บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

1. เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

1.1 เชื้อ reference strains ที่เจริญบน Ogawa medium ได้แก่ *M.tuberculosis* H37 RV, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.avium*, *M.chelonae*, *M.flavescens*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.marinum*, *M.nonchromogenicum*, *M.scrofulaceum*, *M.szulgai*, *M.tarrae* และ *M.xenopi* เชื้อดังกล่าวได้รับจาก Dr.Chiyoji Abe , The Research Institute of Tuberculosis , Japan Anti - Tuberculosis Association ดังแสดงในตารางที่ 14

1.2 Clinical isolates จำนวน 71 isolates ได้แก่ *M. tuberculosis* จำนวน 23 isolates, *M. avium-intracellulae* 24 isolates และ *Mycobacterium* species 24 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วยของ ร.พ.จุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลโรคทรวงอก เชื้อดังกล่าวได้จำแนกสปีชีส์แล้วด้วย conventional methods[23] และการใช้ Accuprobe(Gen Probe; USA) ดังแสดงในตารางที่ 15

2. การแยก nucleic acid มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำโคโลนีของเชื้อ *Mycobacterium* species ที่เจริญบนอาหาร solid medium(Ogawa) ถ่ายลงในน้ำกลั่นปรับความเข้มข้นเท่ากับ No. 1,2,3,4 และ 5 McFarland และนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที

2.2 ดูด suspension ของเชื้อแต่ละความเข้มข้น 90 ul ผสมกับ digestion buffer 10 ul (5% tween 20,10mg/ml of protinase K in 0.2 M.Tris pH 8.3) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง และเขย่าสม่ำเสมอ

2.3 นำมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที และเก็บไว้ที่ - 20 °C เพื่อทำการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 14 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ศึกษา

Species	Source*
M.tuberculosis H 37 RV	KK 11-20
M.bovis	ATCC 19210
M.bovis BCG	KK 12-02
M.avium	ATCC 25291
M.chelonae sub sp *chelonae*	ATCC 35752
M.flavescens	JATA 67-01
M.fortuitum	ATCC 6841
M.gordonae	ATCC 14470
M.intracellulare	ATCC 13950
M.kansasii	ATCC 12478
M.marinum	ATCC 927
M.nonchromogenicum	ATCC 19530
M.scrofulaceum	ATCC 19981
M.szulgai	KK 32-01
M.terrae	ATCC 15755
M.xenopi	ATCC 19250

*KK and JATA : Mycobacteria Collection , Research Institute of Tuberculosis , Tokyo,Japan. ATCC : American Type Culture Collection,Rockville, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี และการใช้ Accuprobe

Results for*

	Biochemical Test								Accuprobe	
No	Nitrate	Niacin	Urease	Tween Hydrolysis	68°C catalase	Arylsulfatase 3 days	Tolerane to 5% NaCl	Iron up take	Nucleic** acid probe	Identification Isolate
1-23	+	+	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	*M.tuberculosis*
24-47	-	-	-	-	ND	-	-	ND	+	*M.avium* complex
48-58	+	ND	+	+	+	ND	-	-	+	*M.kansasii*
59-63	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	*M.fortuitum*
64-66	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	*M.chelonae*
67-68	-	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	+	*M.gordonae*
69-70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	Unidentified
71	-	+	-	ND	+	ND	-	-	ND	*M.simiae*

* - , negative ; +, positive ; +/- usually postive ; ND , not done

** Accuprobe ได้แก่ *M.tuberculosis* complex, *M.avium* complex, *M.gordonae* และ *M.kansasii*

3.การเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ

โดยการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

Primer ที่ใช้ pA 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' และ pI 5' TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA 3' (รูป 4)

วิธีทำ

3.1 ใช้ extracted nucleic acid ปริมาตร 10 ul

3. 2 PCR mixture 90 ul ประกอบด้วย

2.5 units ของ Taq polymerase

50 mMKCl

10 mMTris-HCl pH 8.3

1.5 mM MgCl2

100 pmol ของ primer แต่ละตัว

200 µM ของ dNTP

ปิดทับด้วย 100 ul mineral oil และเติม extracted nucleic acid แล้วนำไป run จำนวน 36 รอบ ที่ 93^0 ซ นาน 1 นาที, 60^0 ซ นาน 2 นาที และ 72^0 ซ นาน 6 นาที

