

บทบาทของยีน *fljD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของ *Helicobacter pylori*

นางสาวรฤทัย ทองเกิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ROLE OF *flaD* GENE IN A REGULATION OF *HELICOBACTER PYLORI* BIOFILM FORMATION

Miss Vorraruthai Thongkerd



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของยีน *fliD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของ
Helicobacter pylori

โดย

นางสาววรฤทัย ทองเกิด

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรรณะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

วรฤทัย ทองเกิด : บทบาทของยีน *flhD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของ *Helicobacter pylori* (ROLE OF *flhD* GENE IN A REGULATION OF *HELICOBACTER PYLORI* BIOFILM FORMATION) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล, 106 หน้า.

เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ แผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก กระเพาะอาหารอักเสบ และมะเร็งในกระเพาะอาหาร พบว่าประชากรโลกมากกว่าครึ่งหนึ่งมีการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบประเทศที่กำลังพัฒนา หนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อ *H. pylori* สามารถแพร่กระจายรวมไปถึงการเกิดการติดเชื้อเรื้อรังและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือการที่เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้งขณะเจริญอยู่ในธรรมชาติและในสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามกลไกที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แพลเจลลาเป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ การศึกษาก่อนหน้าพบการแสดงออกที่สูงขึ้นของโปรตีน FlhD ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่ดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของยีน *flhD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการสร้างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis และเปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ทั้งในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค pellicle assay และเชิงปริมาณด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด เนื่องจากแฟลเจลลามีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่และการยึดเกาะ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลกระทบของยีน *flhD* ต่อความสามารถในการเคลื่อนที่และการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกอล่องเสียง HEp-2 ด้วยเทคนิค motility assay และ adhesion assay ตามลำดับ แม้ว่าปริมาณไบโอฟิล์มระหว่างเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ส่งผลต่อการชะลอการสร้างและโครงสร้างสามมิติที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* สามารถเคลื่อนที่ได้ลดลง แต่ยังคงความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุกอล่องเสียง HEp-2 ได้ในระดับเดียวกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ยีน *flhD* อาจมีบทบาทต่อกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* และอาจนำมาใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการพัฒนาวัคซีนหรือยารักษาการติดเชื้อต่อไปในอนาคต

ภาควิชา เคมีคลินิกลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5576660637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: HELICOBACTER PYLORI / BIOFILM / FLAGELLA / FLID GENE

VORRARUTHAI THONGKerd: ROLE OF *fliD* GENE IN A REGULATION OF *HELICOBACTER PYLORI* BIOFILM FORMATION. ADVISOR: PANAN RATTHAWONGJIRAKUL, Ph.D., 106 pp.

Helicobacter pylori is a leading causative agent of gastrointestinal diseases, including peptic and duodenal ulcers, gastritis and gastric cancer. More than half of the world's population has been infected with this bacterium, particular those who are in developing countries. *H. pylori* is able to form biofilm both in environments and clinical settings contributing to bacterial spreading, chronic infection and antimicrobial resistance. However, the regulation of *H. pylori* biofilm formation is poorly understood. In some bacteria, flagella plays a role in biofilm formation. A previous study showed that FliD flagellar capping protein was up-regulated during the biofilm formation of *H. pylori*. In this study, the impact of the *fliD* gene on the biofilm formation of *H. pylori* was investigated. A *H. pylori fliD* mutant was constructed by inverse PCR mutagenesis. The formation of its biofilm was evaluated, compared to the wild-type ATCC 43504, using a pellicle assay and a crystal violet staining assay. The cyto-architecture of the biofilm was photographed with scanning electron microscopy. The mobility of the bacteria and its adhesion ability to HEp2-cells were assessed using a motility assay and a fluorescein isothiocyanate staining adhesion assay, respectively. It was found that there was no significant difference in the levels of the biofilm formation and bacterial adhesion between the wild-type and the *fliD* mutant. Apart from a poor motility, the *fliD* mutant had a slightly delayed formation and a remarkable incomplete cyto-architecture of its biofilm. The bacterial cells residing in the biofilm of the *fliD* mutant showed a loose accumulation with less apparent cross-linking fibrils. Most of the mutant cells had truncated flagella. This study provides the preliminary evidences that *fliD* potentially regulates complete biofilm formation. The FliD may be used as a novel target for a development of vaccine or antimicrobial agent in future.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and
Molecular Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางแก้ไขปัญหา และข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขณะทำงานวิจัย ตลอดจนให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนบางส่วนจาก ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (เลขที่ MRG 5580161) ทุนวิจัย กองทุนคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2557 (เลขที่ ASHCU57002) ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 3 ปีงบประมาณ 2557 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนสำหรับผู้สมัครที่ไม่ผ่านการคัดเลือกทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนสนับสนุนการไปนำเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ พี่น้อง สาขาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ และความช่วยเหลือมาโดยตลอด สุดทำยนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่เป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จมาจนถึงทุกวันนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 แผนงานในการดำเนินการวิจัย	3
1.4 คำถามงานวิจัย.....	3
1.5 สมมุติฐาน	4
1.6 กรอบแนวความคิด.....	4
1.7 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2	6
ทบทวนวรรณกรรม	6
2.1 การค้นพบ <i>H. pylori</i>	6
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>H. pylori</i>	6
2.3 พยาธิสภาพ.....	8
2.4 การติดต่อ.....	8

2.5 ปัจจัยในการก่อโรค	9
2.6 ระบาดวิทยาของการติดเชื้อและอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งที่มีสาเหตุมาจาก <i>H. pylori</i>	11
2.7 การรักษา	12
2.8 ไบโอฟิล์ม	13
2.9 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i>	16
2.10 กลไกการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มในระดับยีนของ <i>H. pylori</i>	18
2.11 บทบาทของแฟลเจลลาต่อกลไกที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ.....	19
2.12 โปรตีนที่แสดงออกในสถานะของเชื้อ <i>H. pylori</i>	20
2.13 แฟลเจลลาของเชื้อ <i>H. pylori</i>	21
2.14 ยีน <i>flhD</i> กับบทบาทในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์ม	25
บทที่ 3	28
วัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย	28
3.1 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรีย.....	28
3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	29
3.2.1 เชื้อ <i>H. pylori</i>	29
3.2.2 เชื้อ <i>E. coli</i>	30
3.3 การสร้างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>flhD</i> ด้วยเทคนิค Inverse PCR mutagenesis (IPCRM)	30
3.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม	30
3.3.2 การออกแบบ primer สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR และเทคนิค inverse PCR mutagenesis	31
3.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน <i>flhD</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	36
3.3.4 การแยกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส.....	37

3.3.5 การทำให้ผลผลิตจาก PCR บริสุทธิ์.....	38
3.3.6 การโคลนยีน <i>fljD</i> เข้าสู่ pGEM®T-Easy vector	38
3.3.7 การทำ colony PCR amplification	39
3.3.8 การสกัดพลาสมิด.....	40
3.3.9 การทำ restriction enzyme analysis.....	40
3.3.10 การทำ inverse PCR mutagenesis	40
3.3.11 การใส่ kanamycin resistance cassette (kan^R) เข้าสู่ผลผลิต inverse PCR mutagenesis.....	42
3.3.12 การนำพลาสมิดที่มียีน <i>fljD</i> กลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค natural transformation.....	45
3.3.13 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>fljD</i> ด้วยเทคนิค Sequencing.....	45
3.4 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค motility assay	46
3.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกช่องเสียง HEP-2 ด้วย เทคนิค adhesion assay.....	46
3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุกช่องเสียง (human laryngeal epithelial; HEP-2) ...	46
3.5.2 การนับเซลล์	47
3.5.3 การย้อมเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยสี fluorescein isothiocyanate (FITC)	48
3.5.4 การเตรียมเซลล์เยื่อบุกช่องเสียง HEP-2 เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการ ยึดเกาะของเชื้อ <i>H. pylori</i>	48
3.5.5 การวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จากตัวเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุ ช่องเสียง HEP-2.....	49
3.6 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในหลอดทดลอง.....	50
3.6.1 การสร้างไบโอฟิล์มด้วยเทคนิค pellicle assay.....	50

3.6.2 การวัดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> เชงกึ่งปริมาณ.....	50
3.6.3 การวัดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> เชงปริมาณด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet.....	50
3.7 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM).....	51
3.7.1 การเตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด.....	51
3.7.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด	52
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	52
บทที่ 4	53
ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
4.1 การสร้าง <i>H. pylori</i> ที่มียีน <i>fliD</i> กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis ...	53
4.1.1 สารพันธุกรรมของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่สกัดได้	53
4.1.2 primer ที่ถูกออกแบบ.....	53
4.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน <i>fliD</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	54
4.1.4 การโคลนยีน <i>fliD</i> เข้าสู่ pGEM®T-Easy vector.....	55
4.1.5 การทำ inverse PCR mutagenesis.....	58
4.1.6 การใส่ kanamycin resistance cassette เข้าสู่ยีน <i>fliD</i> ที่กลายพันธุ์	62
4.1.7 การนำพลาสมิดที่มียีน <i>fliD</i> กลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค natural transformation.....	65
4.1.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>fliD</i> ด้วยเทคนิค Sequencing	67
4.2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	67

4.3 ความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	69
4.4 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	71
4.4.1 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> เมื่อศึกษาเชิงกึ่งปริมาณ.....	72
4.4.2 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> เมื่อศึกษาเชิงปริมาณ.....	74
4.5 ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	76
บทที่ 5	79
อภิปรายผลการทดลอง.....	79
บทที่ 6	88
สรุปผลการทดลอง.....	88
รายการอ้างอิง	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	106

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ปัจจัยที่ช่วยในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ <i>H. pylori</i>	11
ตารางที่ 2	ปฏิกิริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>fliD</i> การทำปฏิกิริยา inverse PCR mutagenesis และการทำปฏิกิริยา colony PCR.....	37
ตารางที่ 3	ตารางแสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน <i>fliD</i> ปฏิกิริยา inverse PCR mutagenesis และปฏิกิริยา colony PCR และขนาดของผลผลิตที่ได้ตามลำดับ.....	54
ตารางที่ 4	ระดับของ pellicle และ attached biofilm ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	74



สารบัญภาพ

รูปที่ 1	ขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม.....	14
รูปที่ 2	ลักษณะแฟลเจลลาของเชื้อ <i>H. pylori</i> และโปรตีนต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแฟลเจลลา	22
รูปที่ 3	ลำดับเบสของยีน <i>fliD</i> ของ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ ATCC 26695 (HP0752).....	36
รูปที่ 4	ลำดับเบสของ kanamycin resistance cassette	43
รูปที่ 5	อุปกรณ์นับเซลล์ hemacytometer-counting chamber.....	48
รูปที่ 6	ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>fliD</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR.....	55
รูปที่ 7	ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification	56
รูปที่ 8	ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> เข้าสู่พลาสมิดภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ <i>NotI</i>	57
รูปที่ 9	ผลผลิต inverse PCR mutagenesis จากการทำให้ยีน <i>fliD</i> กลายพันธุ์	58
รูปที่ 10	ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ <i>BglII</i>	59
รูปที่ 11	ผลผลิต colony PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BglII</i> จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification..	61
รูปที่ 12	ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NotI</i>	62
รูปที่ 13	ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter.....	64
รูปที่ 14	ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>fliD</i> ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NotI</i>	65

รูปที่ 15 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>fliD</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR.....	66
รูปที่ 16 การเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	68
รูปที่ 17 ขนาดพื้นที่ในการเคลื่อนที่เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	69
รูปที่ 18 ภาพการยึดเกาะของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> จากกล้องฟลูออเรสเซนส์กำลังขยาย 400 เท่า.....	70
รูปที่ 19 การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกอลังเสียง HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	71
รูปที่ 20 ลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> ที่สร้างขึ้น ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay.....	72
รูปที่ 21 pellicle และ attached biofilm ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> ที่สร้างขึ้นในวันที่ 3 และ 4 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay	73
รูปที่ 22 ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	75
รูปที่ 23 ภาพสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> ในช่วงระยะเวลาต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า	78
รูปที่ 24 ภาพสามมิติของรูปร่างเซลล์จากโคลนของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i> ที่มีอายุ 3 วันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า	78

