บทที่ 4
ผลการวิจัย

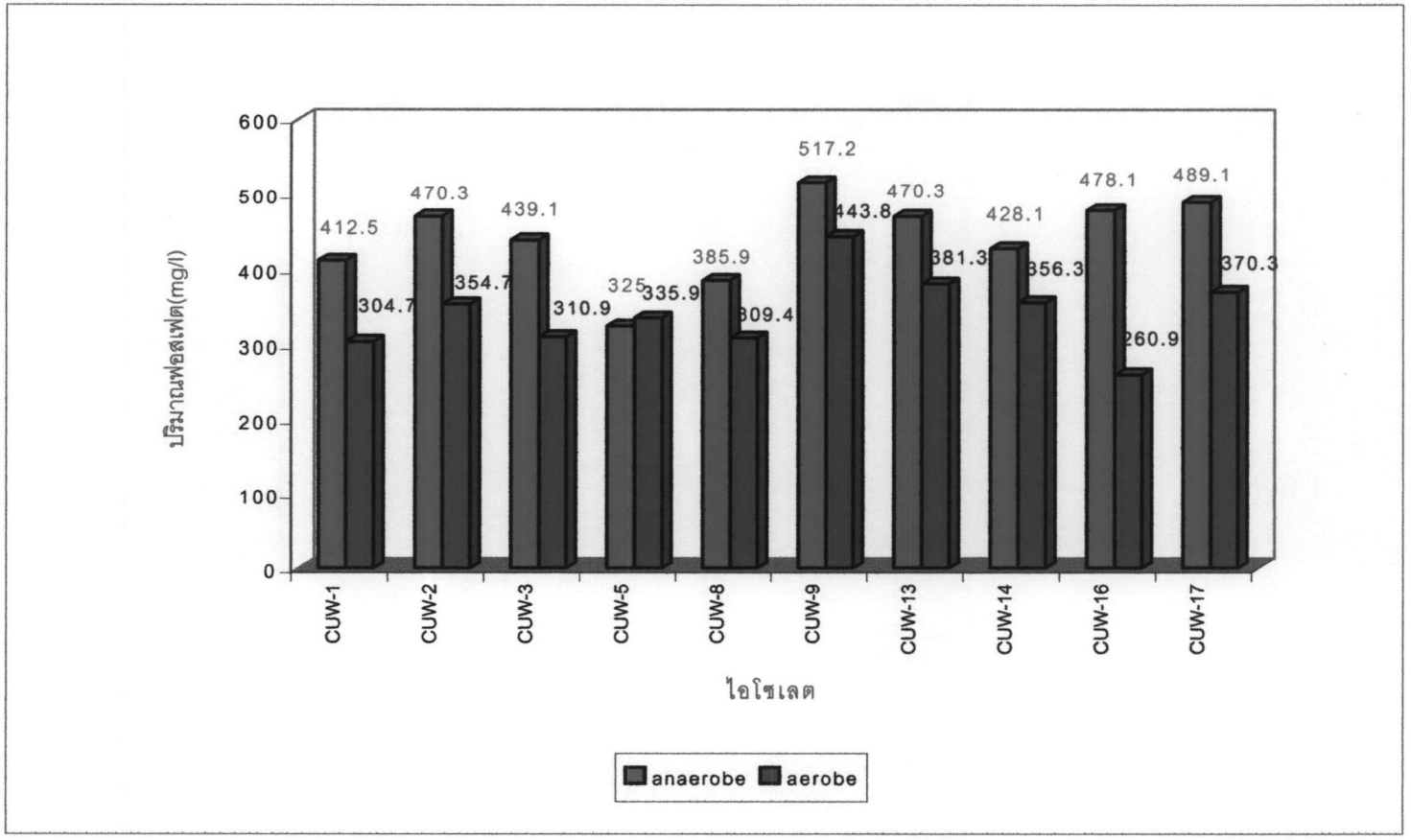
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟต

4.1.1 การแยกแบคทีเรียที่สะสมโพลีฟอสเฟตจากตัวอย่างน้ำเสีย

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ โดยคัดแยกแบคทีเรียดังกล่าวจากตัวอย่างน้ำเสียชุมชนที่อยู่ในบ่อที่มีการให้อากาศและบ่อพักที่ไม่มีการให้อากาศจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร บนอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็ง พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 143 ไอโซเลต และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาย้อมดู โวลูทิน แกรนูล ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ ลอฟเฟลอร์สเมทิลีนบลู พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตที่มีฟอสเฟตแกรนูลอยู่ภายในเซลล์ นั่นคือ CUW-1, CUW-2, CUW-3, CUW-5, CUW-8, CUW-9, CUW-13, CUW-14, CUW-16, CUW-17