3.3 ตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR โดยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 80 volt เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วย ethiduim bromide หลังจากนั้นนำไปดูภายใต้แสง ultraviolet

4. การหาลำดับเบส

Primer **ที่ใช้ แสดงในรูปที่** 4

pB 5′ TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3′

pC 5′CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG 3′

pX 5′CTA CGG GAG GCA GCA GTG GG 3′

pY 5′TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA 3′

วิธีทำมีขั้นตอนดังนี้

4.1 Annealing template and primer

ปริมาตรทั้งหมด 10 ul **ประกอบด้วย**

PCR amplified DNA 9 ul (0.5 pmol)

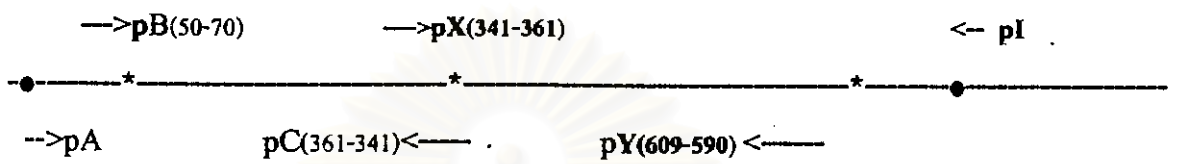
Primer 1 ul (5-10 pmol)

นำมา denature **ที่** 100^0 **ซ.นาน** 2-3 **นาที แล้วทำให้เย็นลงในน้ำแข็งนาน** 5 **นาที**

4.2 Labeling reaction

ปริมาตรทั้งหมด 17.5 ul **ประกอบด้วย**

Annealed DNA mixture	10 ul
Reaction buffer	2 ul
DTT, 0.1 M	1 ul
labeling mix (1:5)	2 ul
[^{35}S] dATP	0.5 ul
DNA polymerase	2 ul



รูปที่ 4 Physical map ของ primers ที่เทียบกับตำแหน่งเป้าหมายบน 16S rDNA ตำแหน่งของเบส กำหนดโดยใช้ของ *E.coli* ดังนี้: pA 8-28, pB 50-70, pC 361-341, pX 341-361, pY 609-509, pI 1047-1027

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 Termination reactions มีขั้นตอนดังนี้

นำหลอดมา 4 หลอด คือ A, C, G และ T

1. ใส่ dd GTP Termination Mix ปริมาตร 2.5 ul ลงในหลอด G , dd ATP, dd TTP และ dd CTP Termination Mix ลงในหลอด A,T และ C ตามลำดับ แช่หลอดใน dry heat ที่ 37^0 ซ อย่างน้อย 1 นาที

2. ดูดส่วนผสมจาก 4.2 ปริมาตร 3.5 ul ใส่ลงในหลอด G,A, T และ C ตามลำดับ แช่ใน dry heat ที่ 37^0 ซ เป็นเวลา 5-10 นาที

3. ใส่ stop solution หลอดละ 4 ul ผสมให้เข้ากันและวางไว้ในน้ำแข็งจนกว่า จะ load ลงใน sequencing gel ถ้า label ด้วย ^{35}S เก็บไว้ที่ -20^0 ซ ได้ 1 อาทิตย์

4. ก่อนนำ load ลงใน gel แช่หลอดใน dry heat ที่อุณหภูมิ 75-80^0ซ นาน 2 นาที ก่อน และ load ทันทีเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส ดังแสดงในรูปที่ 5

