจสอบ *S. aureus* โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน เช่น Enterotoxin (Becker และคณะ, 1998) , 16S rRNA (Saruta และคณะ, 1995) , 16S-23S rRNA spacer region (Saruta และคณะ, 1997) , 16S-23S rDNA (Mendoza และคณะ, 1998) เป็นต้น แต่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาทดลองกับ 23S rDNA

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction เพิ่มปริมาณส่วนของ 23S rDNA ของเชื้อดังกล่าวโดยใช้ genomic DNA ทั้งหมดของเชื้อเป็น DNA Template เนื่องจาก 23S rDNA เป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดยีนมีความเหมือนกันมากในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (Mendoza และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังพบในปริมาณมาก (Mendoza และคณะ, 1998) และในหนึ่งเซลล์ยังมีหลาย copies ซึ่งจะช่วยให้การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารที่กำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยอยู่ในขณะนี้ ในตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างทางคลีนิค ตลอดจนสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่ยังใช้อยู่จนถึงขณะนี้ เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ไม่สะดวก เสียเวลามาก และให้ผลในการตรวจสอบที่คลาดเคลื่อนในบางกรณี เช่น มีปริมาณเชื้อน้อยเกินไป ดังนั้นจึงมีแนวความคิดที่จะนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อดังกล่าว เพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็ว ถูกต้อง สะดวก ประหยัด และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ให้รวดเร็วแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น
2. เพื่อศึกษาสภาวะ และองค์ประกอบที่เหมาะสมในการตรวจหา *S. aureus* ด้วยวิธี PCR
3. เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Staphylococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทรงกลม (Gram positive cocci) อยู่ในตระกูลไมโครคอกคาซี (Micrococcaceae) เซลล์ทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ เป็นแฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ (Facultative anaerobe) มีทั้งออกซิเดทีฟ (oxidative) และเฟอร์เมนเททีฟ เมตาบอลิซึม (fermentative metabolism) เป็นปรสิตที่ผิวหนัง เยื่อเมือกของคน สัตว์เลือดอุ่น

เชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญ คือ *Staphylococcus aureus* ให้โคโลนีสีขาวจนถึงสีทอง ให้ผลการทดสอบโคแอกกูเลส (coagulase) เป็นบวก และทำให้พลาสมาเป็นลิ่ม ทำให้เกิดฝี แผลหนอง การติดเชื้อหลังผ่าตัด ทอคซิกช็อก (toxic shock) อาหารเป็นพิษในคน ในสัตว์ ทำให้เต้านมวัวอักเสบ (mastitis) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539)

อาหารเป็นพิษ (Food poisoning) เนื่องจาก *Staphylococcus*

โรคนี้มักเกิดขึ้นเสมอ โดยมีสาเหตุจากการย่อยสารพิษ (enterotoxin) ของ *Staphylococcus aureus* ที่เจริญในอาหาร สารพิษนี้ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ

เชื้อที่เป็นสาเหตุ มีรูปร่างกลมเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ การเจริญในอาหารแข็งมักมีสีเหลืองทองแต่บางสายพันธุ์ก็ไม่มีสี *S. aureus* ที่ผลิตสารพิษมักเป็นพวกที่สังเคราะห์เอนไซม์โคแอกูเลสได้ เชื้อจัดเป็นพวกแฟคัลเททีฟในอาหารที่มีกลูโคส แต่จะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ไม่จำเป็นที่ทุกสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ผลิตเอนไซม์โคแอกูเลสจะต้องผลิตสารพิษ บางสายพันธุ์สามารถทนเกลือได้สูง (ร้อยละ 10-20) และยังสามารถทนต่อไนไตรท์ได้ค่อนข้างดี ดังนั้นจึงสามารถเจริญได้ในเนื้อเค็มถ้าสิ่งแวดล้อมอื่นเหมาะสม เชื้อยังทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึงร้อยละ 50-60 และมีความสามารถย่อยโปรตีนได้แต่ไม่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น

S. aureus สามารถผลิตสารพิษได้ถึง 6 ชนิดด้วยกัน ซึ่งแยกโดยวิธีทางซีโรโลยีได้แก่A, B, C, C_2, D และ E แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารพิษแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร โดยทั่วๆไป ถ้าอาหารเหมาะสมต่อการเจริญ เชื้อจะสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ พีเอช (pH) และ a_w ที่กว้างขึ้น ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ และการผลิตสารพิษจะอยู่ระหว่าง 4-46°C เช่นในนมข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีอุณหภูมิขั้นต่ำ 6.7°C แต่ในสลัดแฮมจะสูงกว่า 10°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อจะมี pH ขั้นต่ำสำหรับการเจริญต่ำกว่าในสภาวะไร้ออกซิเจน ความต้องการ a_w ขั้นต่ำก็เช่นเดียวกัน

Staphylococcus อาจเจริญได้ช้าลงถ้ามีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญร่วมอยู่ด้วย และแบคทีเรียชนิดอื่นอาจทำให้อาหารเสียจนสังเกตได้ก่อนที่ *Staphylococcus* จะผลิตสารพิษถึงระดับที่เป็นอันตราย แต่การแข่งขันจะไม่เกิดขึ้นถ้าหากอาหารนั้นได้รับความร้อนมาก่อน

Staphylcoccus จะถูกทำลายที่ความร้อน 66°C นาน 12 นาที หรือ 60°C นาน 83 นาที การทนความร้อนของเชื้อจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารและสายพันธุ์

แหล่งที่มาของ *Staphylococcus* ในอาหารมักมาจากมนุษย์ และสัตว์ ซึ่งมักมีเชื้ออยู่ที่จมูก ผิวหนัง และแผลต่างๆ ในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีเชื้ออยู่ในน้ำนม *Staphylococcus* ที่อยู่ในอากาศก็อาจเป็นสาเหตุได้แต่โอกาสน้อยกว่า (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

สารพิษของ *Staphylococcus*

เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 26,000-30,000 ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สายเดียวจับกันเป็นห่วงที่เรียกว่า ซิสทีน ลูป (cystine loop) ด้วยแรงยึดไดซัลไฟด์ (disulfide) ระหว่างกรดอะมิโน เนื่องจากชนิดของกรดอะมิโนในห่วงนี้ของสารพิษ type A และ D ทำให้เกิดโรคมากที่สุด การผลิตสารพิษจะเกิดตามหลังการเจริญของเชื้อไม่นานนัก ดังนั้น สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพิษก็จะเป็นสภาพที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญ การผลิตสารพิษจะทำได้ที่อุณหภูมิ 15.6-46.1°C แต่ที่ดีที่สุดจะอยู่ที่ 40°C ซึ่งใช้เวลาในการผลิตเพียง 4-6 ชั่วโมงเท่านั้น ถ้าอุณหภูมิต่ำก็ต้องใช้เวลานานขึ้น สารพิษของเชื้อ *Staphylococcus* สามารถทนความร้อนได้ดี โดยทั่วๆไป ความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอไรซ์ (72°C นาน 15 วินาที) และยูเอชที (143.3°C นาน 9 วินาที) ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ และสารพิษ type E จะทนความร้อนมากที่สุด อาหารประเภทแป้งและโปรตีน มักจะส่งเสริมให้ *Staphylococcus* สร้างสารพิษมากกว่าอาหารชนิดอื่น

อาการของโรค

ในแต่ละคนจะต่างกัน บางคนมีอาการมาก บางคนมีอาการน้อยหรือไม่มีเลยขึ้นอยู่กับความต้านทานของแต่ละคน ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลา 2-4 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากอาหารเป็นพิษหรือโรคติดเชื้อชนิดอื่นๆที่มีระยะฟักตัวนานกว่านี้

อาการขั้นแรกที่พบเสมอคือ ผู้ป่วยจะมีน้ำลายออกมามากผิดปกติ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย บางรายที่มีอาการมากอาจพบเลือดและมูกในอุจจาระด้วย บางรายปวดศีรษะ กล้ามเนื้อเป็นตะคริว เหงื่อออก หนาวสั่น อ่อนเพลีย ชีพจรอ่อน และช็อค มักพบว่ามีไข้ต่ำๆ มากกว่าไข้สูง อาการจะคงอยู่ 1-2 วันก็หายโดยไม่ต้องรักษา อัตราการตายต่ำ ในรายที่มีอาการมากอาจต้องให้น้ำเกลือ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพแวดล้อมที่สำคัญในการทำให้เกิดโรค

1. อาหารนั้นจะต้องมีเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดที่ให้สารพิษอยู่
2. อาหารชนิดนั้นจะต้องเหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษ
3. อุณหภูมิต้องเหมาะสมต่อการเจริญและมีระยะเวลานานพอต่อการผลิตสารพิษ
4. บริโภคอาหารที่มีสารพิษนั้น

การป้องกันโรค

1. ป้องกันการปนเปื้อนของอาหารจากเชื้อ *Staphylococcus*
2. ป้องกันการเจริญของ *Staphylococcus*
3. ทำลาย *Staphylococcus* ในอาหาร

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ PCR

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ที่ต้องการศึกษาในหลอดทดลอง(Invitro enzymatic gene amplification)

Karry Mullis แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Corporation) เป็นคนแรกที่คิดค้นเทคนิคนี้ได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1983 ต่อมา Seiki และคณะได้รายงานผลงานวิจัยการนำเทคนิคนี้ไปใช้เป็นครั้งแรกในการทำ Novel Method for the Prenatall Diagnosis of Sickle Cell Anemia ในการประชุม American Society of Human Genetics Conference ในปี ค.ศ. 1985 ตั้งแต่นั้นมาจนถึงปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับเทคนิค PCR ในวารสารทางวิชาการเป็นจำนวนมากกว่า 1,000 เรื่อง

หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR

PCR เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติ (DNA replication) ซึ่งหลักการของเทคนิค PCR คือ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอแม่พิมพ์หรือดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA)ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ที่เราต้องการศึกษา
2. ดีเอ็นเอตั้งต้น (oligonucleotide primer) 2 สาย เป็นสายดีเอ็นเอสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary sequence) กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3. เอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้เป็น substrate สำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่
5. อื่นๆ เช่นเกลือ และบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม

ขั้นตอนในการทำ PCR

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อเนื่องกันดังนี้

1. **ขั้นตอน denaturation** เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ของแม่พิมพ์ที่ต้องการศึกษา ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95°C สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. ขั้นตอน **primer annealing** เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-60°C เพื่อให้ดีเอ็นเอตั้งต้น (DNA primer) ทั้ง 2 สาย เข้าจับอย่างจำเพาะ(anneal) กับปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน
3. ขั้นตอน **primer extension** เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (dNTP) ที่ปลาย 3'-OH ของสายดีเอ็นเอตั้งต้น (primers) ด้วย dNTPs ทั้ง 4 ชนิด ไปในทิศทาง 5'→3' ของสายดีเอ็นเอตั้งต้น โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้อยู่ในช่วง 70-75°C

เมื่อปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนเสร็จสิ้น นับเป็น 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เรียกว่าแอมพลิไฟด์ (amplified) หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) เกิดขึ้น จากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ในรอบต่อมาดีเอ็นเอต้นแบบที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จะถูกใช้เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์รอบใหม่ ดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) คือ ได้ 2^n เท่า (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซนต์ในทางปฏิบัติการสังเคราะห์จะทำซ้ำ 20-30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1-10 ล้านเท่า

วิวัฒนาการของ PCR technology เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลา 8 ปีที่ผ่านมา วิทยาการปัจจุบันของหัวข้อสำคัญๆ มีดังต่อไปนี้

1.เอนไซม์ DNA polymerase

การค้นพบเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ (thermostable DNA polymerase) แยกสกัดจาก thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*)ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนใน Yellowstone National Park โดย Brock และ Freeze (J.Bacteroil,1969) ทำให้ได้เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Taq DNA polymerase ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยา PCR แทนที่การใช้เอนไซม์ Klenow fragment Seiki และคณะริเริ่มนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มาใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยแยกสกัดจากแบคทีเรียในรูปของเอนไซม์ธรรมชาติ (native enzyme) ได้ค่าแอคติวิตีค่อนข้างต่ำเพียง 2,000-8,000 units/mg protein ต่อมาจึงพัฒนาการสังเคราะห์เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase โดย Recombinant DNA technology ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีสูงขึ้นถึง 200,000 unit/mg protein นอกจากนั้นยังมีการนำเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูงมากยิ่งขึ้นมาใช้ในเทคนิค PCR อีกด้วย

เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR ในปัจจุบัน มีดังนี้

Taq DNA polymerase

Vent DNA polymerase

Deep Vent DNA polymerase

rTth DNA polymerase (thermostable reverse transcriptase & DNA polymerase)

2. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (PCR Automation)

ในช่วงแรกที่ใช้เอนไซม์ Klenow fragment ในเทคนิค PCR นั้นมีการพัฒนาเครื่องอัตโนมัติชื่อว่า Mr. Cycle โดยบริษัท Perkin Elmer Cetus ซึ่งดัดแปลงมาจากเครื่อง Pro/Pette liquid handler ประกอบด้วย 2 blocks คือ front block เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 2 อ่าง ที่ 94°C และ 37°Cมี switching valve คอยเปลี่ยนอุณหภูมิโดยอัตโนมัติและ back block เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ลักษณะของเครื่อง Mr. Cycle นี้มีความยุ่งยากซับซ้อนมาก ต่อมาเมื่อเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ทำให้ช่วยสนับสนุนให้การพัฒนาเครื่องอัตโนมัติสำหรับปฏิกิริยาทำได้ง่ายขึ้น เป็นผลให้พัฒนาการด้านเครื่องมือดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันเครื่องอัตโนมัติสำหรับควบคุมปฏิกิริยา PCR ที่มีผลิตจำหน่ายแบ่งตามระบบการทำงานของเครื่องเป็น 6 ระบบดังนี้

2.1 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ heater ทำความร้อน และใช้ระบบ air-compresser ให้ความเย็น ตัวอย่างได้แก่ เครื่องอัตโนมัติ 3 รุ่นที่ผลิตจำหน่ายโดยบริษัท Perkin Elmer Cetus

DNA Thermal Cycle

DNA Thermal Cycle 480

GeneAmp PCR System 9600

2.2 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ heater ทำความร้อน และระบายความร้อนด้วยน้ำประปา (tap water) หรือมีระบบทำน้ำเย็น (water cooling unit) มาต่อเพิ่มต่างหาก ตัวอย่างได้แก่

Microcycler (Eppendorf)

Bioexcellence DNA incubators I & II (Bioexcellence)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ระบบ Peltier (Thermoelectric heat pump หรือ Solidstate heating and cooling) ในการควบคุมอุณหภูมิ ตัวอย่างได้แก่

Temp Cycle I & II (Coy)

Temperature Cycle (Savent)

Gene ATAQ (Pharmacia)

2.4 เครื่องอัตโนมัติที่มีโครงสร้างการทำงานแบบตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (oven) ตัวอย่างเช่น ISS Pro-Oven II

Bio Therm BioOven II

2.5 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลอดไฟทำความร้อนและระบายความร้อนด้วยพัดลมตัวอย่างเช่น Thermal Reactor (Hybrid)

Omni Gene (Hybrid)

2.6 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้อากาศเป็นตัวส่งผ่านความร้อน และความเย็น ตัวอย่างเช่น

1605 Air Thermo-Cycle (ATC) (Tdaho Technology)

3. การออกแบบไพรเมอร์ (Primers) และโพรบ (Probes)

ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยออกแบบ primers และ probes ซึ่งสามารถช่วยอำนวยความสะดวก และลดเวลาในการออกแบบและเลือก primers กับ probes ที่ต้องการ โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

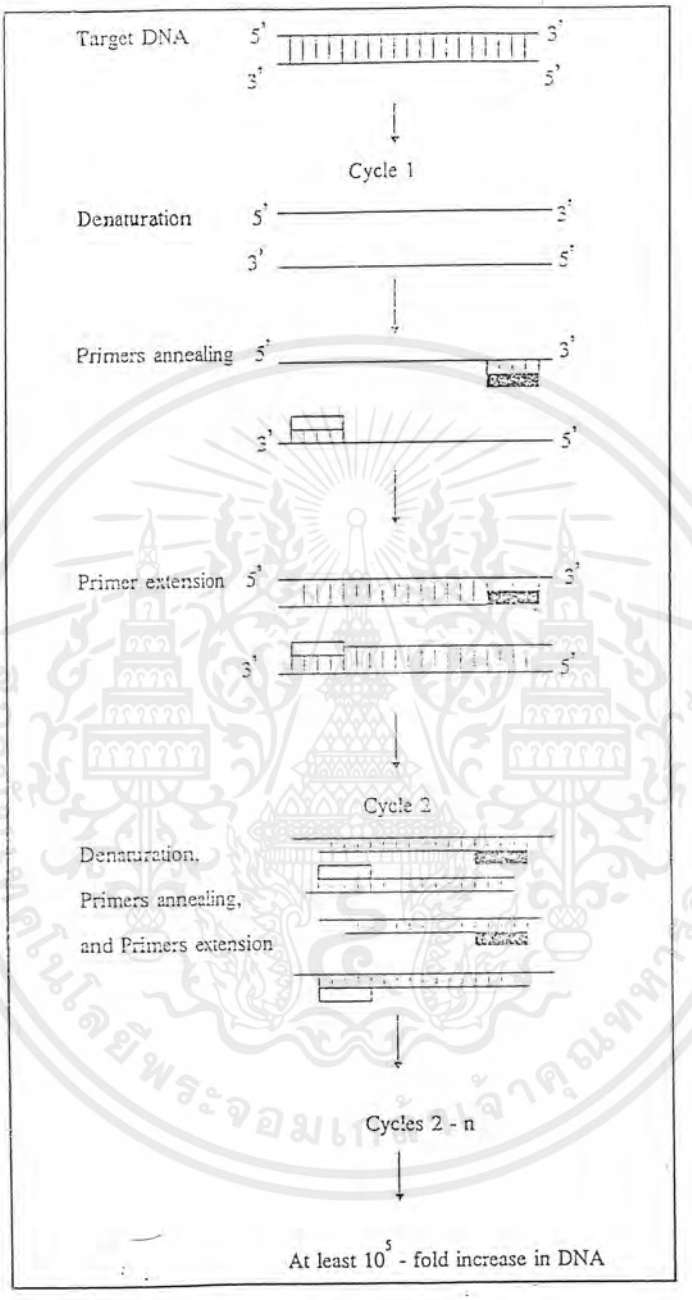
3.1 ใช้คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่างๆ เช่น Tm (melting temperature) โอกาสที่จะเกิดแฮร์พิน (hair-pin) หรือไดเมอร์ (dimer) โอกาสที่จะ anneal กับส่วนอื่นๆ ของ target sequence และโอกาสที่จะจับกับซีเควนซ์ (sequence) อื่นๆ โดยอาศัยข้อมูลจาก Nucleotide Database เช่น GenBank เป็นต้น

3.2 เลือกใช้ ซอฟแวร์ (Software) สำเร็จรูปที่เป็น Automatic primer-probe design program มีจำหน่ายเป็นจำนวนมากให้เลือกใช้ได้