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเกลียว (Gram-negative spiral shape) เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเจือจาง (micro-aerophilic) (1) โดยพบอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาสูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว (2) ผู้ติดเชื้อ *H. pylori* ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการทางคลินิกและอาจมีการติดเชื้อเรื้อรังไปตลอดชีวิต การติดเชื้อ *H. pylori* สามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆในระบบทางเดินอาหารส่วนบน เช่น ภาวะอักเสบเรื้อรัง แผลในกระเพาะ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma และมะเร็งกระเพาะอาหาร (2, 3) โดยในปี ค.ศ. 1994 องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งขององค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ได้จัดให้เชื้อ *H. pylori* เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (class I carcinogen) (4)

เชื้อ *H. pylori* มีปัจจัยในการก่อโรคหลายชนิด โดยมีแฟลเจลลาเป็นหนึ่งในปัจจัยการก่อโรคที่สำคัญ เชื้ออาศัยแฟลเจลลาเพื่อการเคลื่อนที่แบบคorkscrew (screw-like) ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปในชั้นเยื่อเมือกบริเวณกระเพาะอาหารได้ (5) นอกจากนี้แฟลเจลลายังช่วยในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (6) ขณะที่ในเชื้อแบคทีเรียบางชนิดพบว่าแฟลเจลลามีส่วนสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ (7-9) โดยพบว่าเมื่อเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นเริ่มกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อจะสัมผัสพื้นผิวโดยอาศัยแฟลเจลลา ก่อให้เกิดการยึดเกาะระหว่างตัวเชื้อกับพื้นผิวและเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตตามมา เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้งในหลอดทดลอง (10, 11) และในร่างกายของสัตว์ทดลอง (12) เชื้อยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในขณะที่อยู่ในร่างกายของมนุษย์ (12-16) การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียจะช่วยในการป้องกันตัวเชื้อจากระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตที่เชื้ออาศัยอยู่ และช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ดึงเครียดต่างๆ เช่น ในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ถูกสร้างจากเซลล์ฟาโกไซต์ นอกจากนี้การสร้างไบโอฟิล์มยังสามารถป้องกันตัวเชื้อจากการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะและทำให้การรักษาการติดเชื้อเป็นไปได้ยากขึ้น ก่อให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังหรือการรักษาที่ล้มเหลวตามมา (12, 17, 18)

ยีน *fljD* ของ *H. pylori* มีหน้าที่ควบคุมการสร้าง flagellar capping protein (โปรตีน FljD หรือโปรตีน HAP2) ซึ่งมีขนาด 76 กิโลดัลตัน ยีน *fljD* เป็นองค์ประกอบหนึ่งของ *fljD* operon ซึ่งประกอบด้วยยีนต่างๆ ได้แก่ ยีน *flaG* ยีน *fljD* และยีน *fljS* และถูกควบคุมโดย σ^{28} -dependent promoter (19) โปรตีน FljD เป็นโปรตีนที่หุ้มส่วนปลายสุดของเส้นแพลเจลลาของเชื้อ มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน flagellin ก่อให้เกิดการรวมตัวเป็นฟิลาเมนต์ในกระบวนการสร้างแพลเจลลา (20) จากการศึกษาในหนูที่ติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์ พบว่าโปรตีน FljD มีความสำคัญต่อความสามารถของเชื้อในการอยู่อาศัยในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (colonization) และ การสร้างแพลเจลลาที่สมบูรณ์ (19, 21)

ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตในรูปแบบไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังและยากต่อการรักษา อย่างไรก็ตามปัจจุบันข้อมูลที่ยังเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในระดับโมเลกุลยังมีจำกัด การศึกษาหน้าที่ของยีนบางตัวที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อชนิดอื่นๆ พบว่าไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* (14) เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่ดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มของแพลเจลลา (flagellar protein complex) ที่มากขึ้น โดยหนึ่งในโปรตีนที่แสดงออกนั้นคือโปรตีน FljD (22) ดังนั้นโปรตีน FljD จึงอาจเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของความสนใจในการเลือกศึกษายีน *fljD* ที่อาจมีบทบาทควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยทำการสร้างเชื้อ *H. pylori* ให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ที่พบว่ามี การแสดงออกขณะที่เชื้อดำรงอยู่ในสภาวะของไบโอฟิล์มจากการศึกษาที่ผ่านมา จากนั้นเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลองโดยเปรียบเทียบกับ *H. pylori* สายพันธุ์ปกติ เพื่อศึกษาบทบาทของยีนดังกล่าวต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ รวมไปถึงศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเนื่องจากแพลเจลลาเป็นโปรตีนที่ควบคุมการเคลื่อนที่และมีส่วนสนับสนุนการยึดเกาะของเชื้อต่อพื้นผิวต่างๆ (7, 23) ซึ่งทั้งสองขั้นตอนมีส่วนสัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (9, 23) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเคลื่อนที่และการยึดเกาะต่อเซลล์ของเชื้อโดยเปรียบเทียบระหว่าง *H. pylori* สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์

ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *fljD* มีความสำคัญในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* ดังนั้นโปรตีน FljD อาจสามารถนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนายาและวัคซีนที่จำเพาะต่อแพลเจลลาของเชื้อเพื่อใช้ในการรักษาและช่วยในการป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* ที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์มตามลำดับ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มประเทศกำลัง

พัฒนาที่มีความชุกของการติดเชื้อชนิดนี้สูงเนื่องจากการลดโอกาสในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ และช่วยลดปัญหาการดื้อยาในการรักษา ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นตามมา

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD*
- 1.2.2 เพื่อศึกษาบทบาทของยีน *fljD* ในการสร้างไบโอฟิล์มของ *H. pylori* ในหลอดทดลอง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาผลกระทบของยีน *fljD* ต่อโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*
- 1.2.4 เพื่อศึกษาผลกระทบของยีน *fljD* ต่อความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 และต่อการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori*

1.3 แผนงานในการดำเนินการวิจัย

- 1.3.1 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ด้วยวิธี inverse PCR mutagenesis (IPCRM)
- 1.3.2 ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค pellicle assay
- 1.3.3 ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่และความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ด้วยเทคนิค motility assay และเทคนิค adhesion assay ตามลำดับ
- 1.3.4 เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

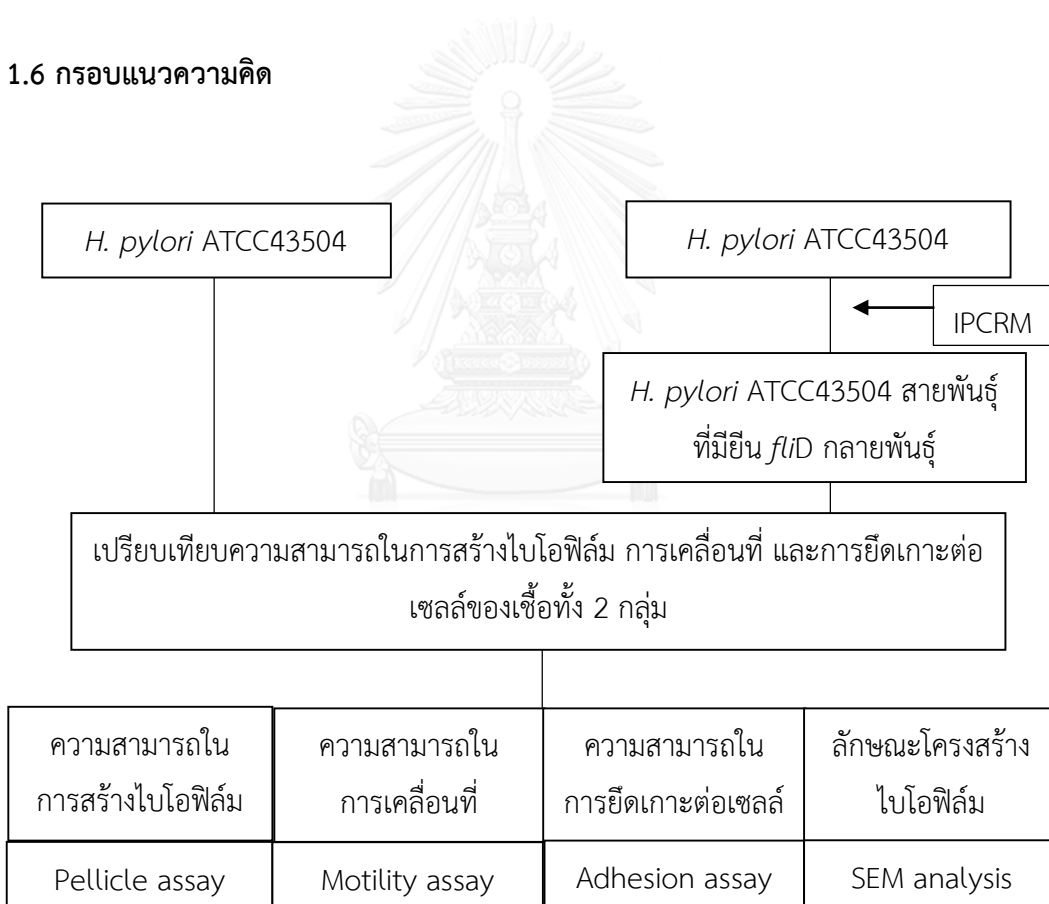
1.4 คำถามงานวิจัย

ยีน *fljD* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* การเคลื่อนที่ และการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 หรือไม่

1.5 สมมุติฐาน

จากการศึกษาในเชื้อบางชนิดพบว่าแฟลเจลลามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ และยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด colonization ของจุลชีพก่อโรคหลายชนิดรวมถึงเชื้อ *H. pylori* และจากข้อมูลการศึกษาทาง proteomic analysis ของเชื้อ *H. pylori* ในอดีต พบว่าโปรตีน Flid ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ flagellar protein complex มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้นยีน *flid* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนดังกล่าวอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* รวมไปถึงการเคลื่อนที่และการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุก่อเสียง HEP-2 ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อในระยะเริ่มต้น

1.6 กรอบแนวความคิด



1.7 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาบทบาทของยีน *flid* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยนำเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มาทำให้มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ด้วยวิธี homologous recombination โดยใช้เทคนิค inverse PCR mutagenesis จากนั้นทำการ

ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว HEp-2 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลอง และลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยเทคนิค motility assay, เทคนิค adhesion assay เทคนิค pellicle assay และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตามลำดับ โดยเปรียบเทียบผลระหว่างเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD*

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1 ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยช่วยอธิบายบทบาทของยีน *fliD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* และนำไปใช้เป็นพื้นฐานความรู้ในการศึกษากลไกระดับโมเลกุลในเชิงลึกต่อไป

1.8.2 ทำให้ทราบหน้าที่อื่นๆ ของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ที่อาจเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด นอกเหนือจากหน้าที่ในการเคลื่อนที่และการมีส่วนร่วมช่วยในการ colonization ของเชื้อ

1.8.3 จากการศึกษาพบว่ายีน *fliD* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน FliD หรือ filament cap protein มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* การศึกษาในอนาคตอาจใช้โปรตีน FliD เป็นเป้าหมายในการพัฒนายาหรือวัคซีน เพื่อใช้ในการรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่สัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์ม ทั้งนี้ FliD เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *H. pylori* สูง และมีแนวโน้มที่ดีในการนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นเป้าหมายของยาและวัคซีนต่อตัวเชื้อ ซึ่งจะช่วยลดอุบัติการณ์การติดเชื้อ ลดปัญหาการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาอีกทางหนึ่ง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 การค้นพบ *H. pylori*

