สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจัดจำแนกชนิดของไกลดิงแบคทีเรียด้วยวิธีการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S Ribosomal DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

นางสาวประดินันท์ เอี่ยมสะอาด

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67269
วัน,เดือน,ปี 2 2 พ.ย. 2549

b 11662691
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Classification and Identification of Gliding bacteria by Sequence analysis of 16S Ribosomal DNA genes amplified by Polymerase Chain Reaction

Pradinan Aemsaard

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจัดจำแนกชนิดของไกลดิงแบคทีเรียด้วยวิธีการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S Ribosomal DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

นักศึกษา นางสาว ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด รหัสประจำตัว 45050753

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นายพรพจน์ ศรีสุขชยะกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ นายพรพจน์ ศรีสุขชยะกุล	

.....

รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การจัดจำแนกชนิดของไกลดิงแบคทีเรียด้วยวิธีการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S Ribosomal DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction
นักศึกษา	นางสาวประดินันท์ เอี่ยมสะอาด รหัสประจำตัว 45050753
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายพรพจน์ ศรีสุขชยะกุล

บทคัดย่อ

เชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แก่ 96GB 37GB 66GB 38GB และ 83GB ที่เก็บรักษาไว้แบบระเหิดแห้ง นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้ สายพันธุ์ 96GB และ 37GB เลี้ยงในอาหาร SAP2 agar และ SAP2 broth ส่วนสายพันธุ์ 66GB 38GB และ 83GB เลี้ยงในอาหาร CYE agar และ CYE broth เป็นเวลา 3 - 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ และนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว มีลำดับเบสดังนี้คือ BF_1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ BR_1(5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') ดีเอ็นเอที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย GFX PCR DNA และ Gel Band Purification kit ก่อนที่จะทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยวิธี Direct Sequencing จากนั้นจึงนำลำดับเบสของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อไกลดิงแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 96GB 37GB 66GB และ 38GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ 96GB และ 37GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Flexithrix เช่นเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์กัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 92 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ 66GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Microscilla โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ 38GB เป็น จีนัส Flexibacter ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอร์เซ็นต์ และอีก 1 สายพันธุ์ได้แก่ 83GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cytophaga marina* มี Accession Number D12667 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Classification and Identification of Gliding bacteria by Sequence analysis of 16S Ribosomal DNA genes amplified by Polymerase Chain Reaction
Name	Miss Pradinan Aemsaard
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Asst.Prof. Dr. Anurug Poeaim
Special Project Coadvisor	Mr. Phompoj Srisukchayakul

Abstract

Five Strains of lyophillization gliding bacteria : 96GB, 37GB, 66GB, 38GB and 83GB were cultured on optimum media, 96GB and 37GB were cultured on SAP2 agar and SAP2 broth but 66GB, 38GB and 83GB were cultured on CYE agar and CYE broth for 3 – 4 days at 30^0C. The 5 strains of gliding bacteria were extracted DNA by Wizard® Genomic DNA Purification Kit and amplified 16S rDNA by PCR with 2 primers, BF_1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and BR_1 (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Then PCR products were purified by GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit before the 16S rDNA genes were sequenced by Direct sequencing method. And the last, DNA sequence of 5 strains were compared with database in NCBI. The results was showed that 4 strains : 96GB, 37GB, 66GB and 38GB of gliding bacteria were new species of gliding bacteria. Both trains, 96GB and 37GB were genus flexithrix but species differentiation with identities at 92% and 96%, respectively. The strain 66GB was genus microscilla with identities 97% and the strain 38GB was genus flexibacter with identities 97%. The strain 83GB was *Cytophaga marina* Accession Number D12667 with Identities at 100%.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้ต้องขอขอบคุณ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่างๆ และกรุณาเป็นกรรมการในการสอบ ที่สำคัญต้องขอขอบคุณ คุณพรพจน์ ศรีสุขชยะกุล ซึ่งเป็นผู้ควบคุมการทำปฏิบัติการจนสำเร็จลุล่วง รวมทั้งให้คำแนะนำที่ดี และเทคนิควิธีการต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำการทดลอง และขอบคุณ คุณฉัตรฤดี สุวรรณชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไกลดิงแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาให้คำปรึกษา รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำการทดลอง จนทำให้โครงงานพิเศษของข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้จัดทำ

มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

กิตติกรรมประกาศ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญรูป..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญของไกลดิงแบคทีเรีย..... 1

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ..... 1

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ

ไกลดิงแบคทีเรีย..... 3

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส..... 15

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์..... 25

วิธีการทดลอง..... 27

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวิจัย..... 32

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย..... 34

ข้อเสนอแนะ..... 35

เอกสารอ้างอิง..... 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..... 38

ภาคผนวก ข..... 40

ภาคผนวก ค..... 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียบนอาหารวุ้น..... 3
รูปที่ 2 แสดงรูปร่างเซลล์ของเชื้อในกลุ่มมิกโซแบคทีเรีย..... 5
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของโคโลนีที่แผ่กระจาย (swarm colony) ของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย..... 6
รูปที่ 4 แสดงลักษณะการพัฒนาเป็นฟรุตติงบอดีของของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย..... 7
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของฟรุตติงบอดีของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย..... 8
รูปที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อไซโทฟากาแบบต่างๆ..... 11
รูปที่ 7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไซโทฟากาที่เจริญบนอาหารวุ้น..... 12
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของสาร flexirubin ก) โครงสร้างของ flexirubin
ข) โครงสร้างของ chloroflexirubin..... 13
รูปที่ 9 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย..... 17
รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 3 ขั้นตอน..... 18
รูปที่ 11 แสดงหน้าต่างของ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast
ที่ใส่ลำดับเบสลงไปในช่อง search แล้วคลิก " BLAST "..... 30
รูปที่ 12 แสดงหน้าต่างของ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast
ปรากฏหน้าต่างนี้ คลิก "Format"..... 31
รูปที่ 13 แสดงแถบ Band ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์..... 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของไกลดิงแบคทีเรีย

ไกลดิงแบคทีเรีย (Gliding bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนหรือเป็นเส้นสายสามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยวิธีคืบคลาน (gliding motility) ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีการใช้ประโยชน์จากเชื้อในกลุ่มไกลดิงแบคทีเรียอย่างมาก เช่น มีการสังเคราะห์สารต่างๆ จากเซลล์ของไกลดิงแบคทีเรียในกลุ่มมิกโซแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น ไกลโคแบคติน มิกโซคีลินและนานโนคลีลิน เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านเนื้องอก นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิของเชื้อไกลดิงแบคทีเรีย เช่น สารมาริแนคแทน ซึ่งเป็นสารจำพวกเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ จาก *Cytophaga uliginosa* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเนื้องอกในหนู (สำนักงานนโยบายและสิ่งแวดล้อม, 2541)

จะเห็นได้ว่าเชื้อไกลดิงแบคทีเรียมีประโยชน์ต่อการวิจัยในอนาคตเป็นอย่างมาก แต่การจัดจำแนกไกลดิงแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมีนั้นทำได้ยาก จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA เพื่อให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น (Nguimbi และคณะ, 2003) ซึ่งในเบื้องต้นได้ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้ออกเป็น 9 กลุ่มแล้วด้วยวิธีทางชีวเคมี พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นเชื้อในกลุ่มไซโทฟากา ซึ่งเชื้อในแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันที่รูปร่างและการสร้างสารต่างๆ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อไกลดิงนอนฟรุตติงแบคทีเรียได้ถึงระดับสปีชีร์ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาไกลดิงนอนฟรุตติงแบคทีเรียด้วยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียที่ได้จัดกลุ่มไว้โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี จำนวน 5 สายพันธุ์

1.2.2 เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อไกลดิงแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทำการสกัด DNA จากเชื้อไกลดิงแบคทีเรีย และเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR

1.3.2 ทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยวิธี Direct sequencing แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียมีความถูกต้องมากขึ้น

1.4.2 สามารถหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไกลดิงแบคทีเรีย (สำนักงานนโยบายและสิ่งแวดล้อม, 2541)

ไกลดิงแบคทีเรีย หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้บนผิวหน้าของของแข็ง หรือภายในซับเสตรท โดยการสร้างเมือก (slime) ซึ่งหากพิจารณาความหมายของคำว่า "glide" ในภาษาไทยจะมีความหมายถึงลื่นไหล หรือคลานนั่นเอง

โคโลนีของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นจะมีลักษณะใส และบางคล้ายกับแผ่นฟิล์มกระจายไปทั่วจานเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1) นอกจากนี้ไกลดิงแบคทีเรียยังมีระบบการสื่อสารระหว่างเซลล์ที่ซับซ้อน เนื่องจากแบคทีเรียประเภทนี้จะอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เพื่อประโยชน์ในการดำรงชีวิตโดยการสื่อสารภายในกลุ่มจะแบ่งออกได้เป็นสองประเภทคือ การสื่อสารทางกล (Mechenical communication) โดยการใช้พิลไล (Pilli) และการสื่อสารทางเคมี โดยอาศัยฟีโรโมน (Pheoromone) ยกตัวอย่างเช่น การสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอาหาร ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเซลล์เดียวจะมีปริมาณน้อยกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากหลายๆเซลล์ ดังนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารของเอนไซม์ที่ผลิตจากกลุ่มเซลล์จึงสูงกว่าที่ผลิตได้จากเซลล์เดียว ด้วยเหตุนี้ไกลดิงแบคทีเรียจึงอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มนั่นเอง

ไกลดิงแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายมีอยู่ 2 กลุ่มใหญ่คือ แบคทีเรียในกลุ่มมิกโซแบคทีเรีย และกลุ่มไซโทฟากา ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มีลักษณะที่แตกต่างกันคือ กลุ่มมิกโซแบคทีเรียจะมีการสร้างฟรุตติงบอดีในขณะที่กลุ่มไซโทฟากาจะไม่มีการสร้างฟรุตติงบอดี

รูปที่ 1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียบนอาหารวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

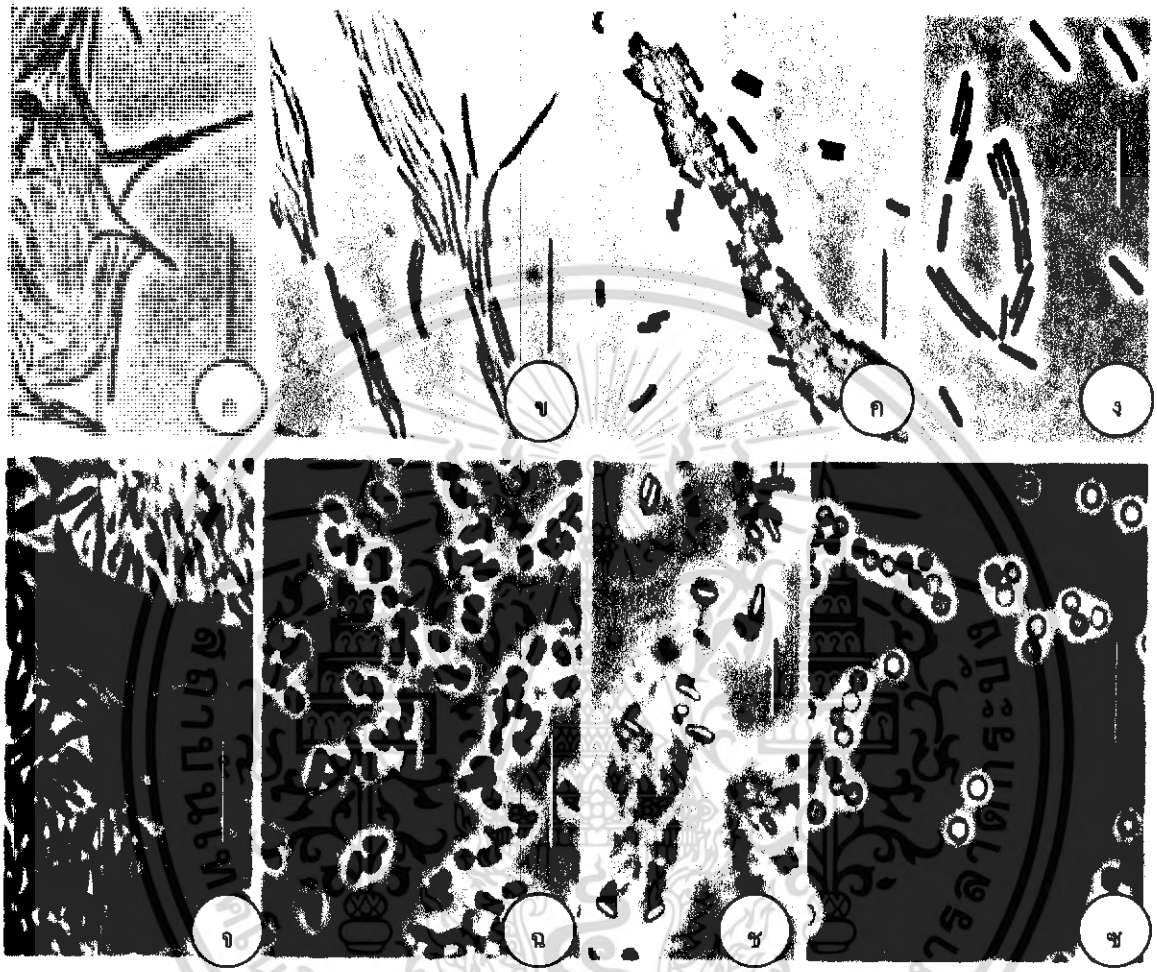
2.1.1 มิกโซแบคทีเรีย (Balows, 1991)

มิกโซแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมลบ (Gram-negative) ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และมีการจัดเรียงเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีรูปร่างเป็นท่อน (รูปที่ 2) เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นโคโลนีจะมีลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มบางกระจายอยู่บนแผ่นวุ้น เป็นลักษณะที่เรียกว่า swarm colony ซึ่งหมายถึงลักษณะของโคโลนีที่แผ่กระจาย (รูปที่ 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่น้อย เมื่อสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน เซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยเซลล์จะรวมตัวกันและยกสูงขึ้นเป็นฟรุตติงบอดีซึ่งมีขนาดระหว่าง 50-500 ไมโครเมตร (รูปที่ 4) และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าฟรุตติงบอดีมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยรูปร่างมีตั้งแต่เรียบง่ายคล้ายกระเปราะไปจนถึงรูปร่างซับซ้อน (รูปที่ 5 (ก-จ)) เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตภายในฟรุตติงบอดีที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ให้มีขนาดสั้นลง และอ้วนขึ้นกลายเป็น มิกโซสปอร์ซึ่งสามารถทนทานต่อความร้อนและการขาดสารอาหารได้ดี

2.1.1.1 แหล่งที่พบมิกโซแบคทีเรีย

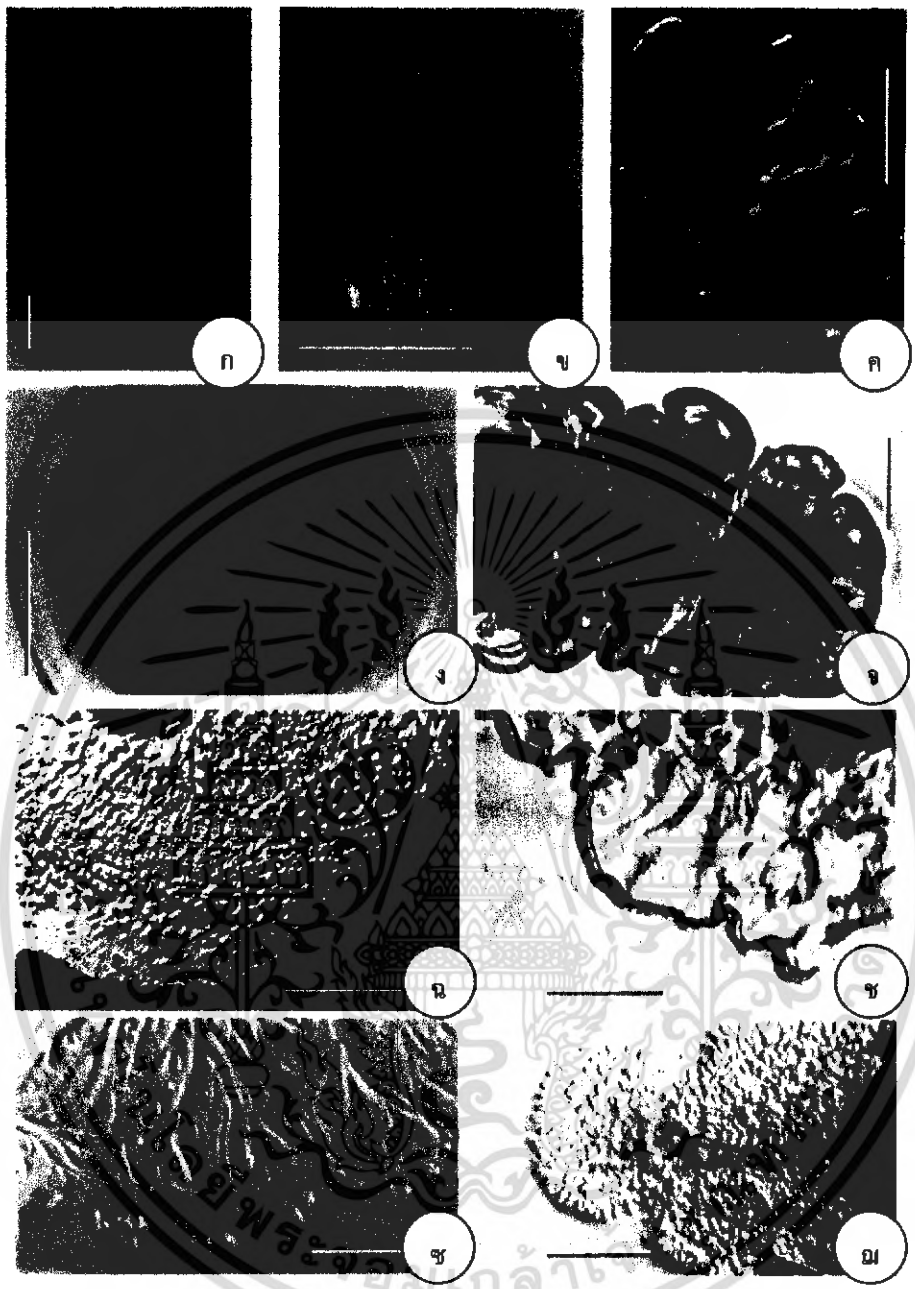
มิกโซแบคทีเรียพบได้ในดิน เปลือกไม้ ซากต้นไม้ที่ผุพัง มูลของสัตว์กินพืช เช่น กระต่าย กระต่ายป่า แพะ และกวาง เป็นต้น โดยสภาพอากาศแบบศูนย์สูตรจะพบมิกโซแบคทีเรียหนาแน่นกว่าในเขตอบอุ่น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ในทุกสภาพอากาศ แม้แต่ในภูมิอากาศแบบทุนดรา ในทวีปแอนตาร์คติก (Reichenbach, 1999) นอกจากนี้มิกโซแบคทีเรียยังสามารถพบได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง เช่นในน้ำเค็มและตะกอนที่อยู่ในน้ำเค็ม บริเวณชายฝั่งทะเลในแถบญี่ปุ่น (Lizuka และคณะ, 1998) และจีน (Li และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



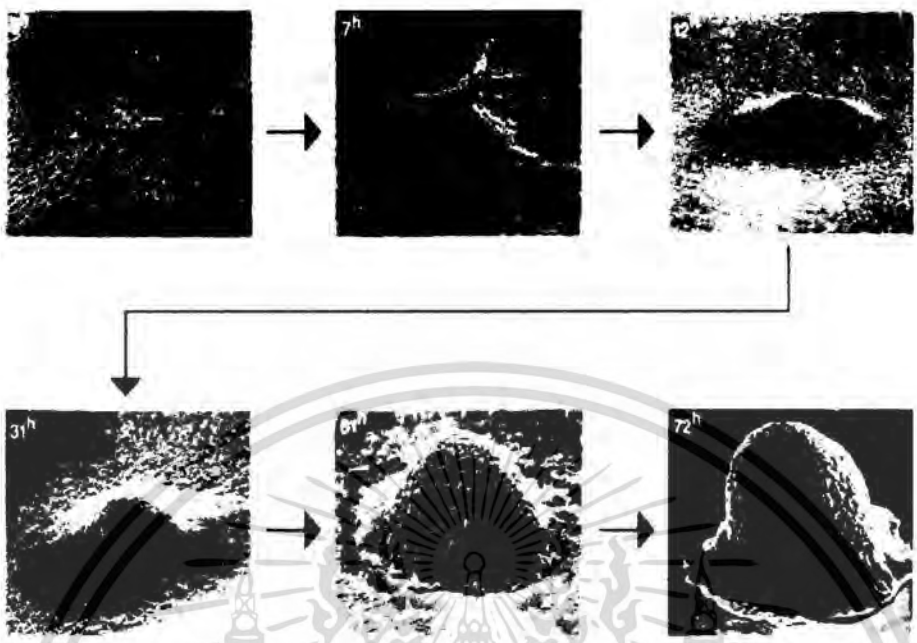
รูปที่ 2 แสดงรูปร่างเซลล์ของเชื้อในกลุ่มมิกโซแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ก รูปร่างเซลล์ *Cystobacter ferrugineus* ที่เจริญในอาหารเหลว ข รูปร่างเซลล์ *Stigmatella aurantiaca* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารวุ้น ค รูปร่างเซลล์ *Chondromyces crocatus* ง รูปร่างเซลล์ *Sorangium compositum* จ รูปร่างมิกโซสปอร์ของ *Cystobacter ferrugineus* ฉ รูปร่างมิกโซสปอร์ของ *Cystobacter velatus* ช รูปร่างมิกโซสปอร์ของ*Stigmatella aurantiaca* ซ รูปร่างมิกโซสปอร์ของ *Myxococcus xanthus* (ที่มา Balows, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของโคโลนีที่แผ่กระจาย (swarm colony) ของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย ก *Stigmatella erecta* บนอาหารวุ้น CY ข *Myxococcus xanthus* บนอาหารวุ้นคาซิโตน ค *Polyangium* sp.บนแผ่นวุ้น ง *Cystobacter violaceus* บนอาหารวุ้น VY/2 จ *Nannocystis exedens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาซิโตน ฉ *Corallococcus coralloides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาซิโตน ช *Polyangium* sp. บนอาหารวุ้นที่เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ซ *Stigmatella erecta* บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาซิโตน ฌ *Nannocystis exedens* บนอาหารวุ้นที่เลี้ยงเชื้อ *Micrococcus luteus* (ที่มา Balows, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงลักษณะการพัฒนาเป็นฟรุตติงบอดีของของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย
(ที่มา http://cmgm.stanford.edu/~kaiserla/about_myxo/about_myxococcus.html)

2.1.1.2 การใช้ประโยชน์จากมิกโซแบคทีเรีย

(สำนักงานนโยบายและสิ่งแวดล้อม, 2541)

มิกโซแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่และซากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว ถึงแม้ว่ามิกโซแบคทีเรียยังไม่ได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมใด แต่มีความเป็นไปได้อย่างมากในการนำประโยชน์จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้ทางด้านชีวภาพ ซึ่งจะมีผลต่อเศรษฐกิจไม่มากก็น้อย โดยแนวโน้มของการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ การแก้ปัญหามลพิษทางน้ำ การใช้เอนไซม์และสารที่สังเคราะห์ได้จากมิกโซแบคทีเรีย

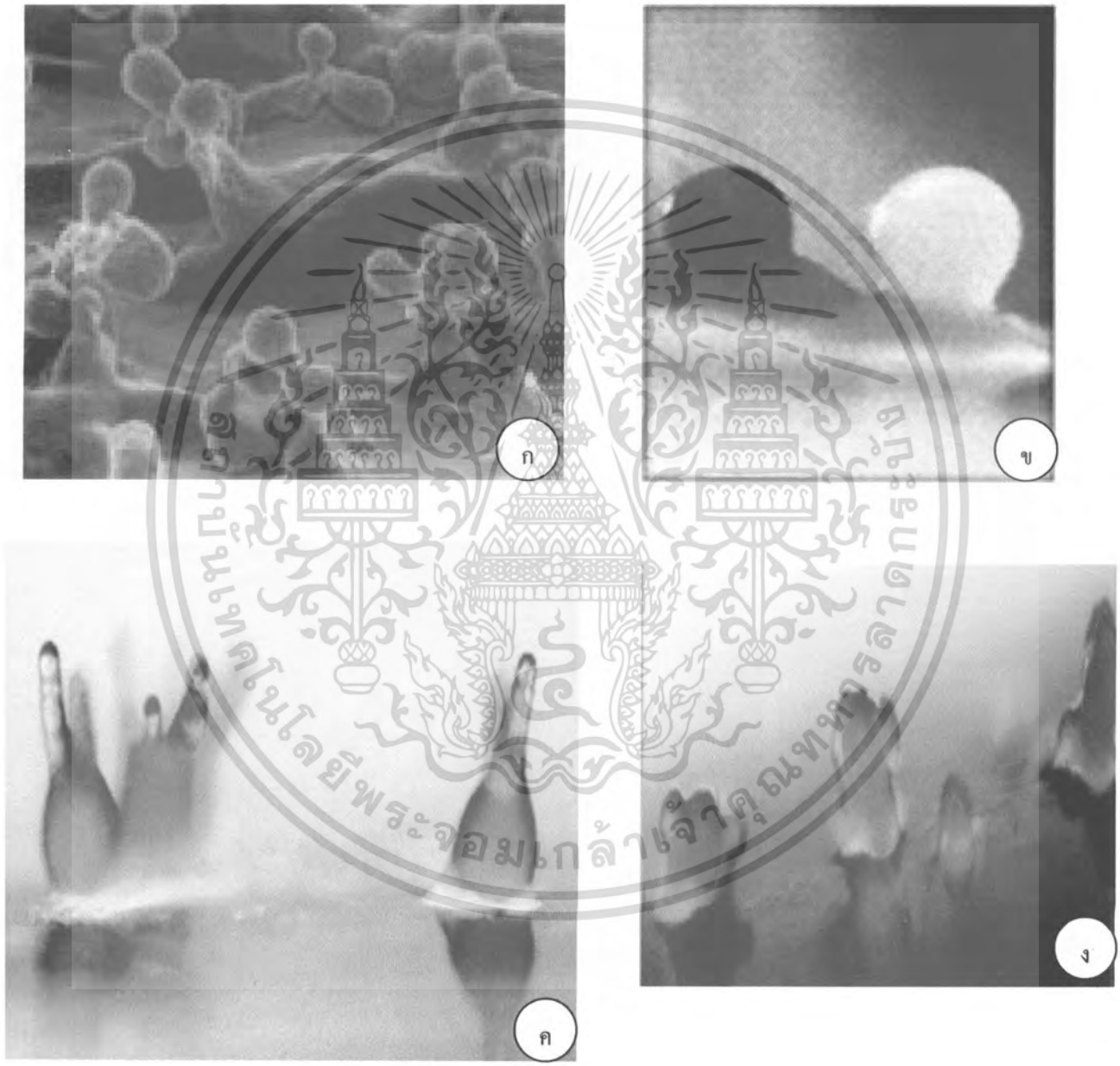
มิกโซแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์สารต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น โปรตีน สารปฏิชีวนะ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นต้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการหลั่งโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากมิกโซแบคทีเรียเป็นสิ่งที่มักไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป เช่น *Myxococcus xanthus* หลั่งโปรตีนกว่า 50 ชนิดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จาก *Myxococcus xanthus* และเป็นที่สนใจได้แก่ แลคติน ซึ่งเป็นสารยับยั้งการตกตะกอนของเลือด นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมขั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุติยภูมิซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น แอมบรูติซิน เป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่ได้ถูกนำมาศึกษาโครงสร้าง โดยสารปฏิชีวนะชนิดนี้เป็นสารประกอบที่ใช้ยับยั้งเชื้อรา ผลิตได้จาก *Sorangium cellulosum*