4. การสังเคราะห์ Oligonucleotide primers และ probes

ก่อนปี ค.ศ. 1985 การสังเคราะห์ oligonucleotide ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เนื่องจากเครื่องสังเคราะห์อัตโนมัติมีราคาแพง และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ (operating costs) ต่อ 1 เบสก็สูง ในปี ค.ศ. 1985 เครื่องสังเคราะห์ oligonucleotide ยุคที่ 2 (Second generation) ถูกพัฒนาเป็นระบบ streamlined และ solid support synthesis สามารถสังเคราะห์พร้อมกันได้ครั้งละหลาย oligonucleotides และค่าใช้จ่ายก็ถูกลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 หลักการของ Polymerase Chain Reaction

(อรอนงค์ รัชตราเชนชัย, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เทคนิค PCR

การพัฒนาด้านเทคนิคใน PCR เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็วตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย การดัดแปลงจากเทคนิค PCR พื้นฐานก่อให้เกิดเทคนิคชั้นสูง (Advanced PCR techniques) จำนวนมาก ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ศักยภาพ และลดปัญหาอุปสรรคต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ยกตัวอย่างเช่น Booster PCR, Asymmetric PCR เป็นต้น แต่ละเทคนิคมีหลักการและประโยชน์ในการประยุกต์ใช้แตกต่างกัน ในปัจจุบันเทคนิคต่างๆ เหล่านี้มีประโยชน์ครอบคลุมวัตถุประสงค์ต่างๆ ในงานวิจัยอย่างครบถ้วน ขึ้นกับการเลือกนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสม

วิธีมาตรฐานของ PCR (Standard PCR Protocol)

วิธีมาตรฐานในการทำ PCR กำหนดให้มีส่วนผสมต่างๆ รวมอยู่ในปริมาตร 50-100 µl และปิดทับผิวบนของส่วนผสมด้วย mineral oil 75 µl หรือใส่ AmpliWax Gem 1 เม็ด เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) 10^5-10^6 โมเลกุล
50 µM ของแต่ละ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
20 picomoles ของแต่ละ primer
20 mM Tris-Cl pH 8.3
25 mM KCl
1.5 mM $MgCl_2$
100 µg/ml autoclaved gelatin
sterile DW
2 units *Taq* DNA polymerase

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย (amplification) เกิดขึ้นโดยกระบวนการหลัก 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามที่กำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ ตั้งเครื่องให้มีสภาวะการทำงานดังนี้

Denaturation	90-95°C	30-60 วินาที
Primer annealing	40-60°C	30-60 วินาที
Primer extension	72°C	1-2 นาที

ทำซ้ำจำนวน 25-30 รอบ
รอบสุดท้ายทำ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลานาน 5 นาที
และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C และ/หรือเติม 10 mM EDTA

วิธีมาตรฐานดังกล่าวสามารถใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีขนาดความยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งแต่ 150-2,951 bp ได้ผลดีและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามสำหรับบางดีเอ็นเอแม่พิมพ์ อาจใช้วิธีการมาตรฐานไม่ได้ผลดี กรณีเช่นนี้จำต้องปรับสภาวะการทำงานให้เหมาะสม เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR เกิดขึ้นสูงสุด ป้องกันปัญหาต่างๆที่อาจเกิดขึ้น เช่น ไม่เกิด PCR product หรือเกิดน้อย หรือการเกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะ เป็นต้น

การปรับสภาวะการทำงานควรพิจารณาถึงปัจจัยต่อไปนี้คือ

1. การคัดเลือกและการออกแบบ Primers

ข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบ primers ที่สำคัญควรพิจารณา คือ

1.1 ควรเลือก primers ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยาย ควรหลีกเลี่ยง primers ที่มี polypurines, polypyrimidines หรือลำดับการเรียงตัวที่ไม่ปกติ (unusual sequence) และควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 50-60 เปอร์เซนต์

1.2 หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3' (3'-end) ของ primer การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ถ้ายังคงมี secondary structure ควรแทนที่ dGTP ด้วย 7-deaza-2-dGTP

1.3 ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละ primer ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3'-overlaps ในคู่ primers ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเกิด "primer dimer"

1.4 ตามหลักเกณฑ์ควรกำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ 3'-end ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์

1.5 มี Tm (melting temperature) ของแต่ละ primers ใกล้เคียงกัน (balanced) อยู่ระหว่าง 55-80°C

1.6 ความเข้มข้นของ primers ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 M ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) และมีการสะสมของผลิตผลที่ไม่ จำเพาะ (nonspecific products) มากขึ้น และอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ซึ่งเป็น template-independent artifact ทั้งผลิตผลที่ไม่จำเพาะและ primer-dimer ต่างก็แย่งใช้เอนไซม์ dNTP และ primers ทำให้ได้ผลิตผลที่ต้องการปริมาณลดลง

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ซื้อได้จากหลายบริษัทผู้ผลิต ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างในเรื่องของสภาวะเหมาะสม (assay conditions) และคำนิยามกำหนดหน่วยวัดแอคติวิตี (unit definitions) ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นใช้ควรจะทดสอบหาความเข้มข้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอเหมาะของเอนไซม์ ในช่วงตั้งแต่ 0.5-5 units ต่อ 100 µl และตรวจผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis ในการทำ PCR ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปเป็นผลให้มีการสะสมผลิตผลที่เป็น nonspecific background เกิดขึ้นมาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการปริมาณน้อย เกณฑ์มาตรฐานกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ประมาณ 1-2.5 units ต่อ 100 µl ของปฏิกิริยา PCR ในกรณีของการขยายตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซับซ้อนมาก เช่น genomic DNA ปกติควรจะใช้เอนไซม์ 1-4 units ต่อ 100 µl

3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ไอออน (Magnesium ion)

ผลของปฏิกิริยา PCR ขึ้นกับความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) ถ้ามีความเข้มข้นในปฏิกิริยามากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลิตผลที่ไม่จำเพาะเกิดสะสมมาก แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลิตผลที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อการเกิด primer annealing, อุณหภูมิที่ทำให้การแยกออกจากกันของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และผลิตผลจาก PCR, ความจำเพาะของผลิตผลจากแม่พิมพ์ (product specificity), การเกิด primer-dimer artifacts และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปของปฏิกิริยา PCR ต้องการความเข้มข้นของ Mg^{2+} อยู่ระหว่าง 0.5-2.5 mM สำหรับกรณีที่มี 200 µM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าในสารละลายของ primers หรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์มี EDTA หรือ สาร chelators ชนิดอื่นๆ จะมีผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในปฏิกิริยา PCR

4. ความเข้มข้นของ Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปกติมีความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละตัวอยู่ระหว่าง 50-200 µm โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่ pH 7.0 และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น primary stock solution มีความเข้มข้น 10 mM แล้วเจือจางเป็น working stock solution มีความเข้มข้น 1 mM แบ่งเป็น aliquots เก็บที่ -20°C (dNTPs สามารถจับกับ Mg^{2+}) ปริมาณ dNTPs ในปฏิกิริยาจะเป็นตัวกำหนดปริมาณ Mg^{2+} ฉะนั้นถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของ dNTPs มากๆ ควรจะต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้พอเหมาะด้วย

dNTPs ทั้ง 4 ชนิดที่มีอยู่ในปฏิกิริยาควรจะมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดสมดุลย์กันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ปริมาณผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงต่อลำดับเบสคู่สม

5. ความสำคัญขององค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับ PCR คือ 10-15 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 ที่ 20°C แต่ pH ที่แท้จริงในสภาวะของ PCR (thermal cycling conditions) เปลี่ยนแปลงจาก 20 mM Tris pH 8.3ที่ 20°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น pH 6.8-7.8 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR มี 50 mM KCl เพื่อเร่ง primer annealing กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ถ้ามีความเข้มข้นของ KCl หรือ NaCl สูงกว่า 50 mM จะยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

gelatin และ bovine serum albumin (BSA) และ nonionic detergent เช่น Tween 20 หรือ Laureth 12 (0.05-0.1% v/v) ที่ใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะช่วยรักษาความคงสภาพของเอนไซม์

6. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน Primer annealing

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต้องการสำหรับ primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้นของ primers อุณหภูมิสำหรับ annealing ควรเลือกที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า Tm ของ primers เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงานได้ที่ช่วงของอุณหภูมิระหว่าง 20-85°C ดังนั้นอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ที่ให้ผลดีที่สุดคือ 72°C การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ช่วยทำให้ไม่เกิดการจับคู่ผิดพลาด และลดการเกิด misextension ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องที่ 3'-end ของ primers ฉะนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรอบแรกๆ ของ PCR จะเพิ่มความจำเพาะ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ควรจะเติมลงในปฏิกิริยาภายหลังขั้นตอน denaturation ของรอบแรกซึ่งอยู่ในขั้นตอน primer annealing จะทำให้ได้ความจำเพาะสูง อุณหภูมิต่ำในขั้นตอน extension กับความเข้มข้นสูงของ dNTP จะช่วยส่งเสริมให้เกิด misextension ของ primers ที่มีขนาดยาวและเลือกใช้ 2 ช่วงของอุณหภูมิ คือ 55-75°C สำหรับตอน annealing และ extension และ 94-97°C สำหรับขั้นตอน denaturation

7. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน Primer extension

เวลาในการเกิด extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิที่เลือกใช้ primer extension ตามหลักการควรทำที่อุณหภูมิ 72°C อัตราการต่อลำดับเบสที่อุณหภูมิ 72°C เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นกับ pH ของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเกลือ และธรรมชาติของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เวลาในการเกิดextension 1นาทีที่ 72°C เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ผลิตผลที่มีความยาวถึง 2 kb อย่างไรก็ตามเวลาที่ยาวขึ้นในการเกิด extension ในรอบแรกจะมีประโยชน์ถ้ามีความเข้มข้นของ substrate ต่ำ และในรอบหลังของ PCR เมื่อความเข้มข้นของผลิตผลสูงเกินความเข้มข้นของเอนไซม์

8. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน Denaturation

ความล้มเหลวของ PCRส่วนมากเกิดจากการ denaturation ของ target template และ/หรือ ผลิตผลที่ได้ไม่สมบูรณ์ สภาวะที่กำหนดสำหรับ denaturation คือที่ 95°C,10 วินาที หรือ 97°C,15 วินาที อย่างไรก็ตาม อาจกำหนดอุณหภูมิสูงขึ้น การเกิด denaturation ที่ไม่สมบูรณ์เป็นผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA strand เกิด "snapback" ทำให้ได้ผลผลิตลดลง ในทางตรงกันข้าม ถ้าขั้นตอน denaturation กำหนดอุณหภูมิสูงเกินไป และ/หรือ เวลานานเกินไป จะนำไปสู่การสูญเสียแอคทิวิตีของเอนไซม์

9. จำนวนรอบ (Cycle number)

จำนวนรอบที่พอเหมาะ ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อปรับองค์ประกอบอื่นๆ ของ PCR ให้เหมาะสมแล้ว ความผิดพลาดที่พบบ่อย คือ ทำจำนวนรอบมากเกินไป ซึ่งเป็นผลให้เกิดปริมาณ และความยุ่งยากของผลิตผลที่เป็น nonspecific background และถ้าทำจำนวนรอบน้อยเกินไปจะสังเคราะห์ผลิตผลได้น้อย ข้อแนะนำสำหรับจำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่กับความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้นมีดังนี้

จำนวน target molecules	จำนวนรอบ
3×10^5	25-30
1.5×10^4	30-35
11×10^3	35-40
50	40-45

10. ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะที่ใช้งาน ควรล้างให้สะอาดปราศจากผงซักฟอก น้ำที่ใช้ควรสะอาด และปราศจากเอนไซม์ nuclease เป็นต้น

การปนเปื้อน

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ความไวสูงมาก ดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงไม่กี่โมเลกุลสามารถถูกเพิ่มจำนวนเป็นล้านๆ โมเลกุลได้เพียง 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นแม้เพียงเล็กน้อยสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ง่าย (false positive) การปนเปื้อนอาจเกิดจาก

1. การปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างตรวจ (cross-contamination) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงการเก็บ การเตรียมหรือการแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง
2. การปนเปื้อนแบบ carry-over contamination เป็นการปนเปื้อนจาก amplified product จากหลอดหนึ่งข้ามไปอีกหลอดหนึ่ง วิธีการแพร่กระจายจะเกิดจากละอองลอย (acrosal) เช่น จากการ vortex การเปิดฝาหลอด และการปั่นหลอด การดูดถ่ายสารละลายโดยใช้ไปเปต (pipette) เป็นต้น การปนเปื้อนส่วนใหญ่ในการทำ PCR เกิดจาก carry over contamination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรการในการป้องกันการปนเปื้อน

1. แบ่งพื้นที่ หรือห้องสำหรับงานก่อนและหลังการทำ PCR และจำเป็นต้องแยกวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องใช้ในการทำงานก่อนและหลังทำ PCR อย่างเด็ดขาด
2. การป้องกันก่อนทำปฏิกิริยา PCR (Pre-PCR sterilization) ซึ่งทำได้หลายวิธี
    2.1 การใช้แสง ultra violet (UV sterilization)
    2.2 การใช้รังสีแกมมา
    2.3 การใช้เอนไซม์ Uracil DNA glycoxylase (UDG)
3. การป้องกันหลังการทำ PCR (Post-PCR sterilization) ทำโดยใช้กระบวนการ photochemical reaction ไปทำให้ผลิตผลของ PCR สูญเสียสภาพการเป็นแม่พิมพ์ สารเคมีที่นิยมใช้จัดอยู่ในกลุ่ม furocuomarines ได้แก่ psoralen และ isopsoralen เป็นต้น
4. การใช้ positive displacement pipette หรือการใช้ aerosal resistant tip เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก aerosal
5. การแบ่งน้ำยาลงขวดหรือหลอดเล็กๆ
6. การใช้ตัวควบคุมที่เหมาะสมร่วมในการทำ PCR ตัวควบคุมประกอบด้วย ตัวควบคุมชนิดบวก (positive control) และตัวควบคุมชนิดลบ (negative control)
7. การปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง เช่น การสวมและเปลี่ยนถุงมือ การเปิด-ปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวัง การเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่ปฏิบัติงาน

ข้อดีของเทคนิค PCR

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

ข้อจำกัดของเทคนิค PCR

1. ต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา
2. ต้องสังเคราะห์ primers
3. อาจเกิดผลบวกปลอมอันเนื่องจากการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของ PCR

1. ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยไม่ต้องแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นออกมาให้บริสุทธิ์ก่อน และไม่ต้องใช้ปริมาณมาก เพียงดีเอ็นเอจากหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอก็สามารถทำได้
2. เพิ่มความไวของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และทำให้ตรวจได้ง่ายขึ้น เพราะดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถตรวจดีเอ็นเอจากสิ่งตัวอย่างปริมาณน้อยมาก ซึ่งไม่เคยทำได้มาก่อน
3. ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR แล้ว สามารถนำมาตรวจหรือศึกษาต่อด้วยวิธีง่ายๆ เช่น การทำ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอโดยตรงแทนวิธีซึ่งใช้ DNA probe ซึ่งใช้แทน Dot blot และ Southern blot hybridization ได้ เนื่องจากดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามีปริมาณเพิ่มขึ้นมาก จนสามารถมองเห็นได้โดยตรงโดยการย้อมสีด้วย ethidium bromide โดยไม่ต้องอาศัย DNA probe และสารกัมมันตรังสี หรือการติดฉลาก DNA probe ด้วยวิธีอื่นๆ ทำให้สะดวก ประหยัด และได้ผลเร็วขึ้น นอกจากนี้ในกรณีที่ส่งตัวอย่างที่มีการผ่าเหล่าที่ตรวจแล้วไม่ทราบชนิด ก็สามารถนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR แล้วไปตรวจหาลำดับของเบสได้โดยตรง โดยทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวก่อน โดยใช้ NaOH หรือความร้อน หรืออาจใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค Unbalance PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการขึ้นเป็นสายเดี่ยว ทำได้โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของ primer ทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทำ PCR เช่น เป็น 1:50 หรือ 1:100 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีนี้สามารถนำไปศึกษาลำดับของเบสได้เลย ซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำ PCR ตามปกติ ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งบางครั้งอาจเกิดปัญหาจากการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบเอง หลังจากที่ทำให้เป็นสายเดี่ยวแล้ว แทนที่จะจับกับ internal primer ซึ่งใช้ช่วยในการหาลำดับเบส ทำให้การศึกษาลำดับของเบสไม่ค่อยได้ผลนัก
4. เป็นการทำ DNA cloning โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ตามวิธีปกติ (cell free molecular cloning) เนื่องจาก PCR สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างจำเพาะและเพิ่มได้มากตามต้องการ
4. มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ใช้ช่วยในการตรวจวิเคราะห์การผ่าเหล่า (mutation) ของยีน อันเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง และใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม และโรคติดเชื้อจากทั้งไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว รวมทั้งทางด้านนิติเวชวิทยา เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

พิสูจน์ว่ามีดีเอ็นเอตามลำดับเบสที่สงสัยอยู่ในหลักฐานที่เก็บได้หรือไม่ เช่น จากคราบเลือด, ขน, ผม หรืออสุจิ เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค PCR ยังมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมก่อนคลอด, การตรวจหาเพศของ embryo ของมนุษย์ก่อนการทำ in vitro fertilization และการวิเคราะห์ HLA และ tissue typing ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะ ตัวอย่างที่ดีสำหรับการใช้ PCR ในการประเมินผล คือ การตรวจ human immunodeficiency virus (HIV) genome ในบุคคลที่ไม่สามารถตรวจพบว่า HIV-positive โดยวิธีการตามปกติ เช่น ทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV และบุคคลที่ seronegative ต่อการทดสอบ anti-HIV แต่มีอัตราการเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคเอดส์

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน

วิธี Gel Electrophoresis

คือ การดูผล PCR product จากการย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide หลังจากผ่านกระบวนการอิเลคโตรโฟริซิสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหา PCR product ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ PCR product เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 bp นิยมใช้ 1%(w/v) agarose เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 bp มักใช้ 2%(w/v) agarose หรือ 5%(w/v) acrylamide เป็นเจล ตรวจหา

Agarose gel electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาด หรือน้ำหนักโมเลกุลมากๆ ซึ่งไม่สะดวกหรือไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย polyacrylamide gel ได้ ปัจจุบัน agarose gel เป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในการวิเคราะห์ทาง immunoelectrophoresis ซีรัมไลโปโปรตีน ไวรัสและโดยเฉพาะการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจาก 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 (sulphate) กลูโคเนต (gluconate) เป็นต้น จึงทำให้เกิดปัญหาของ electrophoresis ดังนั้นจึงมีการเตรียม agar ที่ปราศจากประจุลบเหล่านี้ เรียกว่า agarose และมีการนำ agarose มาใช้แทน agar ในงานวิเคราะห์ต่างๆ อีกมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
35854

หลักการ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis นี้ตำแหน่งของดีเอ็นเอ (DNA fragment) บนเจลจะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะสอดแทรก (intercalate DNA) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเรืองแสงในช่วงคลื่นของอุลตราไวโอเลต ($\lambda = 295$ nm)