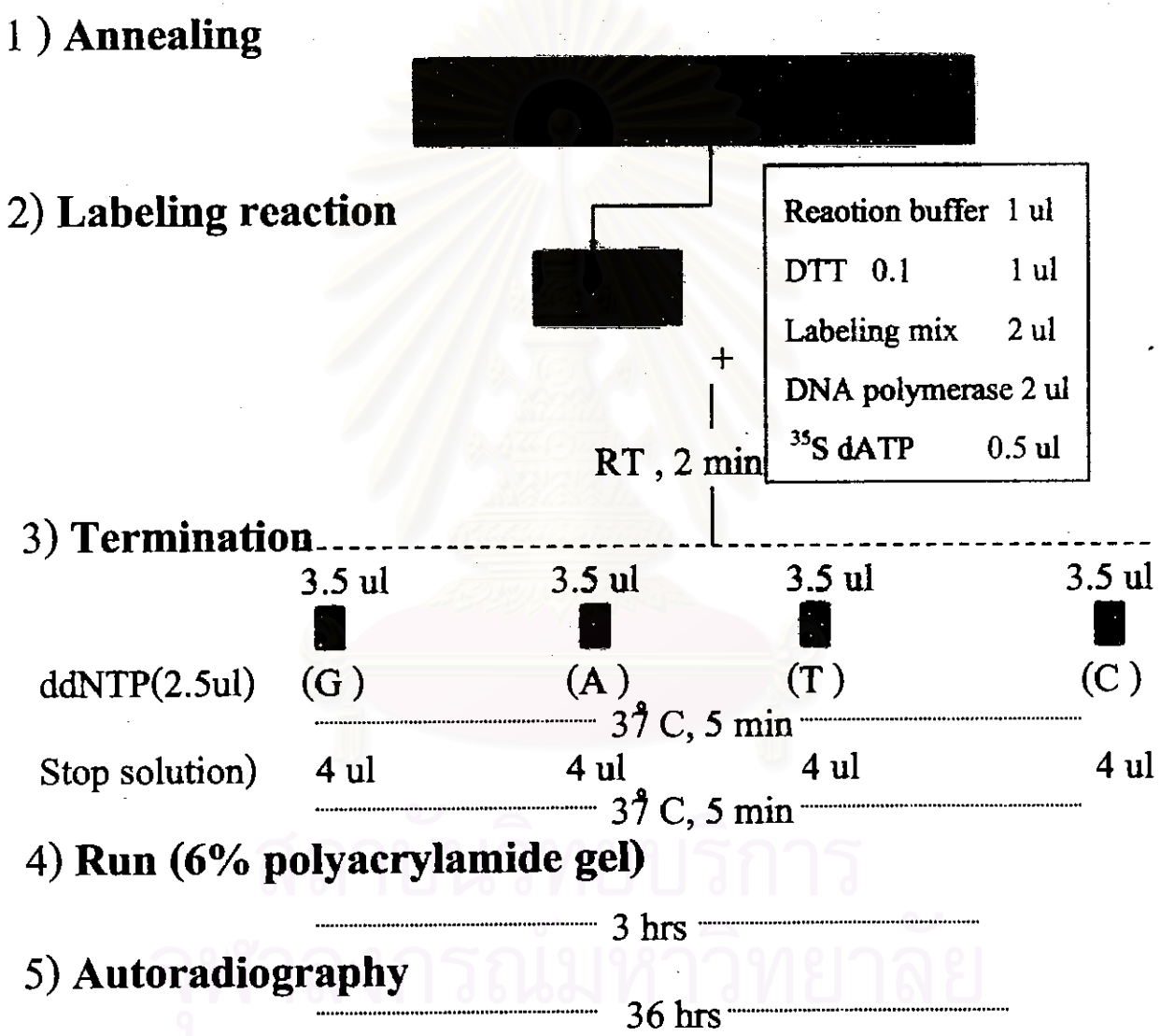
4.4 วิเคราะห์หาลำดับเบส

นำตัวอย่างจากข้อ 4.3 ปริมาตร 2 ul load ลงใน 6% acrylamide/bis-acrylamidegel และนำไป dry gel ก่อนที่จะนำไปประกบกับฟิล์ม เวลาที่ใช้ประกบฟิล์มประมาณ 36 ชั่วโมง และอ่านลำดับเบสจาก bands ที่ปรากฏในฟิล์ม โดยผลของการใช้ primers pB และ pX จะอ่านลำดับเบสจากล่างขึ้นบนที่ตำแหน่ง 129-214 และ 439-497 ตามลำดับ ส่วนผลของการใช้ primers pC และ pY จะอ่าน complementary base sequence จากบนไปล่างที่ตำแหน่ง 129-214 และ 439-497 ตามลำดับเช่นกัน

