

การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำด้วยเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์

Detection of *E. coli* in water using duplex polymerase chain reaction technique

นฤมล ธนานันต์¹ และ ชีระชัย ธนานันต์^{2*}

Narumol Thanananta¹ and Theerachai Thanananta^{2*}

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

²ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

¹Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Khlong Luang, Pathum Thani 13180, Thailand.

²Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.

*Corresponding authors: thana@tu.ac.th

บทคัดย่อ

เทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์แบบที่ไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอได้พัฒนาขึ้น สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำ โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อ *E. coli* สูงและมีความไวของการตรวจสอบ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และสามารถเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์

ABSTRACT

Duplex polymerase chain reaction technique without DNA extraction was developed for detection of *E. coli* in water. Two primer pairs were designed for amplification of DNA fragments of *lacZ* and *uidA* genes. The results showed that the new method of duplex PCR technique in this study was specific to *E. coli* with sensitivity at 10^4 cells/ml and capable to enhance by growing bacterial cell in culture broth.

คำสำคัญ: ดูเพล็กซ์พีซีอาร์, การตรวจสอบแบคทีเรีย, *E. coli*

Keywords: duplex PCR, bacterial detection, *E. coli*

บทนำ

แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ *E. coli* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae รายงานครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 มีรูปร่างเป็นท่อนและติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศแบบ facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นโดยไม่ก่ออันตรายแก่โฮสต์ นอกจากนี้ยังสามารถดำรงชีพในสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกายได้เป็นเวลานาน ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (index microorganism) เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนอุจจาระในอาหารและน้ำ (Nataro and Kaper, 1998)

ในปี ค.ศ. 1940 มีรายงานว่า *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้ทารกท้องเสีย ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของแบคทีเรียที่เดิมไม่ก่อโรคลงมาเป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยส่วนที่เปลี่ยนแปลง ได้แก่ O-antigen ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ H-antigen ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงแฟลกเจลลาและ K-antigen ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแบคทีเรียที่สร้างแคปซูล (Huang et al., 2006) ปัจจุบันพบว่า *E. coli* ที่ก่อโรคมีย 5 กลุ่ม คือ (1) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงในนักท่องเที่ยวและทารกในประเทศกำลังพัฒนาซึ่งขาดสุขอนามัย (2) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นแบคทีเรียก่อโรคโดยการบุกรุกเยื่อลำไส้ ผู้ป่วยจะถ่ายเป็นมูกเลือดมีอาการคล้ายโรคบิด (3) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี โดยเฉพาะในสถานเลี้ยงเด็กก่อนและชุมชนที่ขาดสุขอนามัย มักแพร่ระบาดในช่วงฤดูร้อน (4) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็นแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ใหญ่อักเสบแบบมีเลือดออก (haemorrhagic colitis) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) และ (5) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างทอกซินทนความร้อน (heat stable toxin) และฮีโมไลซิน

(hemolysin) ซึ่งสามารถก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ (Huang et al., 2006; Moses et al., 2006)

ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในอาหารและน้ำหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมี *E. coli* ความเข้มข้น 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก ดังนั้นการนำพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบ *E. coli* จึงได้รับความสนใจมากขึ้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบ *E. coli* ที่เคยมีรายงานมาก่อนนี้ จะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน (Bej et al., 1991; Tantawiwat et al., 2005) ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบ *E. coli* ในน้ำแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอและเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจสอบภายใน 6 ชั่วโมง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาคือ *Escherichia coli* แบคทีเรียควบคุมคือ *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Serratia marcescens* โดยแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* โดยออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank หมายเลข NC009800 และหมายเลข NC010498 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ขนาด 19-21 เบส จำนวน 2 คู่ คือ (1) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* ประกอบด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) ที่มีลำดับเบสเป็น

5' AGCTGGCTACAGGAAGGCC 3' กับไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) ที่มีลำดับเบสเป็น 5' GTTTA TGCAGCAACGAGACG 3' และ (2) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *uidA* ประกอบด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดที่มีลำดับเบสเป็น 5' GTAATTAC CGACGAAAACGGC 3' กับไพรเมอร์รีเวิร์สที่มีลำดับเบสเป็น 5' GCGTGGTTACAGTCTTGCG 3'

การเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB (nutrient broth) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 1,000g เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำ 2 รอบ แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียในน้ำ และนับจำนวนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber จากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร แล้วเจือจางทีละ 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

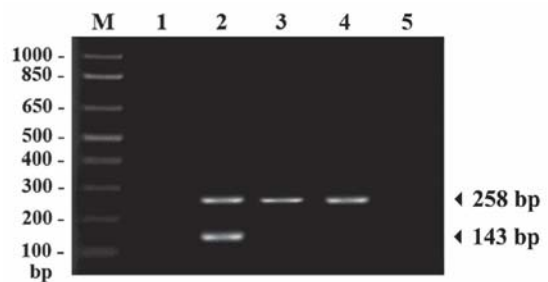
การทำพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ในแบคทีเรียโดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด (2 คู่) ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 0.5 ยูนิต มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที (2) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 °C

เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.8 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