ในการวิเคราะห์จะอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอกาโรส (agarose gel) เช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนใน polyacrylamide gel โดยขึ้นกับ

1. ขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวง จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายเส้น
3. ความเข้มข้นของเจล ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ในเจล ที่มีความเข้มข้นสูงได้ช้ากว่าที่มีความเข้มข้นต่ำ
4. กระแสไฟฟ้า และแรงเคลื่อนไฟฟ้า

สำหรับบัฟเฟอร์ (buffers) ที่ใช้ในการ run gel electrophoresis ของดีเอ็นเอจะใช้บัฟเฟอร์ pH 8 เช่น Tris-acetate, Tris- borate และ Tris- phosphate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกัน คือ

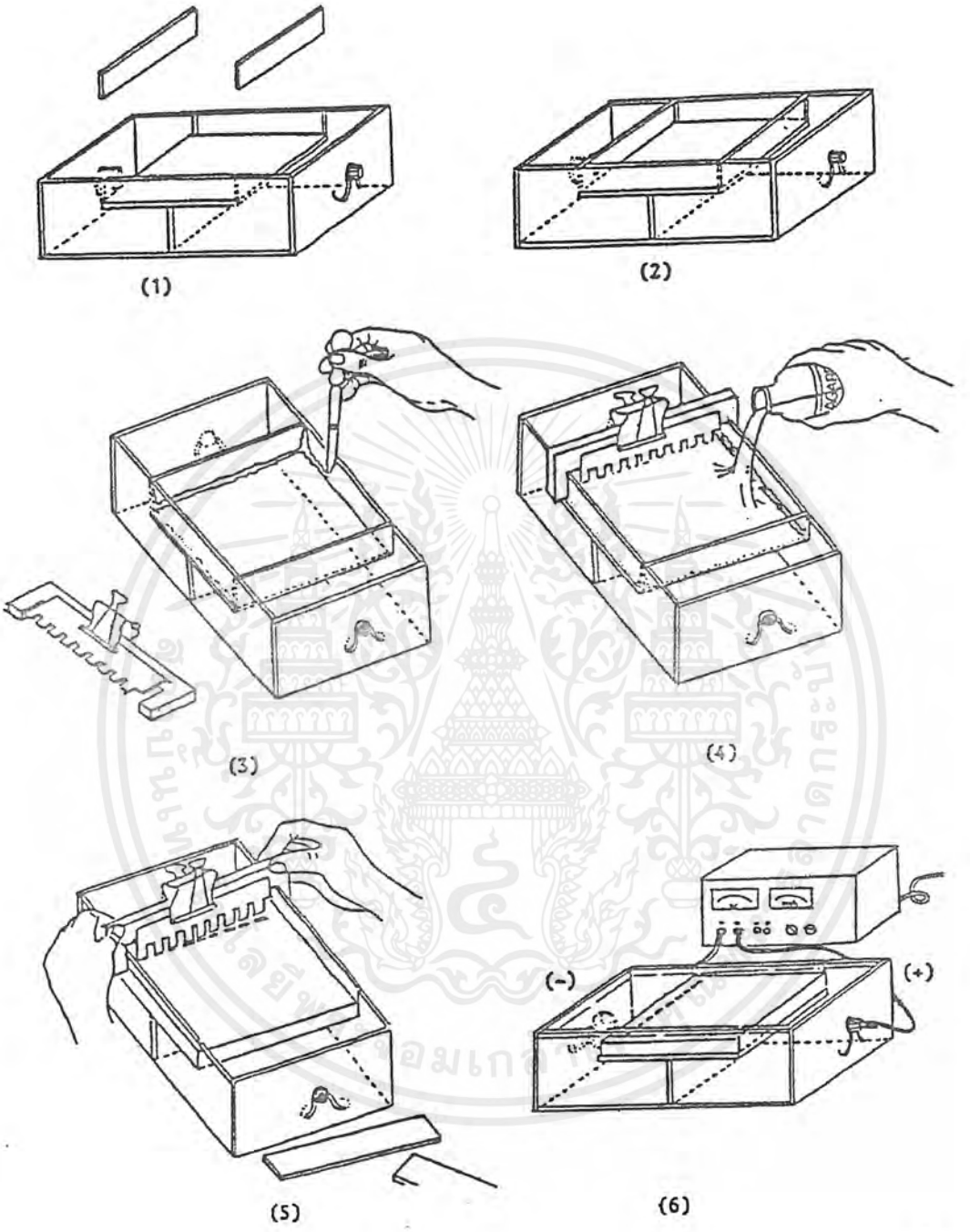
Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจล ยาวๆ หรือนานๆ

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากกรดบอริค เป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์ จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์นี้ได้นาน

Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่จะนำเจล นั้นไปละลายโดยใช้โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) หรือโซเดียมเปอร์คลอเรท (sodiumperchlorate)

Agarose gel electrophoresis สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีลักษณะต่างกัน เช่น linear, open circular, close circular หรือ cross linked ออกจากกันได้ และผู้ใช้สามารถปรับรูตาข่ายของเจล ให้เหมาะสมกับงานโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเจล ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมเจลเพื่อการแยกดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis
(สุมาลี ตั้งประดับกุล และคณะ, 2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

1. จุลินทรีย์

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 capitis* ATCC 27840

1.6 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990

1.7 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

1.8 *Bacillus cereus* ●

1.9 *Bacillus subtilis* ●

1.10 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 357

1.11 *Proteus vulgaris* ●

1.12 *Serratia sp.* ●

1.13 *Escherichia coli* ●

1.14 *Micrococcus sp.* ●

1.15 *Mycobacterium sp.* ●

● เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ATCC : American Type Culture Collection

TISTR : Thailand Institute of Scientific and Technological Research

2. อุปกรณ์

2.1 Agarose gel electrophoresis chamber และ comb (STRATAGENE)

2.2 Power supply (BIO-RAD)

2.3 UV transIluminator (Hoefer)

2.4 Electrophoresis apparatus (STRATAGENE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 Spectrophotometer (LABQUIP)

2.6 DNA Thermal cycle (HibAID)

2.7 Microwave

2.8 Vortex mixer

2.9 Microcentrifuge (MIKRO)

2.10 Micropipette

2.11 Tip

2.12 Stirrer และ Magnetic bar

2.13 Hot air oven

2.14 Hot plate

2.15 Incubator

2.16 Larminar air flow

2.17 Shaker

2.18 Autoclave (Harvey)

2.19 Pipette ขนาด 10, 5, 1.0 และ 0.1 มิลลิลิตร

2.20 Flask ขนาด 1,000, 500 และ 100 มิลลิลิตร

2.21 กระบอกตวง ขนาด 1,000, 500 และ 100 มิลลิลิตร

2.22 Microfuge tube ขนาด 1.5 และ 0.5 มิลลิลิตร

2.23 ตู้เย็น 4°C, -20°C และ -70°C

2.24 เครื่องชั่ง

2.25 จานเพาะเชื้อ

2.26 ถุงมือยาง

2.27 กล้องถ่ายรูป Agarose gel

3. สารเคมี

3.1 Nutrient broth [Beef Extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Agar 15.0 g, Distilled water 1.0 L]

3.2 Nutrient agar [Beef Extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Distilled water 1.0 L]

3.3 Solution I [100mM Tris-HCL (pH7.5), 10 mM EDTA]

3.4 Solution II [200 mM NaOH, 1% SDS]

3.5 Solution III [3 M Potassium, 5 M acetate solution]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 Isopropanal

3.7 70% ethanol

3.8 TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)]

3.9 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.10 สารละลาย 10X PCR buffer [100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% TritonX-100 ; pH 9.5] (GIBCOBRL)

3.11 สารละลาย dNTP [1.25 mM each dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ใน 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA ; pH 7.0] (Promega)

3.12 25 mM $MgCl_2$ (Promega)

3.13 primer 100 pM/µl

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

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

3.14 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5U/µl (Promega)

3.15 สารละลาย 10X TAE buffer [40 mM Tris Acetate, 2 mM EDTA]

3.16 Loading dye [0.1% (w/v) Bromphenol blue, 40% (w/v) Ficoll 400, 5 mM EDTA, 0.25% (w/v) SDS] (BIORAD)

3.17 DNA size marker

Lambda DNA/*Hin*d III Marker (Promega)

100 bp Marker (BIORAD)

3.18 สารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 µg/ml

3.19 Agarose (Promega)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

1.1 สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงไว้ในตารางที่ 1 ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* 4 สายพันธุ์ เชื้อ *Staphylococcus aureus* 3 สายพันธุ์ เชื้อ *Bacillus* เป็นตัวแทนเชื้อแกรมลบ 2 สายพันธุ์ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa Proteus vulgaris* และ *Seratia sp.* เป็นตัวแทนเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เชื้อ *E. coli* เป็นตัวแทนของเชื้อที่พบในมนุษย์และสัตว์ เชื้อ *Micrococcus sp.* และเชื้อ *Mycobacterium sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวแทนเชื้อที่พบปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้เป็นตัวยืนยันผลการทดลอง จากนั้นใช้ loop ลนไฟให้ร้อนแดง ทิ้งให้เย็น เขี่ยเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้ออื่นๆ จาก stock ใส่ลงในหลอดอาหาร NB โดยใช้ 1 หลอดต่อ 1 เชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 คืน

1.2 นำหลอดเลี้ยงเชื้อที่เจริญแล้วโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่ 4°C

ตารางที่ 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาและ แหล่งที่มา

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งที่มา
Staphylococcus aureus	ATCC 13565
Staphylococcus aureus	ATCC 14458
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Staphylococcus aureus	●
Staphylococcus capitis	ATCC 27840
Staphylococcus epidermidis	ATCC 14990
Staphylococcus saprophyticus	ATCC 15305
Bacillus cereus	●
Bacillus subtilis	●
Pseudomonas aeruginosa	TISTR 357
Proteus vulgaris	●
Serratia sp.	●
Escherichia coli	●
Micrococcus sp.	●
Mycobacterium sp.	●

