

ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์และการเปรียบเทียบจีโนมของแบคทีเรีย

กรรณิการ์ ดวงมาลย์

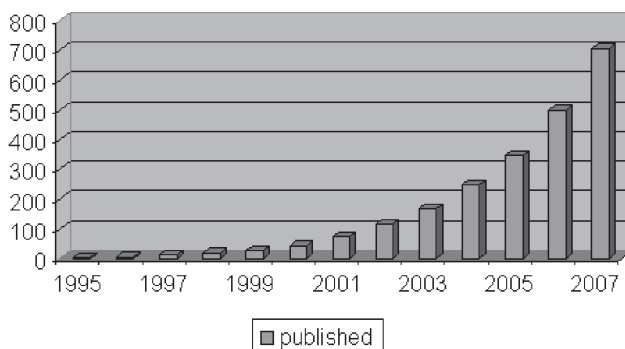
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

E-mail: fscikkd@ku.ac.th

การพัฒนาที่เป็นไปอย่างรวดเร็วของเทคโนโลยีด้านคอมพิวเตอร์ และวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ทำให้การศึกษาลำดับเบสของจีโนมจุลินทรีย์ทั้งจีโนมเป็นไปอย่างรวดเร็ว จนปัจจุบันเรียกได้ว่าเป็นยุคของ complete DNA genome sequence เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ.1995 ซึ่งมีการรายงานลำดับเบสจีโนมของ *Haemophilus influenzae* ชนิดที่ไม่ก่อโรค (Fleischmann et al., 1995) และ *Mycoplasma genitalium* ซึ่งเป็นจีโนมของจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอิสระที่มีขนาดเล็กที่สุด (Fraser et al., 1995) ซึ่งมีขนาดเพียง 580,070 คู่เบส ตั้งแต่นั้นมาข้อมูลลำดับเบสของจีโนมจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้มีการรายงานออกมาอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว (ภาพที่ 1) ข้อมูล ณ วันที่ 2 ธันวาคม 2008 จาก Genomes OnLine Database (GOLD; <http://www.genomesonline.org>)

ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลของจีโนมที่เสร็จสมบูรณ์แล้ว และโครงการที่กำลังดำเนินการ รวมถึงเมตาจีโนม (metagenome) พบว่ามีจีโนมที่เสร็จสมบูรณ์แล้วจำนวน 889 จีโนม และเป็นโครงการที่กำลังดำเนินการอยู่อีกจำนวน 3,327 จีโนม (อาเคียร์ 100 โครงการ แบคทีเรีย 2,082 โครงการ ยูแบคทีเรีย 1,008 โครงการ และเมตาจีโนม 137 โครงการ) จีโนมที่มีการศึกษามีทั้งไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ แมลง ยุง หนู ข้าว ปลา รวมถึงจีโนมของมนุษย์ซึ่งสำเร็จในปี ค.ศ. 2003 ทั้งนี้จากข้อมูลของจีโนมที่มีอยู่ เมื่อนำมาประยุกต์ร่วมกับเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ (microarray) จะเป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการเปรียบเทียบจีโนมของจุลินทรีย์ก่อโรค การระบุความแตกต่างของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ศึกษาวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ หรือจำแนกสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic

Completely Sequenced Genomes ©
January 2008



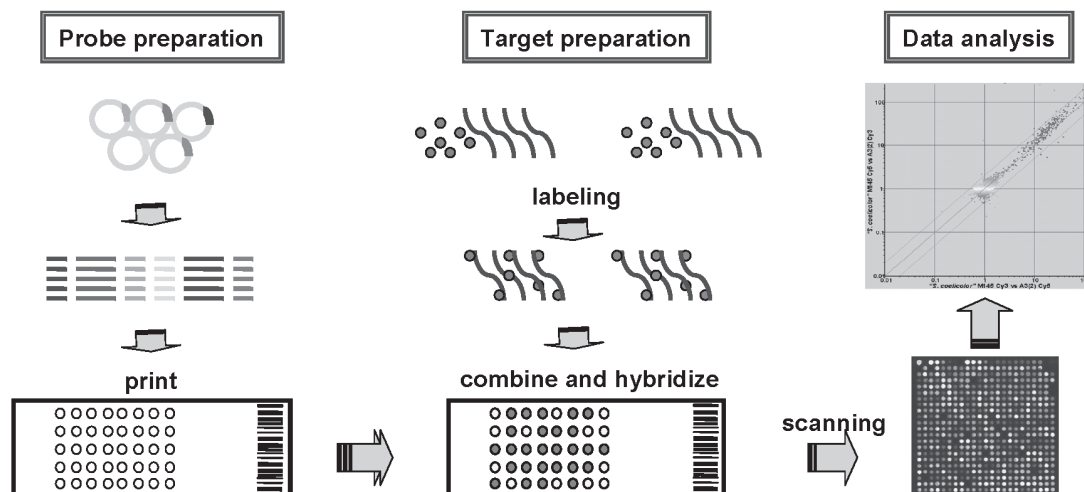
ภาพที่ 1 การเพิ่มขึ้นของจำนวนจีโนมที่ทำสำเร็จแล้วและตีพิมพ์ระหว่างปี ค.ศ. 1995-2007
(http://www.genomesonline.org/gold_statistics.htm)

strain) ออกจากสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic strain) นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งมีการศึกษากันมากทางการแพทย์

ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์เป็นวิธีการหนึ่งที่นักวิจัยนำข้อมูลของจีโนมที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ เป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาทางชีววิทยา ซึ่งมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วในช่วงที่ผ่านมา ทำให้สามารถวิเคราะห์ยีน หรือสายนิวคลีโอไทด์จำนวนมากหลายพันยีนได้พร้อมกันในการทดลองครั้งเดียว ไมโครอาร์เรย์เป็นวิธีการที่พัฒนามาจากหลักการของเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridisation) และ fluorescence microscopy ซึ่งงานตีพิมพ์ฉบับแรกที่รายงานการใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์มีขึ้นในปี ค.ศ. 1995 โดย Schena และคณะ (Schena *et al.*, 1995; Lucchini *et al.*, 2001) หลังจากนั้นการใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ก็มีการพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้เรื่อยมา ซึ่งในสาขาจุลชีววิทยาที่นำมาประยุกต์ใช้กันมากได้แก่การศึกษา genome-wide transcription profile การหาความเหมือน (similarity) และความแตกต่าง (difference) ของจีโนมในกลุ่มจุลินทรีย์ด้วยกัน (Ye *et al.*, 2001) ซึ่งในยุคของ postgenomic มีการประยุกต์ใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์ในการศึกษาสรีระวิทยาของจุลินทรีย์ (physiology) การก่อให้เกิดโรค (pathogenesis) การระบาดของโรค

(epidemiology) นิเวศวิทยา (ecology) วิวัฒนาการ (phylogeny) และการศึกษา metabolic pathway เป็นต้น (Nelson, 2004)

ในการประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์เพื่อเปรียบเทียบจีโนม (comparative genomics) หรือศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) จะมีหลักการที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งในการศึกษานั้น ดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) และสายพันธุ์ทดสอบ (test strain) จะถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ต่างชนิดกัน และนำดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากแล้วปริมาณเท่าๆกัน ของสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ทดสอบมารวมกัน ก่อนนำไปไฮบริไดซ์กับสไลด์ของไมโครอาร์เรย์ที่ต้องการศึกษา จากนั้นจะผ่านขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอส่วนที่ไม่เข้ากับยีนที่ตรึงอยู่บนสไลด์ไมโครอาร์เรย์ออก ก่อนที่จะนำมาเข้าเครื่องสแกนเพื่อวัดค่าความเข้ม (intensity) ของสีฟลูออเรสเซนต์ (ที่ติดฉลากไว้กับดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ทดสอบ) แต่ละชนิดที่ปล่อยออกมาจากแต่ละจุด (spot) ค่าความเข้มที่ได้จากการสแกนจะถูกนำมาเปรียบเทียบกัน โดยถ้าหากเกิดสัญญาณที่เท่ากันของทั้งสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ทดสอบ แสดงว่ายีนทั้งสองชนิดนี้เป็นยีนที่เหมือนกัน หรือมีการแสดงออกที่เท่ากัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 หลักการของไมโครอาร์เรย์

ชนิดของไมโครอาร์เรย์

ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ชนิดที่เป็น oligonucleotide-based และชนิดที่เป็น PCR-based โดยไมโครอาร์เรย์ชนิด oligonucleotide-based ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Affymetrix (www.affymetrix.com; Lipshutz *et al.*, 1999; Gibson, 2002) ไมโครอาร์เรย์ชนิดนี้สังเคราะห์ *in situ* บนแผ่น silicon chip โดยนำเบสมาต่อกันทีละเบสตามข้อมูลของจีนยีนในจีโนมที่สนใจ ด้วยวิธี photolithographic deposition ความยาวของสายนิวคลีโอไทด์มักอยู่ในช่วงระหว่าง 50-70 เบส (Kane *et al.*, 2000) ซึ่งไมโครอาร์เรย์ประเภทนี้มีข้อดีหลายประการเช่น (ก) ไม่ต้องผ่านขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณ (amplification) ดังนั้นจะช่วยลดการปนเปื้อนของการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (ข) ลดการปนเปื้อนแบบ cross contamination ของยีนที่ overlap กัน หรือบริเวณที่มีความเหมือนกันสูง (homologous region) (ค) สามารถควบคุมความเข้มข้นของสายนิวคลีโอไทด์ได้ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายของการทำไมโครอาร์เรย์ประเภท oligonucleotide-based ยังมีราคาที่สูงกว่าชนิด PCR-based มาก

ส่วนดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ชนิด PCR-based จะใช้ขึ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR จากจีโนม มาพิมพ์ลงบนแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารเคมี โดยความยาวของสายดีเอ็นเอส่วนมากจะมีขนาดประมาณ 0.6–2.4 กิโลเบส ในขั้นตอนการทำจะต้องเตรียมตัวอย่างของ PCR product ของจีนยีนที่ต้องการ และทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดเกลือและไพรเมอร์ ที่อยู่ในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอออกก่อน จากนั้นจึงนำมาจุดบนแผ่นแก้วด้วยเครื่องพิมพ์สไลด์ไมโครอาร์เรย์ โดยแต่ละจุดที่พิมพ์ตัวอย่างลงไปจะมีปริมาตรของสารอยู่ในช่วง 0.25–1 นาโนลิตร และมีขนาดของจุดอยู่ในช่วง 100-150 ไมโครเมตร (Chung *et al.*, 1999) ซึ่งแล้วแต่ชนิดของเครื่องพิมพ์ นอกจากนี้แผ่นแก้วที่ใช้จะต้องเป็นชนิดที่มีพื้นผิวที่มีความจำเพาะทางเคมีเช่น aminosilane หรือ poly-L-lysine ที่ทำให้เกิดการยึดเกาะกับดีเอ็นเอที่นำ