เชื้อ *Helicobacter pylori* ได้ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1886 โดย Jaworski W นักวิจัยชาวโปแลนด์ได้พบเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างเกลียวอาศัยอยู่ในชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหารในผู้ป่วยเพศชาย และเรียกจุลชีพนี้ว่า *Vibrio rugula* จากนั้นได้ตั้งสมมติฐานว่าเชื่อนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเกิดพยาธิสภาพของโรคกระเพาะอาหาร นอกจากนี้เขายังได้เขียนหนังสือที่มีชื่อว่า Handbook of Gastric Diseases ซึ่งเป็นการบันทึกเกี่ยวกับการศึกษาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับจุลชีพชนิดนี้แต่ก็ยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลาย (24) จนกระทั่งในปี ค.ศ.1970 Warren JR นักพยาธิวิทยาชาวออสเตรเลียได้บันทึก ลักษณะของแบคทีเรียรูปร่างเกลียวที่พบในชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มีการอักเสบ ของเนื้อเยื่อ (25) ต่อมาในปี ค.ศ. 1975 Steer HW พบแบคทีเรียรูปร่างเกลียวเกาะอยู่บนเยื่อผิว กระเพาะอาหาร จึงได้นำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบเพียงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่เจริญเติบโต (26) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1982 Warren JR และ Marshall BJ สามารถ เพาะเลี้ยงจุลชีพชนิดนี้ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่เป็นแผลเปื่อย ลำไส้ และเรียกเชื้อชนิดนี้ว่า *Campylobacter-Like Organism (CLO)* ในระยะแรกของการค้นพบ เชื้อได้ถูกจัดอยู่ในจีสของ *Campylobacter* และได้ตั้งชื่อว่า *Campylobacter pyloridis* ต่อมาได้ ถูกเปลี่ยนเป็น *Campylobacter pylori* และท้ายที่สุดก็ถูกจัดแยกออกมาเป็นจีสใหม่คือ *Helicobacter* และได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื่อนี้ว่า *Helicobacter pylori (H. pylori)* เนื่องจากมี ลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะแตกต่างไปจากเชื้อในจีส *Campylobacter* (27) จากการศึกษาที่ ผ่านมายังได้อธิบายความเชื่อมโยงของเชื้อ *H. pylori* กับการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในกระเพาะอาหาร (2, 24) จนกระทั่งได้กลายเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกต่างๆที่เป็นปัจจัยในการ ก่อโรค และการศึกษาอื่นๆ ที่ทำให้เกิดองค์ความรู้ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์จนถึงปัจจุบัน

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *H. pylori*

H. pylori เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างเกลียว ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนเจือจาง (microaerophilic) ซึ่งประกอบด้วย ออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์ และไม่

สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) มีความยาว 2-4 ไมโครเมตร ความกว้าง 0.5-1 ไมโครเมตร และความหนา 0.6 ไมโครเมตร โคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งมีสีเหลืองจนถึงเทาขุ่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-2 มิลลิเมตร (1) สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแฟลเจลลาที่มีปลอกหุ้ม (sheathed flagella) จำนวน 4-7 เส้น โดยแต่ละเส้นมีความยาวประมาณ 3 ไมโครเมตร และอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (unipolar) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อในกลุ่ม *Campylobacter* spp. ที่แฟลเจลลาไม่มีปลอกหุ้มและมีเพียงแฟลเจลลาเส้นบางๆ เพียงเส้นเดียวอยู่ที่ปลายทั้ง 2 ด้านของเซลล์ (1) เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์ยูรีเอส และเอนไซม์ออกซิเดสได้ เชื้ออาจมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างออกไปขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ กล่าวคือเมื่อทำการศึกษาจากเนื้อเยื่อที่เก็บได้จากกระเพาะอาหารบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารและต่อมเยื่อเมือกจะพบเชื้อมีรูปร่างเกลียว ขณะที่หากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบว่าเชื้อมีรูปร่างโค้งงอ (comma shapes หรือ U-shapes) ซึ่งเชื้อที่มีลักษณะนี้มีความรุนแรงในการก่อโรค สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อ และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในสัตว์ทดลองได้ (1, 28) นอกจากนี้ยังสามารถพบรูปร่างแท่ง และหากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลาสั้นหรือแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยภายหลังที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ อาจพบเชื้อที่มีรูปร่างกลม ซึ่งจะมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ (28, 29) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าเชื้อที่มีรูปร่างกลมสามารถเพิ่มจำนวน ยึดเกาะกับพื้นผิวเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารของมนุษย์และบุกรุกเข้าไปในไซโทพลาซึมของเซลล์ได้ ซึ่งไม่แตกต่างจากเชื้อที่มีรูปร่างเกลียว เชื้อรูปร่างกลมสามารถแบ่งออกเป็น 5 แบบ ดังนี้ (30, 31) 1.) เชื้อที่ตายแล้ว 2.) เชื้อที่ยังมีชีวิตและสามารถเพาะเลี้ยงได้ 3.) เชื้อที่ยังมีชีวิตแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ 4.) เชื้อซึ่งอยู่ในกระบวนการถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างเซลล์ในแนวราบ (horizontal gene transfer) เพื่อการคงอยู่ของสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ตึงเครียด และ 5.) เชื้อที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ในลักษณะจับกันเป็นก้อน เนื่องจากเชื้อที่มีรูปร่างกลมสามารถถ่ายทอดยีนของเชื้อเข้าไปในไซโทพลาซึมของเซลล์เยื่อบุผิวของโฮสต์ได้เช่นเดียวกับเชื้อที่มีรูปร่างเกลียว ยีนของเชื้อที่มีรูปร่างกลมจึงส่งผลให้เกิดแผลเปื่อยในกระเพาะอาหารมนุษย์รวมถึงโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (2, 31) *H. pylori* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในน้ำทะเลและน้ำจืดนานหลายสัปดาห์ใน 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่เชื้อมีรูปร่างกลมชนิดที่ยังมีชีวิตและสามารถเพาะเลี้ยงได้ และรูปแบบที่เชื้อมีรูปร่างกลมชนิดที่ยังมีชีวิตแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานมากกว่า 1 ปีขึ้นไป (13)

2.3 พยาธิสภาพ

ในคนที่มีสุขภาพดีเมื่อได้รับเชื้อ *H. pylori* เข้าไปจะสามารถเกิดการติดเชื้อเฉียบพลันได้ โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในปริมาณที่มากและย่อยยูเรียในน้ำย่อยได้เป็นแอมโมเนียและไบคาร์บอเนต ทำให้กระเพาะอาหารมีความเป็นด่างมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้แม้ในสภาวะที่เป็นกรดแก่ของกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยออกมามากขึ้นหลังจากที่ได้รับเชื้อไปแล้ว 72 ชั่วโมง ทำให้เกิด epigastric discomfort ในระดับต่างๆ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำย่อยที่หลั่งออกมาและเกิดการอาเจียน ขณะที่อาการอื่นๆจะเกิดขึ้นตามมาภายหลังจากที่เชื้อกระตุ้นให้เกิดภาวะไม่มีกรดเกลือในกระเพาะอาหารหรือ achlorhydria ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่พบว่าการเกิดภาวะ achlorhydria อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ เช่น การที่เชื้อสร้างชีวพิษหรือไซโตไคน์ และการมีปริมาณแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น จากยูเรียที่ถูกย่อยเป็นต้น (1) ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาตั้งแต่เริ่มแรกของการติดเชื้อ หลังจากช่วงการติดเชื้อระยะฉับพลันผู้ป่วยจะพัฒนาไปสู่โรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังโดยยังไม่มีอาการแสดง ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการรุนแรงต่างๆ พัฒนาขึ้นตามมา ในภายหลังมีรายงานว่าโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารโดยจะส่งผลต่อสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์แบบ apoptosis พบว่าปริมาณของเชื้อมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพ กล่าวคือหากปริมาณของเชื้อมีเพียงเล็กน้อยจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่การได้รับเชื้อในปริมาณมากๆ โดยมีอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียต่อเซลล์มากกว่า 100 ขึ้นไปจะส่งผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และยังส่งผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์โดยทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G1 (32) การติดเชื้อ *H. pylori* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารส่วนบน อื่นๆเช่น gastric adenocarcinoma, autoimmune gastritis, มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) เป็นต้น (33, 34)

2.4 การติดต่อ

การติดต่อของเชื้อ *H. pylori* สามารถติดต่อได้โดยตรงจากคนสู่คนโดยเกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ คือ oral-oral, fecal-oral หรือ gastro-oral (35) แต่ส่วนใหญ่มักเกิดจากการติดต่อแบบ fecal-oral เป็นหลัก จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อ *H. pylori* ได้จากสิ่งตัวอย่างที่เป็นน้ำลาย สิ่งตัวอย่างจากกระเพาะอาหารและอุจจาระ ซึ่งผู้ป่วยหนึ่งคนสามารถพบเชื้อได้มากกว่า 1 จีโนมไทป์ แหล่งเก็บกักของเชื้อในร่างกายได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร และช่องปาก (36) และยังพบว่าต่อม

ทอนซิลสามารถเก็บกักเชื้อได้เช่นเดียวกันและหากมีการผ่าตัดต่อมทอนซิลออกไปจะสามารถลดการติดต่อเชื้อได้ (35) นอกจากนี้มนุษย์ยังสามารถติดเชื้อได้จากผลิตภัณฑ์อาหารที่อาจปนเปื้อนอุจจาระของสัตว์ในระหว่างกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (28)

แหล่งน้ำตามธรรมชาติถือเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งซึ่งสามารถก่อให้เกิดการติดต่อแพร่กระจายมาสู่คนได้ มีรายงานว่าประชากรที่ดื่มน้ำจากแม่น้ำหรือบ่อน้ำจะมีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ *H. pylori* มากกว่าการดื่มน้ำประปา ดังนั้นการติดเชื้อจึงมักเกิดในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนามากกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เนื่องจากมีระบบการจัดการแหล่งน้ำดื่มที่ยังไม่ถูกสุขลักษณะ (13) ดังเช่นในประเทศปากีสถาน ซึ่งมีการศึกษาพบว่าอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ที่สูงขึ้นในประเทศมีความสัมพันธ์กับการพบเชื้อในแหล่งน้ำ โดยพบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานในแหล่งน้ำที่มีการบำบัดด้วยคลอรีน เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มที่มีลักษณะลอยอยู่บนผิวน้ำได้ (37) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อจากการดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนนั่นๆ

2.5 ปัจจัยในการก่อโรค

เชื้อ *H. pylori* มีปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการก่อโรคและช่วยให้เชื้ออาศัยอยู่ได้ในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดแก่ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในปริมาณที่มาก ซึ่งจะช่วยย่อยสลายยูเรียในกระเพาะอาหาร เกิดผลผลิตที่เป็นแอมโมเนียและไบคาร์บอเนต ทำให้บริเวณโดยรอบตัวเชื้อมี pH ที่เป็นด่างมากขึ้น ซึ่งจากกลไกดังกล่าวทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดแก่ประมาณ pH 1.5 (2, 38)