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตสารต่อต้านเนื้องอกซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต่อต้านไวรัส ได้แก่ มิกโซคีลิน และนานโนคีลิน ซึ่งสังเคราะห์ได้จากเชื้อมิกโซแบคทีเรียในระดับอุตสาหกรรม



รูปที่ 5 ก - ง แสดงลักษณะของฟรุตติงบอดีที่หลากหลายของเชื้อมิกโซแบคทีเรีย
(ที่มา www.bricker.tcnj.edu/micro/ le8/myx2.gif)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงแม้ว่ามิกโซแบคทีเลียสามารถพบได้ทั่วไปในดินหลายประเภท (ดินจำนวนหนึ่งซ้อนชาจะสามารถแยกได้สี่ถึงห้าสายพันธุ์) แต่ในบทความจากหนังสือจุลชีววิทยาของดินแถบจะไม่กล่าวถึงเลยที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากสามสาเหตุคือ (Reichenbach, 1999)

ก เทคนิคการเจือจางและการเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของมิกโซแบคทีเรียได้เนื่องจากมิกโซแบคทีเรียสร้างเมือกทำให้เซลล์ไม่กระจายตัวได้โดยง่าย ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างดินใส่น้ำแล้วเขย่า และนำส่วนผสมบางส่วนไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่มีมิกโซแบคทีเรียปรากฏอยู่

ข ลักษณะโคโลนีของมิกโซแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจะพัฒนาอย่างช้าๆ และกระจายตัวทำให้ถูกมองข้ามได้โดยง่าย ในขณะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ โคโลนีจะกระจุกตัวกันทำให้มีลักษณะเหมือนโคโลนีของแบคทีเรียทั่วไป

ค มิกโซแบคทีเรียเจริญเติบโตช้าจึงถูกจุลินทรีย์อื่นๆเจริญทับโดยเฉพาะเชื้อรา

2.1.1.3 แหล่งที่นิยมเก็บตัวอย่างมิกโซแบคทีเรีย (Reichenbach, 1999)

1 ดิน

ตัวอย่างดินที่เก็บเพื่อนำมาแยกมิกโซแบคทีเรียนั้นควรต่ำกว่าหน้าดินประมาณ 2-3 เซนติเมตร และตัวอย่างดินที่มีจุลินทรีย์อยู่มากจะเก็บได้จากบริเวณระหว่างรากของต้นไม้ที่อยู่ใกล้ลำต้นจะให้จำนวนจุลินทรีย์มากที่สุด หากยังไม่สามารถใช้ตัวอย่างที่เก็บได้ในทันทีต้องทำการเป่าลมให้แห้งโดยเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ มิเช่นนั้นตัวอย่างอาจเต็มไปด้วยเชื้อรา ดินประมาณ 2-3 ถูกบาศก์เซนติเมตรเพียงพอต่อเทคนิคการแยกเชื้อเกือบทุกวิธี มีการค้นพบว่าตัวอย่างของดินแห้งที่ถูกเก็บไว้นาน 10-15 ปี ที่อุณหภูมิห้อง สามารถทำการแยกเชื้อมิกโซแบคทีเรียได้

2 มูลกระต่าย

การแยกเชื้อจากมูลกระต่ายนั้น ผลจะเกิดขึ้นเมื่อมูลไม่สดและเก่าจนเกินไป และต้องปราศจากสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หากต้องเก็บตัวอย่างไว้มากกว่าหนึ่งวันต้องทำการเป่าลมให้แห้ง นอกจากนี้มูลกระต่ายที่นำมาใช้ควรเป็นมูลของกระต่ายป่าเนื่องจากมูลกระต่ายจากห้องปฏิบัติการและตามบ้านเรือนมักไม่เหมาะสมเนื่องจากจะเปียกยูเรีย

3 เปลือกไม้และเนื้อไม้

เปลือกไม้และเนื้อไม้ที่นำมาใช้แยกเชื้อนั้นต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีสารประกอบเรซินและแทนนินต่ำ และการแยกเชื้อที่ประสบความสำเร็จมักได้จากเนื้อไม้ที่ถูกย่อยสลายจนนิ่มแล้วและเปลือกไม้บริเวณโคนต้นและจากกิ่งไม้ที่ตกลงมาจากต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

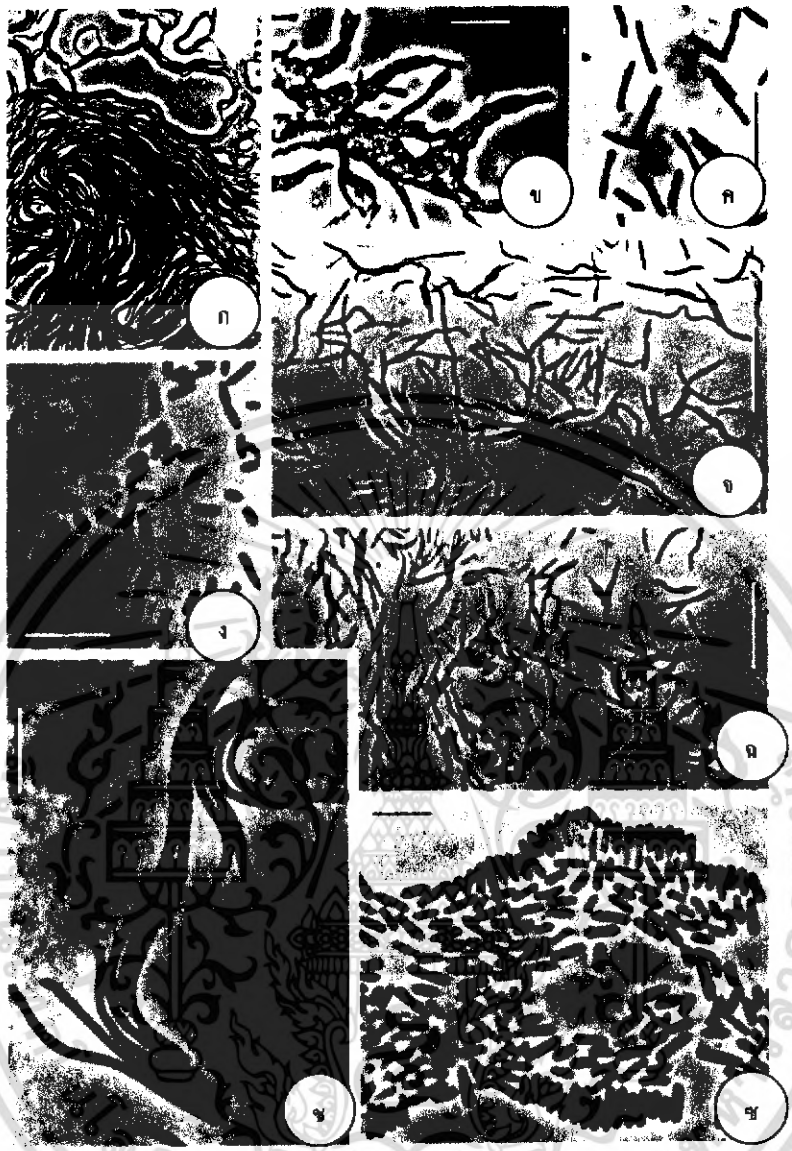
2.1.2 ไซโทฟากา (Balows, 1991)

ไกลดิงแบคทีเรียในกลุ่มไซโทฟากาเคยถูกพิจารณาให้อยู่ในกลุ่มมิกโซแบคทีเรียโดยใช้ชื่อว่า *Cytophaga columnaris* แต่ในความเป็นจริงแล้วแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้ไม่ได้จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันเนื่องจากไม่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กันแต่อย่างใด (จากการศึกษายีน 16s rRNA ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียหรือพวกโปรคาริโอต เนื่องจากเป็นลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Nguimbi และคณะ, 2003)) ไซโทฟากาเป็นไกลดิงแบคทีเรียที่มีการจัดเรียงเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) และติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน โดยมีทั้งท่อนยาวและท่อนสั้น ส่วนปลายของเซลล์อาจเป็นปลายตัด (Tapering end) หรือปลายมน (Rounded end) ก็ได้ (รูปที่ 6) ในเจเนอรา *Sporocytophaga* จะสร้างเซลล์ไมโครซิสต์ ที่มีลักษณะกลม และ *Flexibacter* (บางสายพันธุ์) มีเซลล์ทั้งแบบที่เป็นท่อนยาวมากและแบบที่เป็นท่อนสั้นมากจนเกือบเป็นทรงกลม โคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่กระจายไปทั่งจานเพาะเชื้อ และบางครั้งพบว่ามีลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มและจะปกคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อได้ภายในเวลาไม่กี่วัน เชื้อบางสายพันธุ์มีลักษณะการเจริญเหมือนไรซอยด์หรือรากพืช (rhizoid) (รูปที่ 7) โคโลนีของเชื้อไซโทฟากาจะมีสีสันสดใส ซึ่งอาจเป็นสีเหลือง สีส้ม หรือสีอิฐเป็นต้น เนื่องจากมีรงควัตถุที่เรียกว่า "Flexiburin Type" (มีโครงสร้างในรูปที่ 8) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนสีของโคโลนี และจะพบเฉพาะในแบคทีเรียกลุ่มนี้เท่านั้น

ไซโทฟากามีทั้งพวกที่ต้องการออกซิเจน(Aerobe) ต้องการออกซิเจนปริมาณน้อย (Microaerophile) ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ (Capnophilic) และเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) (Balows, 1991)

เชื้อในกลุ่มนี้สามารถที่จะย่อยสลายสารชีวโมเลกุลใหญ่ได้ เช่น โปรตีน ไคติน แป้งและเซลลูโลส เป็นต้น จึงมีบทบาทหลักในการหมุนเวียนสารในธรรมชาติ (Balows, 1991)

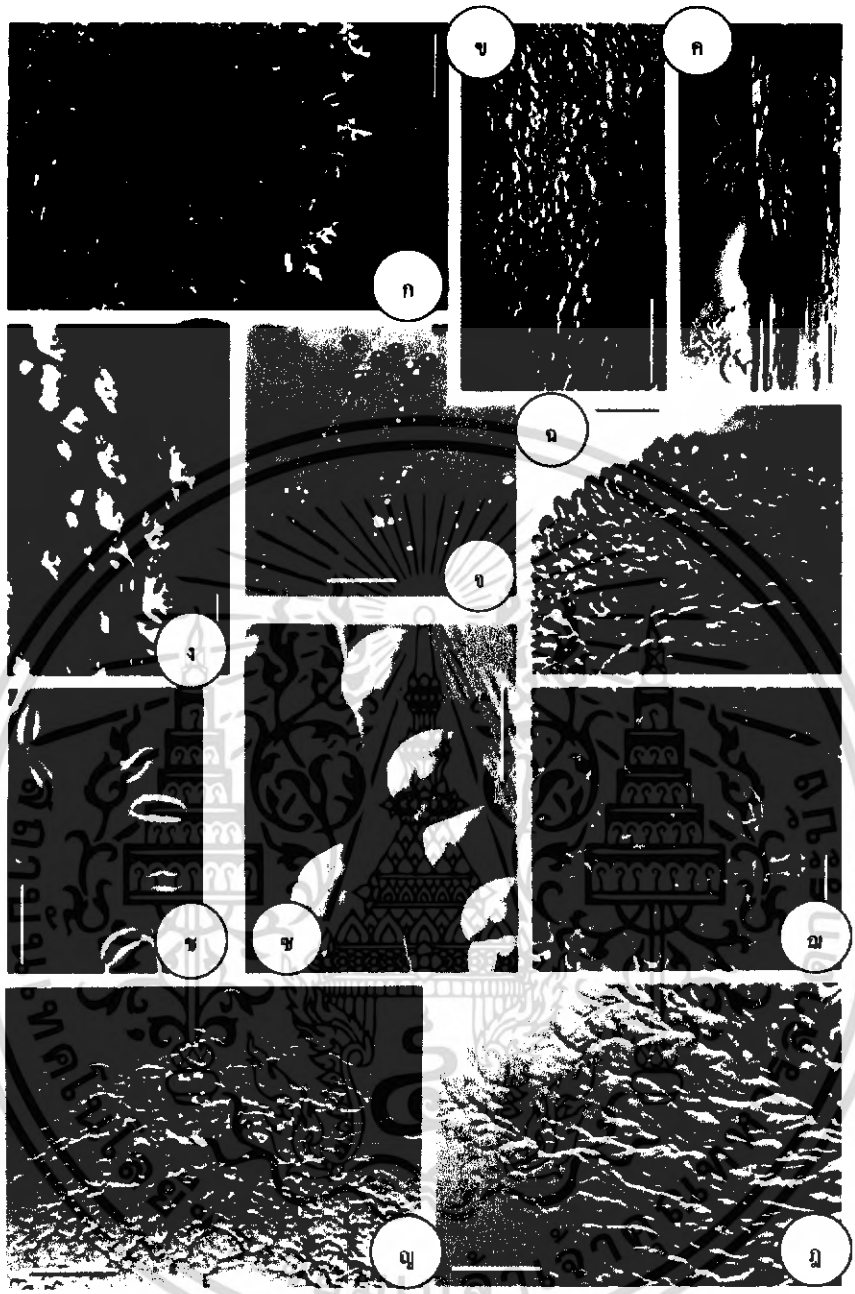
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อไซโทฟากาแบบต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ก รูปร่างเซลล์ *Microscilla* ซึ่งเซลล์มีรูร่างยาวและมีปลายแหลม ข เซลล์ที่ส่วนปลายเมือกของ Cytophaga-like bacteria (CLB) ที่แยกจากดิน ค รูปร่างเซลล์ *Cytophaga lytica* ง *Cytophaga succinicans* ที่เจริญบนอาหาร AO agar จ *Cytophaga aurantiaca* มีรูปร่างเป็นท่อนหยักและยาว ฉ *Cytophaga aurantiaca* ที่มีรูปร่างคล้ายผลมะนาว ช *Flexibacter flexilis* ที่เจริญในอาหาร Starch agar ซ รูปร่างเซลล์ *Taxeobacter* ที่เจริญบนอาหาร water agar

