บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

<u>แบคทีเรียแลคติกและแหล่งที่มา</u>

แบคทีเรียแลคติกจำนวนทั้งสิ้น 58 strains ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองชนิดต่างๆดังแสดงในตารางที่ 3 ได้รับมาจาก รศ. ดร. สมบูรณ์ ชนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ตารางที่ 3</u> รายชื่อและแหล่งที่มาของแบคทีเรียแลคติก 58 strains

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
100	ไส้กรอกเปรี้ยว	FP 15-1	แหนม
101	มั่ม	RS 96	แหนม
105	หอมดอง	F 33-1	มั่ม
106	ส้มฟัก	870	ทุเรียนเปรี้ยว
107	ข้าวหมาก	FP 38-1	เมี่ยง
108	แหนม	A 24	ปลาส้ม
110	ผักกุ่มดอง	F 10-2	ถั่วงอกดอง
111	ข้าวหมาก	FN 3r	แหนม
112	ผักกุ่มดอง	F 20	แหนม
200	ไส้กรอกเปรี้ยว	N 78	แหนม
203	แหนม	BP-1	แหนม
205	ส้มฟัก	RS 55	แหนม
208	มั่ม	RS 56	แหนม
210	ผักเสี้ยนดอง	RS 74	แหนม
211	แหนม	RS 93	แหนม

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
215	ผักเสี้ยนดอง	RS 44	แหนม
218	ปลาส้ม	RS 46	แหนม
F 28-1	ปลาส้ม	RS 94	แหนม
222	เมี่ยง	RS 43	แหนม
225	เมี่ยง	RS 91	แหนม
P 322-1	สตอดอง	RS 95	แหนม
F 18-2	ผักเสี้ยนดอง	RS 97	แหนม
236	หน่อไม้ดอง	RS 98	แหนม
402	แหนม	RS 27	หน่อไม้ดอง
450	ผักเสี้ยนดอง	RS 28	หน่อไม้ดอง
1145	ผักเสี้ยนดอง	RS 31	หน่อไม้ดอง
FN 12-1	ปลาเจ่า	RS 32	หน่อไม้ดอง
P 46-1	ผักเสี้ยนดอง	RS 90	แหนม
862	ถั่วงอกดอง	RS 92	แหนม

<u>เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน</u>

เชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์คือ

- *Lactobacillus pentosus* DSM 20314^T
- *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T
- *Pediococcus pentosaceus* DSM 20336^T

ได้มาจากศูนย์เก็บเชื้อ Deutsche Sammlung von Mekroorganismen and Zellkulturen Gmb H (DSM), Germany.

<u>สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ</u>

1. Phenol saturated solution (Amresco) Biotechnology grade

pH (before addition of buffer) 6.6 $\pm$ 0.2

pH (after addition of buffer) 7.9 $\pm$ 0.2

เสถียรภาพที่อุณหภูมิ 4 °C มากกว่า 1 ปี

2. Chloroform M.W. 119.38 (Carls erba)

3. Isoamyl alcohol (2-Propanol) $CH_3CH(OH)$ M.W. 60.10 (Merck)

4. Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$) M.W. 121.1 (Sigma) for laboratory use only

5. Tris Hydrochloride ($C_4H_{11}NO_3$ HCl) M.W. 157.6 (Sigma)

6. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$) M.W. 372.2 (Sigma) purity 100% for laboratory use only

7. Sodium chloride (NaCl) M.W. 58.44 (Sigma) for laboratory use only

8. Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) M.W. 342.3 (Sigma) for laboratory use only

9. Sodium dodesyl sulfate (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$) M.W. 288.4 (Sigma) for laboratory use only

10. Hexadecy trimethylammonium bromide (CTAB) ($C_{19}H_{42}NBr$) M.W. 364.5 Approximately 99% (Sigma) for laboratory use only

11. Ethanol (C_2H_5OH) M.W. 46.07 (Merck)

<u>เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ</u>

1. Lysozyme (from Chicken Egg White) M.W. approximately 14,400 (Sigma)

2. Mutanolysin (from *Streptomyces golbisporus* ATCC 21553) (Sigma) for laboratory use only

3. Proteinase K (Sigma)

<u>อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ</u>

1. Micropipette 2, 20, 200, 1000 µl (Gilson)

2. Micropipette tip 2, 20, 1000 µl (Gilson)

3. Microcentrifuge tube (Brand)

4. Microcentrifuge (Denver Instrument)

<u>สารเคมีสำหรับทำ gel electrophoresis</u>

1. Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$) M.W. 121.1 (Sigma) for laboratory use only

2. Acetic acid glacial 100% (CH_3COOH) M.W. 60.05 (Merck)

3. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) purity 100% ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$) M.W. 372.2 (Sigma) for laboratory use only