4.1.2 การตรวจสอบความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

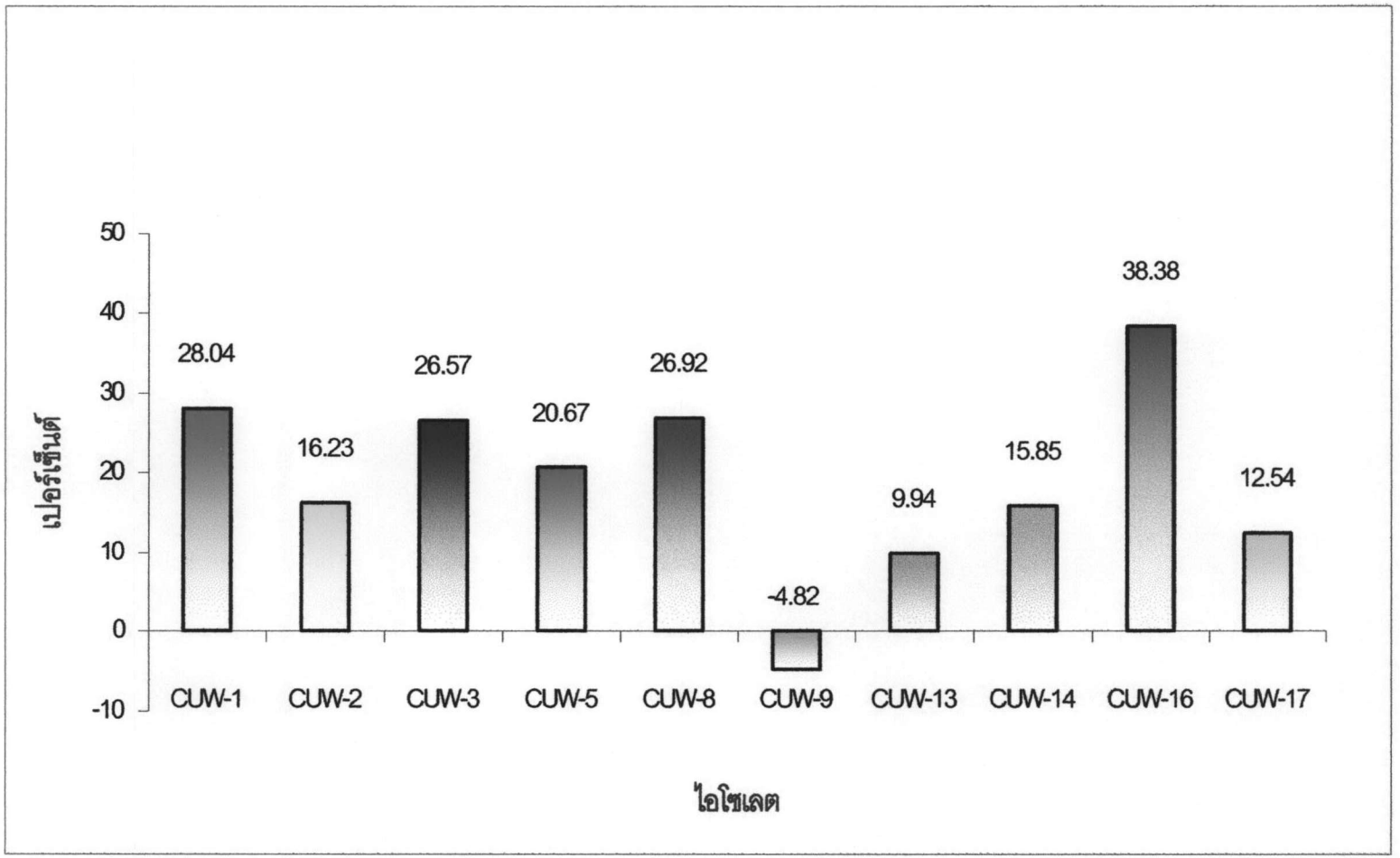
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตที่พบว่ามีโวลูทิน แกรนูลอยู่ตามที่ทดสอบเบื้องต้นดังผลในข้อ 4.1.1 มาตรวจสอบความสามารถของการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ตามวิธีการทดลองดังข้อ 3.1.2 พบว่าสามารถเปรียบเทียบปริมาณของฟอสเฟตที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลวในกรณีที่เซลล์แบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตอยู่ในภาวะไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจนได้ดังรูปที่ 4.1 และแปลผลเป็นปริมาณโพลีฟอสเฟตที่สะสมไว้ในเซลล์ได้ดัง ตารางที่ 4.1 นั่นคือ แบคทีเรียไอโซเลต CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ CUW-16 มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้ในช่วง 100-160 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย monoculture ที่ Sidat และคณะ (1999) ได้ศึกษาโดยคัดแยกจากตะกอนของระบบ BNR พบว่าสามารถสะสมได้ถึง 176-229 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียอีก 6 ไอโซเลต คือ CUW-2, CUW-5, CUW-9, CUW-13, CUW-14 และ CUW-17 มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งไอโซเลต CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ CUW-16 สามารถสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไอโซเลตเหล่านี้มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตภายนอกเซลล์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจนของแบคทีเรียคัดเลือก 10 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 10 ไอโซเลต เมื่อวัดปริมาณด้วยชุดทดสอบฟอสเฟต Spectroquant® Phosphate Test