ATCC : American Type Culture Collection

TISTR : Thailand Institute of Scientific and Technological Research

● เชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 ใช้ pipette ดูด culture ของเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน Microfuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 นำไป Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์จุลินทรีย์

2.3 ใช้ Micropipette ดูดส่วนใส (supernatant) ออกให้เหลือแต่ตะกอนของจุลินทรีย์

2.4 เติม Solution I ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เพื่อทำให้เซลล์แตก

2.5 เติม Solution II ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา เพื่อแยกโปรตีน

2.6 เติม Solution III ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา เพื่อตกตะกอนโปรตีน

2.7 นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ

2.8 ใช้ Micropipette ดูดส่วนใสใส่ใน Microfuge tube ใหม่ (ไม่ควรให้ตะกอนของเซลล์ติดมาด้วย)

2.9 เติม Isopropanal ปริมาตร 420 µl (0.7 vol) ลงในหลอดที่ใส่ส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการตกตะกอน

2.10 นำไป Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอ

2.11 ใช้ Micropipette ดูดส่วนของ supernatant ออกให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างด้วย 70 % ethanol

2.12 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง

2.13 เติม TE buffer ปริมาตร 50 µl เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วนำส่วนหนึ่งมาทำ Agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหา genomic DNA ของจุลินทรีย์แต่ละตัวเทียบกับ DNA size marker คือ Lambda DNA/*Hin*d III marker (Promega)

2.14 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การออกแบบ Primer

ออกแบบ Primer ที่มีความเป็นคู่สมกับลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของเชื้อ *S. aureus* โดยอาศัยการค้นหาลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของเชื้อชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลใน GenBank แล้วจึงใช้คอมพิวเตอร์ทำการ alignment อีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาช่วงลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น

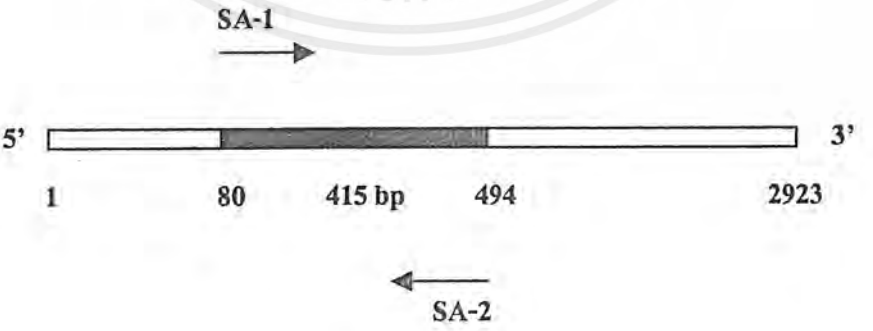
3.1 ค้นหาลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus* จากฐานข้อมูลของ GenBank

3.2 นำเอาข้อมูลลำดับเบสจากข้อ 3.1 มาทำการ alignment เพื่อเปรียบเทียบหาช่วงที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น แต่มีความแตกต่างกับเชื้อชนิดอื่นโดยใช้โปรแกรม BLAST

3.3 เลือกช่วงลำดับเบสที่ 80 ถึงลำดับเบสที่ 494 ของเชื้อ *S. aureus* ที่มีความยาว 415 bp มาเพื่อทำการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR เนื่องจากช่วงดังกล่าว มีความแตกต่างจากลำดับเบสของเชื้ออื่นๆ (รูปที่ 3)

3.4 ออกแบบ primer จากช่วงลำดับเบสดังกล่าว แล้วตรวจสอบความเหมาะสมโดยให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus* เท่านั้นด้วย Program Oligo จนได้ primer SA-1 และ SA-2 (รูปที่ 4)

3.5 primer ดังกล่าวได้ให้ทางสวทช. (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) เป็นผู้สังเคราะห์ และเป็นprimer ชนิด purified grade primer ที่ได้จะมีความเป็นคู่สมกับลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus* เท่านั้น และมีความแตกต่างจากลำดับเบสของเชื้อ อื่นๆ จากฐานข้อมูลใน GenBank เมื่อนำ primer ทั้งสองไปทำการจำลองสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR คาดว่าจะได้ PCR product ที่มีความยาว 415 bp



รูปที่ 3 ตำแหน่ง primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ขนาด 415 bp ของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SA-1 SA-2

5' ATCAAAGAAGGTAATAATCC 3' 3'GTCCATTGTGACTTACATCC 5'

80 494

5'AATCAAAGAAGGTAATAATCCT.....TTCAGGTAACACTGAATGGAGGA 3'

รูปที่ 4 ไพร์เมอร์ทั้ง 2 ชนิด (SA-1และSA-2) และลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus* เฉพาะบริเวณที่เป็นคู่สมกับไพร์เมอร์

(ลำดับเบสของยีน 23S rRNA ของ *S. aureus* ได้มาจากฐานข้อมูลในGenBank หมายเลข X68425 ของ Ludwig,W. และ PCR product ที่ได้จะมีขนาด 415 bp)

4. การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการทำ PCR ทุกขั้นตอน ก่อนนำเข้าเครื่อง DNA Thermal Cycle ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°C หรือบนน้ำแข็ง เพื่อรักษาประสิทธิภาพของสารเคมีและเอนไซม์ต่างๆ ให้ทำงานได้ดีอยู่เสมอ

4.1 เตรียม PCR mixture ในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่น	26.75×15 = 401.25	-
10X PCR buffer	5×15 = 75	10mM Tris-HCl(pH9 at25°C) 50mM KCl, 0.1% TritonX-100
10X dNTP	5×15 = 75	200 pM/µl
100 pM/µl SA-1primer	5×15 = 75	10 pM/µl
100 pM/µl SA-2primer	5×15 = 75	10 pM/µl
25 mM $MgCl_2$	3×15 = 45	1.5 mM
5 U/µl *Taq* DNA-polymerase	0.25×15 = 3.75	0.025 U/µl

แล้วผสมให้เข้ากัน

4.2 ใช้ micropipette ดูด PCR mixture 40 µl ผสมเข้ากับสารละลาย DNA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

4.3 เริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในช่วง 80-494 bp ของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23S rRNA ของ *S. aureus* 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

(DNA Thermal Cycle ของบริษัท HibAID)

5.วิธีการวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

5.1 เตรียมวุ้น Agarose เข้มข้น 2% (w/v) ในสารละลาย 1X TAE [Agarose 0.8 g, 1X TAE 40 ml]ให้ความร้อนโดยใช้ Microwave ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทลงในelectrophoresis chamber

5.2 เมื่อวุ้นแข็งตัว จึงเทสารละลาย 1X TAE ลงใน chamber ให้ท่วมผิวหน้าวุ้น

5.3 ดูดสารละลาย PCR product ในแต่ละหลอดปริมาตร 5 µl ผสมกับ Loading dye 1µl แล้วหยอดลงไปในแต่ละช่อง

5.4 ใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ที่ 100 volts จนกระทั่งสีของ loading dye เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายด้านตรงข้าม จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

5.5 ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 µg/ml นาน 10 นาที

5.6 ตรวจดูแถบของสารพันธุกรรม (DNA) โดยสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV-transilluminator แล้วบันทึกผล โดยเปรียบเทียบกับ DNA size marker Ez Load 100 bp Molecular Ruler markersที่ได้หยอดในช่องก่อนที่จะเริ่มการทำ Electrophoresis

6. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR

เป็นการทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอของ 23S rRNAที่น้อยที่สุด ที่สามารถตรวจหาได้ด้วยวิธี PCR ในการศึกษาครั้งนี้เลือกเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มาใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบ

6.1 เตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

6.2 สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ที่เตรียมได้จาก 6.1 ตามวิธีการในหัวข้อการสกัดดีเอ็นเอ

6.3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spectrophotometer เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ (μg/ml)

(1 OD_{260} = ปริมาณดีเอ็นเอ 25 μg/ml)

6.4 ทำละลาย DNA dilution ด้วย TE buffer (pH 8.0) ให้มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg และ 10 fg ตามลำดับ

6.5 นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีปริมาณต่างกันในแต่ละหลอดมาทำ PCR ตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ การทำ Polymerase Chain Reaction

6.6 ทำการวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

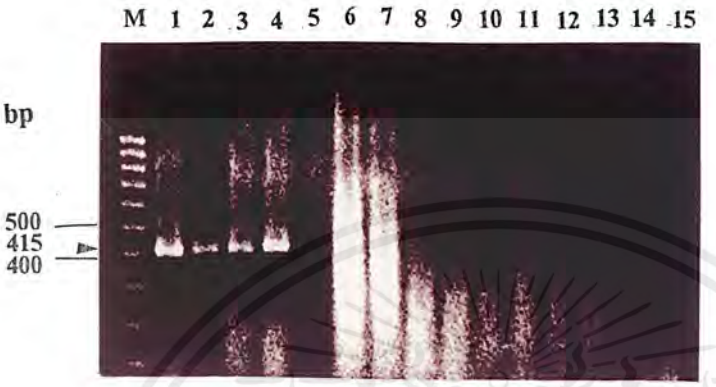
1. การทดลองความจำเพาะเจาะจงของเทคนิค PCR

จากการทดลองทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 12 ชนิดเป็น template ใช้ SA-1 และ SA-2 เป็น primer ภายใต้สภาวะอุณหภูมิดังที่กล่าวมาแล้ว ปรากฏว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* (ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 25923 และสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) ให้ผลบวก (+) (ตารางที่ 2, รูปที่ 5 lanes ที่ 1-4) และได้ PCR product ขนาด 415 bp ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งหมดให้ผลลบ (-) (ตารางที่ 2, รูปที่ 5 lanes ที่ 5-15) โดยจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค PCR นี้จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้นโดยจะเกิด PCR product 1แถบที่ตำแหน่ง 415 bpและไม่เกิดปฏิกิริยากับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆที่นำมาทำการทดลอง (*Staphylococcus* 3 สายพันธุ์ รวมทั้งจุลินทรีย์อื่นๆ 8 สายพันธุ์) ไม่เกิด PCR product ใดๆ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* เทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นด้วยเทคนิค PCR

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ผลการตรวจสอบ
Staphylococcus aureus ATCC 13565	+
Staphylococcus aureus ATCC 14458	+
Staphylococcus aureus ATCC 25923	+
Staphylococcus aureus ●	+
Staphylococcus capitis ATCC 27840	-
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	-
*Staphylococcus saprophyticus*ATCC15305	-
Bacillus cereus ●	-
Bacillus subtilis ●	-
Pseudomonas aeruginosa TISTR 357	-
Proteus vulgaris ●	-
Serratia sp. ●	-
Escherichia coli ●	-
Micrococcus sp. ●	-
Mycobacterium sp. ●	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1 *S. aureu* 13565
2 *S. aureu* 14458
3 *S. aureu* 25923
4 *S. aureu* *
5 *S. capitis*
6 *S. epidermidis*
7 *S. saprophyticus*
8 *B. cereus*
9 *B. subtilis*
10 *P. aeruginosa*
11*Proteus vulgaris*
12 *E. coli*
13 *Micrococcus*
14 *Mycobacterium*
15 *Serratia*

รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิค PCR ด้วยวิธีAgarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิค PCR ในเชื้อทั้ง 15 สายพันธุ์ PCR product ขนาด 415 bp ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 23S rRNA จะถูกแยกใน 2% agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอโดยสารละลาย Ethidium bromide ใน lanes m เป็น DNA size markers ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอทางด้านซ้าย lanes 1-4 แสดง PCR product ของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 25923 และสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตามลำดับ ส่วน lanes ที่ 5-15 เป็นผลการทำ PCR ของเชื้อ *S. capitis* ATCC 27840, *S..epidermidis* ATCC14990, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *B. cereus* ●, *B. subtilis*●, *P. aeruginosa* TISTR 357, *Proteus vulgaris* ●, *Serratia sp.* ●, *E. coli* ●, *Micrococcus sp.*●และ *Mycobacterium sp.*●

● เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR

ในการทดลองการตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค PCR ได้ และได้ PCR product ขนาด 415 bp คือ 10 ng ถ้ามีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่านี้ จะไม่สามารถเห็นผลการย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ด้วยวิธีนี้ได้ (รูปที่ 6 lanes 1-3) โดยจะเกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบใน lanes ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 µg, 100 ng และ 10 ng ที่ตำแหน่ง 415 bp โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงมาตามลำดับ (1 µg, 100 ng และ 10 ng) เนื่องจากมีปริมาณ DNA template ที่น้อยลงมาก ส่วนใน lanes ที่ 4-9 (ปริมาณDNA 1 ng - 10fg) ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งดังกล่าว อาจเนื่องมาจากมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยเกินไปไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR นี้

รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923

PCR product (415 bp) จะถูกแยกใน 2% agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอโดยสารละลาย Ethidium bromide ใน lanes m เป็น DNA size markers ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอทางด้านซ้าย lanes 1-10 มีปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg และ 10 fg ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาครั้งนี้ การวางแผนการทดลอง ตลอดจนทุกขั้นตอนของกระบวนการทดลองมีความสำคัญมากเพราะจะส่งผลโดยตรงกับ PCR product ที่จะได้ (415 bp) โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จึงเลือกใช้เชื้อที่มาจาก 1 โคโลนี และทุกขั้นตอนในระหว่างทำการคัดเลือก และเพาะเลี้ยงต้องปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการ contaminate จากเชื้อชนิดอื่น ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ไม่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของเชื้ออื่น ต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสม ตั้งแต่การสลายเซลล์ จนถึงขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ เช่น เวลา ความปลอดเชื้อ และการ mixing ซึ่งต้องไม่รุนแรงเพื่อป้องกันการขาดของดีเอ็นเอเป็นต้น ซึ่งจากการทดลองได้ปริมาณ genomic DNA ของเชื้อทั้ง 15 สายพันธุ์พอสมควร ซึ่งอาจสูญเสียไปบ้างในบางขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอ การทำ PCR ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวเป็นสิ่งสำคัญ เพราะถ้าไม่เหมาะสมแล้วจะได้ PCR product ที่น้อย หรืออาจเกิด nonspecific ขึ้นได้ primer ที่ออกแบบต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีความจำเพาะกับ *S. aureus* และเหมาะสมจริงจึงจะสังเคราะห์ได้ ในการทดลองนี้ใช้ Program Oligo ในการตรวจสอบซึ่งได้ผลดี ช่วยให้การทำงานรวดเร็วขึ้น ส่วนที่สำคัญอีกอย่างในการทำ PCR คือ การกำหนดอุณหภูมิ และจำนวนรอบของเครื่อง DNA Thermal Cycle ให้เหมาะสมจึงจะทำให้ได้ PCR product ที่ถูกต้องและมีปริมาณมาก ในขั้นตอนสุดท้ายการตรวจวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ส่วนที่สำคัญ คือ ต้องเลือกเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ agarose gel ให้เหมาะสมกับขนาดของ PCR product ที่จะตรวจสอบ การศึกษาครั้งนี้เลือก 2% agarose gel เนื่องจาก PCR product มีขนาด 415 bp ซึ่งเหมาะสมกับเปอร์เซ็นต์เจลดังกล่าว (0.1-3 Kb) DNA size markers เลือกใช้ EZ Load 100 bp Molecular Ruler markers เนื่องจากมีตำแหน่งเบสที่ 400-500 bp ชัดเจน เหมาะสำหรับตรวจดูขนาดของ PCR product ที่สนใจซึ่งมีขนาด 415 bp การทดลองจะไม่มีการเติม Ethidium bromide ผสมกับเจลโดยตรง จะใช้วิธีแช่แผ่นเจลลงไปแทน เพื่อความปลอดภัยของผู้ทำการทดลอง (Ethidium bromide เป็นสารเคมีซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง) ทั้งนี้ผู้ทำการทดลองต้องป้องกันตัวเองโดยสวมถุงมือยางทุกครั้งที่ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 23S rRNA โดยอาศัย primers 2 ชนิดคือ

SA-1 5'-ATCAAAGAAGGTAATAATCC-3'

SA-2 5'-CCTCCATTCAGTGTTACCTG-3'

ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อให้เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 23S rRNA ลำดับเบสที่ 80 ถึง 494 ของเชื้อ *S. aureus* โดยเฉพาะ ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 415 bp ภายใต้สภาวะใน DNA Thermal Cycle 95°C 5 นาที 1 รอบ เพื่อกระตุ้นปฏิกิริยาในการเริ่มต้น, 95°C 45 วินาที ในการ Denaturation สายดีเอ็นเอ 55°C 45 วินาที ในการ extension และ 72°C 45 วินาที ในการ annealing เป็นจำนวน 30 รอบ สุดท้ายที่ 72°C 7 นาที 1 รอบ ในการ final extension เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่า ในจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อทั้งหมด 15 สายพันธุ์ที่นำมาทำ PCR เกิด PCR product ขนาด 415 bp เฉพาะสายพันธุ์ของ *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 14458, *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ อาคารสมเด็จพระเทพฯ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เท่านั้น โดยจะสังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอของ PCR product 1 แถบของแต่ละสายพันธุ์บน agarose gel ที่อยู่สูงจากตำแหน่ง 400 bp เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ DNA size markers ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นตำแหน่งที่ 415 bp ส่วนเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่งดังกล่าวทำให้เราทราบว่า primer ทั้ง SA-1 และ SA-2ที่เราออกแบบมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะกับเชื้อ *S. aureus* เท่านั้นและ ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมถึงสภาวะต่างๆ ในการทำ PCR ด้วยวิธีนี้สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ได้จริงทั้งยังให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และยังสามารถตรวจสอบได้ในเวลาอันสั้น (เพียงประมาณ 3 ชั่วโมง) ได้อีกด้วย

การตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR มีจุดมุ่งหมายที่จะหาความไว (sensitivity) ของเทคนิคนี้ ในการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยหาว่าปริมาณ DNA template เท่าใดจะเป็นปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุด ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR วิธีนี้ โดยทำเจือจางปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มาเป็นเชื้อตัวอย่าง ให้มีปริมาณ 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg และ 10 fg ตามลำดับ แล้วทำ PCR ตามขั้นตอนข้างต้น จากการตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอ 1 μg, 100 ng

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 10 ng สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR วิธีนี้ และปริมาณดีเอ็นเอ 10 ng เป็นปริมาณ DNA template ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ สังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอของ PCR product ที่ตำแหน่ง 415 bp บน agarose gel เมื่อดูเทียบกับ DNA size markers ทำให้เราทราบได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีนี้อย่างน้อยต้องมีปริมาณ 10 ng จึงจะตรวจสอบได้ (รูปที่6) แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบ *S. aureus* ด้วยวิธีนี้มีความไวและประสิทธิภาพสูง แม้มีปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ($\geq$ 10 ng) แต่เรายังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ PCR ให้สูงขึ้นได้อีกโดยการเพิ่มจำนวนรอบในการทำ PCR หรือใช้วิธี Double amplification หรือ Nested PCR (Wilson และคณะ, 1991)