(ที่มา Balows, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

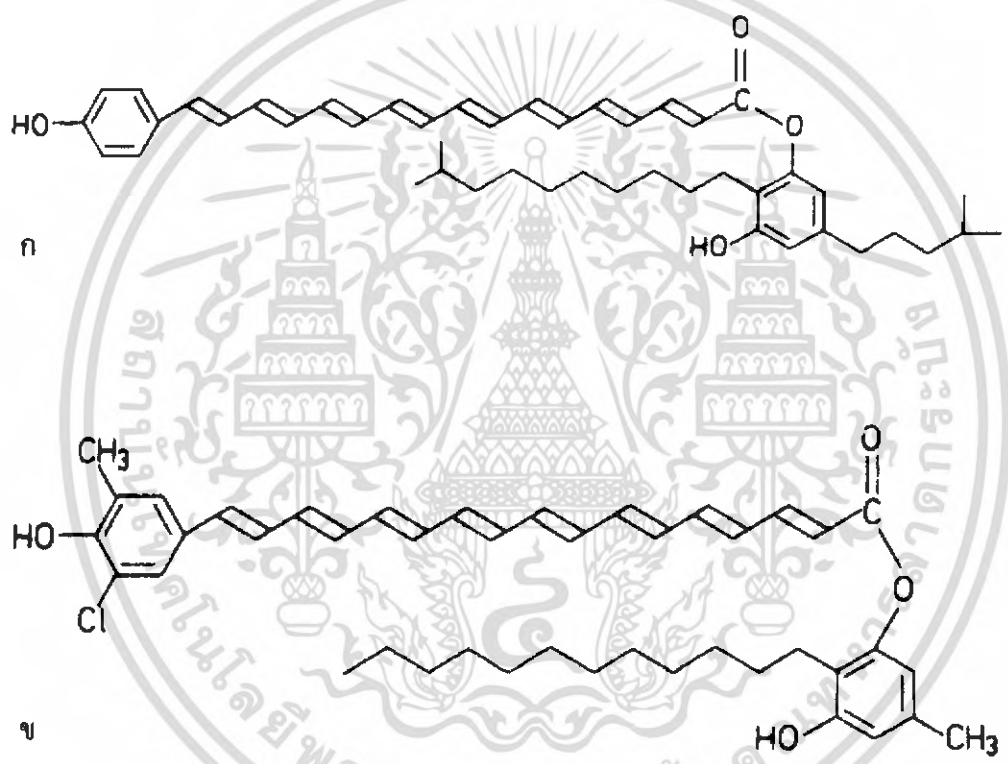


รูปที่ 7 แสดงลักษณะโคโลนีที่หลากหลายของไซโทฟากา ก และ ค โคโลนีของ Cytophaga-like bacteria(CLB) ที่แยกได้จากดิน ข *Flexibacter filiformis* บนอาหารวุ้น ง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อยโคโลนีจะมีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีการกระจายตัวเล็กน้อย จ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมากโคโลนีจะมีขนาดเล็กและกระจุกตัวกันอยู่แน่น ช โคโลนีของ Cytophaga –like bacteria(CLB) บนอาหารวุ้น CY ซ *Cytophaga flevensis* ที่ทำการแยกเชื้อจากแหล่งน้ำจืด ฌ *Flexibacter filiformis* กลุ่มเซลล์อยู่อย่างหนาแน่นบริเวณส่วนปลายของเมือก ญ และ ฎ *Cytophaga columnaris* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในปลาน้ำจืด (ที่มา Balows, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 แหล่งที่พบเชื้อไซโทฟากา

สามารถพบเชื้อในกลุ่มนี้ได้ในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ซากพืชที่เน่าเปื่อย มูลของสัตว์กินพืช พวกที่พบในแหล่งน้ำจืดโดยจะลอยตัวอยู่เป็นอิสระและจะพบมากในช่วงฤดูหนาวของประเทศเขตอบอุ่น หรือแม้แต่ในแหล่งน้ำเค็ม เช่นตามซากสาหร่ายทะเล ตะกอนดินก้นทะเล ซากสัตว์ทะเล (Li และคณะ, 1995) และมีรายงานจากการทดลองเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าสามารถพบได้ในนมและผลิตภัณฑ์นม และพบว่าเชื้อในกลุ่มไซโทฟากาเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์แต่สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ (Nakagawa และคณะ, 2001)



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของสาร flexirubin

ก โครงสร้างของ flexirubin ข โครงสร้างของ chloroflexirubin

(ที่มา Balows, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.3 การใช้ประโยชน์จากไซโทฟากา

(สำนักงานนโยบายและสิ่งแวดล้อม, 2541)

ไซโทฟากามีบทบาทหลักในการหมุนเวียนสารสารต่างๆ ในธรรมชาติ จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตปุ๋ยมูลสัตว์ นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มไซโทฟากายังสามารถย่อยสลายสารเคมีที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ยาฆ่าแมลงจำพวก คลอโรเบนโซอิกแอซิด เพนตะคลอโรฟีนอล พาราไธอล ฟีแนนทรีน และอะลิฟาติกไดอล

มีการใช้ประโยชน์จากไซโทฟากาในการผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่นการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส ไลเอสและเอกโซกลูคาเนส จากเชื้อในจีนัส Cytophaga และ Sporocytophaga

ส่วนประกอบของเซลล์ของไซโทฟากา สามารถนำมากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้โดยโนเวลไมโตเจนจะเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวให้สร้าง IgG และ IgA ซึ่งเป็นอิมมูโนกลอบูลิน และสร้าง โปรตีนไมโทเจน ได้แก่ จีบีแอดจาเวน (GBA) ซึ่งจะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดบีเซลล์ในหนู

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิของไซโทฟากา เช่นสารมาริแนคแทนซึ่งเป็นสารจำพวกเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์สร้างจากเชื้อ Cytophaga uliginosa ซึ่งสามารถยับยั้งเนื้องอกในหนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (สุรินทร์, 2545)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอของตัวเอง จากการศึกษากระบวนการนี้ทำให้ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เอนไซม์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้โดยต้องมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ (template) และมีส่วนหนึ่งเป็นสายคู่ โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอตรงจุดที่ต่อเนื่องกันระหว่างบริเวณที่เป็นสายเดี่ยวกับบริเวณที่เป็นสายคู่ โดยเกาะทางด้านปลาย 3′ ของบริเวณที่เป็นสายสั้น ขณะเดียวกันก็จะจับกับโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) เพื่อนำมาต่อกับปลาย 3′ ของดีเอ็นเอสายที่สั้นกว่า โดยอาศัยพลังงานที่มาจากการสลายพันธะของหมู่ฟอสเฟตนั่นเอง เอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามความยาวของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบและเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ ของสายดีเอ็นเอที่สั้นกว่าไปเรื่อยๆ จนได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่สมบูรณ์

ในห้องปฏิบัติการก็สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายหนึ่งที่จะใช้เป็นต้นแบบเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นคู่สม ใส่สารละลายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบในหลอดทดลอง เติมเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสและนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dNTP = dATP dGTP dCTP dTTP) แต่องค์ประกอบดังกล่าวนี้ไม่เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ต้องมีจุดเริ่มต้นที่เป็นสายคู่โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆ เข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งก่อน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจึงจะเข้าไปเกาะและเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอสายสั้นๆ นั้น โดยทิศทางและตำแหน่งในการสังเคราะห์จะต่อจากปลาย 3′ ของดีเอ็นเอสายสั้นไปเรื่อยๆ ดีเอ็นเอสายสั้นที่เป็นส่วนเริ่มต้นนี้เรียกว่าไพรเมอร์โดยเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ใดๆ ที่มีเบสเป็นคู่สมกับบริเวณหนึ่งของดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถจะเลือกสังเคราะห์ดีเอ็นเอส่วนใดส่วนหนึ่งได้โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของบริเวณที่ต้องการ โดยปลาย 3′ ของไพรเมอร์มีทิศทางเข้าสู่ส่วนที่ต้องการสังเคราะห์ ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นเกลียวคู่ ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับได้ และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสก็ไม่สามารถจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ต้องทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเกลียวคู่เสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว (denature) ไพรเมอร์จึงจะมีโอกาสเข้าไปเกาะ (anneal) ตรงบริเวณที่มีเบสคู่สม และเอนไซม์จึงจะสามารถนำนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่มาสังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 เทคนิคพีซีอาร์ (สุรินทร์, 2545)

พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นๆ โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์โพลีเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเองไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20 – 35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสพร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุล จะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกัน (denaturation-annealing-extension) หลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8,... เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (รูปที่ 9)

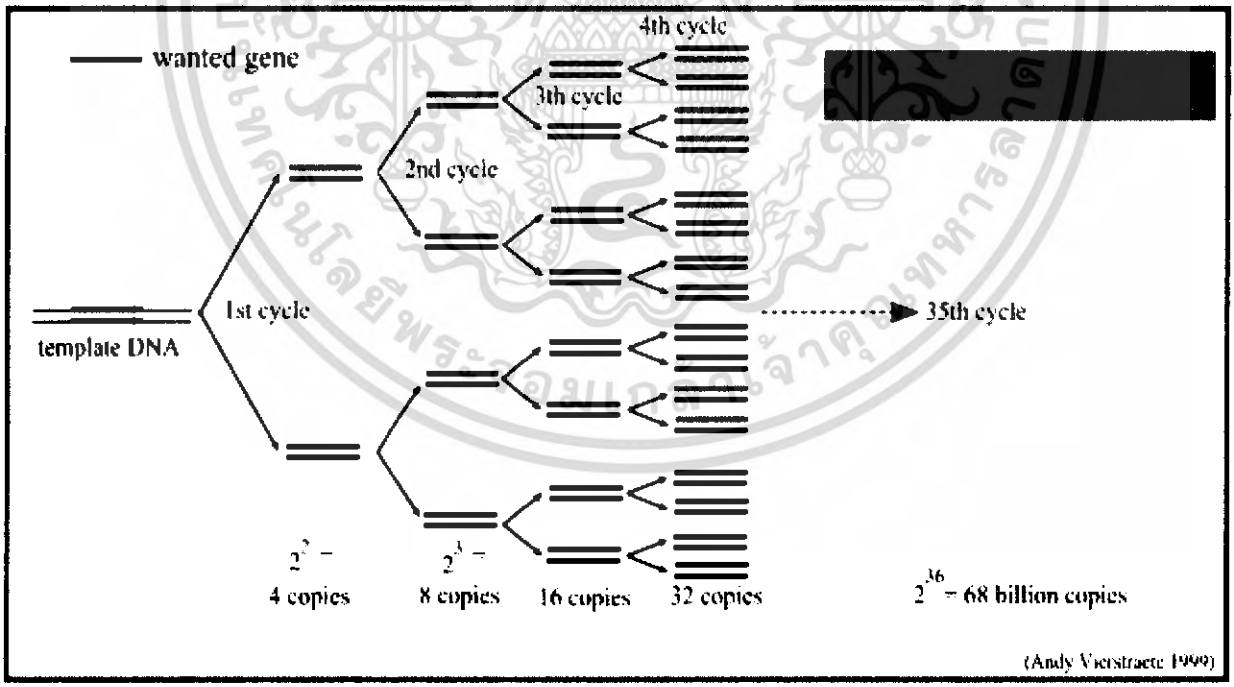
ถ้าใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจากแบคทีเรีย *E. coli* หรือจากเซลล์อื่น เมื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็จะเสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในปฏิกิริยาทุกรอบของการสังเคราะห์ ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้การดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์สะดวกขึ้นไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์ และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องอัตโนมัติได้ โดยควบคุมอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอน ทำซ้ำ 30 – 40 รอบ ก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นล้านๆ เท่าโดยใช้เวลาเพียง 3-4 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ขั้นตอนนั้น ขั้นที่ 1 คือทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ มักใช้ที่ 94 - 95 องศาเซลเซียส ส่วนขั้นที่ 2 ทำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ จะอยู่ในช่วง 25 - 65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ ทั้งนี้เพราะขนาดและองค์ประกอบของเบสมีผลต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50% เรียกว่า melting temperature หรือ $T_m = [4 \times (G+C)] + [2 \times (A+T)]$ โดย G (กัวนีน) C(ไซโตซีน) A(อะดีนีน) และ T(ไทมีน) คือจำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส อุณหภูมิสำหรับ annealing จะใช้ประมาณ $T_m - 5$ องศาเซลเซียส ขั้นสุดท้ายคือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์จะใช้อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดหรับ *Taq* DNA polymerase คือ 72 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10)