สายพันธุ์	ปริมาณโพลีฟอสเฟตที่สะสมในเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์
CUW-1	118.7	28.04
CUW-2	68.7	16.23
CUW-3	112.5	26.57
CUW-5	87.5	20.67
CUW-8	114.0	26.92
CUW-9	-20.4	-4.82
CUW-13	42.1	9.94
CUW-14	67.1	15.85
CUW-16	162.5	38.38
CUW-17	53.1	12.54



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียคัดเลือก10 ไอโซเลต

4.1 การจำแนกสกุลแบคทีเรียตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 ทางอนุกรมวิธาน

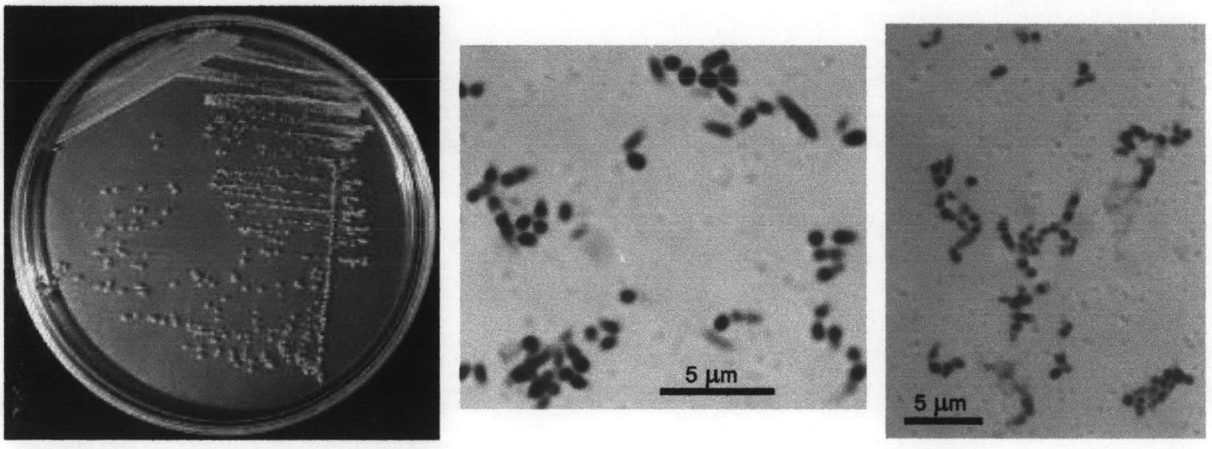
4.1.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 3 ไอโซเลตมีลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น ดังตารางที่ 4.2

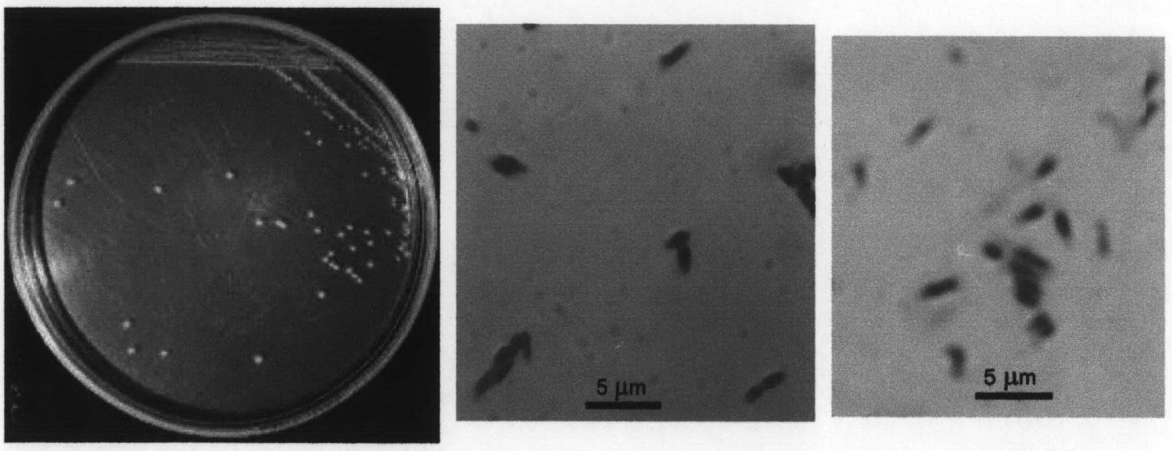
ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต CUW-1, CUW-3 และ CUW-8

