หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ความเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์ของดีเอนเอ

ในการวิเคราะห์รูปแบบการตัดดีเอนเออย่างจำเพาะโดยเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆ นั้น ความสะอาดและความเป็นโมเลกุลสมบูรณ์ (intact molecule) ของดีเอนเอเป็นสิ่งสำคัญมากที่จะทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำ การวิเคราะห์ดีเอนเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส จะสามารถบอกถึงรูปแบบรวมทั้งความเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์ของดีเอนเอได้ ดังเช่น Kieser (36) ได้รายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อดีเอนเอในรูป CCCDNA (covalently closed circular DNA) ของ Streptomyces lividans และ E. coli โดยดูจากแถบดีเอนเอที่ได้ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสในงานวิจัยนี้พบว่าแถบดีเอนเอของStreptomyces ทั้ง 5 ชนิด (รูปที่ 1) มีลักษณะเป็นแถบเดียวปรากฏอยู่ในตำแหน่งเดียวกับชิ้นส่วนขนาดใหญ่ที่สุดของ λ ดีเอนเอที่ถูกตัดด้วยHindIII โดยมีหมอกบางลาดลงมา (tailing) น้อยมาก ซึ่งแสดงว่าดีเอนเอที่เตรียมได้มีความสะอาดและอยู่ในรูปโมเลกุลสมบูรณ์ในปริมาณสูงมาก จึงเหมาะสมที่จะนำไปศึกษารูปแบบภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

การแปรปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยกแถบชิ้นส่วนดีเอนเอ

ผลการทดลองหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยกแถบชิ้นส่วนดีเอนเอโดยแปรปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่

ปริมาณเรสทริกชันเอนไซม์

แม้ว่าบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ได้ระบุว่า เรสทริกชันเอนไซม์ 1 หน่วยหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอนเอ 1 ไมโครกรัมที่ตำแหน่งเฉพาะได้อย่างสมบูรณ์โดยบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่นำมา

ใช้จริงอาจมีค่าไม่ถึง 100 % ซึ่งการเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะช่วยเพิ่มความสามารถในการตัดดีเอนเอให้สมบูรณ์โดยใช้เวลาสั้น ดังเช่น Hintermann และคณะ (26) รายงานว่าใช้ BamHI 10 หน่วยในการตัดดีเอนเอของ S. glaucescens ได้สมบูรณ์ แต่การใช้เอนไซม์ปริมาณมากก็เป็นการสิ้นเปลืองเพราะเรสทริกชันเอนไซม์มีราคาสูงมาก งานวิจัยนี้จึงได้แปรปริมาณเอนไซม์เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลองในรูปที่ 2 พบว่าการใช้เรสทริกชันเอนไซม์เพียง 6 หน่วยต่อ 1 ไมโครกรัมของดีเอนเอ ก็สามารถทำให้การตัดเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์

ความต่างศักย์ เวลา และความยาวของแผ่นเจลในการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

ความต่างศักย์และระยะเวลาในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า ซึ่งถึงแม้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับความแรงของสนามไฟฟ้าที่ใช้ แต่การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสจะทำให้เกิดการระเหยของสารละลายและทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างการทำอิเลกโทรโฟรีซีส โดยจะทำให้เกิดการแพร่ (diffusion) ของโมเลกุลและการแยกสารไม่ดีเท่าที่ควร ในทางตรงกันข้ามถ้าให้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไป ถึงแม้จะช่วยลดปัญหาเรื่องความร้อนที่เกิดขึ้น แต่ผลของการทำอิเลกโทรโฟรีซีสจะไม่ดีเนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสนานขึ้น ทำให้เกิดการแพร่ในอัตราที่เพิ่มขึ้น (37) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงแปรความต่างศักย์ เวลา รวมถึงความยาวของแผ่นเจลซึ่งจะมีผลต่อการทำอิเลกโทรโฟรีซีสด้วย เพื่อให้ได้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ชัดเจนที่สุด ซึ่งผลการวิจัยพบว่าที่ความต่างศักย์ 14 โวลต์/ซม. ของความยาวเจล (รูปที่ 3จ) จะได้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ดีที่สุด และได้ทำการทดลองเพิ่มเวลาในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสเป็น2ชั่วโมง 30 นาที(รูปที่ 4ข) พบว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอไม่ชัดเจนเท่าที่ใช้เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที (รูปที่ 4ก) ซึ่งอาจเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นตามเหตุผลดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ยังได้เพิ่มความยาวของแผ่นเจลจาก 7 ซม. (รูปที่ 6ก) เป็น 15 ซม. ซึ่งต้องใช้ความต่างศักย์ถึง 210 โวลต์ (14 โวลต์ / ซม.ของความยาวเจล) พบว่าบัฟเฟอร์มีอุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจาก V= IR (V = ความต่างศักย์ไฟฟ้า I=กระแสไฟฟ้าและR=ความต่างศักย์) จึงเป็นผลทำให้