มาพิมพ์ลงบนแผ่นแก้ว อย่างไรก็ตามสไลด์สำเร็จรูปที่เคลือบด้วยสารเคมีเหล่านี้และพร้อมที่จะนำมาพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทันที สามารถหาซื้อได้จากหลายบริษัทที่ทำจำหน่ายเป็นการค้า เช่น Corning, Telechem, Amercham Pharmacia Biotech เป็นต้น ไมโครอาร์เรย์ชนิด PCR-based มีข้อดีหลายประการเช่น จากข้อมูลของจีโนมที่มีอยู่ สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องทำการโคลน และขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอจะพอเหมาะกับการนำมาทำไฮบริดเซชัน

การติดฉลากและไฮบริดเซชัน

ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาต้องนำมาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสซินด้วยวิธี nick translation หรือ random priming ด้วย Klenow fragment ของ DNA polymerase (Richmond *et al.*, 1999) ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ด้วยระบบสีคู่ (dual colour microarray) สีที่นิยมใช้คือ cyanine dye ชนิด Cy3 and Cy5 ซึ่งข้อดีของ cyanine dye คือการที่สีทั้งสองชนิดนี้สามารถกระตุ้น และตรวจวัดด้วยความยาวคลื่นที่ต่างกันได้ แม้ว่าจะอยู่บนไมโครอาร์เรย์แผ่นเดียวกัน ดังนั้นทำให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างสองชนิดบนไมโครอาร์เรย์แผ่นเดียวกันได้ทั้งนี้ Phimister (1999) ได้ให้คำจำกัดความของ “PROBE” คือ known sequence และ “TARGET” คือ unknown sequence ดังนั้นในการวิเคราะห์ไมโครอาร์เรย์จะมี oligonucleotide หรือ PCR fragment ของยีนที่ทราบลำดับเบสแล้ว ยึดติดอยู่กับแผ่นสไลด์แก้วที่ทราบตำแหน่งแล้ว ดังนั้นดีเอ็นเอที่ตรงหรือพิมพ์ลงบนแผ่นสไลด์ จะเรียกว่าเป็น “probe” ในขณะที่ “target” จะเป็นดีเอ็นเอที่มาจากจุลินทรีย์ที่สนใจศึกษานำมาติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน และนำมาไฮบริดซ์กับ probe ซึ่งสี Cy3 จะปล่อยแสงฟลูออเรสซินที่มีความยาวคลื่น 532 nm (แสงสีเขียว) และ Cy5 ซึ่งจะปล่อยแสงฟลูออเรสซินที่มีความยาวคลื่น 635 nm (แสงสีแดง) ทั้งนี้ในการเข้าคู่กันของ target และ probe ในการทำไฮบริดเซชัน

จะต้องเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปของดีเอ็นเอสายเดี่ยว และปริมาณของ target ที่ใช้ในการศึกษาที่จะนำมาไฮบริไดซ์ จะขึ้นอยู่กับชนิดของไมโครอาร์เรย์และวิธีการติดฉลาก แต่โดยทั่วไปนิยมใช้ตัวอย่างที่ติดฉลากด้วย Cy3 และ Cy5 ปริมาณเท่ากันมาผสมกัน และนำมาไฮบริดลงบนสไลด์แผ่นเดียวกัน ซึ่งการใช้วิธีสลับสี (dye swap procedure) ในการติดฉลากตัวอย่าง สามารถช่วยลดความคลาดเคลื่อนของประสิทธิภาพของสีในการติดฉลากได้

ไมโครอาร์เรย์ที่เป็นสไลด์แก้ว ก่อนที่จะนำมาใช้มักจะต้องนำแผ่นสไลด์มาผ่านการ pre-hybridisation เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ และชะเอา target ที่ไม่ติดออกไปก่อน ซึ่งสารละลายที่จะใช้ในขั้นตอนการ pre-hybridisation ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ใช้ผสมกับดีเอ็นเอ ในขั้นตอนการพิมพ์ไมโครอาร์เรย์ด้วย เมื่อเตรียมสไลด์พร้อมแล้วจึงนำมาไฮบริดกับ target ในตู้บ่มเพื่อควบคุมความชื้นไม่ให้ตัวอย่างที่ศึกษาแห้งไประหว่างการทดลอง โดยทั่วไประยะเวลาในขั้นตอนนี้จะใช้เวลาประมาณ 10-15 ชั่วโมง ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดตัวอย่างที่ศึกษาเมื่อครบเวลาจึงนำสไลด์มาล้างเพื่อกำจัด probe ที่ไม่เข้าคู่หรือเข้าคู่ได้ไม่ดีเนื่องจากมีเบสที่ไม่เข้าคู่กับ target เพื่อช่วยป้องกันสัญญาณที่เป็น false positive และกำจัด background และ noise (ภาพที่ 3) ส่วนมากนิยมใช้สารละลาย SSC/SDS ที่มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับ เป็นสารละลายที่ใช้ในการล้างสไลด์ จากนั้นจะนำไปทำให้แห้งก่อนนำไปเข้าเครื่อง