เชื้อ *H. pylori* มีแฟลเจลลาที่มีปลอกหุ้ม 4-7 เส้นบริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ทำให้เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วแบบวงสว่าน (screw-like motion) ผ่านชั้นเยื่อเมือกของเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารซึ่งมีความเหนียวและหนาเพื่อเข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนเชื้อในบริเวณใต้เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (submucosa) ที่มีความเป็นกรดน้อยกว่า จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเชื้อจะมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืด ขณะที่ในสภาวะที่มีความเป็นกรด pH ต่ำกว่า 4 จะทำให้เชื้อมีการเคลื่อนที่ที่ผิดปกติ (27) การที่เชื้อมีประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเยื่อเมือกมีความหนืดสูง จะช่วยให้เชื้อมีโอกาสสามารถสัมผัสกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารได้มากขึ้น เชื้อมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ มักเลือกเกาะที่เยื่อเมือกกระเพาะอาหาร โดยมีเพียง 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เกาะอยู่ที่เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (33) และเชื้อจะไม่เกาะที่เยื่อเมือกของลำไส้ (1) แฟลเจลลามีส่วนช่วยเชื้อในการอยู่อาศัยหรือ colonization ในสัตว์ต่างๆ เช่นหนูทดลอง (19, 39) โดยลักษณะของแฟลเจลลาที่ผิดปกติของเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถ

อาศัยอยู่ในกระเพาะของหนูและลูกหมู (gnotobiotic piglets) (19, 40) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่เคลื่อนที่ได้สามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารของลูกหมูได้ในปริมาณที่มากกว่าและเป็นเวลานานกว่าเชื้อที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ (40) เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมทำให้เชื้อมีความหลากหลายของโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะ (adhesins) ตัวอย่างของโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะที่สำคัญและพบมาก ได้แก่ outer membrane proteins (OMPs) อาทิเช่น AlpA, AlpB, BabA, SabA, และ HopZ (41) NAP และ neuraminyl-lactose-binding hemagglutinins (NLBH) (42) เมื่อเชื้อเข้าไปในร่างกายของคนเชื้อจะยึดเกาะกับ receptors ซึ่งอยู่บนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร และมีความจำเพาะกับตัวเชื้อ receptors ที่สำคัญ อาทิเช่น Lewis B, antigenphosphatidylethanolamine และ ganglioside GM3 นอกจากนี้เชื้อยังสามารถสร้าง Lewis X antigen ทำให้เชื้อมีความคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อของโฮสต์ และสามารถหลบหลีกการทำลายจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (1, 33) การติดเชื้อ *H. pylori* จะเกิดความรุนแรงมากขึ้นในกรณีที่สามารถสร้างโปรตีนที่มีชื่อว่า CagA ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์ (cytotoxins) และถูกควบคุมการสร้างโดยยีน cytotoxin-associated gene A (*cagA*) ที่อยู่บน *cagA* pathogenicity island (*cag*-PAI) (43) เมื่อเกิดการติดเชื้อ *H. pylori* ในร่างกายเชื้อจะปล่อยโปรตีน CagA เข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารผ่านทาง type IV secretory system (T4SS) ของเชื้อ (43) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในเซลล์ อาทิเช่น การเรียงตัวของ cytoskeleton ภายในเซลล์ที่ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า hummingbird การเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่สร้างโปรตีน CagA มักพบการถูกทำลายของเยื่อเมือกกระเพาะอาหารและการอักเสบมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่สร้างโปรตีน CagA (44)

Vacuolating cytotoxin A (VacA) เป็นอีกปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *H. pylori* โปรตีนชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการที่นำมาสู่พยาธิสภาพต่างๆ ภายในเซลล์ของโฮสต์ เช่น การเกิดช่องว่างในเซลล์ (vacuolation) การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ การรบกวนการทำงานของเอนโดโซมและ/หรือไลโซโซม การตายของเซลล์ และรบกวนสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน โปรตีน VacA ยังมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคกระเพาะอักเสบที่เพิ่มขึ้น โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการก่อนการอักเสบ (pro-inflammatory responses) ของเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (1, 43, 44) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยในการก่อโรคอื่นๆ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพหลังการติดเชื้อ *H. pylori* ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ช่วยในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *H. pylori* (27)

ปัจจัยในการก่อโรค	ผลกระทบ
แฟลเจลลา	การเคลื่อนไหวผ่านชั้นเยื่อเมือก
ยูรีเอส	การเจือจางความเป็นกรดภายในกระเพาะอาหาร และเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุและสร้างความเสียหายต่อรอยต่อระหว่างเซลล์ (tight junction)
โปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะ	การยึดเกาะของตัวเชื้อกับเซลล์กระเพาะอาหาร
เอนไซม์ย่อยโปรตีน	การทำงานของเอนไซม์ glucosulfatase ในการทำลายเมือกในกระเพาะอาหาร
โปรตีน Cag A	สัมพันธ์กับการเกิดแผลเปื่อยกระเพาะและโรคระเพาะอักเสบรุนแรง
โปรตีน Vac A	เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารถูกทำลาย
Phospholipase A	ฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย
Alcohol dehydrogenase	เยื่อเมือกกระเพาะอาหารเสียหาย

2.6 ระบาดวิทยาของการติดเชื้อและอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งที่มีสาเหตุมาจาก *H. pylori*

จำนวนของผู้ที่มี *H. pylori* อาศัยอยู่ในร่างกายมีมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกทั้งหมด (2) โดยความชุกของเชื้อมีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ จากการศึกษาพบว่าประชากรที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ส่วนมากอยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาซึ่งพบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนประชากรในประเทศนั้นๆ และส่วนใหญ่อยู่ในวัยเด็ก (2) ซึ่งอาจเกิดจากการดื่มนมที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อที่ไม่เหมาะสม (28) และการติดเชื้อจะคงอยู่ไปตลอดชีวิตหากไม่ได้รับการรักษา และยังพบว่าประเทศกำลังพัฒนาจะมีจำนวนของผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการคงที่ ขณะที่ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาประเทศอุตสาหกรรมจะมีจำนวนของผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการที่ลดลง ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการมีสุขลักษณะและสุขภาพที่ดีโดยเฉพาะในวัยเด็ก และการได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (18) สำหรับประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ซึ่งพบมากในกลุ่มประชากรที่มีอายุ 30-49 ปี และพบน้อยในกลุ่มเด็กที่มีอายุ 5-9 ปี (45)

ในปี ค.ศ. 1994 องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งขององค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ได้จัดให้ *H. pylori* เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (4) หมายถึงสารหรือสารผสมที่ก่อให้เกิดมะเร็งแก่มนุษย์

(46) โดยที่มะเร็งในกระเพาะอาหารจัดเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตเป็นอันดับที่ 2 และ 4 ในเพศชาย และหญิงตามลำดับ (3) ในปี ค.ศ. 2008 พบว่าเพศชายมีอัตราป่วยเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารมากกว่าเพศหญิงถึง 2 เท่า และผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารจะมีอัตราการเสียชีวิตมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารสูงในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ยุโรปตะวันออก และอเมริกาใต้ (47) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประเทศไทยจะมีอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับประเทศจีน หรือประเทศญี่ปุ่นซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว แต่อัตราการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารของประเทศไทยอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าทั้งสองประเทศนี้ เนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรมของประชากร รวมไปถึงพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศ (48)

2.7 การรักษา

การรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* มีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิดโรคแผลเปื่อยกระเพาะอาหารและโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (49, 50) ในปี ค.ศ. 2005 European Helicobacter Study Group (EHSG) ได้กำหนดแนวทางและทางเลือกในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ในงานประชุม Maastricht ครั้งที่ 3 ซึ่งกำหนดให้ใช้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสามขนาน (triple therapy) เป็นทางเลือกอันดับแรกในการรักษาการติดเชื้อ โดยยาต่างๆ ประกอบไปด้วยยายับยั้งการหลั่งกรด (proton pump inhibitor; PPI) ยา clarithromycin และยา amoxicillin หรือยา metronidazole (51) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่า การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสามขนานมีประสิทธิภาพในการรักษาต่ำ ดังนั้น คณะกรรมการจากงานประชุม Maastricht และ American College of Gastroenterology จึงได้แนะนำแนวทางในการใช้ยาสำหรับการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เพิ่มเติมเพื่อเป็นทางเลือกอันดับแรกอีกทางเลือกหนึ่ง (52) เรียกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสี่ขนาน (quadruple therapy) ประกอบด้วยยายับยั้งการหลั่งกรด ยาบิสมัท ยา tetracycline และยา metronidazole (53) สำหรับข้อแนะนำของ Asia-Pacific Consensus ครั้งที่ 2 ในปี ค.ศ. 2009 ได้กำหนดให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสามขนานเป็นทางเลือกอันดับแรกในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* และใช้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสี่ขนานเป็นทางเลือกอันดับสองเมื่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสามขนานไม่ประสบความสำเร็จ (54) ปัจจุบันพบปัญหาเชื้อ *H. pylori* ตื้อยา clarithromycin และยา metronidazole เพิ่มสูงขึ้น (54-56) โดยพบอัตราการดื้อต่อยา clarithromycin ในหลายประเทศทั่วโลกและมีความถี่ของการดื้อต่อยาที่แตกต่างกัน ได้แก่ ทวีปอเมริกาเหนือ 12 เปอร์เซ็นต์ เอเชียตะวันออก 13 เปอร์เซ็นต์ และยุโรปมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (57) สำหรับการดื้อต่อยา metronidazole ในประเทศกำลังพัฒนาสามารถพบได้ทั้งในเพศชายและเพศ

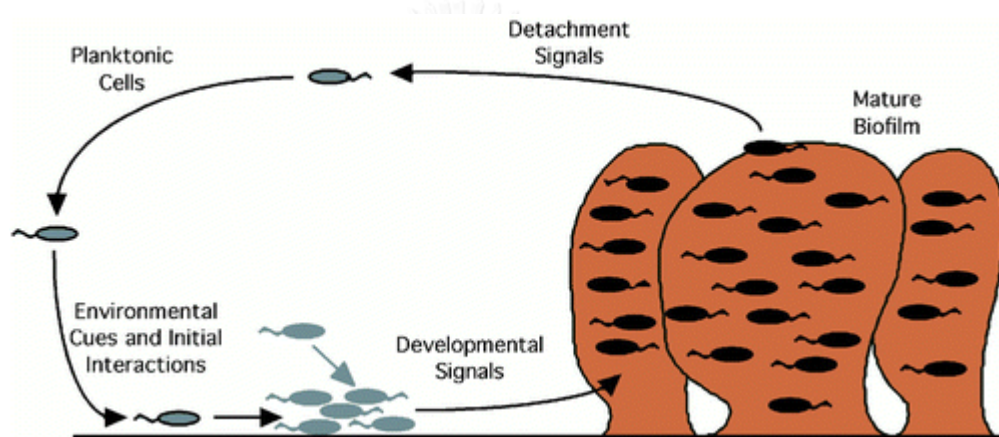
หญิงซึ่งมีอัตราการดื้อต่อยาดังกล่าวไม่แตกต่างกันคือ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (57) และพบค่อนข้างสูงในประเทศที่เจริญแล้ว ได้แก่ ประเทศแคนาดา (58) และสหรัฐอเมริกา (59) ซึ่งมีอัตราการดื้อต่อยาประมาณ 40 และ 20 ถึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีการศึกษาในการเพิ่มยาปฏิชีวนะอีกหนึ่งชนิดคือยา nitroimidazole เพื่อใช้ในการรักษาร่วมกับยาปฏิชีวนะแบบสามขนานที่มีอยู่เดิม เรียกว่า “non-bismuth quadruple therapy” พบว่าการรักษาโดยเพิ่มยาดังกล่าวทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้น ถึงแม้ว่าปัญหาการดื้อต่อยา clarithromycin ที่สูงขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาในกลุ่ม non-bismuth quadruple therapy แต่จากการศึกษาของ Gisbert JP และคณะในปี ค.ศ. 2011 พบว่าประสิทธิภาพในการรักษาที่ลดลงเกิดขึ้นน้อยกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพที่ลดลงจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสามขนาน (60) นอกจากนี้ยา levofloxacin ยังสามารถนำมาใช้แทนยา clarithromycin เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาคาการดื้อต่อยา clarithromycin (61)