จากการศึกษาจะพบว่า Primer SA-1 และ SA-2 รวมถึงสภาวะต่างๆ ในการทำ PCR ด้วยวิธีนี้ มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงในการใช้ตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว ความไวในการตรวจสอบมีมาก แม้มีปริมาณของดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างน้อยมากเพียง 10 ng เหล่านี้เป็นข้อดีที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การตรวจสอบอาหารที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนจาก *S. aureus* การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ตามแหล่งน้ำ หรือตรวจสอบหา *S. aureus* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิคของคนไข้ในกรณีที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* เป็นต้น

ในอนาคตเรายังสามารถนำเอาความรู้และข้อมูลจากการทดลองนี้ไปศึกษาต่อ เพื่อพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ให้มีความรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น โดยอาจจะเปลี่ยนช่วงของยีนที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน หรือปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ให้มีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้น รวมไปถึงการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้ออื่นๆ ด้วย ส่วนการตรวจสอบประสิทธิภาพของการทำ PCR ในอนาคต อาจมีการพัฒนาหาจำนวนเซลล์ของเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR ซึ่งจะทำให้ทราบความไวของปฏิกิริยาได้ อีกทางหนึ่งจะทำให้ทราบสภาวะและองค์ประกอบที่เหมาะสมต่อการใช้เทคนิค PCR และสามารถนำไปปรับปรุงใช้ในงานครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ลักษณะของเชื้อ *S. aureus* และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของแบคทีเรีย	แกรม	ความต้องการอากาศ	ลักษณะทั่วไป
Staphylococcus aureus	+	Facultative anaerobe	รูปร่างกลมเกาะกันเป็นกลุ่มไม่เคลื่อนที่ เป็นปรสิตที่ผิวหนัง เยื่อเมือกขอคนสัตว์เลือดอุ่น ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ
Staphylococcus capitis	+	Facultative anaerobe	เซลล์ทรงกลมไม่เคลื่อนที่ คาตาเลสให้ผลบวก เป็นปรสิตที่ผิวหนัง
Staphylococcus epidermidis	+	Facultative anaerobe	เซลล์ทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ให้ผลโค-แอกกูเลสเป็นลบ ทำให้เกิดการติดเชื้อ
Staphylococcus saprophyticus	+	Facultative Anaerobe	เซลล์ทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ให้ผลโค-แอกกูเลสเป็นลบ ทำให้เกิดการติดเชื้อ
Bacillus cereus	+	Faculative Anaerobe	รูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ พบในลำไส้คนและสัตว์ อาจทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ
Bacillus subtilis	+	Faculative Anaerobe	รูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ พบในลำไส้คนและสัตว์
Pseudomonas aeruginosa	-	Aerobic	รูปท่อน เคลื่อนที่ได้ เป็นแซโพรไฟต์ในดินในน้ำ อาจทำให้เกิดโรค
Serratia sp.	-	Facultative anaerobe	รูปท่อน พบทั่วไปในดิน น้ำ ผิวของพืช อาจทำให้เกิดโรค
Proteus vulgaris	-	Facultative anaerobe	รูปท่อน พบในลำไส้คน สัตว์ น้ำเสีย ในดิน ทำให้เกิดโรคในคน
Escherichia coli	-	Facultative anaerobe	รูปท่อน พบในลำไส้คน สัตว์เลือดอุ่น เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น
Micrococcus sp.	+	Facultative anaerobe	ทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ เป็นแซโพรไฟต์ ไม่ก่อโรค มักอยู่ในดิน น้ำจืด
Mycobacterium sp.	+	Facultative anaerobe	รูปท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย ทนกรด เป็นแซโพรไฟต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจหาโคลิฟอร์มทั้งหมดของ *Staphylococcus aureus* โดยแสดงปริมาณในรูปของเอ็มพีเอ็น (Most probable number, MPN) ต่อกรัม

1. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 25 กรัม
2. เติม phosphate buffer (PB) pH 7.2 225 มิลลิลิตร
3. บดด้วยเครื่อง Stomaching เป็นเวลา 1 นาที
4. เจือจางตัวอย่างที่ได้เป็น 10^{-2} และ 10^{-3} โดยใช้ PB pH 7.2
5. นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วที่ 10^{-1} ,10^{-2}, 10^{-3} มาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่บรรจุอาหาร Trypticase Soy 10% NaCl broth (10%NaCl TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
6. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหาร 1 ลูป Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salted Egg Yolk Agar (MS-EY)
8. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง
9. สังเกตจากโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารจะเป็นสีเหลืองแสดงปริมาณในรูปของ MPN โดยคำนวณจากจำนวนของหลอดอาหารที่ให้ผลโคแอกูเลส เป็นบวก (coagulase positive)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

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

ภาคผนวก ง

ความเข้มข้นของ Buffer ที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้	ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ต่อลิตร
Tris-acetate (TAE)	0.04 M Tris-acetate 0.002 M EDTA	50 เท่า : 242 gm Tris-base 57.1 ml glacial acetic acid 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	0.08 M Tris-phosphate 0.008 M EDTA	10 เท่า : 100 gm Tris-base 15.5 ml of 85% phosphoric acid (1.679 µg/ml) 40 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)
Tris- borate (TBE)	0.089 M Tris 0.089 M boric acid 0.002 M EDTA	10 เท่า : 108 gm Tris-base 55 gm boric acid 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจลยาวๆ หรือใช้เวลานานๆ

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากกรดบอริค เป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์ จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์นี้ได้นาน เหมาะสำหรับการใช้วิเคราะห์เป็นประจำ

Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่จะนำเจลนั้นไปละลายโดยใช้โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) หรือโซเดียมเปอร์คลอเรท (sodiumperchlorate) เพื่อนำ DNA ไปวิเคราะห์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

แสดงข้อกำหนดทางด้านจุลินทรีย์ (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ภายในประเทศ)

ชนิดของจุลินทรีย์	หน่วย	ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีได้		
		I	II	III
Total Plate count	colony/gm	< 100,000	< 100,000, 30C	< 500,000, 30C
Coliforms	MPN, col/gm	< 500	< 5,000	
E. coli	MPN, col/gm	Negative		< 3
Clostridium perfringen	colony/gm	Negative in 10 g		Negative in 0.1g
Staphylococcus aureus	colony/gm	Negative in 10 g	< 100	Negative in 0.1g
Fecal Streptococci	colony/gm	< 1,000	< 1,000	
Salmonella	colony/gm	Negative in 25 g	Negative in 25 g	Negative in 25 g
Yeast and Mold	colony/gm	< 100		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539. การติดเชื้อและการเป็นพิษของอาหาร จุลชีววิทยาทั่วไป, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 226-277, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536. การออกแบบและการปรับหาสภาวะพอเหมาะของ PCR ทฤษฎี & การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology , พิมพ์ครั้งแรก หน้า 154-162, โรงพิมพ์เรือนแก้ว

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536. วิวัฒนาการของ PCR technology ทฤษฎี & การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology , พิมพ์ครั้งแรก หน้า 5-10, โรงพิมพ์เรือนแก้ว

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539. เทคนิคการโคลนยีนที่เพิ่มขยายโดยวิธีพีซีอาร์ การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540. เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบและจำแนกจีโนม การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1

สุมาลี ตั้งประดับกุล, นารีรัตน์ วิเศษกุล, เพียงจันทร์ ราชกุลชัย, วันทณี ธนาบุญชัย, สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล, สุณี เกิดบัณฑิต, ชนันทร์ อังศุธนสมบัติ, มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, รัชฎา เสริฐศรีวนิช, โชคชัย อินทพฤกษ์, สกล พันธุ์ยิ้ม, 2539. ขั้นตอนการย้ายยีน β-galactosidase คู่มือทดลองในภาคปฏิบัติการ เรื่อง เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 150-154, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุมาลี เหลืองสกุล, 2539. จุลชีววิทยาทางอาหาร (FOOD MICROBIOLOGY) (ฉบับปรับปรุงใหม่), พิมพ์ครั้งที่ 3 หน้า 220-227, โรงพิมพ์ชัยเจริญ

อรอนงค์ รัชตราเชนชัย, 2540. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ PCR, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 24-33, สำนักพิมพ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Aranda, E., Rodriguez, M. M., Asensio, M. A. and Córdoba, J. J. (1997) Detection of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in foods by PCR and DNA probe. Letters in Applied Microbiology 25, 186-190.

Becker, K., Roth, R. and Peters, G. (1998) Rapid and specific detection of toxigenic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus : use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin gene, exfoliative toxin gene and toxin shock syndrome toxin 1 gene. Journal of Clinical Microbiology 36, 2548-2553.

Fach , P., Hauser, D., Guillou, J. P. and Popoff, M. R. (1993) Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food sample. Journal of Applied Bacteriology 75, 234-239.

Mendoza, M., Meugnier, H., Bes, M., Etienne, J. and Freney, Jean . (1998) Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 1049-1055.

Saruta, K., Hoshina, S. and Machida, K. (1995) Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. Microbiology and Immunology 39, 839-844.

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

Takeshi, K., Fujinaga ,Y., Inoue, K., Nakajima, H., Oguma, K., Ueno, T., Sunagawa, H. and Ohyama, T. (1996) Simple Method for Detection of*Clostridium botulinum* Type A to F Neurotoxin Genes by Polymerase Chain Reaction. Microbiology and Immunology 40(1), 5-11.

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

Wang, R. F., Coa, W. W., Franklin, W., Campbell, W. and Cerniglia, C. E. (1994) A 16S rDNA-based PCR mehod for rapid and specific detection of *Clostridium perfringen* in food. Molecular and Cellular Probes 8, 131-138.

Wilson, I. G., Cooper, J. E. and Gilmour, A. (1991) Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the Polymerase Chain Reaction for amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin gene *ent B* and *ent C1* and the thermonuclease gene *nuc*. Applied and Environmental Microbiology 57, 1793-1798.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้