กำลังไฟฟ้าสูงขึ้น (37) และจะเกิดผลอื่น ๆ ตามมาดังกล่าว และยังได้ทำการทดลองลดความต่างศักย์ลงโดยใช้ความยาวเจล 15 ซม. ก็ยังเกิดปัญหาเกี่ยวกับอัตราการแพร่เพิ่มขึ้น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสนาน ซึ่งปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นเนื่องจากความจำกัดของอุปกรณ์ อาจจะแก้ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ได้ดังรายงานการวิจัยของ Collins และ De Lisle (28) ที่ได้ใช้เจลที่มีความยาวถึง 26 ซม. ในการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องสูบเป็นจังหวะ (peristaltic pump) ช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์เพื่อรักษาความเป็นกรด - ด่าง (pH) ให้คงที่และช่วยลดความร้อนที่เกิดขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้ชิ้นส่วนดีเอนเอแยกออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น

เปอร์เซ็นต์ของอะกาโรสเจล

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลมีผลต่อขนาดของดีเอนเอที่เคลื่อนที่ กล่าวคือถ้าเปอร์เซนต์เจลสูง เจลจะมีรูตาข่ายเล็ก ขนาดของดีเอนเอที่มีขนาดเล็กจึงจะเคลื่อนที่ได้ และถ้าเปอร์เซนต์เจลต่ำ เจลจะมีรูตาข่ายใหญ่ ดีเอนเอทั้งขนาดเล็กและใหญ่สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซนต์ของอะกาโรสเจลที่เหมาะสมคือ 0.7% (รูปที่ 5ค) และขนาดชิ้นส่วนที่ปรากฏเด่นชัดของโครโมโซมอลดีเอนเอในการวิจัยนี้มีช่วงขนาด 25.0 - 1.75 kb ซึ่งสอดคล้องกับ Maniatis และคณะ (38) ได้แสดงความสัมพันธ์เส้นตรงของขนาดดีเอนเอกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลโดยพบว่า 0.6 - 0.7% ของอะกาโรสเจลจะแยกดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 20.0 - 0.8 kb ได้ดี

ชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตัดโครโมโซมอลดีเอนเอ

เรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีตำแหน่งจดจำในการตัดดีเอนเอที่แตกต่างกันไป การวิจัยนี้จะอาศัยรูปแบบการเรียงตัวของดีเอนเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ในการบอกความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงของตำแหน่งจดจำในดีเอนเอของ Streptomyces ชนิดต่าง ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ที่

เหมาะสมในการตัดโครโมโซมอลดีเอนเอดังกล่าว จากการตัดโครโมโซมอลดีเอนเอของ Streptomyces sp. 42-9 Streptomyces sp. 190-1 S. glaucescens S. coelicolor A3(2) และ S. lividans 1326 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่า PstI (รูปที่ 7จ) ตัดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ BamHI (รูปที่ 7ก) BglII(รูปที่ 7ข) และ EcoRI (รูปที่ 7ค) ตามลำดับ โดยมีตำแหน่งจดจำคือ C'TGCA G'GATCC A'GATCT และ G'AATTC ตามลำดับ Hintermann และคณะ (26) ได้ศึกษาการตัดดีเอนเอของ Streptomyces สายพันธุ์ต่าง ๆ ก็พบว่าถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย BamHI แสดงว่า Streptomyces spp. มีตำแหน่งจดจำในโครโมโซมอลดีเอนเอคล้ายคลึงกัน แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอของ Streptomyces ที่ทราบชนิดที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดแม้ จะมีบางชิ้นส่วนที่มีขนาดเท่ากัน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบการเรียงตัวของแถบชิ้นส่วนดีเอนเอของ Streptomyces ที่ทราบชนิดและ Streptomyces ที่ไม่ทราบชนิดบนอะกาโรสเจลที่ผ่านการทำอิเลกโทรโฟรีซีส

ขนาดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันจะแสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ได้ ถึงแม้ว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอจะแตกต่างกัน จากผลการวิจัยพบว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ Streptomyces sp. 42-9 Streptomyces sp. 190-1 S. glaucescens S. coelicolor A3(2) และ S. lividans 1326 ภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ PstI (รูปที่ 7จ) BamHI (รูปที่ 7ก) BglII (รูปที่ 7ข) และ EcoRI (รูปที่ 7ง) แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดและเมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอนเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะมีจะมีแถบเด่นบางแถบที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4ก 4ข 4ค และ 4ง ตามลำดับ) ในทำนองเดียวกัน Streptomyces ที่ไม่ทราบชนิดจะมีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 8ก - 8ง และรูปที่ 9ก - 9ง) และจะมีแถบเด่นบางแถบที่มีขนาด

เท่ากันหรือใกล้เคียงกันกับ Streptomyces ที่ทราบชนิดเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ Streptomyces sp. 20306 ภายหลังการตัดด้วย PstI (ตารางที่ 5ก) BamHI (ตารางที่ 5ข) BglII (ตารางที่ 5ค) และ EcoRI (ตารางที่ 5ง) จะมีแถบเด่นคล้ายกับ S. lividans 1326 (ตารางที่ 4ก) Streptomyces sp. 190-1 (ตารางที่ 4ข) S. glaucescens (ตารางที่ 4ค) และ Streptomyces sp. 190-1 (ตารางที่ 4ง) ตามลำดับ

Klich และ Mallaney (20) รายงานถึงการใช้ชิ้นส่วนของดีเอนเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เป็นวิธีบอกความแตกต่างของ Aspergillus flavus และ Aspergillus oryzae ซึ่งพบว่าเมื่อตัดดีเอนเอด้วย SmaI จะได้ชิ้นส่วนของดีเอนเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน Torres และคณะ (39) จำแนก Neisseria gonorhoeae และ Nisseria ชนิดอื่น ๆ โดยการตัดดีเอนเอด้วย HaeIII Patel และคณะ (40) ก็รายงานความแตกต่างของ Mycobacterium ชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของดีเอนเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

งานวิจัยนี้ก็ได้นำเทคนิคการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยดูลักษณะการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บนอะกาโรสเจลมาจำแนกชนิดของ Streptomyces ผลการทดลองกับ Streptomyces ที่ทราบชนิดแน่นอนแล้ว 5 ชนิด พบว่ามีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง ซึ่งแสดงว่าวิธีการนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้จำแนกชนิดของ Streptomyces ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ Streptomyces ที่ยังไม่ทราบชนิด 10 ชนิด มาจำแนกโดยวิธีการเดียวกันนี้ก็พบว่ามีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ไม่เหมือนกันกับ Streptomyces ที่ทราบชนิดทั้ง 5 จึงคาดว่า Streptomyces ทั้ง 10 ชนิดนี้ไม่จัดอยู่ในชนิดใดชนิดหนึ่งของ Streptomyces ที่ทราบชนิดแล้ว การจำแนกชนิดของ Streptomyces ทั้ง 10 ชนิดนี้ จึงยังไม่สามารถกระทำได้ ทั้งนี้เพราะความจำกัดของจำนวน Streptomyces มาตรฐานที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ในอนาคตถ้าได้มีการจัดทำ restriction fingerprint library ของ Streptomyces

ขึ้นก็คาดว่าจะสามารถนำวิธีการนี้มาจำแนกชนิดของ Streptomyces ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

ข้อเสนอแนะ

รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กที่ได้อาจยังไม่เด่นชัดเท่าที่ควร ถ้าได้มีการนำเทคนิคของพัลซ์ดฟิลด์เจลอิเลกโทรโฟรีซีส (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFG) ซึ่งเป็นวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสชนิดใหม่ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาโดย Schwartz และคณะ (40) โดยการแยกดีเอนเอที่มีขนาดต่างกันในสภาพการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าที่สลับขั้วในช่วงเวลาที่เหมาะสม อาจทำให้การแยกดีเอนเอขนาดต่าง ๆ กันเป็นไปได้ดียิ่งขึ้น