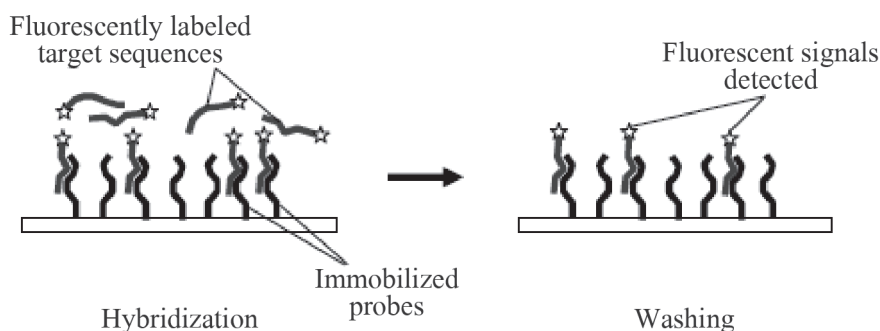
scanner เพื่อตรวจวัดแสงที่ปลดปล่อยออกมา ในปัจจุบันสามารถใช้วิธีอัตโนมัติ ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดหลังจากการฉีดตัวอย่างที่ติดฉลากแล้ว เพื่อเข้าไปไฮบริดกับสไลด์ไมโครอาร์เรย์ ขั้นตอนการล้างและทำให้แห้งเพื่อรอนำไปเข้าเครื่องสแกน จะเป็นไปโดยขั้นตอนที่ถูกกำหนดไว้ด้วย microarray hybridisation station และสามารถทำได้พร้อมกันที่ละหลายสไลด์

การตรวจสอบ (detection)

หลังจากขั้นตอนไฮบริไดเซชัน จะเป็นการสแกนเพื่อวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมาจาก target แต่ละจุด โดยเครื่องสแกนไมโครอาร์เรย์จะปล่อยแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นที่ต่างกัน เพื่อกระตุ้นสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดฉลาก target ไว้ จากนั้น confocal microscope ที่ติดอยู่กับระบบตรวจวัด (detector system) จะบันทึกความเข้มแสงที่ปล่อยออกมาจากแต่ละจุดของ probe (ภาพที่ 4) และนำสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะนำมาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์

การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

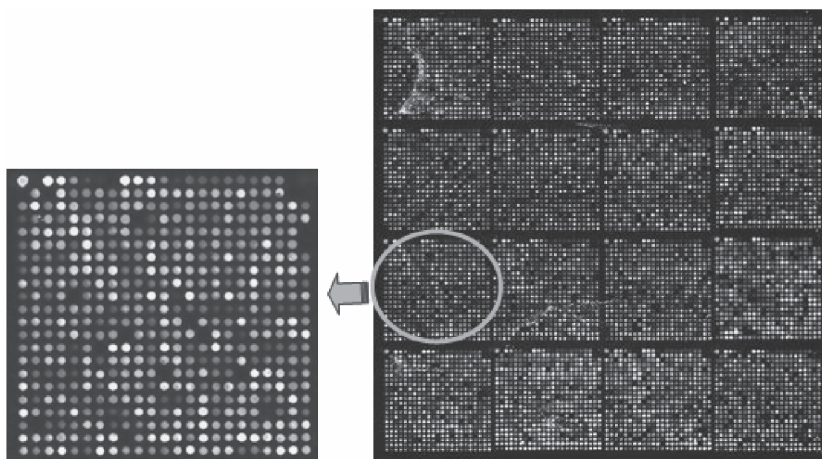
ในขั้นตอนการศึกษาด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ มีหลายขั้นตอนที่มีผลกระทบต่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่ทำต่างครั้งกัน เช่น การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่นำมาไฮบริดกับสไลด์แต่ละสไลด์ ทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ หรือประสิทธิภาพในการ



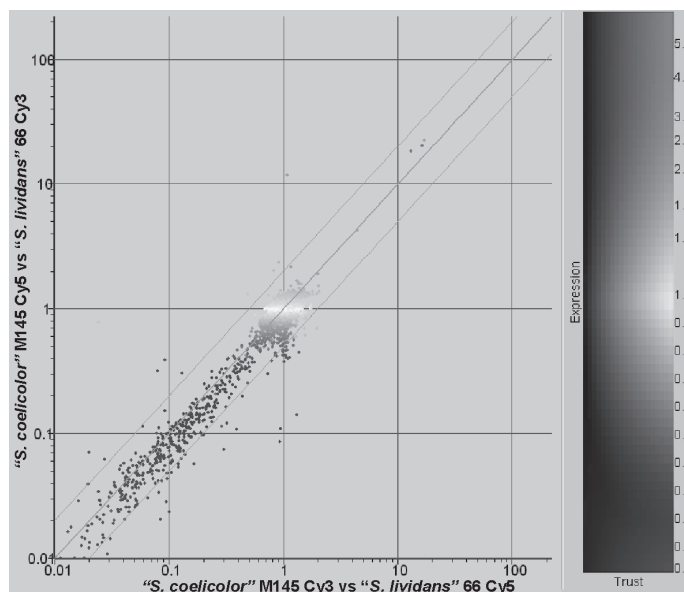
ภาพที่ 3 หลักการไฮบริไดเซชัน (Li and Liu, 2003)