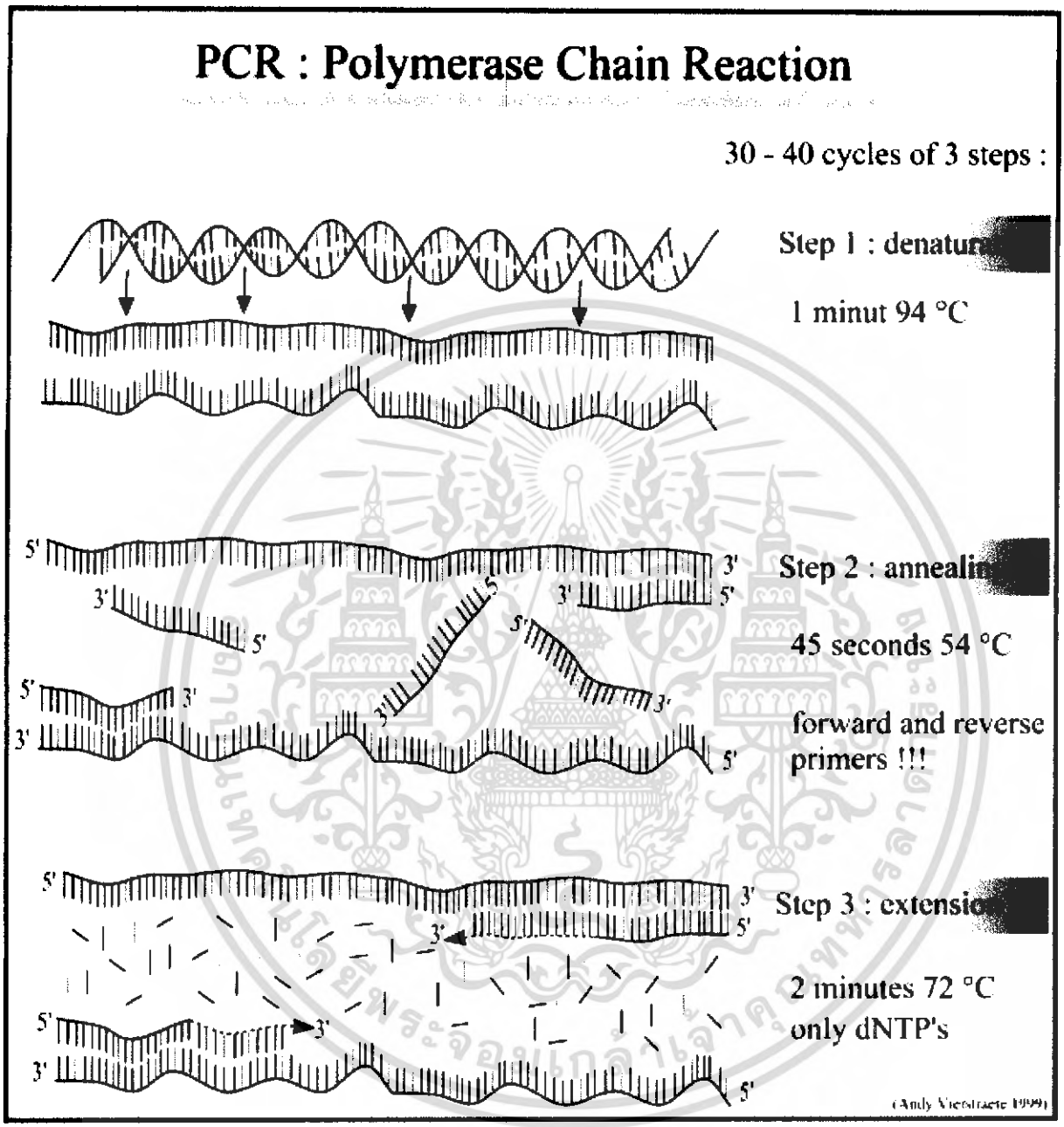
เมื่อทราบลำดับเบสของยีนใดๆ แล้วสามารถสังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 ชนิด สำหรับส่วนหัวและท้ายของยีนนั้น นำมาใช้เพิ่มปริมาณส่วนของยีนดังกล่าวเพื่อแยกยีนนั้นจากจีโนมหรือจากดีเอ็นเอ โดยรวมได้ โดยอาจใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการแยกส่วนของยีนใดๆ ที่ทราบลำดับเบสเพื่อมาใช้โคลนยีน ใช้เป็นโพรบเพื่อตรวจหายีนที่มีความสัมพันธ์กัน ใช้ตรวจโพลีมอร์ฟิซึมในสิ่งมีชีวิต ใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ ตรวจหาเชื้อโรคที่เกิดกับคน สัตว์หรือพืช เป็นต้น



รูปที่ 9 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

(ที่มา http://users.vgent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67269



รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 3 ขั้นตอน

(ที่มา http://users.vgent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวมาก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆ เท่าได้อย่างรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำพีซีอาร์ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ควรสะอาดมีคุณภาพสูง แยกเด็ดขาดจากการทดลองอื่น สวมถุงมือในการปฏิบัติงาน และมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอกนี้เป็นปัญหาสำคัญมากในการทดลองเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากอาหาร

2.2.2 การทำพีซีอาร์ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ (McPHESON และคณะ, 1991-1995)

2.2.2.1 บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา

บัฟเฟอร์มักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

2.2.2.2 dNTP

ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อมาสำเร็จหรือซื้อมาแต่ละชนิด แล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

2.2.2.3 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส กัวนีน และ ไซโตซีนอยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส กัวนีน และ ไซโตซีน เท่ากัน เพื่อให้ค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกันและไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลายสองข้างเป็นคู่สมกัน ทั้งภายในไพรเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันแต่ในบางกรณีใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้บ้าง การออกแบบไพรเมอร์อาจทำโดยดูลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูปก็ได้ เมื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์เรียบร้อยแล้ว จึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 - 2.0 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.4 ดีเอ็นเอเป้าหมาย

ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟิน เป็นต้น แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะใช้ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

2.2.2.5 แมกนีเซียมคลอไรด์

ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหากเพื่อให้ปรับใช้ได้ในปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อน เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

2.2.2.6 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 7.3-8.3 ชนิดที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรียเดียวกันเป็นชนิดที่คนใช้กันมาก รู้จักกันในชื่อ *Taq* polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงสายเดียว (monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61-100 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือการมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3' (3' → 5' exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดได้ (proofreading)

การเลือกใช้เอนไซม์ในการทำพีซีอาร์ เบื้องต้นจะพิจาณาจากความสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ยาวมากน้อยเพียงใดจากการเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละครั้ง (processivity) และความถูกต้องในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่น *Taq* polymerase มีอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดเท่ากับ 2×10^{-5} ส่วน *Pfu* polymerase มีค่าเพียง 1.6×10^{-6} ในการทำพีซีอาร์เพื่อการวิเคราะห์ผลทางคุณภาพอาจเลือกใช้เอนไซม์ชนิดใดก็ได้ แต่ถ้าต้องการความถูกต้อง เช่น การโคลนยีน การตรวจสอบจีโนไทป์ของสเปิร์ม การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียวควรเลือกใช้เอนไซม์ที่มีระบบการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาด คือมี 3' → 5' exonuclease proofreading เช่น เอนไซม์ *Mth, Pfu, Taq* และ *Tma* เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทนความร้อนที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ชนิดแรกที่นิยมใช้กัน คือ *Taq* polymerase แม้ว่าจะมีอัตราการสังเคราะห์เบสผิดพลาดสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น แต่ก็ยังนิยมใช้มากเนื่องจากมีราคาถูกกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น และได้มีการตัดโพลีเพพไทด์ของเอนไซม์นี้ออกไปบางส่วน ทำให้ทนความร้อนได้มากขึ้น เรียกชื่อว่า Stoffel fragment ซึ่งทำงานได้ในช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่กว้างขึ้น สำหรับเอนไซม์ *Taq* polymerase มักจะอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้ในปฏิกิริยา 2.5 – 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร

2.2.3 การเพิ่มประสิทธิภาพของพีซีอาร์ (สุรินทร์, 2545)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์นั้นบางครั้งก็ไม่ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ หรือได้ผลผลิตปริมาณน้อย หรือมีชิ้นดีเอ็นเออื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง (non specific band) เกิดขึ้น จึงควรทำหลอดควบคุมด้วยทุกครั้ง การปรับสภาวะในการทำพีซีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดบางครั้งก็เสียเวลามาก แต่ก็มีความจำเป็น เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ถูกต้องและปริมาณมากเพียงพอ การเพิ่มประสิทธิภาพของพีซีอาร์ทำได้หลายวิธีขึ้นกับปัญหาที่เกิดขึ้น

2.2.3.1 เลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดใหม่

ถ้าไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่ว่าจะออกแบบเองหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ก็ตาม ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้หรือได้ผลผลิตต่ำควรออกแบบให้ไพรเมอร์ใหม่ให้มีขนาดยาวขึ้นหรือสั้นลง หรือเปลี่ยนตำแหน่งที่สังเคราะห์ไพรเมอร์ไปอาจจะได้ผลดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากลำดับเบสที่บริเวณ 3' ของไพรเมอร์มีความสำคัญมาก โดยถ้าจับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี หรือมีส่วนที่เป็นคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกันหรือต่างไพรเมอร์จะมีผลต่อปฏิกิริยามาก หรืออาจเริ่มจากการสังเคราะห์ไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งคู่ เพื่อทดลองเปลี่ยนแปลงอาจจะทำให้ประสิทธิภาพของพีซีอาร์สูงขึ้น แต่ถ้าไม่สามารถเปลี่ยนไพรเมอร์ได้ให้ปรับในด้านอื่นแทน

2.2.3.2 ปรับเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาแต่ละรอบ

ปฏิกิริยาแต่ละรอบประกอบด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denature) ปล่อยให้ไพรเมอร์เข้ามาเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพใช้อุณหภูมิประมาณ 94 องศาเซลเซียส แต่อาจใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ก็ได้ บางการทดลองใช้เพียง 92 องศาเซลเซียส ก็ได้ผลดี เพราะแม้ว่าเอนไซม์ *Taq* polymerase จะทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว แต่กิจกรรมจะลดลงเรื่อยๆ เช่นหลังจากอยู่ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 ครั้ง เอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปในขั้นนี้จะใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพียง 30 วินาทีก็พอ แต่ในปฏิกิริยารอบแรกควรใช้เวลานานกว่า คือ 1 - 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) เสียสภาพได้อย่างสมบูรณ์ แต่ดีเอ็นเอแบบบางชนิดอาจต้องการอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพที่สมบูรณ์ เช่น ดีเอ็นเอที่มีองค์ประกอบเป็นเบส ไซโตซีนและไซโตซีนสูงควรเพิ่มเวลาหรือเพิ่มอุณหภูมิในการทำให้เสียสภาพหรือบางครั้งอุณหภูมิในหลอดทดลองอาจไม่สูงเท่าอุณหภูมิในเครื่อง ดังนั้นจึงต้องเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เกิดขึ้นโดยการสุ่มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไพรเมอร์ การมีตำแหน่งให้ไพรเมอร์เกาะอย่างเพียงพอและการมีตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะได้ไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดการแข่งขันกับตำแหน่งที่แท้จริง โดยเมื่อลดอุณหภูมิลงจากขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพไพรเมอร์ จะเคลื่อนไหวอยู่อย่างอิสระในปฏิกิริยาและเกิดพันธะกับดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่ออุณหภูมิลดลงเรื่อยๆ และจะเกิดสมดุลที่อุณหภูมิหนึ่ง คือ T_m ที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m ไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้น้อย ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่าT_m ไพรเมอร์จะเกาะได้สมบูรณ์ที่ตำแหน่งที่ถูกต้อง แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำลงมากไพรเมอร์จะเข้าเกาะตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องได้ด้วย นอกจากนี้ดีเอ็นเอในเซลล์ที่มีชุดซ้ำจำนวนมากก็จะกลับมาจับกันได้อย่างรวดเร็ว และจะขัดขวางการจับตัวระหว่างไพรเมอร์กับตำแหน่งเป้าหมาย ในการปรับประสิทธิภาพของปฏิกิริยาจะเริ่มทดลองทำพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิที่ T_m -5 องศาเซลเซียส และปรับโดยเพิ่มหรือลดอุณหภูมิครั้งละ 2 องศาเซลเซียส จนเลือกได้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือได้ผลผลิตที่ถูกต้องปริมาณมาก สำหรับเวลาที่ใช้ในขั้นนี้โดยทั่วไปใช้ประมาณ 30 – 60 วินาทีก็เพียงพอ