4. Agarose (Sigma) for laboratory use only

5. Ethidium bromide (aqueous solution 10 mg per ml) (Sigma)

<u>อุปกรณ์สำหรับทำ gel electrophoresis</u>

1. Gel electrophoresis tank and accessories set (Bio-rad)

2. Camera (Single len Reflex, SLR) (Kodak)

3. Polaroid film (3 1/4 * 4 1/4 ") ISO 3000/36 ° (Kodak)

4. Ultra violet lamp

<u>สารเคมีสำหรับปฏิกิริยา PCR</u>

1. deoxyadenine triphosphate (dATP) (Promega Corporation, U.S.A)

2. deoxycytosine triphosphate (dCTP) (Promega Corporation, U.S.A)

3. dexyguanine triphosphate (dGTP) (Promega Corporation, U.S.A)

4. deoxythymine triphosphate (dTTP) (Promega Corporation, U.S.A)

5. Arbitrary primers (10 - mers) (Operon Co; Ltd. U.S.A.)

6. 10 × PCR buffer

- 1M. Tris-HCl buffer (pH 8.3)
- 1M. KCl
- 1M. $MgCl_2$
- 0.01% gelatin

7. Taq DNA Polymerase (Promega Corporation, U.S.A.)

Source : *Themus aguatieus* strain TY1 (1)

concentration : 5 units/µl

8. Mineral oil (Perkin Elmer Cetus)

<u>PCR Apparatus</u>

Omni Gene Thermal Cycler (HYBAID Limited, UK)

9. ชุดคอมพิวเตอร์และโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Vilber Lourmat, France)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาการสกัด Chromosomal DNA จากแบคทีเรีย Lactobacilli และ Pediococci

สำหรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ดัดแปลงมาจาก Dudley Ed. (1995) และ Ausubel และคณะ (1987) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

เลี้ยงเซลในอาหารเหลว MRS (วัด OD_{600} =0.7-0.8 ; เมื่อเจือจาง 1:5)

↓

นำเซลที่เลี้ยงในอาหารเหลวมา 2 ml ใส่ใน microcentrifuge tube

เหวี่ยงตกตะกอนเซลที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

↓

ล้างเซลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TES (10 mM Tris; pH 8.0, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl)

ปริมาณ 0.5 ml

เหวี่ยงตกตะกอนเซลที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

↓

แขวนลอยเซลในสารละลายบัฟเฟอร์ TES ที่มี sucrose เข้มข้น 6.7 % ปริมาณ 300 µl

↓

ย่อยผนังเซลชั้นนอกโดยเติม lysozyme 130 µl (100 µg/ml TES) และ mutanolysin 10 µl (1 U/µl)

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที

↓

ย่อยเยื่อหุ้มเซลโดยเติม proteinase K 50 µl (1 mg/ml TES) และ SDS 100 µl (20 % in TES)

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 60 นาที

↓

เติมสารละลาย NaCl 100 µl (5 M) และสารละลาย CTAB/NaCl 80 µl (10 % CTAB in water)

เพื่อตกตะกอนโปรตีน, polysaccharide และเศษผนังเซล

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

↓

สกัดโปรตีน, polysaccharide และเศษผนังเซลออกจากดีเอ็นเอด้วยสารละลาย

chloroform/isoamyl alcohol (24 :1)

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

↓

ถ่ายส่วน aqueous phase ที่ดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่

↓

สกัดซ้ำด้วยสารละลาย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 :24 :1)
เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

↓

ถ่ายส่วน aqueous phase ที่ดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่
ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ 95 % ethanol (-20 °C) ปริมาณ 2.5 เท่า ของ aqueous phase
เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

ทิ้งส่วน supernatant จากนั้นล้าง pellet ของดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol (cold)
เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

นำ pellet ของดีเอ็นเอไปทำให้แห้งโดยใช้ vacuum dryer

↓

ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นปริมาตร 50 µl

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอทำโดยการ run gel electrophoresis ใช้ agarose ที่ความเข้มข้น 0.8% (มี ethidium bromide ความเข้มข้น 100 ng/ml) ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 40 volts เป็นระยะทาง 3 cm โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาณ 3 µl โดย run เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว (standard lambda DNA) จากนั้นนำ gel มาส่องผ่านลำแสง UV (320 nm) เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ ขั้นตอนนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2. <u>การศึกษาภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

ภาวะและปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR เป็นภาวะที่ดัดแปลงมาจาก Hosaka (1994), Tailliez และคณะ (1996) และ Williams และคณะ (1991) โดยภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ

heating up to	90 °C	1 min
denaturation at	94 °C	1 min

annealing at	35 °C	1 min	45 cycles amplification
extension at	72 °C	2 min	
complete nascent products at	72 °C	5 min	
hold at	28 °C		

และองค์ประกอบของปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย

- DNA template (1.5 ng/µl) 2.0 µl
- 10XPCR buffer 1.0 µl
  (100 mM Tris-HCl; pH 8.3,
  500 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin)
- 1 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) 1.0 µl
  (1 mM dATP, 1mM dCTP,
  1 mM dGTP and 1 mM dTTP)
- 2 µM arbitrary primer* 1.0 µl
- Taq DNA Polymerase (1 U/µl) 0.2 µl
- distilled H_2O 4.8 µl