ลักษณะที่ทดสอบ	CUW-1	CUW-3	CUW-8
โคโลนีบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์	สีส้มอมชมพู โคโลนีมีความหนาสูงจากผิวหน้าอาหาร (raised) ไม่มันวาว ผิวหน้าขรุขระ เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-3.0 มิลลิเมตร	สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีนูนโค้งเล็กน้อย (convex) ทึบแสง ผิวหน้าแห้ง เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.5 มิลลิเมตร	สีขาวครีม โคโลนีนูนโค้งเล็กน้อย (convex) ขอบเรียบ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร
เซลล์ : รูปร่าง : สีแกรม : ขนาด	รูปแท่ง เปลี่ยนรูปร่างได้ เมื่ออายุมากจะมีรูปร่างกลม บางครั้งแตกกิ่ง บวก 0.5x1-5 ไมโครเมตร	รูปแท่ง งอเล็กน้อย ปลายปิดเข้าเป็นจุด บวก 0.7x2.5 ไมโครเมตร	รูปแท่งสั้น อยู่เป็นคู่และสายยาว บวก 0.5x1.3 ไมโครเมตร
เอนโดสปอร์	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่

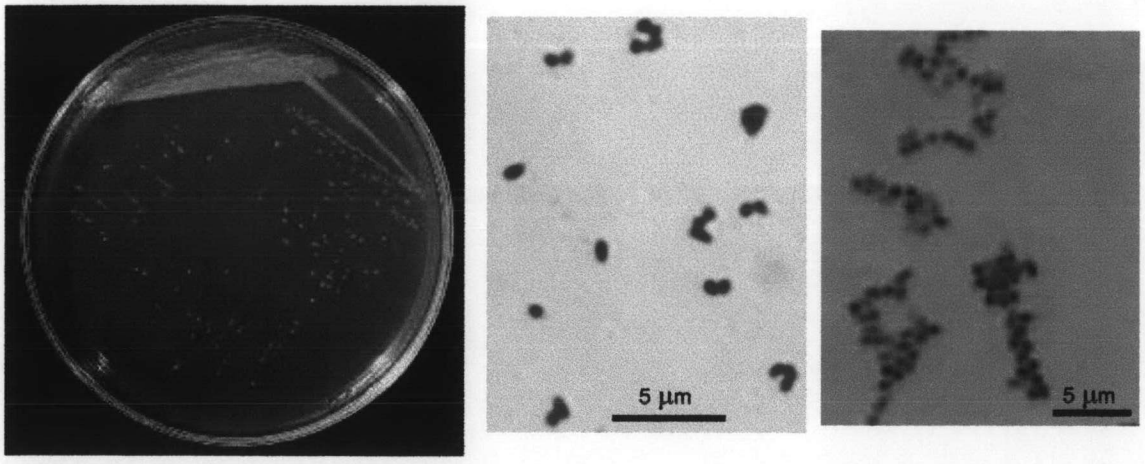
ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรม และปริมาณโวลูทิน แกรนูล ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 แสดงดังรูปที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูล ของไอโซเลต CUW-1



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูล ของไอโซเลต CUW-3



รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูล ของไอโซเลต CUW-8

4.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8

ลักษณะที่ทดสอบ		CUW-1	CUW-3	CUW-8
แคตะเลส		+	+	+
การทดสอบเมธิลเรด		-	-	-
การผลิตอินโดล		-	-	-
การทดสอบไนเตรต		+	-	-
การผลิตกรด	ดี-กลูโคส	+	-	-
	มอลโตส	-	-	-
	แลคโตส	+	-	-
	ดี-ฟรุคโตส	+	-	-
	ดี-ไซโลส	-	-	-
	อะราบิโนส	-	-	-
	แรฟฟิโนส	-	-	-
	กาแลคโตส	-	-	-
การผลิตแก๊สจากกลูโคส		-	-	-
การเจริญในภาวะไร้อากาศ		+	+	-
การสลาย	เคซีอีน	-	-	-
	เจลาติน	-	-	-
	แป้ง	-	-	-
เจริญที่อุณหภูมิ	30^{o}ซ	+	+	+
	37^{o}ซ	+	+	-
	40^{o}ซ	-	-	-
	50^{o}ซ	-	-	-
	55^{o}ซ	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ให้ผลในการทดสอบ + หมายถึง ให้ผลในการทดสอบ

และเมื่ออาศัย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ในการจำแนกชนิดตามอนุกรมวิธานพบว่าไอโซเลต CUW-1 น่าจะเป็น *Propionibacterium* sp., ไอโซเลต CUW-3 น่าจะเป็น *Corynebacterium* sp. และไอโซเลต CUW-8 น่าจะเป็น *Renibacterium* sp.