2.8 ไบโอฟิล์ม

ในปี ค.ศ. 1684 Leewenhoek AV ได้สังเกตเห็นกลุ่มเชื้อจุลชีพบนคราบฟันของตนเองโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่ประดิษฐ์ขึ้น และตั้งชื่อสิ่งที่พบว่า animicule ในปี ค.ศ. 1933 Henrici AT พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำส่วนใหญ่ไม่ได้ลอยอยู่อย่างอิสระ แต่มักเจริญโดยเกาะกับพื้นผิวต่างๆ (62) ในปี ค.ศ. 1943 Costerton และคณะ (63) ได้เสนอทฤษฎีเกี่ยวกับการสร้างไบโอฟิล์ม โดยอธิบายว่าเชื้อส่วนใหญ่มักเจริญเติบโตในไบโอฟิล์มและจะยึดเกาะกับพื้นผิวซึ่งเป็นแหล่งน้ำและมีอาหารสมบูรณ์ ในกรณีที่เป็นเชื้อชนิดเดียวกันพบว่าการยึดเกาะนี้จะมีคุณสมบัติแตกต่างกับการที่เชื้อลอยอยู่อย่างอิสระ (planktonic) ซึ่งข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาแหล่งน้ำตามธรรมชาติด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียจะมีการเจริญในรูปแบบของไบโอฟิล์มบนพื้นผิวที่แตกต่างกันและยังสามารถพบไบโอฟิล์มได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ยกเว้นน้ำใต้ดินและก้นมหาสมุทร (64)

มีผู้ให้คำจำกัดความของไบโอฟิล์มไว้อย่างกว้างขวางโดยในปี ค.ศ. 1976 Marshall KC ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า “ไบโอฟิล์มเป็นโพลิเมอร์ของเส้นใยเส้นเล็กๆ ที่สร้างออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ของจุลชีพ” (65) นอกจากนั้นยังมีคำจำกัดความอื่นๆ อาทิเช่น “ไบโอฟิล์มเป็นความสัมพันธ์ของเชื้อกับส่วนประกอบของเซลล์ที่ใช้ในการยึดเกาะกับพื้นผิวทั้งที่เป็นสารธรรมชาติและไม่ใช่สารธรรมชาติ” (64) กลไกการสร้างไบโอฟิล์มประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ 1.) การเริ่มต้นการสร้างไบโอฟิล์ม 2.) การเจริญของไบโอฟิล์ม 3.) การรักษาสภาพของไบโอฟิล์ม และ 4.) การแยกตัวออกจากไบโอฟิล์ม การสร้างไบโอฟิล์มเริ่มจากกระบวนการที่เชื้อใช้ glycocalyx ซึ่งเป็น exopolysacchhalide (EPS)

เกาะติดกับพื้นผิวประเภทพอลิเมอร์ โดยอาจเป็นการยึดเกาะแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) หรือแบบผันกลับได้ (reversible) ต่อมาเซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนีขนาดเล็กภายในไบโอฟิล์ม และมีเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระอื่นๆ เข้ามายึดเกาะ ทำให้เกิดการเจริญของไบโอฟิล์มในลักษณะสามมิติ เชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์สามารถแยกตัวออกมาจากโคโลนีในไบโอฟิล์มกลายเป็นเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระ และเมื่อเชื้อไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น มีสารอาหารเพียงพอ หรือมีพื้นผิวให้ยึดเกาะ เชื้อจะสามารถเปลี่ยนสถานะไปยึดเกาะกับพื้นผิวแล้วเริ่มสร้างไบโอฟิล์มขึ้นใหม่ (รูปที่ 1) (66) โดยเชื้อจะใช้ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ อาทิเช่น extracellular matrix หรือ exopolysaccharide, glycocalyx polymers ในการยึดเกาะพื้นผิว (63, 66-69)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม (66) เซลล์เชื้อแบคทีเรียลอยอยู่อย่างอิสระสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ และยึดเกาะกันกับเซลล์แบคทีเรียอื่นๆ เพื่อสร้างเป็นโคโลนีขนาดเล็กภายในไบโอฟิล์ม การเจริญของโครงสร้างไบโอฟิล์มสามมิติสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียภายในโคโลนีเองและจากเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระจากภายนอกเข้ามายึดเกาะในไบโอฟิล์ม เซลล์แบคทีเรียในไบโอฟิล์มสามารถแยกออกมาจากโคโลนีในไบโอฟิล์มกลายเป็นเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระ และเมื่อเชื้อไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อจะสามารถเปลี่ยนสถานะไปยึดเกาะกับพื้นผิวแล้วเริ่มสร้างไบโอฟิล์มขึ้นใหม่

โครงสร้างของไบโอฟิล์มประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก ได้แก่ ตัวเชื้อจุลินทรีย์ และ exopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบของน้ำตาล ทำให้โครงสร้างไบโอฟิล์มมีลักษณะเหนียวยืดหยุ่นและมีลักษณะคล้ายยาง (64) โดยพบว่าอาจเป็นเยื่อบางชั้นเดียวหรือหลายชั้นที่ประกอบด้วยรู

ซึ่งเป็นทางผ่านของน้ำ ไบโอฟิล์มอาจมีประจุเป็นกลางหรือประจุลบสูง ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของ exopolysaccharide คือความเป็นประจุลบที่เกิดจากการที่มีกรดยูโรนิค (d-glucuronic, d-galacturonic และ mannuronic acid) เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ exopolysaccharide ยังช่วยในการดึงน้ำจำนวนมากเข้าสู่ไบโอฟิล์มด้วยพันธะไฮโดรเจนผ่านทางรู ซึ่งเป็นทางผ่านของสารอาหาร ออกซิเจน และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง (65) เชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มอาจเกิดจากการรวมกลุ่มของเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน หรือเชื้อหลายสายพันธุ์ ซึ่งการรวมกลุ่มแบบนี้มักพบในธรรมชาติทั่วไป ส่วนการรวมกลุ่มของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันมักก่อให้เกิดการติดเชื้อ หรือเกาะบนอุปกรณ์ทางการแพทย์ จึงทำให้เชื้อกลุ่มนี้เป็นที่สนใจในการศึกษาค้นคว้าในปัจจุบัน (66) การยึดเกาะของเชื้อสามารถยึดเกาะได้ทั้งพื้นผิวที่เป็นสารธรรมชาติและไม่ใช่อุปกรณ์ธรรมชาติ (66) โดยสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวเรียบได้ง่ายกว่าพื้นผิวหยาบ และมีโครงสร้างของไบโอฟิล์มที่แข็งแรงยากต่อการทำลาย ในขณะที่ไบโอฟิล์มที่เกาะบนผิวหยาบจะมีความแข็งแรงน้อยกว่าและง่ายต่อการถูกทำลายได้มากกว่า (64) เนื่องจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ รวมถึงถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญของไบโอฟิล์ม โดยอาจพบได้ 2 ลักษณะคือ 1.) การทนต่อยาปฏิชีวนะคือยาปฏิชีวนะไม่สามารถทำลายเชื้อได้ถึงแม้ว่าเชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะและ 2.) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือเชื้อสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ (70) ตัวอย่างเช่นเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ แต่จะไวต่อยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดไรโบนิวคลีอิกและโปรตีน ในขณะที่เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระมีความไวต่อยาทั้งสองกลุ่ม (36) จึงอาจกล่าวได้ว่ายาปฏิชีวนะทั่วไปที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อโดยการทำลายเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระ แต่อาจไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้ ดังนั้นเมื่อหยุดการรักษาไบโอฟิล์มจึงเป็นเหตุการณ์สำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำหรือเกิดการติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งการติดเชื้อยังคงอยู่ต่อไปจนกว่าจะนำไบโอฟิล์มของเชื้อออกจากร่างกาย (71)

การที่เชื้อในไบโอฟิล์มไม่สามารถถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะ อาจมีสาเหตุดังต่อไปนี้ 1.) สสารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของไบโอฟิล์มอาจส่งผลให้ยาปฏิชีวนะแพร่เข้าสู่ไบโอฟิล์มช้าลง (72) เช่น alginate ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* และมีลักษณะเป็นประจุลบสามารถจับกับประจุบวกของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ส่งผลให้การแพร่ของยาดังกล่าวช้าลง (73) การที่ยาค่อยๆ แพร่ผ่านชั้นของ exopolysaccharide ในไบโอฟิล์มส่งผลให้เชื้อสัมผัสกับยาเป็นเวลานาน หรือเจือจางความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะจนมีความเข้มข้นที่เซลล์เชื้อที่อยู่ด้านบนของไบโอฟิล์มสามารถทนและอยู่รอดก่อนที่ยาจะแพร่ไปถึงเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ชั้นล่างสุดของไบโอฟิล์ม อาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้

(74, 75) 2.) เอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นภายในไบโอฟิล์มสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เจริญในไบโอฟิล์มมีการแสดงออกของยีน *ampC* เพิ่มขึ้นและหลังเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ทำให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่างๆ ในกลุ่ม β -lactam ภายในไบโอฟิล์มลดลงและยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาดังกล่าว (76) และทำให้เชื้อสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้ (70) 3.) อัตราการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นของออกซิเจนที่ลดลงเมื่อเชื้ออาศัยอยู่บริเวณชั้นล่างสุดของไบโอฟิล์ม โดยพบว่าการเจริญของเชื้อ การสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อสามารถเกิดได้มากที่สุดบริเวณชั้นนอกสุดของไบโอฟิล์มและจะค่อยๆลดลงเมื่อเชื้ออยู่ในบริเวณชั้นในของไบโอฟิล์ม รวมไปถึงความเข้มข้นของออกซิเจนซึ่งจะมีความเข้มข้นสูงมากบริเวณชั้นนอกสุดของไบโอฟิล์ม และจะค่อยๆลดลงและเข้าสู่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนบริเวณชั้นในสุดของไบโอฟิล์มซึ่งทำให้เชื้อไม่มีการเจริญเติบโตและหยุดกระบวนการเมแทบอลิซึมในที่สุด ส่งผลให้เชื้ออยู่ในสภาวะจำศีลและไม่ถูกทำลายจากยาปฏิชีวนะเนื่องจากเป้าหมายของยาปฏิชีวนะคือการออกฤทธิ์ต่อกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆที่เชื้อใช้ในการเจริญ (70) 4.) การกลายพันธุ์ในระดับพันธุกรรมของเชื้อที่เจริญในไบโอฟิล์มซึ่งสามารถถ่ายทอดสู่เซลล์แบคทีเรียรุ่นต่อไปโดยกระบวนการถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างเซลล์ในแนวราบภายในไบโอฟิล์ม (77) สามารถพบได้ในเชื้อต่างๆ เช่น *P. aeruginosa* (78), *Streptococcus pneumonia* (79) และ *S. aureus* (80) ซึ่งภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่เกิดขึ้นภายในไบโอฟิล์มเป็นสาเหตุหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีนของเชื้อและส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นในไบโอฟิล์มจะไปทำลายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย แม้ว่าโดยทั่วไปเชื้อจะมีกลไกซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวไว้ให้สามารถกลับมาทำงานได้ตามปกติ อย่างไรก็ตามหากมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดปกติจะส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อในระดับพันธุกรรม (78) มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เจริญในไบโอฟิล์มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากเกิดความผิดปกติของกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอซึ่งเกิดขึ้นในภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (78) นอกจากนี้เชื้อที่เจริญในสภาวะไบโอฟิล์มยังมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์คาตาเลสลดลง (81) ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกับสารต้านอนุมูลอิสระและทำให้เกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลตามมา

2.9 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* มีความคล้ายคลึงกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยเริ่มจากการยึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อ *H. pylori* แต่ละตัวและรวมตัวกันจนเกิดเป็นโคโลนีขนาดเล็ก จากนั้นโคโลนีเหล่านี้จะรวมกันและเจริญเป็นไบโอฟิล์มในลักษณะสามมิติ เชื้อ