5.การแปลผล

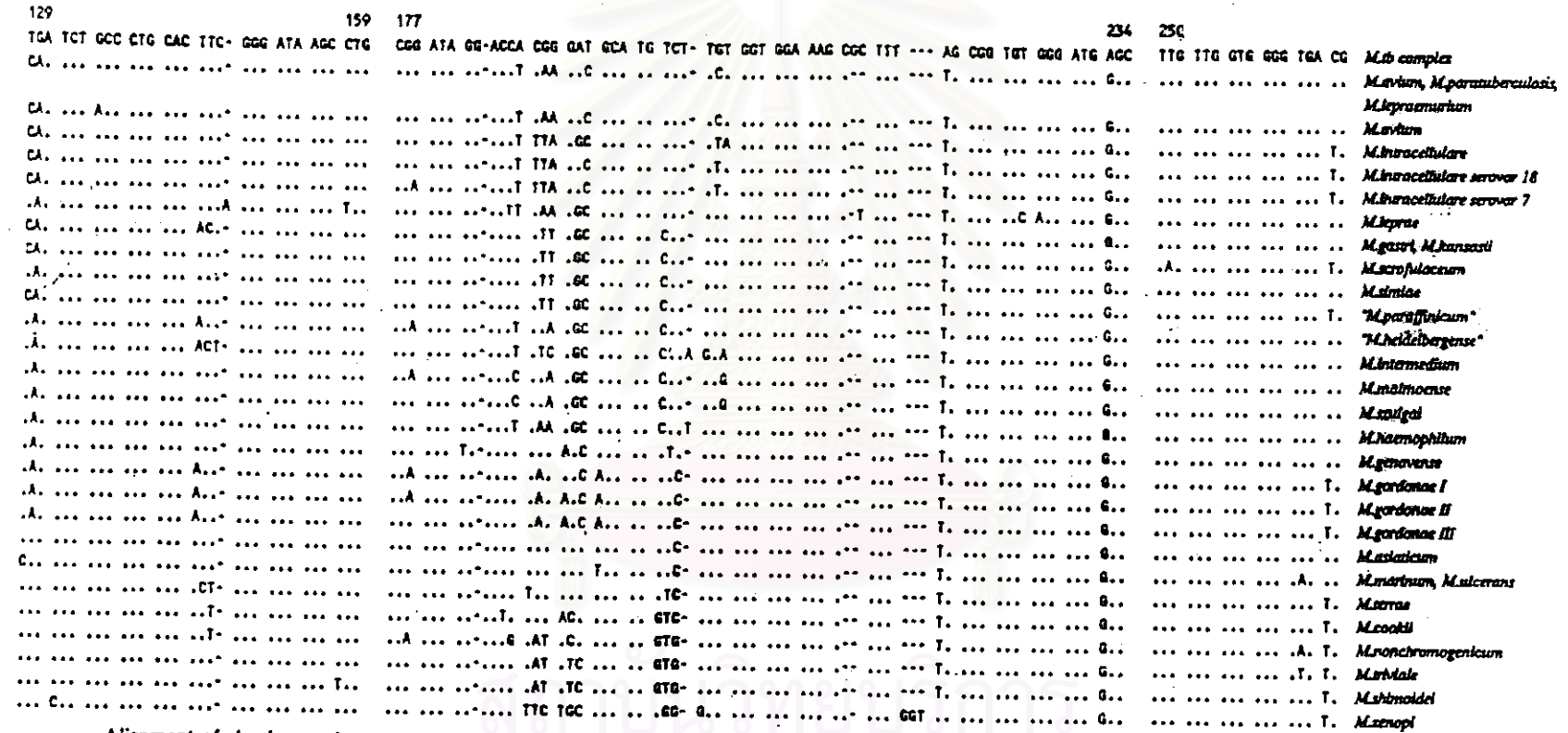
นำลำดับเบสที่อ่านได้เปรียบเทียบกับ 16S rDNA sequence และจำแนก สปีชีส์ ตามตารางที่แสดงไว้โดย Persing[43] และ Kirscher[44] ดังแสดงในตารางที่ 16 และ17