4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสจากเชื้อ CUW-1, CUW-3และ CUW8

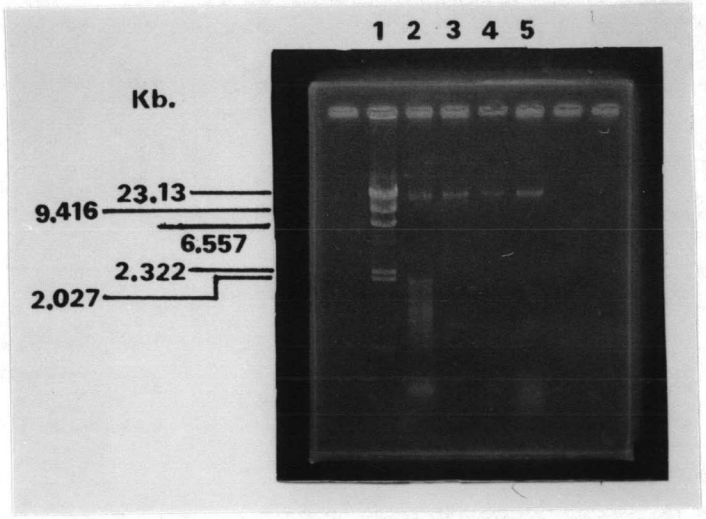
จากการวิเคราะห์กิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสด้วยวิธีดังข้อ 3.3 พบว่าให้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมโพลีฟอสเฟตไคเนส, ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธีของ Bradford และผลของกิจกรรมจำเพาะของสารสกัดจากเซลล์ตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่วัดได้จากสารสกัดจากเซลล์ของการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ปราศจากออกซิเจนและชุดที่มีการให้อากาศ

สารสกัดจากเซลล์	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
ชุดปราศจากออกซิเจน						
CUW-1	0.65	0.89	0.579	0.3245	0.2109	0.364
CUW-3	0.65	0.98	0.637	0.336	0.2184	0.343
CUW-8	0.65	1.275	0.829	0.2334	0.1517	0.183
ชุดที่มีการให้อากาศ						
CUW-1	0.65	1.39	0.904	0.546	0.3549	0.3926
CUW-3	0.65	1.41	0.917	0.7795	0.5067	0.552
CUW-8	0.65	1.345	0.874	0.3445	0.224	0.256

4.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ และ *E. coli* JM109

เมื่อทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดและ *E. coli* JM109 ด้วยวิธีการดังข้อ 3.4 และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตดังข้อ 3.5.1 และวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟริซิสโดยเทียบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมดา ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII ดังวิธีการในข้อ 3.5.2 พบว่า ได้ผลดังรูปที่ 4.6 และสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นได้ดังตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.6 แสดงผลของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์และ *E. coli* JM109 บน 0.7 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล

ช่องที่ 1 แลมดา ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII

ช่องที่ 2 CUW-1

ช่องที่ 3 CUW-3

ช่องที่ 4 CUW-8

ช่องที่ 5 *E. coli* JM109

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์และ *E. coli* JM109

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ ds DNA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
CUW-1	0.107	0.061	1.754	535
CUW-3	0.322	0.174	1.851	1,610
CUW-8	0.384	0.200	1.920	1,920
E. coli JM109	0.162	0.088	1.841	810

4.5 <u>การออกแบบไพร์เมอร์เพื่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนโพลีฟอสเฟตไคเนส</u>

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ข้อมูลจากเครือข่ายของ Genbank 13 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการดังข้อ 3.6 (ภาคผนวก ฉ.) ทำให้สามารถคัดเลือกลำดับอนุรักษ์เพื่อนำไปสร้างไพร์เมอร์ได้ โดยคัดเลือกลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 515-521 สำหรับ forward primer (CUP5) และตำแหน่ง 723-728 สำหรับ reverse primer (CUP6) โดยการออกแบบจะอ้างอิงเชื้อ *Streptomyces coelicolor* เพราะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูงเช่นเดียวกับเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 โดยมีลำดับของกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นต่อไปนี้

ลำดับกรดอะมิโน L K A R F D E
ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' YTN AAR GCN MGN TTY GAY GAR 3' : CUP5

ลำดับกรดอะมิโน S S A D W M
ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' CAT CCA RTC NGC NWS NWS 3' : CUP6

และค่าอุณหภูมิ melting หรือ T_m ของไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 นั้นเท่ากับ 70 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 นี้เป็นไพร์เมอร์ชนิดดีเจ็นเนอเรต (degenerated primer) ซึ่งบางตำแหน่งไม่สามารถกำหนดเบสที่แน่นอนได้ (ภาคผนวก ช.) โดยจะมีความแปรปรวน (degeneracy) ของ CUP5 และ CUP6 เท่ากับ 2^{15} และ 2^{14} ตามลำดับ และผลจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมระหว่างไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 นี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 642 เบสแพร์