H. pylori สามารถยึดเกาะและสร้างไบโอฟิล์มได้บนพื้นผิวที่เป็นแก้ว เหล็กกล้าไร้สนิม เหล็กหล่อและดิน โดยจะสร้างไบโอฟิล์มบริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลวของพื้นผิวนั้น ภายใต้สภาวะที่หยุดนิ่งหรือถูกเขย่าตลอดเวลา อย่างไรก็ตามเชื้อ *H. pylori* ไม่สร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวประเภทพลาสติก (14) มีการศึกษาโครงสร้างของไบโอฟิล์มพบว่าประกอบด้วยชั้นหนาหลายชั้นซ้อนกันและมีรูจำนวนมากซึ่งเป็นทางผ่านเข้าออกของสารอาหารและน้ำ เยื่อเมือกที่มีมากในกระเพาะอาหารจะช่วยให้เชื้อ *H. pylori* ที่ลอยอยู่อย่างอิสระเพิ่มจำนวนมากขึ้นแต่ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เชื้อมักดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มเป็นหลัก แต่เชื้อที่อยู่ในชั้นเยื่อเมือกในกระเพาะอาหารของมนุษย์มักอยู่ในรูปแบบของเชื้อที่ลอยอยู่อิสระมากกว่าการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร เนื่องจากเมือกในกระเพาะอาหารมีหน้าที่ป้องกันการยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารและยังสามารถทำให้เชื้อที่เกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารอยู่เดิมหลุดออกจากเซลล์ได้ (12, 14) จากการศึกษาพบว่าลักษณะของเซลล์เชื้อ *H. pylori* ขณะที่ดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มสามารถพบได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ 1.) เซลล์เชื้อที่มีรูปร่างเกลียว 2.) เซลล์เชื้อที่มีรูปร่างเกลียวร่วมกับรูปร่างกลม และ 3.) เซลล์เชื้อที่มีรูปร่างกลม (82) โดยเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในรูปแบบต่างๆ ดังนี้ “pellicle” คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่ม ลอยบนผิวน้ำบริเวณระหว่างของเหลวและอากาศและไม่สามารถยึดเกาะบนผิวแก้ว (83) “attached biofilm” คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่เกาะบนผิวแก้วบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ (10) นอกจากนี้ pellicle และ attached biofilm เชื้อ *H. pylori* ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มในรูปแบบที่เรียกว่า “floc” คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นก้อนเล็กๆ ไม่สามารถยึดเกาะบนผิวแก้วและกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะถูกเขย่าตลอดเวลา (75) จากการวิเคราะห์ไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* พบว่าส่วนประกอบหลักของไบโอฟิล์มประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแล็กโทส นมูตาล fucose โมเลกุล glycerol-manno-heptose โมเลกุล N-acetylglucosamine และโมเลกุล N-acetylmuramic acid นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนและไขมัน ได้แก่ tetradecanoic acid (คาร์บอน 14 อะตอม) และ hexadecanoic acid (คาร์บอน 16 อะตอม) (17) ในปี ค.ศ. 1999 Stark และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 พบว่ามีการสร้าง exopolysaccharide ขณะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง (17) ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Yang และคณะทำการศึกษา exopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ดังกล่าวพบว่ามีโมเลกุลของ proteomannans เป็นส่วนประกอบ (82) งานวิจัยของ Drouet และคณะในปี ค.ศ. 1993 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้าง exopolysaccharide ได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง และสิ่งที่น่าสนใจคือ exopolysaccharide ไม่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร (84)

ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อ *H. pylori* ที่สร้างไบโอฟิล์ม exopolysaccharide อาจเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยป้องกันเชื้อจากการถูกทำลายด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหารได้ ทำให้เชื้อสามารถดำรงอยู่ในโฮสต์ได้เป็นระยะเวลาอันยาวนาน และสามารถเอาชนะสถานะแวดล้อมที่ตรึงเครียด รวมถึงป้องกันตัวเองจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์และยาปฏิชีวนะได้ (17) แม้ว่าจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด แต่กลับมียาเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์มในสัตว์ทดลองได้ เป็นผลให้เชื้อติดต่อยาปฏิชีวนะ และการรักษาไม่ประสบความสำเร็จ (18) เนื่องจากยาสามารถแพร่เข้าไปในชั้นของ exopolysaccharide ได้ช้าลง ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อมีการกระตุ้นให้ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของประจุบน exopolysaccharide หรือยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ที่ทำลายยาซึ่งอยู่ในชั้นของ exopolysaccharide แสดงออกมากขึ้น ทำให้เกิดการจับหรือยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่าการที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในชั้นในสุดของไบโอฟิล์ม อาจทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ (12, 85) การสร้างไบโอฟิล์มยังทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดฟาโกไซด์ และเซลล์เหล่านี้ยังมีความสามารถในการบุกรุกเข้าไปในไบโอฟิล์มของเชื้อได้ต่ำ ทำให้ไม่สามารถทำลายเชื้อที่กำลังเจริญภายในไบโอฟิล์มได้ (12) นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์สามารถอยู่ร่วมกันในไบโอฟิล์มได้มากกว่า 1 สายพันธุ์ โดยการใช้ quorum sensing ในการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ มีผลให้เชื้อบางสายพันธุ์ เช่น *H. pylori* ได้รับประโยชน์ในการไม่ถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ จากการกระตุ้นของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งอยู่ร่วมกันในไบโอฟิล์ม (86)

2.10 กลไกการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มในระดับยีนของ *H. pylori*

ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในระดับโมเลกุลมีอยู่อย่างจำกัด อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้พยายามศึกษาถึงกลไกเหล่านี้ จากการศึกษาพบว่ายีน *luxS* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน autoinducer 2 (AI-2) ซึ่งเป็นโมเลกุลของระบบการส่งสัญญาณแบบ quorum signaling (87) เพื่อใช้ในการส่งสัญญาณของเชื้อจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม เมื่อยีน *luxS* ถูกทำให้กลายพันธุ์พบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับที่สูงขึ้น (14) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่พบว่าเมื่อยีน *luxS* เกิดการกลายพันธุ์ เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มที่มีความหนาแน่นมากขึ้นและสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวแก้วได้ดีกว่าสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นการทำงานของยีนดังกล่าวของเชื้อทั้งสองชนิดน่าจะมีความคล้ายคลึงกัน โดยอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างส่วนประกอบบางอย่างที่จำเป็นสำหรับการยึดเกาะหรือการสร้างไบโอฟิล์ม (14, 88) ขณะที่ยีน *cagE* เป็น 1 ใน 6 ยีนซึ่งอยู่ภายใน cytotoxin-associated gene pathogenicity island (89) ของเชื้อ *H. pylori* มีหน้าที่กระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารให้หลั่ง

อินเตอร์ลิวคิน-8 และควบคุม type IV secretory system ซึ่งทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ และยังช่วยบรรจุสารประกอบโปรตีนต่างๆ ของเชื้อจุลชีพเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ พบว่าเมื่อยินดังกล่าว เกิดการกลายพันธุ์เชื้อยังคงมีความสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวแก้วได้ดีและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับที่สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ ทั้งนี้ยีน *luxS* และ *cagE* อาจทำงานร่วมกัน อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายเหตุผลของกรณีดังกล่าวและต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (14) การศึกษาพบว่า neutrophil-activating protein A (NapA) เป็นโปรตีนพื้นผิวซึ่งมีหน้าที่ในการดึงดูดเม็ดเลือดขาว ชนิดนิวโทรฟิล มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยพบว่าเมื่อเกิดกลายพันธุ์ของยีน *napA* เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* จะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะระหว่างกัน เป็นผลให้โครงสร้างของไบโอฟิล์มจับกันแบบหลวมเมื่อเทียบกับไบโอฟิล์มของเชื้อที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว (82) ขณะที่ยีนอื่นๆ ซึ่งมีการรายงานว่ามีผลต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพ บางสายพันธุ์ อาทิเช่น ยีน *ppk* ควบคุมการสร้างโปรตีน polyphosphokinase และยีน *clp* ควบคุมการสร้างโปรตีน protease ของเชื้อ *Vibrio cholera* (90) และ *Pseudomonas fluorescens* (91) ตามลำดับ ไม่มีผลต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* (14) ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนว่ายีนในกลุ่มใดมีหน้าที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยตรง และยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

2.11 บทบาทของแฟลเจลลาต่อกลไกที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

แฟลเจลลานอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังมีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่แบบ swarming การยึดเกาะพื้นผิว และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่าแฟลเจลลามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Vibrio* spp., *Escherichia coli* และ *Aeromonas* spp. (7-9) ในระยะเริ่มต้นของการสร้างไบโอฟิล์มเชื้อจะใช้แฟลเจลลาในการสัมผัสกับพื้นผิวทำให้เกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตย์และการยึดเกาะของเชื้อต่อพื้นผิวนั้น จึงเป็นที่เชื่อกันว่าแฟลเจลลาเป็นองค์ประกอบของเซลล์เชื้อที่เป็นจุดเริ่มต้นในการดึงดูดกับพื้นผิวและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพ (7) จากการศึกษาต่างๆ ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์พบว่ามีความสัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อนั้นๆ อาทิเช่น การกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โพลาร์แฟลเจลลา (polar flagella) และยีน *lafA* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แฟลเจลลาที่อยู่ด้านข้างลำตัวของเซลล์เชื้อ ส่งผลต่อความสามารถในการยึดเกาะและการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวแก้วและพลาสติกของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่ลดลง (9) ขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *fliC* ยีน *fliH* และยีน *motAB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน flagellin การสังเคราะห์แฟลเจลลา และการหมุนของ flagellar rotor ตามลำดับ มีผลต่อ

ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ที่ลดลง (8) สำหรับเชื้อ *Bacillus subtilis* มีการศึกษาพบว่า แพลเจลลามีส่วนสำคัญในขั้นตอนของการเริ่มสร้างไบโอฟิล์มเช่นกัน โดยในระหว่างขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อจะหยุดการเคลื่อนที่ และโปรตีน EpsE จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง exopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของไบโอฟิล์มและในขณะเดียวกันจะกระตุ้นให้เกิดการยึดของ flagellar rotor เพื่อยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ (92) นอกจากนี้ยีน *flaA* ยังมีความสำคัญกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอย่างเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งใช้แพลเจลลาในการเคลื่อนที่ โดยจากการศึกษาของ Houry และคณะในปี ค.ศ. 2010 พบว่าเมื่อเชื้อ *B. cereus* เกิดการกลายพันธุ์ของ *fla* locus (ยีน *flaA* และยีน *flaB*) ส่งผลให้เชื้อไม่มีแพลเจลลาและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และยังทำให้การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อใน microtitre plate และในหลอดแก้วผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญ (93) ในขณะที่เชื้อ *Campylobacter jejuni* มีการศึกษาพบว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *maf5* ที่ควบคุมการสร้างแพลเจลลา เชื้อจะไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มแบบ pellicle ได้ (23)