ไฮบริดซ์ รวมถึงขั้นตอนในการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากการสแกน ดังนั้นขั้นตอนการ normalisation จึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นในการแก้ไขหรือปรับข้อมูลให้ถูกต้อง เพื่อจะได้นำข้อมูลของแต่ละสไลด์มาเปรียบเทียบกันได้ เช่น ในการลดความผิดพลาดของประสิทธิภาพ ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอของสปีฟอเรส

ชนิดที่ต่างชนิดกัน (dye incorporation efficiency) สามารถทำได้โดยการใช้ dye swap experiment ซึ่งเป็นการสลับสีที่นำมาติดฉลากกับตัวอย่างด้วยการทำซ้ำ (replicate) ในการทดลองเดียวกัน (Ye et al., 2001) ตัวอย่างดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 ลักษณะไมโครอาร์เรย์ของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ที่ได้หลังจากการสแกน



ภาพที่ 5 Dye swap experiment ของ *S. coelicolor* A3(2) ไมโครอาร์เรย์ (*S. coelicolor* M145 ติดฉลากด้วย Cy3 และ *S. lividans* ติดฉลากด้วย Cy5 เปรียบเทียบกับ *S. coelicolor* M145 ติดฉลากด้วย Cy5 และ *S. lividans* ติดฉลากด้วย Cy3)

การวิเคราะห์ด้วยไมโครอาเรย์เป็นเทคโนโลยีชนิด high-throughput ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดลองแต่ละครั้งจะออกมามากมาย ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลจึงจำเป็นที่จะต้องมีความรู้พื้นฐานข้อมูลที่ใช้เก็บข้อมูลและซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากการสแกนและการอ่านผล ซึ่งปัจจุบันมีซอฟต์แวร์ที่หลากหลายที่พัฒนาขึ้นมา ให้เหมาะสมกับการศึกษาไมโครอาเรย์แต่ละชนิด

การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอไมโครอาเรย์ในการเปรียบเทียบจีโนม

การเปรียบเทียบจีโนมด้วยวิธีการนี้อาศัยข้อมูลที่ว่าจีโนมของจุลินทรีย์ที่ใกล้ชิดกันจะมีความคล้ายกัน ถ้าหากผลการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์มีความใกล้ชิดกันมากเท่าใด จุลินทรีย์นั้นก็ยิ่งมีความคล้ายกันของจีโนมมากขึ้นเท่านั้น ดังนั้นถ้าหากจุลินทรีย์สองสายพันธุ์มีความใกล้ชิดกันในระดับที่มากพอ จะพบว่าจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้จะแสดง “synteny” คือ จะมีการอนุรักษ์บางส่วนหรือทั้งหมดลำดับยีน ดังนั้นจึงสามารถใช้ข้อมูลจากจีโนมหนึ่ง เพื่อบอกตำแหน่งของยีนในอีกจีโนมที่นำมาเปรียบเทียบได้

ดีเอ็นเอไมโครอาเรย์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียหลายสปีชีส์ (ตารางที่ 1) ทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ จนถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Richmond *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 2000; Kato-Maeda *et al.*, 2001) และมีดีเอ็นเอไมโครอาเรย์ที่สร้างขึ้นจากจีโนมจุลินทรีย์ที่นิยมศึกษา และใช้กันจนเป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง ซึ่งการใช้ไมโครอาเรย์เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างจีโนมที่สมบูรณ์แล้ว และสายพันธุ์ที่ยังไม่มีข้อมูลแต่มีความใกล้ชิดกัน จะทำให้ทราบถึงความหลากหลาย (diversity) และวิวัฒนาการ (evolution) ของจุลินทรีย์ชนิดนั้น (Ochman *et al.*, 2000).

อย่างไรก็ตามการทำดีเอ็นเอไมโครอาเรย์ยังมีข้อจำกัดเช่น การใช้วิธีการนี้เพียงวิธีการเดียวในการเปรียบเทียบจีโนม จะไม่สามารถได้ข้อมูลที่สมบูรณ์เนื่องจากวิธีการนี้ใช้หลักการของไฮบริดเซชัน ดังนั้นเบสของสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ทดสอบ ที่สามารถเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่ตรึงอยู่บนสไลด์ไมโครอาเรย์เท่านั้นที่จะถูกตรวจวัดได้ นอกจากนี้การจับกันของยีนที่ใช้ศึกษา จะไม่คำนึงถึงความจำเพาะของ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอไมโครอาเรย์เพื่อเปรียบเทียบจีโนมของแบคทีเรีย