ขั้นสุดท้ายคือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ ใช้อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์ *Taq* polymerase คือ 72 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ส่วนใหญ่มีค่า T_m ต่ำ กว่า 72 องศาเซลเซียส ดังนั้นที่อุณหภูมินี้ไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ไม่สมบูรณ์ แต่ที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เป็นเพราะเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากช่วง annealing มาสู่ช่วง extension ปฏิกิริยา การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นแล้วอย่างช้าๆ เมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแล้วไพรเมอร์ก็จะมีเบสยาวเพิ่มขึ้นทำให้มีความเสถียรพอที่จะสังเคราะห์ต่อไปได้ ในสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ *Taq* polymerase จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้หลายพันเบสต่อนาที ดังนั้นถ้าผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหมายมีขนาดน้อยกว่า 500 คู่เบส จะใช้เวลาพียง 30 วินาทีก็พอ ถ้าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ระหว่าง 500 – 1,500 คู่เบสจะใช้เวลา 60 วินาที และถ้าขนาดยาวกว่า 1,500 คู่เบสจะใช้เวลา 90 วินาที โดยใช้เวลาเพิ่มขึ้นประมาณ 1 นาที ต่อผลผลิตที่มีขนาดเพิ่มขึ้น 1,000 คู่เบส จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ขึ้นกับปริมาณเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบโดยทั่วไปจะใช้ 30 – 35 รอบ หรือไม่เกิน 40 รอบ เพราะว่าถ้าใช้มากกว่า 40 รอบ อาจทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงเพิ่มมากขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.3 ปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความต้องการแมกนีเซียมไอออนในความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยแมกนีเซียมไอออนจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ผลผลิตดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ไพรเมอร์ และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่อยู่ในปฏิกิริยา ถ้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนน้อยเกินไปปฏิกิริยาจะไม่เกิดขึ้น หรือเกิดได้ไม่ดีทำให้เกิดผลผลิตต่ำ แต่ถ้ามีแมกนีเซียมไอออนมากเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงมากขึ้น จึงควรปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนให้เหมาะสม โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5 มิลลิโมลาร์ แต่ควรปรับเพิ่มหรือลดครั้งละ 0.5 มิลลิโมลาร์จนได้ค่าที่ดีที่สุด

2.2.3.4 ปรับองค์ประกอบอื่น

ถ้าปรับเปลี่ยนสภาพต่างๆ จากข้อ 1 ถึงข้อ 3 แล้วยังไม่ได้ผลอาจลองปรับเปลี่ยนสภาวะอื่น เช่น ปรับพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในช่วง 8.0 – 10.0 โดยปรับเพิ่มครั้งละ 0.5 (ปกติใช้ 8.3) หรือปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ เอนไซม์ หรือดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ดีเอ็นเอต้นแบบบางชนิดมีองค์ประกอบ กัวนีนและไซโตซีนสูง อาจต้องใส่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น DMSO (dimethy sulfoxide) หรือ formamide ลงไปเพื่อลดค่า T_m ทำให้การเสียสภาพของดีเอ็นเอเกิดได้สมบูรณ์ นอกจากนี้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้อาจมีสารปนเปื้อนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงควรเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบใหม่หรือสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีใหม่

2.2.4 วิธีการปรับปรุงปฏิกิริยาพีซีอาร์ (สุรินทร์, 2545)

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลผลิตที่ถูกต้อง ถ้าปรับสภาวะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพตามที่กล่าวแล้วยังไม่ได้ผลอาจใช้วิธีพีซีอาร์ประยุกต์ดังต่อไปนี้

2.2.4.1 Hot start PCR

เป็นวิธีควบคุมให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มขึ้นหลังจากดีเอ็นเอ เสียสภาพอย่างสมบูณ์แล้วเท่านั้นขณะที่เริ่มทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพครั้งแรกโดยเพิ่มอุณหภูมินั้น ไพรเมอร์อาจเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องและเกาะได้แบบไม่สมบูรณ์ แต่เอนไซม์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ได้ ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ถูกต้อง วิธีที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในช่วงที่เพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องไปถึงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพครั้งแรก ทำได้โดยยังไม่ต้องใส่สารบางชนิดลงในปฏิกิริยา เช่น ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต แมกนีเซียมไอออนหรือเอนไซม์ โดยการใส่สารทุกชนิดยกเว้นเพียง 1 ชนิด นำหลอดปฏิกิริยาไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแล้วจึงใส่สารประกอบตัวสุดท้ายลงไป แต่การทำ hot start PCR โดยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลามาก อาจใช้วิธีแยกส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่ให้ปนกันโดยใช้ขี้ผึ้ง (wax) ปิดไว้ด้านบนของสารละลายในปฏิกิริยา แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงใส่สารประกอบตัวหนึ่งไว้บนขี้ผึ้ง เมื่ออุณหภูมิสูงเพียงพอขี้ผึ้งจะหลอม ทำให้สารละลายที่อยู่ด้านบนไหลลงไปรวมตัวกับสารละลายทั้งหมด และทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ตามปกติ ปัจจุบันใช้เอนไซม์ที่มีแอนติบอดีจับอยู่และแอนติบอดีจะปลดปล่อยเอนไซม์เพื่อให้ทำปฏิกิริยาได้เมื่อได้รับความร้อนถึงอุณหภูมิที่ต้องการเท่านั้น

2.2.4.2 Nested PCR

เป็นวิธีทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรก เริ่มทำพีซีอาร์ปกติโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์แล้วจึงนำมาทำให้เจือจางลง แล้วทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ใหม่ซึ่งมีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครั้งแรก ผลที่ได้ครั้งที่ 2 นี้จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงในการทำพีซีอาร์ครั้งที่2 อาจใช้ไพรเมอร์คู่เดิม 1 ชนิด และใช้ไพรเมอร์ใหม่อีก 1 ชนิดที่มีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอครั้งแรก ซึ่งเรียกว่า seminested PCR ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ถึง 2 ครั้ง และอาจมีการปนเปื้อนจากการดูดสารละลายจากหลอดหนึ่งมายังอีกหลอดหนึ่ง

2.2.4.3 Touch down PCR

เป็นการทำพีซีอาร์โดยใช้สภาวะที่เข้มงวดมาก (high stringency) ในรอบแรก และค่อยๆ ลดลงในรอบต่อมาตามลำดับ วิธีนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณน้อยและมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย

การปฏิบัติใช้วิธีปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้สูงในรอบแรกและค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงทีละน้อยในรอบต่อๆ มาจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการทำปฏิกิริยาจริงๆ ในรอบแรกๆ ไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ยากเนื่องจากอุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m มาก จึงจับตัวได้เฉพาะตำแหน่งที่ถูกต้องจริงๆ เท่านั้น ในรอบต่อๆ มาแม้ว่าจะลดอุณหภูมิลง แต่ผลผลิตที่ถูกต้องจะเพิ่มมากขึ้นเป็นหลายเท่าและมีมากกว่าดีเอ็นเออื่นมาก จึงไม่ต้องกลัวว่าไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเออื่นที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอีกต่อไป

2.2.4.4 Booster PCR

เป็นการทำพีซีอาร์โดยใส่ไพรเมอร์ปริมาณน้อยๆ ในช่วงแรก และเพิ่มความเข้มข้นให้เท่ากับปกติในการทำปฏิกิริยาช่วงหลังการใส่ไพรเมอร์ปริมาณน้อยๆ ทำให้การจับตัวของไพรเมอร์และดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง (mispriming) เกิดได้น้อยลง ทำให้ได้เฉพาะผลผลิตที่ถูกต้องเท่านั้น ในรอบหลังๆ ผลผลิตที่ถูกต้องมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากแล้ว ทำให้การจับตัวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกต้องเกิดได้ดีกว่าคล้ายกับวิธีทำ touch down PCR นั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

เชื้อไกลดิงแบคทีเรียที่เก็บแบบ Lyophyllization จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 96GB 37GB 66GB 38GB และ 83GB

จานเลี้ยงเชื้อ (Sterilin)

ขวดเลี้ยงเชื้อ (Pyrex 250 มิลลิลิตร)

มีดตัดวุ้น

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CX 31)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova 4080)

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิ (Tomy:High Speed Micro Refrigerated Centrifuge MRX-150)

ไมโครปิเปต (Gilson)

ตู้แช่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Toshiba GR-A1652) และ -20 องศาเซลเซียส (Whirpool WH B9)

ตู้บ่มเชื้อ (Incucell Model 55)

ตู้เขี่ยเชื้อ (Heraeus รุ่น Herasafe)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Tomy รุ่น SS-245 และ SS-325)

เครื่องเพิ่มขยายปริมาณยีน (GeneAmp PCR System 9700)

หลอดทำพีซีอาร์ (PCR tube)

เครื่องทำ gel electrophoresis (Bio-Rad รุ่น Power Pac Basic)

เครื่องส่องดูเจลภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (Gel Documentation:Syngene รุ่น CHEMI GENIUS 2)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Cyberscan รุ่น MP225)

เครื่องชั่งน้ำหนัก (Satorius รุ่น LA 320S)

เครื่องแก้ว

นาฬิกาจับเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องอุ่นสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Heat box: Thermolyne Type 16500 Dri bath และ Water bath: Memmert)

เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (Automated DNA Sequencer :ABI PRISM 310 Genetic Analyzer))

หลอดสำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส (Genetic Analyzer Sample tube)

จุกยางปิดหลอดวิเคราะห์ลำดับเบส (Genetic septa)

Vortex (Vortex-2 Genie)

ชุดสกัดดีเอ็นเอทางการค้า Wizard® Genomic DNA Purification Kit

ชุดทำให้บริสุทธิ์ทางการค้า (GFX PCR DNA และ Gel Band Purification kit)

PCR reaction mixture

อาหารเลี้ยงเชื้อ CYE agar CYE broth SAP2 agar และ SAP2 broth

สารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเชื้อไกลดิงแบคทีเรียเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อไกลดิงแบคทีเรียที่ได้แยกให้บริสุทธิ์ซึ่งเก็บด้วยวิธีระเหิดแห้งทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 96GB 37GB 66GB 38GB และ 83GB มาผสมอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ คือ สายพันธุ์ 96GB และ 37GB เลี้ยงในอาหารเหลว SAP2 broth แล้วหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SAP2 agar ส่วนสายพันธุ์ 66GB 38GB และ 83GB เลี้ยงในอาหารเหลว CYE broth แล้วหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYE agar จากนั้นบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน รอจนเชื้อเจริญแล้วจึงทำการถ่ายเชื้อด้วยการตัดขอบโคโลนีมาวางลงบนขอบของจานเพาะเลี้ยงใหม่ (อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งชนิดเดียวกันกับที่ใช้หยดสารละลายเซลล์) โดยปกติจะเก็บได้ประมาณ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะต้องทำการถ่ายเชื้อใหม่ จากนั้นตัดชิ้นวุ้นมาลงบนอาหารเหลว CYE broth หรือ SAP2 broth (สายพันธุ์ 96GB และ 37GB เลี้ยงในอาหารเหลว SAP2 broth และสายพันธุ์ 66GB 38GB และ 83GB เลี้ยงในอาหารเหลว CYE broth) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหลังจากนั้นจึงนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไกลดิงแบคทีเรีย

การสกัดดีเอ็นเอในการศึกษานี้เลือกใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดทางการค้า Wizard® Genomic DNA Purification Kit โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดทางการค้ามีขั้นตอนในการสกัดดังนี้คือ ดูดเชื้อไกลดิงแบคทีเรียมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วทำซ้ำอีกครั้ง (ตั้งแต่ดูดเชื้อใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จนถึงตอนนำมาปั่นเหวี่ยง) ล้างเซลล์ด้วย TE buffer pH 8.0 สองครั้ง ก่อนนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม 480 ไมโครลิตรของ 50 มิลลิโมลาร์ ของ EDTA และ 120 ไมโครลิตรของไลโซไซม์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีแล้วจึงทิ้งส่วนใส หลังจากนั้นจึงเติม 600 ไมโครลิตรของ Nuclei Lysis Solution ดูดเซลล์ขึ้นลงเบาๆ ด้วยไมโครปิเปตจนกระทั่งเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย่อยเซลล์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงเติม 3 ไมโครลิตรของ RNase Solution กลับหลอดไปมา 2-5 ครั้ง ก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตรของ Protein Precipitation แล้วนำไป vortex (ปั่นเพียงเล็กน้อยให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน) เป็นเวลา 20 วินาที นำไปแช่ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จึงนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่มีดีเอ็นเออยู่ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดใหม่ที่ใส่ 600 ไมโครลิตรของไอโซโพรพานอลเอาไว้แล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นเป็นเส้นสีขาวๆ ละลายอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้เทส่วนใสทิ้งแล้วซับหลอดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ล้างตะกอนด้วย 600 ไมโครลิตรของเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยการกลับหลอดไปมาหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วซับหลอดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู โดยทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นให้ผึ่งหลอดให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที จนตะกอนแห้ง แล้วจึงเติม 50 ไมโครลิตรของ DNA Rehydration Solution เพื่อละลายดีเอ็นเอ นำไปเก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน 16S Ribosomal DNA โดยวิธีพีซีอาร์

ยีน 16S Ribosomal DNA ของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ Taq express ของ Takara และ primer BF_1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ BR_1(5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Nakagawa และคณะ, 2002) ซึ่งมีสภาวะดังต่อไปนี้ (ทำการเพิ่มปริมาณ 25 รอบ)

- Initial Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที
- Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 วินาที
- Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
- Primer Extension	ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที
- Final Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปรันเจล เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการเพิ่มปริมาณ นำดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย GFX PCR DNA และ Gel Band Purification kit ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้ คือ นำ GFX คอลัมน์ มาใส่ใน Collection tube เติม 500 ไมโครลิตร ของ Capture buffer ลงในคอลัมน์ดังกล่าว ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต 4-6 ครั้ง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนใสทิ้งแล้วเติม 500 ไมโครลิตร ของ Wash buffer ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว

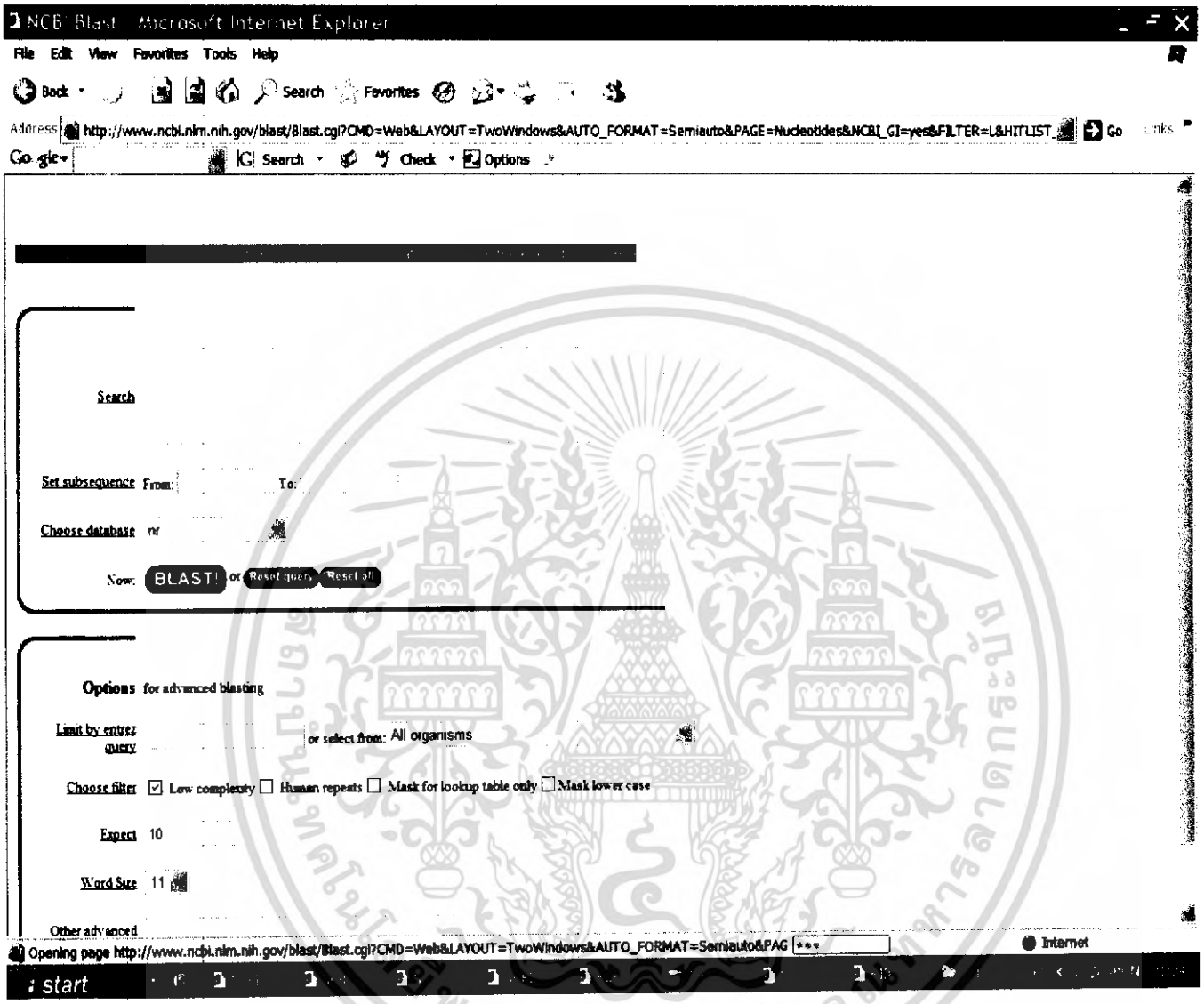
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบและเวลาเท่าเดิม เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นจึงนำคอลัมน์มาใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม 50ไมโครลิตร ของ Elution buffer ลงในคอลัมน์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่มีดีเอ็นเออยู่ นำดีเอ็นเอที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ด้วยการรันเจล ก่อนนำดีเอ็นเอดังกล่าวส่งไปหาลำดับเบสของยีน 16S Ribosomal DNA ต่อไป

3.2.4 การเปรียบเทียนลำดับเบสของยีน 16S Ribosomal DNA กับฐานข้อมูล NCBI

เมื่อได้ลำดับเบสของเชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์แล้ว นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลในเว็บไซต์ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast เมื่อเปิดหน้าเว็บไซต์แล้วให้คลิกคำว่า " blast " แล้วนำลำดับเบสที่ได้จากการ sequencing (ประมาณ 1256 เบส) ใส่ลงในช่อง search แล้วคลิก คำว่า " BLAST " (รูปที่ 11) แล้วเมื่อมีหน้าเว็บไซต์ใหม่ขึ้นคลิกคำว่า " Format " (รูปที่ 12) จะปรากฏผลการทดลองซึ่งจะบอกว่าลำดับเบสของเชื้อมีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ใด โดยจะบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบส (%Identities) ซึ่งถ้าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบสต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ลงไปถือว่าเชื้อที่ทำการเปรียบเทียบเป็นสายพันธุ์ใหม่ (Lesk, 2002)

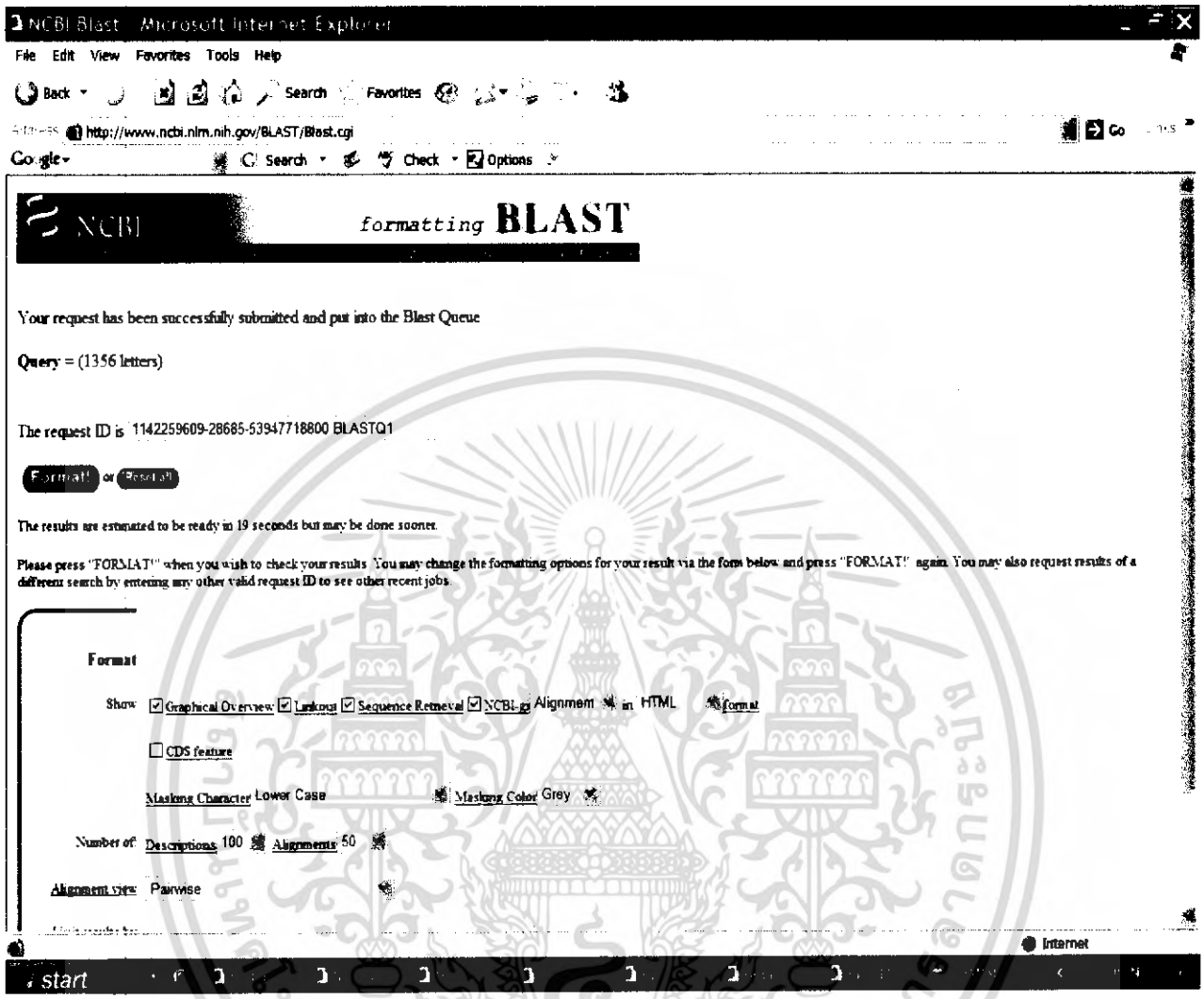
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 แสดงหน้าต่างของ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast ที่ใส่ลำดับเบสลงไปในช่อง search แล้วคลิก " BLAST "

(ที่มา www..ncbi.nlm.nih.gov/blast)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



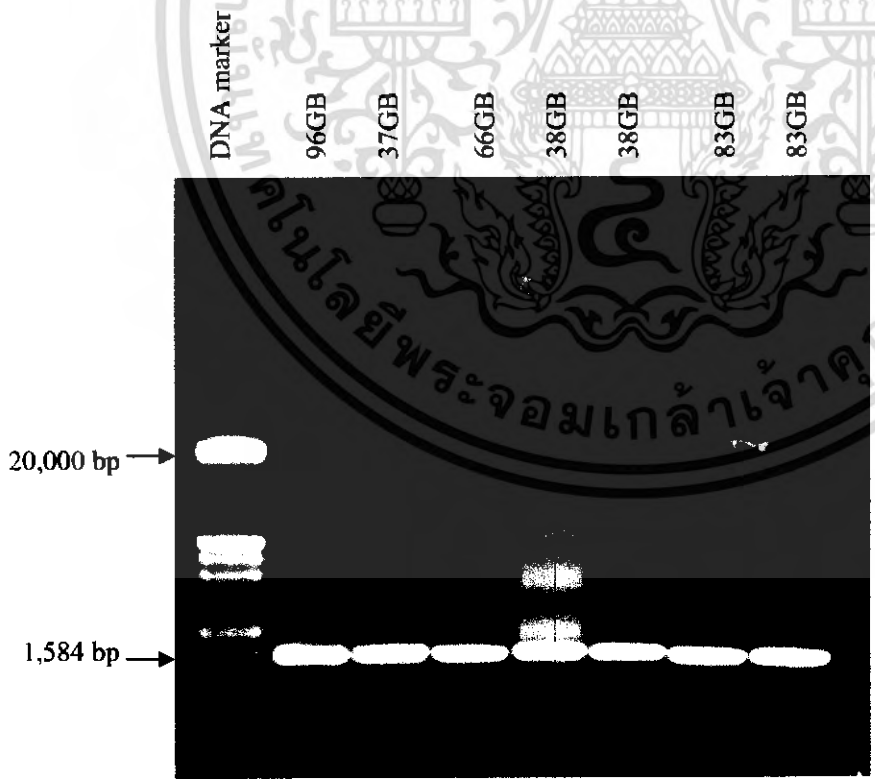
รูปที่ 12 แสดงหน้าต่างของ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast หลังจากที่ใส่ลำดับเบสและคลิก BLAST แล้ว เมื่อปรากฏหน้าต่างนี้ให้คลิก Format (ที่มา www..ncbi.nlm.nih.gov/blast)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการวิจัย

จากการทำการทดลองเพื่อจัดจำแนกเชื้อไกลดิงแบคทีเรียที่เก็บรักษาแบบระเหิดแห้ง จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 96GB 37GB 66GB 38GB และ 83GB ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารดังนี้ คือ เชื้อสายพันธุ์ 96GB และ 37GB เลี้ยงในอาหาร SAP2 agar และ SAP2 broth ส่วนสายพันธุ์ 66GB 38GB และ 83GB เลี้ยงในอาหาร CYE agar และ CYE broth พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวประมาณ 2-3 วันสามารถนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์แล้วจึงนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำดีเอ็นเอที่ได้นี้ไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA โดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งในการทดลองมีการใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ BF_1(5'- GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ BR_1(5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 ตัวนี้ สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และเมื่อทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอของทั้ง 5 สายพันธุ์โดยการรันเจล พบว่ามีขนาดเท่ากัน ดังรูป