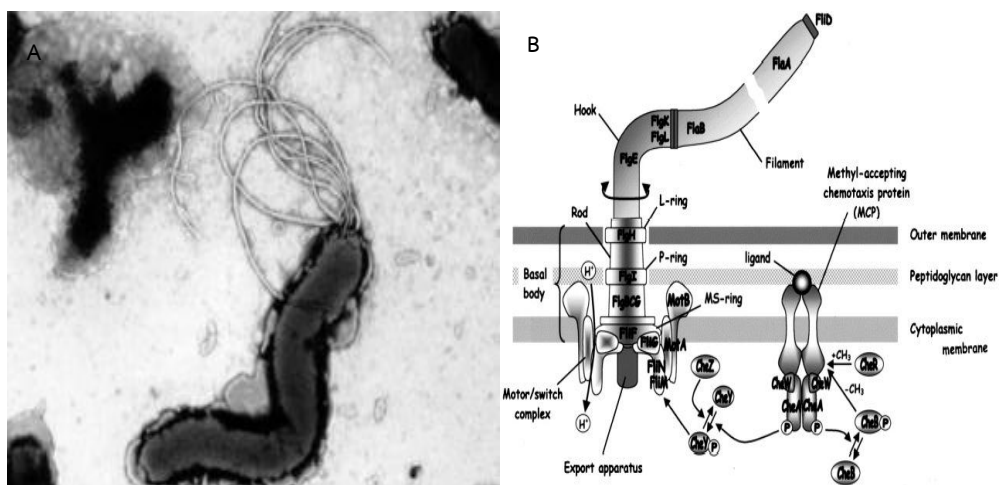
2.12 โปรตีนที่แสดงออกในสภาวะของเชื้อ *H. pylori*

เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ จากการวิเคราะห์แยกโปรตีนของเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับเชื้อในสภาวะที่ลอยอยู่อย่างอิสระด้วยการทดสอบ 2-dimensional gel electrophoresis พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน (22) โดยกลุ่มของโปรตีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มคือโปรตีนในกลุ่มของแพลเจลลา (flagellar protein complex) ได้แก่ flagellar hook-associated protein 3 (โปรตีน HAP3 หรือ โปรตีน FlgL), flagellar hook protein (โปรตีน FlgE), flagellinA (โปรตีน FlaA), flagellar hook assembly protein (โปรตีน FlgD), รวมถึง flagellar capping protein (โปรตีน FliD) (22) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของแพลเจลลาต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (7-9, 23, 92) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มของโปรตีนอื่นๆ ดังนี้ 1.) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล ได้แก่เอนไซม์คาตาเลส (KatA) เอนไซม์ thioredoxin reductase (TrxB) และเอนไซม์ alkyl hydroperoxide reductase (TsaA) 2.) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งอิเล็กตรอน ได้แก่ pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit (PorB), bifunctional methionine sulfoxide reductase A/B (HPSH_01160) และ flavodoxin (FldA) 3.) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ elongation factor Tu (EF-Tu), elongation factor P (EF-P), trigger factor (Tig), heat

shock protein ขนาด 60 กิโลดัลตัน (Hps60), co-chaperone และ heat shock protein (GrpE) 4.) เอนไซม์ acetyl coenzyme A acetyltransferase (FadA) 5.) เอนไซม์ urease ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของไนโตรเจน ได้แก่ urease subunit alpha (UreA), urease subunit beta (UreB) และ bifunctional urease subunit gamma/beta 6.) โพรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ bifunctional aconitate hydratase 2 หรือ 2-methylisocitrate dehydratase (AcnB) และ citrate synthase (GltA) 7.) โพรตีนซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด ได้แก่ HPB128_25g37, HP1037 และ HP0175 ขณะที่เมื่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอาจพบการแสดงออกของโปรตีนต่างชนิดเมื่อเชื่อนั้นดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม อาทิเช่น เชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบโปรตีน response regulator transcription regulator เชื้อ *Burkholderia mallei* พบโปรตีน hypothetical protein เชื้อ *Burkholderia ambifaria* พบโปรตีน gluconate 2-dehydrogenase (acceptor) และเชื้อ *Caulobacter crescentus* พบโปรตีน UDP-galactopyranose mutase เป็นต้น (22) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวทั้งหมดสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกระดับโมเลกุลที่ควบคุมโปรตีนซึ่งอาจสัมพันธ์กับการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

2.13 แพลเจลลาของเชื้อ *H. pylori*

การเคลื่อนที่มีความสำคัญในการอยู่อาศัยของเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหารและเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญต่อการก่อให้เกิดพยาธิสภาพในมนุษย์ เชื้อ *H. pylori* มีแฟลเจลลาประมาณ 4-7 เส้น อยู่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (รูปที่ 2) (20, 94)



รูปที่ 2 A: ลักษณะแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* (94) และ B: โปรตีนต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแฟลเจลลา (20) แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งประกอบไปด้วยเส้นแฟลเจลลาประมาณ 4-7 เส้นอยู่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ภายในเส้นแฟลเจลลาประกอบด้วย filament, hook และ basal body ซึ่งมี motor-switch complex เป็นส่วนประกอบ โปรตีนต่างๆ ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสร้าง rod, hook และ filament จะถูกหลั่งออกมาจาก export apparatus ซึ่งอยู่บริเวณไซโทพลาซึมรอบของวงแหวน MS การไหลของโปรตอนก่อให้เกิดพลังงานเพื่อให้เกิดการหมุนของมอเตอร์ โดยทิศทางการหมุนถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันของโปรตีน FliM ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ motor-switch complex และ chemotaxis regulator CheY; H⁺ หมายถึงโปรตอน P หมายถึง phosphate และ CH₃ หมายถึงหมู่เมทิล (20)

แฟลเจลลาแต่ละเส้นมีความยาวประมาณ 3 ไมโครเมตรและอยู่รวมกันโดยมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยื่นออกมาจากตัวเชื้อมาปกคลุมเสมือนเป็นปลอกหุ้มบริเวณบางส่วนของแฟลเจลลา ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันแฟลเจลลาจากการถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร (95) แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ประกอบไปด้วย 3 ส่วนหลัก คือ 1.) basal body เป็นส่วนที่อยู่ภายในผนังเซลล์และบรรจุโปรตีนต่างๆ ไว้ภายใน ซึ่งจำเป็นสำหรับการหมุนของแฟลเจลลาและปฏิกิริยาชักนำทางเคมี 2.) flagellar hook เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นข้อต่อเชื่อมระหว่าง basal body และ flagellar filament 3.) flagellar filament คือส่วนที่ทำหน้าที่เสมือนใบพัด (96)

แฟลเจลลาเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความซับซ้อนซึ่งถูกสร้างโดยโปรตีนต่างๆ จำนวน 30 ชนิด มอเตอร์ของแฟลเจลลาทำให้เกิดการหมุนทั้งในทิศทางทวนเข็มนาฬิกาและตามเข็มนาฬิกา (97) เชื้อแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ไปยังที่ต่างๆ โดยอาศัยโปรตีน methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP) ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และมี cytoplasmic domain ขนาดใหญ่เป็นส่วนที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน histidine kinase (CheA) และโปรตีน adaptor protein (CheW) โปรตีน MCP ควบคุมกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตหรือ autophosphorylation ให้กับโปรตีน CheA และเมื่อโปรตีน CheA ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะส่งหมู่ฟอสเฟตต่อเพื่อเติมให้กับโปรตีน CheY จากนั้นโปรตีน CheY ที่มีหมู่ฟอสเฟตจะไปจับกับมอเตอร์ตรงบริเวณไซโตรพลาสซึม ทำให้มอเตอร์หมุนในทิศทางตามเข็มนาฬิกา (96) มอเตอร์ประกอบด้วยใบพัดและสเตเตอร์ ใบพัดประกอบด้วยโปรตีน FlIF โปรตีน FlIG โปรตีน FlIM และโปรตีน FlIN โปรตีน FlIF มีหน้าที่สร้างวงแหวน MS อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (98, 99) ขณะที่โปรตีน FlIG โปรตีน FlIM และโปรตีน FlIN มีหน้าที่สร้างวงแหวน C บนไซโตรพลาสซึมของวงแหวน MS (100, 101) นอกจากนี้โปรตีน FlIG โปรตีน FlIM และโปรตีน FlIN ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนทิศทางในการหมุนของใบพัด ทำให้มอเตอร์สามารถหมุนในทิศทางทวนเข็มนาฬิกาและตามเข็มนาฬิกา (102) สเตเตอร์ประกอบด้วยโปรตีนที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชนิดได้แก่โปรตีน MotA และโปรตีน MotB (103-105) โปรตีนทั้งสองสร้าง proton channel complex เพื่อให้โปรตอนไหลผ่านและเป็นบริเวณที่มีการสร้าง force-generating element หรือ torque (106, 107) ซึ่งถูกสร้างโดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน MotA และโปรตีน FlIG (108) ทำหน้าที่เสมือนเป็นแรงที่ทำให้ filament หมุน (109)

export apparatus ของเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วยโปรตีนต่างๆ ซึ่งถูกสร้างโดยยีน *flhH* ยีน *flil* ยีน *fliQ* ยีน *flilL* ยีน *fliP* ยีน *fliR* ยีน *flhA* (*flbA*) และยีน *flhB* เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *flil* และยีน *flhA* ทำให้เชื้อ *H. pylori* ไม่สามารถสร้างแฟลเจลลาซึ่งส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (110) และยังมีผลต่อการขนส่งโปรตีนแฟลเจลลา (111) นอกจากนี้ยีน *fliQ* และยีน *flhB* มีความจำเป็นในกระบวนการสร้างแฟลเจลลาและการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองส่งผลให้เชื้อไม่มีแฟลเจลลา ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่สามารถอาศัยในกระเพาะอาหารของหนูได้ และอาจมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งโปรตีนแฟลเจลลาเพื่อใช้ในการสร้างแฟลเจลลา นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *fliQ* ส่งผลให้ความสามารถของเชื้อในการเกาะบนเซลล์เยื่อผิวกระเพาะอาหาร AGS ลดลง แต่การกลายพันธุ์ของยีน *flhB* ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการดังกล่าว (111)

flagellar filament เชื่อมต่อกับ basal body โดย hook ที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีรูปร่างโค้ง ซึ่งมีโปรตีน FlgE เป็นส่วนประกอบ ก่อให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า basal body-hook

complex ความยาวของ hook ที่ถูกสร้างขึ้นจะขึ้นอยู่กับการทำงานของโปรตีน Flk ซึ่งมีการศึกษาพบว่ายังมีหน้าที่ปิดการทำงานของ σ^{54} ในระหว่างที่มีการแสดงออกของยีนแฟลเจลลาต่างๆอีกด้วย (112) โปรตีน FlgD มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง hook เช่นเดียวกับโปรตีน FlgE โดยเมื่อเสร็จสิ้นการสร้าง rod โปรตีน FlgD จะถูกเติมที่ส่วนปลายของ rod จนเจริญเป็น hook ที่มีความยาวและเจริญเต็มที่ จากนั้นโปรตีนดังกล่าวจะถูกส่งไปที่ส่วนปลายของ hook เพื่อรอให้โปรตีน FlgK และ FlgL ตามลำดับถูกเติมที่บริเวณส่วนปลายของ hook เพื่อสร้าง hook-filament junction หรือข้อต่อระหว่าง hook และ filament (87) โปรตีน FlgE ถูกควบคุมโดยโปรตีน FlgR และถือว่าโปรตีน FlgR ควบคุมการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้าง hook ยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hook และยีนอื่นๆที่อาศัยการทำงานของ σ^{54} (20)