4.6 <u>การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยีน *ppk* จากเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ และ *E. coli* โดยวิธี PCR</u>

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อตัวอย่าง 3 ชนิดคือ CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *Streptomyces coelicolor* ด้วยวิธี PCR ดังวิธีการทดลองข้อ 3.7 พบว่าเมื่อปรับสภาวะ (condition) ต่างๆ เช่น ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ, ปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิในช่วง annealing แล้วพบว่าไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างหรือ *Streptomyces coelicolor* ที่เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) เลย

จึงทำการเปลี่ยนแปลงเบสในตำแหน่งที่เป็น N ของลำดับเบสใน CUP5 และ CUP6 โดยใช้ดีอ๊อกซีอิโนซีน (deoxyinosine, I) แทนเบส N ซึ่งจะก่อให้เกิดความแปรปรวนของไพร์เมอร์น้อยกว่า ทำให้ได้ไพร์เมอร์ใหม่คือ CUP7 และ CUP8 ซึ่งมีความแปรปรวนเท่ากับ 2^{9} และ 2^{7} ตามลำดับ

CUP7 : 5' YTI AAR GCI MGI TTY GAY GAR 3'

CUP8 : 5' CAT CCA RTC IGC IWS IWS 3'

และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์คือ CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *Streptomyces coelicolor* ด้วยวิธี PCR ดังวิธีการทดลองข้อ 3.7 โดยใช้ไพร์เมอร์ CUP7 และ CUP8 พบว่าไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างหรือ *Streptomyces coelicolor* ที่เป็นตัวควบคุมบวก เช่นเดียวกัน

เมื่อเปลี่ยนไพร์เมอร์ที่เป็นดีเจ็นเนอเรตให้กลายเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยอ้างอิงกับไพร์เมอร์ของ López และคณะ (López และคณะ, 1997) ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *ppk* ในเชื้อ *E. coli*, *Campylobacter coli*, *Klebsiella aerogenes* และ *Neisseria meningitidis* จะได้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 ซึ่งมีลำดับดังต่อไปนี้

CUP9 : 5' TTACAGGCGCGTTTCGACGAA 3'

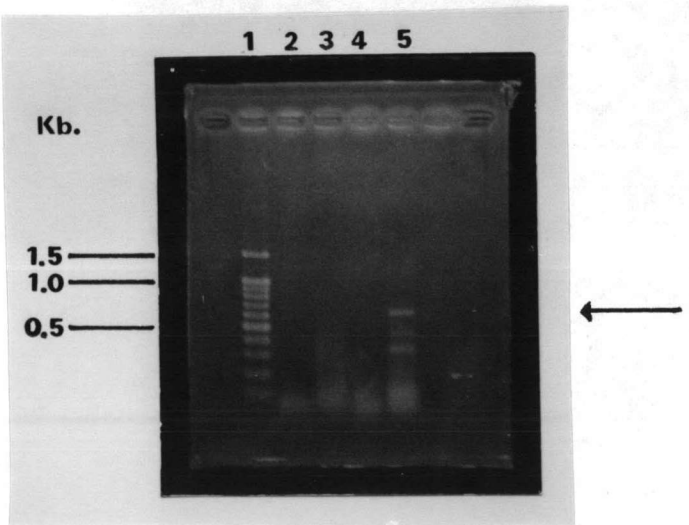
CUP10 : 5' CATCCAGTCGGCGGAAGA 3'

หมายเหตุ

ส่วนที่ขีดเส้นใต้คือส่วนที่เหมือนกับไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 ที่ได้ออกแบบไว้ข้างต้น

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์และ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี PCR ดังวิธีการทดลองข้อ 3.7 ด้วยไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น 3 แถบกับ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกของปฏิกิริยา ดังรูปที่ 4.7 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ดังกล่าวนี้ คือ ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ 2.0 มิลลิโมลาร์ และใช้ annealing temperature เป็น 51 องศาเซลเซียส ดังที่ได้หาปริมาณแมกนีเซียมคลอไรด์และ annealing temperature ที่เหมาะสมดังวิธีการทดลองข้อ 3.7

เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์ + 1.5 kb แล้วพบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 350-650 เบสแพร์ แต่ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการซึ่งคาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน *ppk* น่าจะมีขนาด 650 เบสแพร์ จึงสนใจที่จะศึกษาแถบดีเอ็นเอขนาดนี้เท่านั้น



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR บนอะกาโรส เจล 2 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 100 bp ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 kb

ช่องที่ 2 CUW-1

ช่องที่ 3 CUW-3

ช่องที่ 4 CUW-8

ช่องที่ 5 *E. coli* JM109

4.7 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

พบว่าชิ้นดีเอ็นเอผลผลิต CAP1 นี้มีขนาด 650 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับการเรียงตัวเป็นดังรูปที่ 4.8

