การพัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรียในดินโดยใช้เทคนิค ดีเอ็นเอ ติดตาม

(Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique)

รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การพัฒนาความรู้ทางอณูชีววิทยาได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ยากแก่การแยกเชื้อมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินโดยตรง พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินด้วยวิธีที่ใช้ไลโซไซม์ และโปรทีเนส-เค ตามด้วยสารละลายด่างสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณสูง ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีปริมาณ 4 ไมโครกรัมต่อดินนาข้าว (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งเมื่อใช้โปรทีเนส-เคจะให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ 82.34% การสกัดโดยวิธีนี้ใช้เวลาเพียง 5 ชั่วโมง โดยจากตัวอย่างที่มีสารประกอบอินทรีย์ในช่วง 0.73 ถึง 62.77% สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้จะปนเปื้อนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ได้และสามารถกำจัดออกโดยอาศัย Agarose gel electrophoresis และ Sephacryl S-300 column chromatography จากนั้นทำการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ RISA primer จากการศึกษาผลของการยับยั้งสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับสารละลายดีเอ็นเอต่อการยับยั้งกระบวนการ PCR ผลพบว่าสารอินทรีย์ที่มีอยู่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ PCR ในระดับหนึ่งและความหลากหลายของลักษณะดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ทำการสกัดจากแหล่งดินต่างๆ อีกด้วย ในส่วนของประสิทธิภาพความไวในการตรวจสอบพบว่าเมื่อใช้ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ปลูกเชื้อลงไปในตัวอย่างดินต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำนวนของเซลล์เท่ากับ 1, 10, 10^3, 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อกรัมของตัวอย่างที่มีปริมาณสารอินทรีย์ปนเปื้อน 0.73% (ดินร่วนปนทราย), 1.07% (ดินเหนียว), 3.38 (ดินทราย), 4.25% (ดินร่วน) และ 62.77% (พีท) ตามลำดับ

Abstract

The development of molecular biology is allowed scientists to realize that microbial populations in the natural environment are much more diverse than microorganisms, so far isolated in the laboratory. In this study, a rapid method for the direct extraction of DNA from soil was developed. The methodology was developed by using lysozyme and proteinase-K followed by alkali treatment. This approach provides relatively highest yield of DNA recovery. Purified DNA was 4 μg per gram soil (dry weight) sample collecting from rice field. This rapid procedure took at least 5 hours for completion. Extraction efficiency was evaluated based on percentage of bacterial survival. When applied proteinase-K in this extraction protocol the bacterial cell destruction efficiency was 82.34%. By using agarose gel electrophoresis followed by Sephacryl S-300 column chromatography able to separate organic matter and other enzyme inhibitors for extracted DNA in samples which contained high concentrations of organic matter (range between 0.73 to 62.77%). Then it was used as a template in order to determine the inhibitory effect on PCR condition. It was found that the inhibitory effect was increased when using higher amount of DNA template (more than 5 μl). Moreover, RISA primer was also used to demonstrate the DNA diversification patterns from various soil samples. To determine the detection limit or sensitivity of this system, various numbers of certain amounts of *Pseudomonas aeruginosa* were inoculated into sterilized soil samples prior to direct extraction from soil. It was found that the detection limits of this system were 1, 10, 10^3, 10^4, and 10^5 cells per gram soil (dry weight) that contained the amount of organic matter of 0.73% (loamy sand), 1.07% (clay), 3.38% (sand), 4.25% (sandy clay loam), and 62.77% (peat), respectively.