Microarray	Organisms	References
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella</i> strains	Cummings <i>et al.</i> (2004)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	Pearson <i>et al.</i> (2003)
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> 2000 generations	Riehle <i>et al.</i> (2001)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> clinical isolates	Kato-Maeda <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas</i> strains	<i>Pseudomonas</i> strains	Cho and Tiedje (2001)
<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. enterica</i> strains <i>S. bongori</i> strains	Chan <i>et al.</i> (2003)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	<i>Shewanella</i> species, <i>Escherichia coli</i> K-12	Murray <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> strains	Van Leeuwen <i>et al.</i> (2003)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces</i> , <i>Kitasatospora</i>	Hsiao and Kirby (2008)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces</i> strains	Kirby <i>et al.</i> (2008)
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> strains	Dziejman <i>et al.</i> (2002)
<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>X. fastidiosa</i> strains	Koide <i>et al.</i> (2004)

ตำแหน่ง หรือความยาวหรือการเรียงตัวของยีน ดังนั้นถ้าหากจีโนมของจุลินทรีย์ที่นำมาไฮบริดซ์กับไมโครอาร์เรย์ ไม่สามารถเข้าคู่กันได้เลยหรือเข้าคู่กันได้ในระดับต่ำ จะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดขึ้นยีนหรือดีเอ็นเอในส่วนนั้นได้ อาจต้องใช้เทคนิคอื่นช่วยในการศึกษา เช่น subtractive hybridisation เป็นต้น

การใช้ประโยชน์ของไมโครอาร์เรย์เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ สามารถใช้บ่งบอกความเป็นสปีชีส์เดียวกันจากยีนที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งการเปรียบเทียบจีโนมของแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน ที่มีความใกล้ชิดกันในระดับสายพันธุ์ ว่ามีความแตกต่างกันของยีนมากน้อยเพียงไร หรือมีการเปลี่ยนแปลงไปมากน้อยเพียงใด พบว่าเทคนิคไมโครอาร์เรย์สามารถแสดงยีนส่วนที่เป็น “core” (conserved) และ “dispensible” (sporadically distributed) ของจีโนมได้ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ของยีนในส่วน core จะแปรผันตามสปีชีส์ของจุลินทรีย์ (Ochman and Santos, 2005) เช่น การศึกษาเปรียบเทียบ *Salmonella enterica* จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่ามียีนจำนวน 54 % ที่เป็นส่วน core ในขณะที่ *Helicobacter pylori* และ *Staphylococcus aureus* มียีนประมาณ 78 % ที่เป็นส่วน core และจากการศึกษา *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 100 ไอโซเลต พบว่ามียีนถึง 94 % ที่เป็นส่วน core โดยเป็นยีนที่พบในทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา (ตารางที่ 2)

ในการนำเทคนิคไมโครอาร์เรย์มาใช้ศึกษา

จีโนมของจุลินทรีย์ ที่มีข้อมูลของยีนที่ทราบหน้าที่ของยีนเหล่านั้นแล้ว จะทำให้ทราบว่าในจุลินทรีย์ที่มีความใกล้ชิดกัน มียีนส่วนใดที่ทำให้มีการแสดงออกที่ต่างกัน เช่น *Samomella enterica* มี dispensible region ที่จำเพาะกับ subspecies 1 ซึ่งพบว่ามีความสำคัญในการเข้าก่อโรครกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก (Porwollik et al., 2002) หรือ HHGII island ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคของ *Helicobacter hepaticus* สัมพันธ์กับโรคตับในหนู ซึ่งทำให้ทราบว่าการศึกษาที่ไม่มียีนหรือการหายไประหว่างวิวัฒนาการของยีนเหล่านั้นออกจากโครโมโซม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์หรือการก่อโรคหรือไม่ เช่นในการศึกษา *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 100 ไอโซเลต พบว่ามีประมาณ 5.5 % ของยีนทั้งหมดที่ขาดหายไป ในไอโซเลตที่ศึกษา แต่คุณสมบัติในการก่อโรคของไอโซเลตเหล่านี้ยังเหมือนเดิม (Tsolaki et al., 2004)

ตัวอย่างของการใช้ไมโครอาร์เรย์ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของจีโนม เช่น การศึกษา *Streptomyces coelicolor* A3(2) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นโมเดลของการศึกษาทางพันธุกรรมของสเตรปโตมัยซีต จากการรวบรวมสายพันธุ์มาจากห้องปฏิบัติการจำนวน 21 แห่ง พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่มียีนขนาด 1.06 เมกะเบส เพิ่มขึ้นมาจากจีโนมของ *S. coelicolor* M145 ซึ่งยีนส่วนที่เพิ่มขึ้นมานี้มีขนาดคิดเป็น 11 % ของขนาดจีโนม เป็นส่วนที่เรียกว่า inverted repeat อยู่ทางด้านขวาของโครโมโซมของ *S. coelicolor* A3(2)

ตารางที่ 2 การศึกษา ORFs ที่มีร่วมกันของแบคทีเรียด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์

Species	No. of ORFs	No. of Strains	Shared (%)	Reference
<i>Campylobacter jejuni</i>	1654	11	79	Dorrell et al. (2001)
<i>Helicobacter pylori</i>	1660	15	78	Salama et al. (2000)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3924	100	94	Tsolaki et al. (2004)
<i>Salmonella enterica</i>	4169	24	54	Chan et al. (2003)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2817	36	78	Fitzgerald et al. (2001)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2137	36	90	Smoot et al. (2002)
<i>Vibrio cholerae</i>	3632	9	99	Dziejman et al. (2002)