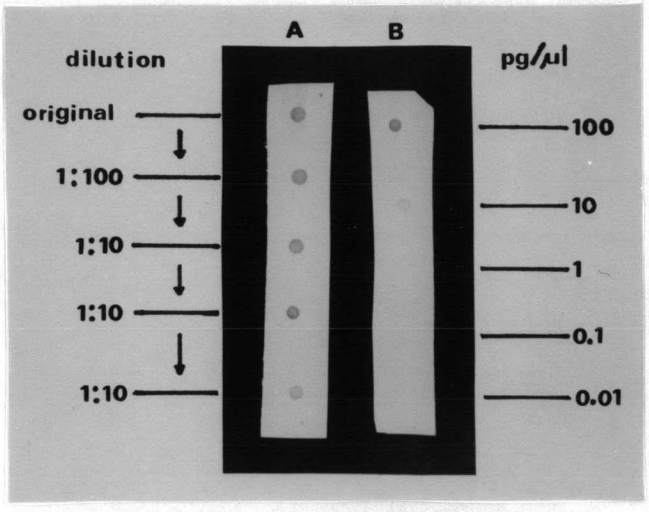
```
GCAGAGGAAA AATCAAACCC GGGCATGTTC AAGGTAACGG TCAACAATAC
TGATGGCACG AATGTTGTCG CTAATGCCTT CCAGATTGGG GATCAGCGAA
CACATTCCGC GAACCAGCAG ATTAACCGGT ACGCCGGAGC TGGAGGCCGC
ATACAGACGA TCAACCAGGC CTTTATCGAC AAGGTTATTT AGCTTCAGGG
TGATACCACT GGGCAGCCCT TGCTGCGCGT TGGCGATCTC GCGGTCCACC
ATTTCATACA ATAGGCGGCG GGAGTTTTGC GGCGATACCA TTAAATAATC
AAATGTCACC GGACGGTATG GGTTTTCAAT AAAGTTAAAT ACCCGCCGTA
CTTCGTTGGT GATGCGCGCA TCGGCGGTCA GCAACAAATA GTGAGTATAA
AGACGCGCGG GGTTTTCATT TAAGTTCCCC GCCCCGATGT GTGGGTTTCG
CACCACTTAA CCCGTTTTCT TTACTTGAAA TAAGGATCAG NNNNNNNTNA
NTTTNATTCC CCGTGNGGAG AANAAAAANNN TAAANCCCTC CTNCTTTTTT
TCTTTTANNN CCNNCGCNNN AAAAAATANN TTTTCNNTTT TNNCCNGCNT
TNGGGNGNNN NTNTANNTCC NTTNTTNTCN CACTTGNNNT CTTCTTTNTT
```

รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CAP1 ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* JM109 เป็นแม่แบบ

และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CAP1 ที่ได้กับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดยอาศัยโปรแกรม BlastN เวอร์ชั่น 2.2.1 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CAP1 มีความเหมือน (homology) กับลำดับเบสของยีน *ppk* ของเชื้อ *E. coli* K-12, *E. coli* Kohara clone #425 และ *E. coli* O157: H7 อยู่ 96 เปอร์เซ็นต์

4.8 <u>การตรวจสอบจำนวนของตัวติดตาม PE ที่ผ่านการติดฉลากด้วยชุดทดสอบ</u>

พบว่าเมื่อเทียบกับแถบของดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วพบว่า ตัวติดตาม PE ที่ถูกติดฉลากด้วย Digoxigenin แบบสุ่มนั้นมีความเข้มข้นอยู่ประมาณ 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.9



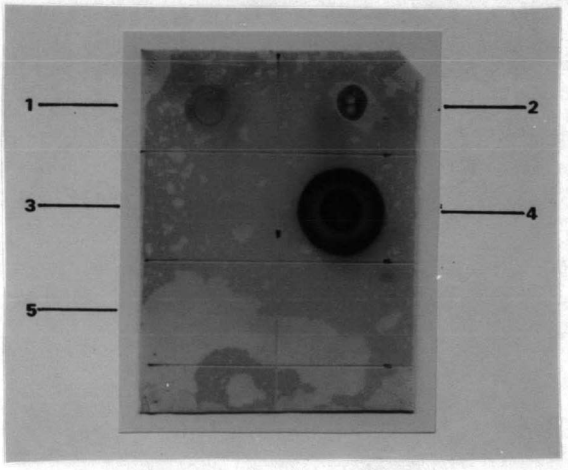
รูปที่ 4.9 การประมาณปริมาณตัวติดตาม PE ที่ถูกติดฉลากด้วย Digoxigenin แบบสุ่มเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของชุดทดสอบ

ภาพ A. คือ ตัวติดตาม PE

ภาพ B. คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานของชุดทดสอบ

4.9 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน *ppk* บนแถบจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างและ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE โดยใช้กระบวนการไฮบริไดเซชัน

โดยอาศัยวิธีไฮบริไดซ์แบบ dot blot พบว่าเกิดสัญญาณขึ้นกับเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ *E. coli* JM109 ที่ใช้เป็นผลบวกควบคุม และไม่เกิดสัญญาณในเชื้อตัวอย่าง CUW-8 และดีเอ็นเอที่ใช้เป็นผลลบควบคุมซึ่ง ได้แก่ ดีเอ็นเอที่ไม่มียีน *ppk* คือดีเอ็นเอของฟาจ (phage) ดังรูปที่ 4.10 และสามารถยืนยันผลดังกล่าวได้ด้วยการทำเซาท์เธิร์นไฮบริไดเซชัน ซึ่งปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ *E. coli* JM109 ที่ใช้เป็นผลบวกควบคุมเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นได้ ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.10 การไฮบริไดซ์แบบ dot blot ของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE

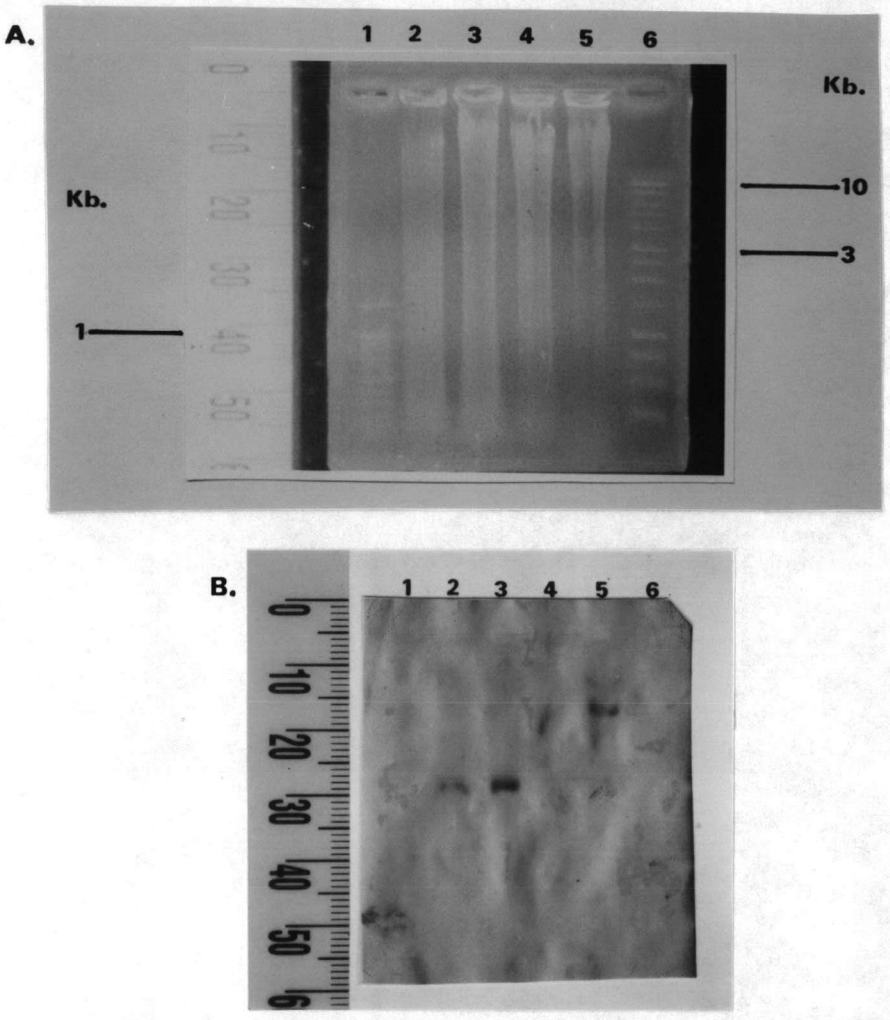
ช่องที่ 1 CUW-1

ช่องที่ 2 CUW-3

ช่องที่ 3 CUW-8

ช่องที่ 4 *E. coli* JM109

ช่องที่ 5 ผลควบคุมลบ



รูปที่ 4.11 A. ภาพอะกาโรส เจลที่มีดีเอ็นเอของไอโซเลต CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Eco*RI

B. สัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE

ช่องที่ 1 100 bp ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 kb

ช่องที่ 2 CUW-1

ช่องที่ 3 CUW-3

ช่องที่ 4 CUW-8

ช่องที่ 5 *E. coli* JM109

ช่องที่ 6 1 kb ดีเอ็นเอ แลดเดอร์