ขั้นตอนการทำ Sequence



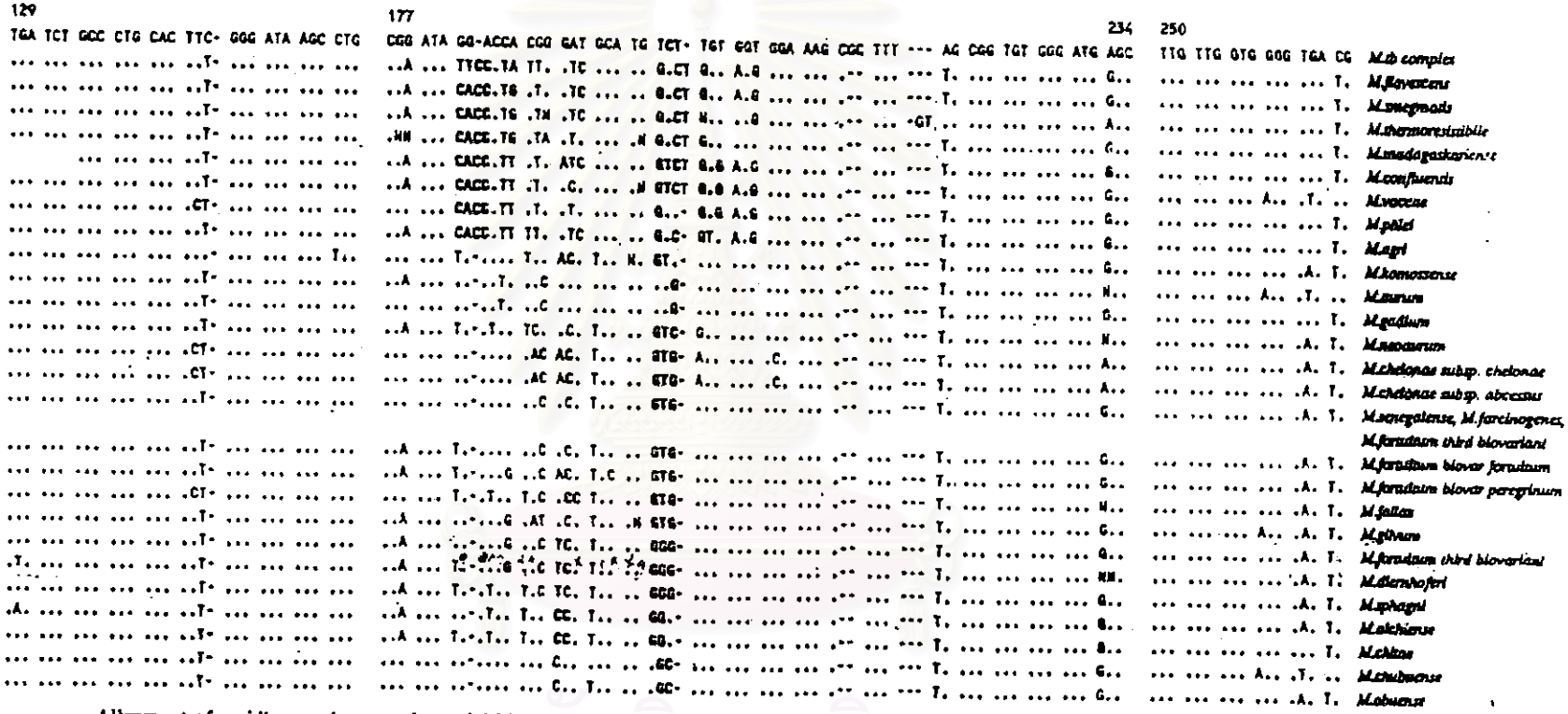
รูปที่ 5 ขั้นตอนหาลำดับเบส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1.Annealing 2. Labeling 3. Termination