ซึ่งทำให้ทราบว่าทราบว่ายีนสายพันธุ์แรกเริ่มของ *S. coelicolor* A3(2) จะมียีนส่วนนี้อยู่ (Weaver et al., 2004)

การค้นพบทางพันธุกรรมรวมถึงการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม มีผลทำให้จุลินทรีย์มีการแสดงออกที่ต่างกัน เช่น จุลินทรีย์สปีชีส์เดียวกันมีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ก่อโรค และสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคของสปีชีส์เดียวกัน จะสามารถใช้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ว่า ยีนใดเป็นยีนที่สำคัญที่มีส่วนทำให้เกิดการติดเชื้อ ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค หรือทำให้มีการปรับตัวของแบคทีเรียให้เข้ากับโฮสต์ ดังนั้นการใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์ในการเทียบจีโนมที่ทราบลำดับเบสแล้ว กับสายพันธุ์ที่ยังไม่ทราบลำดับเบสของจีโนม จะช่วยให้เกิดข้อมูลที่สำคัญในด้านความหลากหลายและวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบทำให้ทราบว่า ยีนใดมีอยู่ในทั้งสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ทดสอบ หรือยีนใดที่มีอยู่แต่ในสายพันธุ์อ้างอิงแต่ไม่มีในสายพันธุ์ทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สามารถตรวจสอบยีนที่มีอยู่ในสายพันธุ์ทดสอบแต่ไม่มีในสายพันธุ์อ้างอิง ยีนที่เกิด point mutation, frame-shift mutation, small deletion รวมถึง rearrangement ของจีโนมที่ไม่มีผลทำให้เกิด deletion ของยีน (Schoolnik, 2002)

ในการศึกษาความหลากหลายของ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคหลายชนิด เช่น gastric, duodenal peptic ulcer disease และ gastric cancer ผลจากการเทียบจีโนมของ *H. pylori* สองสายพันธุ์ที่มีจีโนมที่สมบูรณ์แล้วพบว่ามีความเหมือน 6 % ของจีโนมที่แตกต่างกัน และเมื่อใช้ไมโครอาร์เรย์ซึ่งมีจีโนมประมาณ 98.6 % ของทั้งสองจีโนมนี้ในการศึกษา *H. pylori* อีก 15 สายพันธุ์พบว่ามีความเหมือน 1,281 ORFs ที่พบอยู่ในทุกสายพันธุ์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นส่วนของ core ใน *H. pylori* เมื่อศึกษาในรายละเอียดพบว่า ยีนกลุ่มนี้เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolic และ biosynthetic pathway, cellular และ regulatory function และมี

อีกประมาณ 262 ORFs (ประมาณ 22 % ของจีโนม) ที่ขาดหายไปจากอย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ของสายพันธุ์ทดสอบ ซึ่งพบว่ายีนที่จำเพาะกับสายพันธุ์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของจุลินทรีย์ ให้เข้ากับเจ้าบ้านรวมอยู่ด้วย (Salama et al., 2000) นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบจีโนมของสองสายพันธุ์ ที่ให้ระดับความรุนแรงของโรคที่ต่างกัน พบว่ายีนสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงของโรคน้อยกว่า จะมีการหายไปของ cag pathogenecity island (Israel et al., 2000)

ในการเปรียบเทียบข้าม taxa เช่น การเทียบ *Krebsiella pneumoniae* กับ *Escherichia coli* โดยใช้ *E. coli* ไมโครอาร์เรย์สไลด์ พบว่ามีประมาณ 3000 ORFs ของ *E. coli* ที่พบใน *K. pneumoniae* (Dong et al., 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษาด้วยเทคนิคนี้ จะไม่ได้ข้อมูลของยีนที่มีอยู่ในแต่เฉพาะสายพันธุ์ทดสอบ ดังนั้นถ้าจีโนมของสายพันธุ์ที่ศึกษา และนำมาเทียบกันมีความแตกต่างกันมาก ก็จะทำให้ยีนส่วนใหญ่ที่มีในสายพันธุ์ทดสอบไม่สามารถตรวจพบทั้งนี้ Everts et al. (2001) เสนอว่าการศึกษาด้วยวิธีนี้ จะเที่ยงตรงที่สุดเมื่อจีโนมมีระดับความเหมือนกันมากกว่า 80 % และควรยืนยันผลด้วยเทคนิคอื่นประกอบด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Chan, K., Baker, S., Kim, C.C., Detweiler, C.S., Dougan, G. and Falkow, S. 2003. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 185: 553-563.
- Cho, J.C. and Tiedje, J.M. 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridisation by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 67: 3677-3682.
- Chung, V.G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A.,