* arbitrary primer ใช้ primer รหัส OPB 08 (5' -GTCCACACGG- 3')

2.1 <u>ศึกษาผลของปริมาณ Taq DNA Polymerase และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing ที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ</u>

จากภาวะและปฏิกิริยาตั้งต้นในข้อ 2 จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาหาปริมาณ Taq DNA Polymerase ที่เหมาะสมพร้อมกับศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing โดยการแปรปริมาณ Taq DNA Polymerase เป็น 5 ระดับคือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 unit/reaction ที่ภาวะการใช้อุณหภูมิในการ annealing 3 ระดับดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการแปรปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับ ที่ภาวะในการใช้อุณหภูมิในการ annealing 3 ระดับและจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ระดับ

อุณหภูมิในการ annealing (°C)	จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	Taq DNA Polymerase (unit/reaction)
35	45, 35	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0
50	45, 35	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0
55	45, 35	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0

การทดลองใช้ดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สายพันธุ์คือ type strain of *L. pentosus* DSM 20314, type strain of *L. plantarum* DSM 20174 และ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.2 ศึกษาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมกับปริมาณ Taq DNA Polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR

จากภาวะที่เหมาะสมในข้อ 2.1 จะถูกนำมาทำการศึกษาระดับของปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม โดยแปรปริมาณ $MgCl_2$ เป็น 4 ระดับคือ 10, 20, 30 และ 40 nmol/reaction การศึกษาขั้นตอนนี้ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับข้อ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in RCBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3. การสรรหา arbitrary primer ที่เหมาะสมในการนำไปใช้จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมือง

จากภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 จะถูกนำมาใช้ในการทดสอบเพื่อคัดเลือก arbitrary primer ที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อสายพันธุ์ *L. pentosus, L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ออกจากกันได้ โดย arbitrary primer ที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 100 primers ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Operon Co, Ltd. U.S.A. ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดและรหัสของ arbitrary primers ที่นำมาใช้ในการทดสอบจำนวน 100 primers

รหัส primer (code No.)	ความยาว primer	ชนิดของ primer
OPA 01- OPA 20	10-mers	arbitrary single short oligonucleotide
OPB 01- OPB 20	10-mers	
OPC 01- OPC 20	10-mers	
OPD 01- OPD 20	10-mers	
OPE 01- OPE 20	10-mers	

การทดสอบ arbitrary primers นี้ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.1 และ 2.2 วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

4. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมือง

จากภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ที่ได้จากข้อ 2 และ arbitrary primer ที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 3 จะถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุด ดีเอ็นเอของเชื้อชนิดต่างๆที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา RAPD จะถูกนำมา run gel electrophoresis โดยใช้ 1.0 % agarose ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 40 volts เป็นระยะทาง 5 cm จากนั้นนำ gel มา stain ในน้ำกลั่นที่มี ethidium bromie ความเข้มข้น 0.5 μg/ml เป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำมาส่องผ่านลำแสง UV (320 nm) บันทึกภาพโดย software "Bio-gene" (Vilber Lourmat, France) ขั้นตอนนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

5. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลร่วมกับลายพิมพ์เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สายพันธุ์คือ type strain of *L. pentosus* DSM 20314, type strain of *L. plantarum* DSM 20174 และ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 โดย software "Bio-gene" จะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละ strain ตามค่า Similarity Index (S.I.) ดังนี้คือ

$$\text{Similarity Index (S.I.)} = 2n_{xy}/(n_x+n_y)$$

เมื่อ n_x คือ จำนวน band ที่ปรากฏใน lane x

n_y คือ จำนวน band ที่ปรากฏใน lane y

n_{xy} คือ จำนวน band ที่ปรากฏตรงกันใน lane x และ y

จากค่าความสัมพันธ์ S.I. นี้ จะถูกแปลงเป็น % S.I. และแสดงผลออกมาในรูปแบบความสัมพันธ์เชิงแผนภูมิที่เรียกว่า "Dendrogram"

6. <u>การเปรียบเทียบผลการจัดจำแนกเชื้อทั้ง 58 strains ระหว่างผลจากวิธี RAPD กับลักษณะทางชีวเคมี (biochemical tests)</u>

ข้อสรุปที่ได้จากการจัดจำแนกเชื้อทั้ง 58 strains โดยวิธี RAPD จะถูกนำมาเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูรูปร่างของเซล ลักษณะทางชีวเคมีซึ่งทำการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน 10 ชนิด สำหรับเชื้อ *Lactobacilli* คือ glycerol, xylose, ribose, L-arabinose, D-fructose, D-maltose, D-melibiose, D-melezitose, raffinose และ L-rhamnose (Hammers และคณะ , 1991) ส่วน *Pediococci* ทดสอบการใช้ maltose, melezitose ทดสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ทดสอบการเจริญเติบโตที่ pH 4.2 และการเจริญเติบโตในภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 6.5 % (Hammers และคณะ , 1991) ขั้นตอนนี้วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17259149