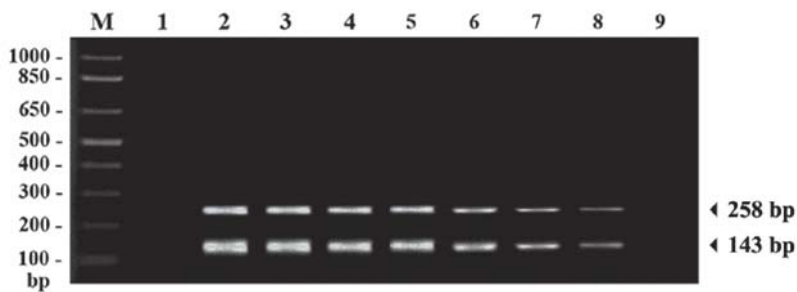
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 258 คู่เบส ของยีน *lacZ* และแถบดีเอ็นเอขนาด 258 คู่เบส ของยีน *uidA* ในตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 258 คู่เบส ของยีน *lacZ* ในตัวอย่างน้ำที่มี *S. typhimurium* และ *K. pneumoniae* แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำที่มี *S. marcescens* และตัวอย่างน้ำที่ไม่มีแบคทีเรีย (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากชิ้นส่วนของยีน *lacZ* มีความจำเพาะต่อ *E. coli*, *S. typhimurium* และ *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้กรดและก๊าซ ส่วนไพรเมอร์ที่ออกแบบจากชิ้นส่วนของยีน *uidA* มีความจำเพาะต่อ *E. coli* โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tantawiwat et al. (2005)



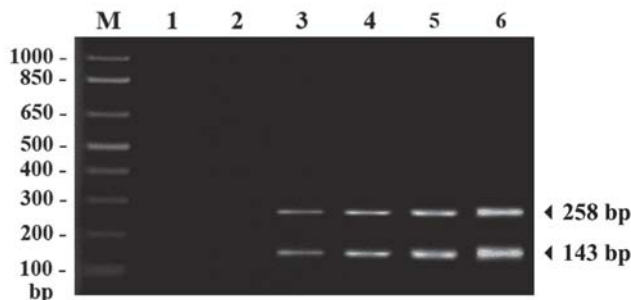
ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-5 คือตัวอย่างน้ำที่มีแบคทีเรีย *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* และ *S. marcescens* ตามลำดับ]

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างน้ำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งมีแบคทีเรีย 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 เซลล์ ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าตัวอย่างน้ำที่มีแบคทีเรีย 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 เซลล์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 258 และ 143 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความไวต่อ *E. coli* ถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา หรือเทียบ

เท่ากับน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้น เมื่อเติมอาหาร 2x NB ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าตัวอย่างที่บ่มนาน 45, 60, 75 และ 90 นาที ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 258 และ 143 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่บ่มนาน 30 นาที (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มความไวของ



ภาพที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ในตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้นต่างๆ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-9 คือตัวอย่างน้ำที่มีแบคทีเรีย *E. coli* ความเข้มข้น 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ]



ภาพที่ 3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* ในตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1 คือตัวอย่างน้ำที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-6 คือตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้น 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากเพิ่มปริมาณในอาหาร NB เป็นเวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ตามลำดับ]

เทคนิคพีซีอาร์ได้ ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB เป็นเวลานานอย่างน้อย 45 นาที ก่อนนำไปทำพีซีอาร์ ซึ่งการเพิ่มความไวของเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ อาจเพิ่มได้มากขึ้นอีกด้วยการบ่มแบคทีเรียในอาหาร NB ให้มากขึ้น ดังนั้นตัวอย่างน้ำที่มี *E. coli* ความเข้มข้น 10^2 , 10 และ 1 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถตรวจสอบได้เช่นกันถ้าเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์ โดยความไวของการตรวจสอบ *E. coli* นี้เท่ากับหรือสูงกว่ารายงานของ Fode-Vaughan et al. (2003) และ Tantawiwat et al. (2005)

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้ได้ประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำโดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย เทคนิคคูเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จะเพิ่มขึ้นส่วนของยีน *lacZ* และ *uidA* โดยมีความจำเพาะต่อ *E. coli* สูงและมีความไวของการตรวจสอบ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตรและสามารถเพิ่มความไวของการตรวจสอบได้ด้วยการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหาร NB ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปทำพีซีอาร์ นอกจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ยังสามารถตรวจสอบ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำได้ภายในเวลา 4-5 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างรวดเร็วมาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับทุนสนับสนุนจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

เอกสารอ้างอิง

- Bej, A.K., McCarty, S.C. and Atlas, R.M. 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: Comparison with defined substrate and planting methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol* 57: 2429-2432.
- Fode-Vaughan, K.A., Maki, J.S., Benson, J.A. and Collins, M.L.P. 2003. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 37: 239-243.
- Huang, D.B., Mohanty, A., DuPont, H.L., Okhuysen, P.C. and Chiang, T. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 55: 1303-1311.
- Moses, A.E., Egwu, G.O. and Ameh, J.A. 2006. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* O157 and non-O157 serogroups isolated from humans, animals, dairy products and water in Borno and Adamawa States, Nigeria. *Res J Medicine & Med Sci* 1: 96-103.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Tantawiwat, S., Tansuphasiri, U., Wongwit, W., Wongchotigul, V. and Kitayaporn, D. 2005. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 162-169.