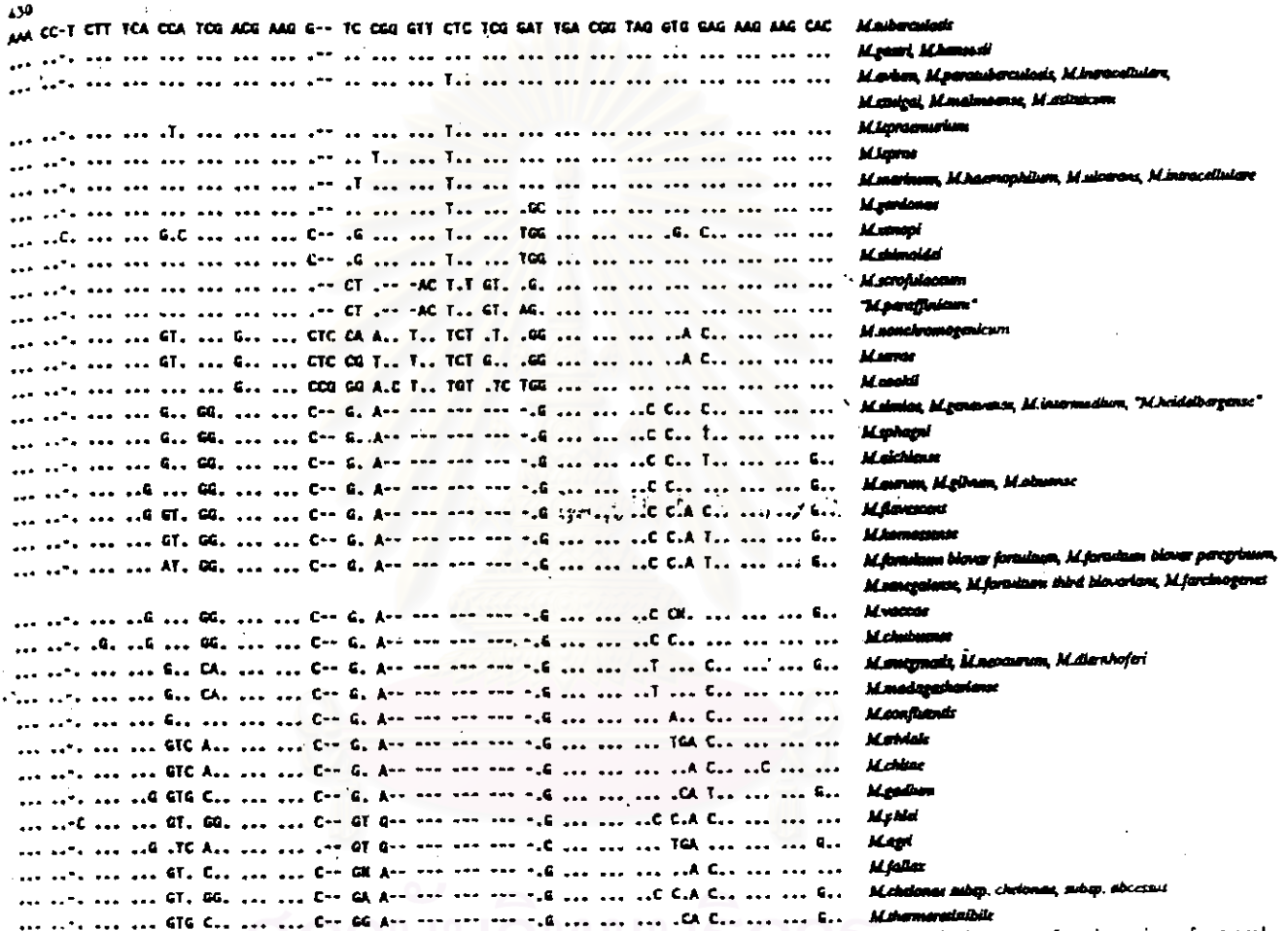
Alignment of slowly growing mycobacterial 16S rRNA gene sequences within hypervariable region A. *M. tuberculosis* (*M.tb*) was used as a reference sequence. Nucleotides different from those of *M. tuberculosis* are indicated; dashes indicate deletions (unpublished data); dots indicate identity. The numbers indicate the respective *E. coli* 16S rRNA positions. For reasons of space limitation, nt 160 to 176 and nt 235 to 249 are not shown.

ตารางที่ 16 ลำดับเบสเชื้อมัยโคแบคทีเรียของ 16S rDNA ตำแหน่ง 129-214[44]



Alignment of rapidly growing mycobacterial 16S rRNA gene sequences within hypervariable region A comprising helix 10. Dashes indicate deletions
N, undetermined nucleotide.

ตารางที่ 16(ต่อ) ลำดับเบสเชื้อมัยโคแบคทีเรียของ 16S rDNA ตำแหน่ง 129-214[44]



Alignment of 16S rRNA gene sequences within hypervariable region B comprising helix 18. Because of an insertion of several nucleotides at the primary sequence level, slowly growing mycobacteria typically show a secondary structure with a long helix 18 in this region. N, undetermined nucleotide.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ลำดับเบสเชื้อมัยโคแบคทีเรียของ 16S rDNA ตำแหน่ง 439-497[44]