รูปที่ 13 แสดงแถบ band ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยการรันเจลแล้วจึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะทำการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยลำดับเบสที่ได้จากการตรวจหาประมาณ 1,256 เบสนั้น นำไปทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งเป็นการนำลำดับเบสของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ เข้าไปตรวจดูว่าลำดับเบสของเชื้อที่ได้มีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อในฐานข้อมูลของเว็บไซต์ www..ncbi.nlm.nih.gov/blast เป็นกี่เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้พบว่าเชื้อไกลดิงแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 96GB 37GB 66GB และ 38GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ โดยเชื้อสายพันธุ์ 96GB และ 37GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Flexithrix แต่ต่างสปีชีย์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 92 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ 66GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Microscilla โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอเซ็นต์ และสายพันธุ์ 38GB เป็นจีนัส Flexibacter ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอร์เซ็นต์ (ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด เนื่องจากเป็นลิขสิทธิ์ของทางสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) และอีก 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 83GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cytophaga marina* Accession Number D12667 โดยมีเปอร์เซ็นต์ ความเหมือนของลำดับเบสจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายถึงลำดับเบสจำนวน 1,256 เบสของเชื้อสายพันธุ์ 83GB มีความเหมือนทุกตัวกับลำดับเบสของเชื้อ *Cytophaga marina* ในฐานข้อมูล ซึ่งข้อมูลของเชื้อ *Cytophaga marina* ในฐานข้อมูลนั้นเป็นงานวิจัยของ Nakagawa, Y. และ Yamasato, K. ในปี 1992 ซึ่งเป็นการจัดทำสายลำดับวิวัฒนาการของเชื้อในกลุ่มไซโทฟากา โดยใช้ 16S rRNA sequencing ซึ่งเป็นงานวิจัยที่มีเนื้อหาใกล้เคียงกัน โดยเป็นการจัดจำแนกเชื้อไกลดิงแบคทีเรีย ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำวิจัยมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้ผลการวิจัยเป็นไปในทางเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อไกลดิงแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 96GB 37GB 66GB 38GB และ 83GB ซึ่งได้จัดไว้ในกลุ่มเดียวกันโดยการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี (โดยคุณฉัตรฤดี สุวรรณชาติ เจ้าหน้าที่ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) พบว่าเมื่อนำมาจัดจำแนกโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์นั้นพบว่า เชื้อ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 96GB 37GB 66GB และ 38GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ 96GB และ 37GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Flexithrix (ต่างสปีชีย์)ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 92 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ 66GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียในจีนัส Microscilla โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ 38GB เป็นจีนัส Flexibacter ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส 97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 83GB เป็นเชื้อไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cytophaga marina* Accession Number D12667 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่ได้จัดไว้ในกลุ่มเดียวกันเหมือนในการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบว่าการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยการจัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อทำให้การจัดจำแนกกลุ่มหรือชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากเชื้อไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยนั้น เป็นเชื้อที่มีลักษณะการเจริญบนอาหารวุ้นคล้ายกับแผ่นฟิล์มบางๆ อาจทำให้การสังเกตการเจริญของเชื้อเป็นไปได้ยาก เพราะโคโลนีของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ไม่มีสี ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาในขั้นตอนที่ต้องตัดชิ้นวุ้นของอาหารวุ้น ใส่ในอาหารเหลวเพื่อเตรียมเซลล์ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยอาจทำให้เชื้อตายก่อนหากเก็บเชื้อไว้นานหลายวัน (เนื่องจากมองไม่เห็นการเจริญของเชื้อ) และเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่มีเมือกมากดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เพื่อเก็บเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอ ต้องมีความระมัดระวังในการดูดสารละลายเซลล์ (ดูดโดยใช้ไมโครปิเปต) ซึ่งหากมีเมือกปนมามากจะทำให้ได้ตัวเซลล์น้อย นอกจากนี้ยังทำให้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดไม่บริสุทธิ์อีกด้วย

5.2.2 ในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการใช้เทคนิคพีซีอาร์ สิ่งที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ การเลือกใช้ไพรเมอร์ ในงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์เพียง 2 ตัว ซึ่งอาจไม่เพียงพอ โดยสังเกตได้จากลำดับเบสที่ได้จากการ sequence มีบริเวณที่อ่านลำดับเบสไม่ได้เกิดขึ้น ซึ่งถ้าเป็นงานวิจัยในระดับสูงต่อไปควรมีการเลือกใช้ไพรเมอร์ให้สอดคล้องกับเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยและควรใช้มากกว่า 2 ตัวเพื่อความถูกต้องมากขึ้น

5.2.3 การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ถือเป็นการทดลองในขั้นพื้นฐานของการทดลองในขั้นสูงต่อไป โดยเฉพาะในการทดลองหรืองานวิจัยที่ต้องนำเชื้อจุลินทรีย์ที่จัดจำแนกได้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไปในอนาคต ดังนั้นการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ให้ถูกต้องจึงมีความสำคัญ และมีประโยชน์อย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานนโยบายและสิ่งแวดล้อม. 2541. การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่สงวนชีวมณฑล. กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม : กรุงเทพฯ

Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. 1991. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Springer-Verlag New York

Lesk, A.M. 2002. Introduction to Bioinformatics. New York : Oxford University Press

Li, X., Liu, J. and Gao, P. 1995. A simple method to the isolation of cellulolytic myxobacteria and cytophagales. *Journal of Microbiological methods* 25:43 –47

Li, Y.Z., Hu, W., Zhang, Y.Q., Qui, Z.J., Zhang, Y. and Wu, B.H. 2002. A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. *Journal of Microbiological Methods* 50

Lizuka, T. , Jojima, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S. 1998. Isolation of myxobacteria from marine environment. *Journal of FEMS Microbiology Letters* 169 : 317-322

McPHESON, M.J., QUIRKE, P., TAYLOR, G.R. 1991-1995. PCR: a practical approach. Oxford : IRL Press

Nakagawa, Y., Suzuki, M. and Hatano, K. 2001. Phylogenetic diversity of Cytophaga like strains isolated from the sub-tropical zone of Japan. *IFO Res. Common.*,20:61-72

Nakagawa, Y. and Yamasato, K. 1992. Phylogenetic diversity of the genus Cytophaga revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. *J. Gen. Microbiol.* 139 : 1155-1161

Nguimbi, E., Li, Y.Z., Gao, B.L., Li, Z.F., Wang, B., Wu, Z.H., Yan, B.X., Qu, Y.B. and Gao, P.J. 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic Myxobacteria and Differentiation of Closely Related Strains. *System. Appl Microbiol.* 26: 262 - 268

Reichenbach, H. 1999. The Ecology of the Myxobacteria ; The Minireview of Environmental Microbiology 1 : 15 – 20

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning A Laboratory manual. New York : Cold Spring Habor Press

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://cmgm.stanford.edu/~kaiserla/about_myxo/about_myxococcus.html

http://users.vgent.be/~avierstr/principles/pcr.html

www.bricker.tcnj.edu/micro/le8/myx2.gif

www..ncbi.nlm.nih.gov/blast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

1. SAP2 agar

- tryptone	0.1 กรัม
- yeast extract	0.1 กรัม
- agar	1.5 กรัม
- sea water	100 มิลลิลิตร

pH 7.2

2. SAP2 broth

- tryptone	0.1 กรัม
- yeast extract	0.1 กรัม
- sea water	100 มิลลิลิตร

pH 7.2

3. CYE agar

- casitone	0.5 กรัม
- yeast extract	0.3 กรัม
- $MgSO_4$	0.1 กรัม
- agar	1.5 กรัม
- distilled water	100 มิลลิลิตร

pH 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. CYE broth

- casitone	0.5 กรัม
- yeast extract	0.3 กรัม
- $MgSO_4$	0.1 กรัม
- distilled water	100 มิลลิลิตร

pH 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

1. EDTA 0.5 M (stock solution)

- $Na_2EDTA.2H_2O$ 18.6 กรัม
- distilled water 70 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 8.0 โดยการเติม 10M NaOH 5 มิลลิลิตร ในขณะ stirring

* EDTA จะไม่ละลายจนกว่า pH จะเข้าใกล้ 8.0

2. Tris Cl pH 8.0

- Tris base 121.1 กรัม
- distilled water 800 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 8.0 โดยใช้ HCl

3. TE buffer pH 8.0

- Tris Cl (pH 8.0) 100 มิลลิโมลาร์
- EDTA (pH 8.0) 10 มิลลิโมลาร์

4. TBE buffer (stock solution)

- 5 x Tris base 54 กรัม
  Boric acid 27.5 กรัม
  0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร

5. TAE buffer (stock solution)

- 50 x Tris base 242 กรัม
  Gracial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
  0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Agarose gel 0.7% w/v

- Agarose 0.7 กรัม
- TBE หรือ TAE buffer 100 มิลลิลิตร

*** เลือกใช้ TBE หรือ TAE ขึ้นอยู่กับว่าใช้ electrolyte เป็นตัวไหนก็ให้ใช้ตัวเดียวกับที่ใช้ในการรันเจล**

7. stock primer 200 ไมโครโมล

7.1 - primer BF 1 ที่มีค่า OD purified 11.39 353.09 ไมโครกรัม
- milli Q water 298 ไมโครลิตร

7.2 - primer BR 1 ที่มีค่า OD purified 11.56 358.36 ไมโครกรัม
- milli Q water 292.02 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Cytophaga marina* (จากการ sequencing)

```
   1 gggtgcgtaa cgcgtataga atctgccttc tacagaggga tagcctttag aaatgaagat
  61 taatncctca  taacactttg gaatggcatc gttttaaagt taaagattta tcggtagaag
 121 atgactatgc ntcctattag ctagatggta aggtaacggc ttaccatggc nacgataggt
 181 aggggtcctg agagggagat cccccacact ggtactgaga cacggaccag tctcctacgg
 241 gaggcagcan tgaggaatat tgggcaatgg aggcaactct tacccagcca tgccgcgtgc
 301 aggaagactg ccctatgggt tgtaaactnc ttttatacag gaagaaacgt acctncgagt
 361 aggtatttga cggtactgta agaataagga ccggctaact ccgtgccagc anccncggtn
 421 atacggagng tcctagcgtt atccggaatc attgggttta aagggtccgc aggcggtcga
 481 ttaagtcaga ggtgaaatcc catagcttaa ctatggaact gcctttgata ctggttgact
 541 tgagtaatac ggaagtagat agaatatgta gtgtagcggt gaaatgcata gatattacat
 601 agaataccga ttgcgaaggc tgtctactac gtatttactg gcgctcatgg acgaaagcgt
 661 gggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgg acactagttg
 721 ttgggaaata tctcagtgac taagcgaaag tgataagtgt cccacctggg gagtacgatc
 781 gcaagattga aactcaaang aattgacggg nncccgcaca agcggtggag catgtggttt
 841 aattcgatga tacgcgagga accttaccag ggcttaaatg tggaatgaca gggctagaga
 901 tagcnttttc ttcggacatt tcacaaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga
 961 ggtgttaggt taagtcctat aacgagcgca acccctattg ttagttgcta gcatgtaaag
1021 ctgaggactc tagcgagact gccggtgcat accgtgagga tggtngggat gacgttaaat
1081 catcacggcc cttacgtcct gggctacaca cgtgctacaa tggtatggac aatgagcagc
1141 catctggctt cagagagcga atctacaaac catatcacag ttcggatcgg agtctgcnac
1201 tcgactccgt gaagctggaa tcgctagtaa tcggatatca gccatgatcc ggtgaa
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การจับคู่กันของลำดับเบสของเชื้อจากการทดลองกับลำดับเบสของเชื้อในฐานข้อมูล NCBI

>gi|425726|dbj|D12667.1|CYT16SRR14 C.marina 16S ribosomal RNA, partial sequence
Length=1256

Score = 2395 bits (1208), Expect = 0.0
Identities = 1256/1256 (100%), Gaps = 0/1256 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1
GGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTCTACAGAGGGATAGCCTTTAGAAATGAAGAT  60
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1
GGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTCTACAGAGGGATAGCCTTTAGAAATGAAGAT  60

Query  61
TAATNCCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTTTTAAAGTTAAAGATTTATCGGTAGAAG  120
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61
TAATNCCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTTTTAAAGTTAAAGATTTATCGGTAGAAG  120

Query  121
ATGACTATGCNTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCATGGCNACGATAGGT  180
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121
ATGACTATGCNTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCATGGCNACGATAGGT  180

Query  181
AGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGTCTCCTACGG  240
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181
AGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGTCTCCTACGG  240

Query  241
GAGGCAGCANTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTTACCCAGCCATGCCGCGTGC  300
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241
GAGGCAGCANTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTTACCCAGCCATGCCGCGTGC  300

Query  301
AGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTNCTTTTATACAGGAAGAAACGTACCTNCGAGT  360
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301
AGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTNCTTTTATACAGGAAGAAACGTACCTNCGAGT  360

Query  361
AGGTATTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCANCCNCGGTN  420
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361
AGGTATTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCANCCNCGGTN  420
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Query 421
ATACGGAGNGTCCTAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGTCGA 480
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 421
ATACGGAGNGTCCTAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGTCGA 480

Query 481
TTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAACTGCCTTTGATACTGGTTGACT 540
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 481
TTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAACTGCCTTTGATACTGGTTGACT 540

Query 541
TGAGTAATACGGAAGTAGATAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACAT 600
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 541
TGAGTAATACGGAAGTAGATAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACAT 600

Query 601
AGAATACCGATTGCGAAGGCTGTCTACTACGTATTTACTGGCGCTCATGGACGAAAGCGT 660
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601
AGAATACCGATTGCGAAGGCTGTCTACTACGTATTTACTGGCGCTCATGGACGAAAGCGT 660

Query 661
GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGACACTAGTTG 720
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661
GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGACACTAGTTG 720

Query 721
TTGGGAAATATCTCAGTGACTAAGCGAAAGTGATAAGTGTCCCACCTGGGGAGTACGATC 780
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721
TTGGGAAATATCTCAGTGACTAAGCGAAAGTGATAAGTGTCCCACCTGGGGAGTACGATC 780

Query 781
GCAAGATTGAAACTCAAANGAATTGACGGGNNCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT 840
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781
GCAAGATTGAAACTCAAANGAATTGACGGGNNCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT 840

Query 841
AATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTGGAATGACAGGGCTAGAGA 900
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841
AATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTGGAATGACAGGGCTAGAGA 900

Query 901
TAGCNTTTTCTTCGGACATTTCACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGA 960
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 901
TAGCNTTTTCTTCGGACATTTCACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGA 960
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Query 961
GGTGTTAGGTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCTAGCATGTAAAG 1020
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 961
GGTGTTAGGTTAAGTCCTATAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCTAGCATGTAAAG 1020

Query 1021
CTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCATACCGTGAGGATGGTNGGGATGACGTTAAAT 1080
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1021
CTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCATACCGTGAGGATGGTNGGGATGACGTTAAAT 1080

Query 1081
CATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTATGGACAATGAGCAGC 1140
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1081
CATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTATGGACAATGAGCAGC 1140

Query 1141
CATCTGGCTTCAGAGAGCGAATCTACAAACCATATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCNAC 1200
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1141
CATCTGGCTTCAGAGAGCGAATCTACAAACCATATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCNAC 1200

Query
 1201 TCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGGTGAA 1256
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct
 1201 TCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGGTGAA 1256
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้