- Kucherlapati, R. and Childs, G. 1999. Making and reading microarrays. *Nature Genet* (supplement) 21: 15-19.
- Cummings, C.A., Brinig, M.M., Lepp, P.W., van de Pas, S. and Relman, D.A. 2004. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* 186: 1484-1492.
- Dong, Y., Glasner, J.D., Blattner, F.R. and Triplett, E.W. 2001. Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. *Appl Environ Microbiol* 67: 1911-1921.
- Dorrell, N., Mangan, J.A., Laing, K.G., Hinds, J., Linton, D., Al-Ghusein, H., Barrell, B.G., Parkhill, J., Stoker, N.G., Karlyshev, A.V., Butcher, P.D. and Wren, B.W. 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res* 11: 1706-1715.
- Dziejman, M., Balon, E., Boyd, D., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F. and Mekalanos, J.J. 2002. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1556-1561.
- Everts, E.M., Au-Young, J., Ruvolo, M.V., Lim, A.C. and Reynolds, M.A. 2001. Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays. *Biotechniques* 31: 1182-1192.
- Fitzgerald, J.R., Sturdevant, D.E., Mackie, S.M., Gill, S.R. and Musser, J.M. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8821-8826.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. and Venter, J.C. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, J.L., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.-C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison III, C.A. and Venter, C. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403.
- Gibson, G. 2002. Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Mol Ecol* 11: 17-24.
- Hsiao, N.H. and Kirby, R. 2008. Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus*

- and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93: 1-25.
- Israel, D.A., Salama, N., Arnold, C.N., Moss, S.F., Ando, T., Wirth, H.P., Tham, K.T., Camorlinga, M., Blaser, M.J., Falkow, S. and Peek, R.M. Jr. 2000. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 107: 611-620.
- Kane, M.D., Jatke, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D. and Madore, S.J. 2000. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res* 28: 4552-4557.
- Kato-Maeda, M., Rhee, J.T., Gingeras, T.R., Salamon, H., Drenkow, J., Smittipat, N. and Small, P.M. 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 11: 547-554.
- Kirby, R., Gan, T.K., Hunter, I., Herron P. and Tilley, E. 2008. The genome of *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* shows a novel structure compared to other *Streptomyces* using DNA/ DNA microarray analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 94: 173-186.
- Koide T, Zaini, P.A., Moreira, L.M., Vêncio, R.Z., Matsukuma, A.Y., Durham, A.M., Teixeira, D.C., El-Dorry, H., Monteiro, P.B., da Silva, A.C., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A.M. and Gomes, S.L. 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J Bacteriol* 186: 5442-5449.
- Li, E.S.Y. and Liu, W.-T. 2003. DNA microarray technology in microbial ecology studies-principle, applications and current limitations. *Microbes Environ* 18: 175-187.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R. and Lockhart, D.J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genet* 21: 20-24.
- Lucchini, S., Thompson, A. and Hinton, J.C.D. 2001. Microarrays for microbiologists. *Microbiology* 147: 1403-1414.
- Murray, A.E., Lies, D., Li, G., Nealson, K., Zhou, J. and Tiedje, J.M. 2001. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9853-9858.
- Nelson, K.E. 2004. Genomics. In A.T. Bull (ed.) *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Washington: ASM Press. pp. 250-259.
- Ochman, H. and Santos, S.R. 2005. Exploring microbial microevolution with microarrays. *Infect Genet Evol* 5: 103-108.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Pearson, B.M., Pin, C., Wright, J., I'Anson, K., Humphrey, T. and Wells, J.M. 2003. Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS Lett* 554: 224-230.
- Phimister, B. 1999. Going global. *Nature Genet* 21: 1.
- Porwollik, S., Wong, R.M. and McClelland, M. 2002. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8956-8961.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H. and Blattner, F.R. 1999. Genome-wide expression

- profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 27: 3821-3835.
- Riehle, M.M., Bennett, A.F. and Long, A.D. 2001. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 525-530.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L. and Falkow, S. 2000. A whole-genome microarrays reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14668-14673.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schoolnik, G.K. (2002). Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 5: 20-26
- Smoot, J.C., Barbian, K.D., Van Gompel, J.J., Smoot, L.M., Chaussee, M.S., Sylva, G.L., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Porcella, S.F., Parkins, L.D., Beres, S.B., Campbell, D.S., Smith, T.M., Zhang, Q., Kapur, V., Daly, J.A., Veasy L.G. and Musser, J.M. 2002. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4668-4673.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F.R. and Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* 181: 6425-6440.
- Tsolaki, A.G., Hirsh, A.E., DeRiemer, K., Enciso, J.A., Wong, M.Z., Hannan, M., de la Salmoniere, Y.-O. L. G., Aman, K., Kato-Maeda, M. and Small, P.M. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4865-4870.
- Van Leeuwen, W.B., Jay, C., Snijders, S., Durin, N., Lacroix, B., Verbrugh, H.A., Enright, M.C., Troesch, A. and van Belkum, A. 2003. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J Clin Microbiol* 41: 3323-3326.
- Weaver, D., Karoonuthaisiri, N., Tsai, H.H., Huang, C.H., Ho, M.L., Gai, S., Patel, K.G., Huang, J., Cohen, S.N., Hopwood, D.A., Chen, C.W. and Kao C.M. 2004. Genome plasticity in *Streptomyces*: identification of 1 Mb TIRs in the *S. coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 51: 1535-1550.
- Ye, R.W., Wang, T., Bedzyk, L. and Croker, K.M. 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J Microbiol Meth* 47: 257-272.