โปรตีน hook-associated proteins (HAPs) เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างเส้น flagellar filament กับ flagellar hook และยังเป็นส่วนประกอบที่หุ้มส่วนปลายสุดของเส้นแฟลเจลลาประกอบไปด้วยโปรตีน FlgK (HAP1) โปรตีน FlgD (HAP2) และโปรตีน FlgL (HAP3) ซึ่งโปรตีน FlgK และโปรตีน FlgL ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่าง filament และ hook หลังจากที่มีการสร้างข้อต่อระหว่าง filament และ hook แล้ว โปรตีน FlgD จะถูกเติมและก่อให้เกิดกระบวนการโพลิเมอไรเซชันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน flagellin monomer เพื่อประกอบกันเป็นเส้น filament ที่สมบูรณ์ (19, 87) เส้น flagellar filament ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีน FlaA ที่เป็น flagellin หลัก และโปรตีน FlaB ที่เป็น flagellin รอง โดยมียีน *flaA* และยีน *flaB* เป็นยีนที่ควบคุมโปรตีนดังกล่าวและถูกควบคุมโดย promoter ที่แตกต่างกัน ได้แก่ σ^{28} และ σ^{54} ตามลำดับ โปรตีน flagellin ทั้งสองชนิดมีมวลโมเลกุล 53 กิโลดาลตันและประกอบด้วยกรดอะมิโนซึ่งความเหมือนกันมากถึง 58 เปอร์เซ็นต์ (113) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* พบว่าส่งผลให้แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ขาดและทำให้เชื้อเคลื่อนที่ได้ลดลง ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *flaB* ไม่ส่งผลต่อรูปร่างของแฟลเจลลา เพียงแต่ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* เคลื่อนที่ลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ (114) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของทั้งยีน *flaA* และยีน *flaB* พบว่าทำให้เชื้อไม่มีแฟลเจลลาและไม่เคลื่อนที่ (115) รวมไปถึงทำให้ความสามารถในการอยู่อาศัยของเชื้อ *H. pylori* ในสัตว์ทดลองลดลง (116) และถ้ายีนทั้งสองถูกกำจัดออกไปจะส่งผลกระทบต่อกลไกดังกล่าวข้างต้น (19, 116)

การควบคุมกระบวนการ transcription ของยีนต่างๆ ในการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ถูกควบคุมโดย RNA polymerase sigma factor ต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ประเภทดังนี้ 1.) class 1 คือกลุ่มของยีนที่ถูกควบคุมโดย housekeeping sigma factor σ^{80} (117) ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนควบคุมหลักของแฟลเจลลา ได้แก่ยีน HP0244 ซึ่งควบคุมการสร้าง histidine kinase (FlgS) ยีน *flgR* ควบคุมการทำงานของโปรตีน FlgR ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมหลักของกลุ่ม

ยีนที่ขึ้นอยู่กับ σ^{54} และถูกถอดรหัสโดย σ^{70} directs RNA polymerase ยีนต่างๆ ที่ถูกควบคุมโดย โปรตีน FlgR ทำหน้าที่เกี่ยวข้องการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของแฟลเจลลา เช่น basal body และ hook นอกจากนี้ FlgR ยังสามารถยับยั้งการ transcription ของยีน *flaA* ซึ่งเป็นยีนที่ถูกจัดอยู่ใน class 3 (118) 2.) class 2 คือกลุ่มของยีนที่ถูกควบคุมโดย alternative sigma factors σ^{54} หรือ RpoN regulon (119) ได้แก่ ยีนต่างๆ ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง ส่วนกลางของแฟลเจลลา ประกอบด้วย hook โปรตีน flagellin และปลอกหุ้มแฟลเจลลา ได้แก่ยีน *flaB* ควบคุมการสร้าง flagellin รอง ยีน *flgK* ควบคุมการสร้างโปรตีน FlgK ยีน *flgE* ควบคุมการสร้างโปรตีน FlgE ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ hook ยีน *flgL* ควบคุมการสร้างโปรตีน FlgL และยีนที่ถูกค้นพบใหม่ ได้แก่ ยีน HP0366 หรือ/367 ยีน HP0869 ยีน HP0906 ยีน HP1076 ยีน HP1154 หรือ/1155 และยีน HP1233 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด การทำงานของ σ^{54} ถูกควบคุมโดยโปรตีน FlgS และโปรตีน FlgR และเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน HP703/jhp643 ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน FlgR ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่โดยจะไปรบกวนการ transcription ของยีนใน class 2 (20) และ 3.) class 3 คือกลุ่มของยีนซึ่งถูกควบคุมโดย σ^{28} หรือ flagellar sigma factor; FliA (120) ได้แก่ ยีน *flaA* ควบคุมการสร้างโปรตีน flagellin หลัก ยีน HP0472 ยีน HP1051 และยีน HP1052 นอกจากนี้ยีนแฟลเจลลาอื่นๆ สามารถถูกควบคุมโดย promoter ได้มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม intermediate class ได้แก่ ยีน *flaG* ควบคุมการสร้างโปรตีน FlaG polar flagellin (120) ยีน *fliS* ควบคุมการสร้าง chaperone ซึ่งมีความจำเป็นต่อความยาวของแฟลเจลลา (121) ยีน *fliD* ควบคุมการสร้าง flagellar capping protein ยีน *fliT* ควบคุมการสร้าง chaperone regulator ยีน *flgM* ควบคุมการสร้าง anti-sigma factor ยีน *flgB* และ *flgC* ควบคุมการสร้าง rod ยีน *flgD* ควบคุมการสร้าง hook และยีนที่ถูกค้นพบใหม่ได้แก่ยีน HP0165หรือ/166 ยีน HP0366 หรือ/367 ยีน HP0488 และยีน HP1440 (119) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีข้อมูลจากการศึกษาามากเพียงพอที่สามารถอธิบายกลไกในระดับยีนที่ควบคุมการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในระดับโมเลกุลแฟลเจลลาต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยังมีจำกัดและยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

2.14 ยีน *fliD* กับบทบาทในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์ม

ยีน *fliD* มีขนาด 2,025 คู่เบสและอยู่บน open reading frame (ORF) ลำดับที่ 2 ของ *fliD* operon ของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งประกอบด้วยยีนต่างๆ ได้แก่ ยีน *flaG* ยีน *fliD* และยีน *fliS* ตามลำดับ ถูกควบคุมโดย σ^{28} promoter ยีน *fliD* ควบคุมการสร้าง filament capping protein (โปรตีน FliD หรือโปรตีน HAP2) มีขนาด 76 กิโลดัลตัน ซึ่งอยู่บริเวณส่วนปลายของ flagellar filament มีหน้าที่

ช่วยในกระบวนการโพลีเมอไรเซชันโมเลกุลของโปรตีน flagellin monomer ให้เป็น flagellar filament เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนจะส่งผลต่อการรวมกันของ flagellar filament ที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้เชื้อมีแฟลเจลลาที่มีลักษณะผิดปกติและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (19) การทดลองในหนูทดลองที่ติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* พบว่าโปรตีน FliD มีความสำคัญในการอยู่อาศัยของเชื้อและยังพบว่าเมื่อยีน *fliD* ถูกลบจะส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน FlaA ลดลงเนื่องจากยีน *fliD* ควบคุมกระบวนการ transcription ของยีน *flaA* (19) และทั้งยีน *flaA* และ *fliD* ถูกควบคุมด้วย promoter เดียวกันคือ σ^{28} (19, 21) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถส่งผลต่อการสร้างแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* จะมีลักษณะของแฟลเจลลาที่ผิดปกติ คล้ายกับกรณีของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ซึ่งจะมีส่วนของ filament ที่สั้นลง ดังนั้นความผิดปกติของลักษณะแฟลเจลลาที่เกิดขึ้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* จึงมีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (19) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากลักษณะที่ผิดปกติของแฟลเจลลาของเชื้อที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์ (19) ถึงแม้ว่ายีน *fliD* มีความสำคัญต่อลักษณะโครงสร้างของแฟลเจลลาและการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* แต่สำหรับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ยีน *fliD* ยังมีหน้าที่สำคัญโดยเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวต่างๆ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ของเชื้อ *P. aeruginosa* ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเกาะบนชั้นเยื่อเมือกของโฮสต์ได้ แต่เมื่อทำการฟื้นฟูยีน *fliD* พบว่าเชื้อสามารถเกาะบนชั้นเยื่อเมือกได้ตามปกติ และยังพบว่าการแสดงออกของยีน *fliD* ของเชื่อดังกล่าวถูกควบคุมโดยโปรตีนซึ่งต่างจากเชื้อ *H. pylori* คือ transcriptional regulator ได้แก่ โปรตีน FleQ และ sigma factor ได้แก่ โปรตีน RpoN (122) นอกจากนี้โปรตีน FliD ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นต่อการยึดเกาะบนเซลล์และชั้นเยื่อเมือกในโฮสต์ของเชื้อ *Clostridium difficile* (123)

เนื่องจากการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์พบว่าเมื่อเชื้อ *H. pylori* เจริญในสภาวะไบโอฟิล์มจะทำให้เชื้อมีการแสดงออกของโปรตีน FliD มากขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ที่ลอยอยู่อย่างอิสระ (22) การศึกษาในเชื้อ *P. aeruginosa* พบการแสดงออกของยีน *fliD* ที่มากขึ้นเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มในระยะเริ่มต้น (124) นอกจากนี้ยีน *fliD* ยังมีความสำคัญกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Cronobacter sakazakii* โดยเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ (125) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่สามารถอธิบายความเกี่ยวข้องของยีน *fliD* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

โปรตีน FliD ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวแทนโปรตีนในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA (78) เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของ

โปรตีนดังกล่าวมีความจำเพาะกับเชื้อ *H. pylori* มากถึง 97 เปอร์เซ็นต์และมีความแตกต่างจากโปรตีน FLiD ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งในระดับพันธุกรรมและระดับโปรตีน จากการศึกษาพบว่าการใช้โปรตีน FLiD เป็นตัวชี้วัดในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. pylori* มีความจำเพาะและความไวมากกว่า 99 และ 97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (78) ดังนั้นโปรตีน FLiD จึงมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ หรือการผลิตยาเพื่อใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่สัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ ซึ่งจะช่วยให้การรักษาเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและอาจเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มประเทศที่มีอัตราการติดเชื้อชนิดนี้สูง



บทที่ 3

วัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรีย

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา มีรายละเอียดดังนี้

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วย วัุ้น agar base no.2 และอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion (BHI) broth ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร อาหารเลี้ยงเชื้อ luria-bertani (LB) broth ซื้อจากบริษัท LabM จำกัด สหราชอาณาจักร ยา vancomycin ยา amphotericin B ยา polymyxin B ยา trimethoprim ยา ampicilin ยา kanamycin สาร Dimethyl Sulfoxide (DMSO) และสาร β -cyclodextrin (BCD) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical จำกัด สหรัฐอเมริกา เลือดแกะซื้อจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย gas generating kit ซื้อจากบริษัท Mitsubishi จำกัด ประเทศญี่ปุ่น สาร isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) และสาร -bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (X-Gal) ซื้อจากบริษัท Bioline จำกัด สหราชอาณาจักร

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และการสร้าง *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ประกอบด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue kit และชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep kit ซื้อจากบริษัท QIAGEN จำกัด ประเทศเนเธอร์แลนด์ FavorPrep™ Gel/PCR purification kit ซื้อจากบริษัท FAVORGEN® BIOTECH CORP จำกัด ประเทศไต้หวัน เอนไซม์ Taq DNA polymerase และเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bgl II และ Not I ซื้อจากบริษัท New England Biolabs Inc จำกัด สหรัฐอเมริกา เอนไซม์ MyFi™ DNA Polymerase High Fidelity และดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100-bp และ ขนาด 10k-bp ซื้อจากบริษัท Bioline จำกัด สหราชอาณาจักร loading dye ซื้อจากบริษัท Fermentas Life Sciences จำกัด สหรัฐอเมริกา pGEM® T-Easy vector ซื้อจากบริษัท Promega จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดสอบ motility assay และการวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ประกอบด้วยสี crystal violet, ethanol,

acetone ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical จำกัด สหรัฐอเมริกา อาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* broth ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ และการทดสอบ adhesion assay ประกอบด้วย เซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ เทียนสีวาทกุล Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), Antibiotic-Antimycotic และ Trypan blue เครื่องหมายการค้า Gibco ซื้อจากบริษัท Invitrogen จำกัด สหรัฐอเมริกา ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75 tissue culture flask และ T25 tissue culture flask ซื้อจากบริษัท Corning Inc จำกัด สหรัฐอเมริกา จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมซื้อจากบริษัท Nunc จำกัด สหรัฐอเมริกา กระจกแก้วปิดสไลด์ซื้อจากบริษัท VWR International จำกัด สหรัฐอเมริกา Membrane filter ขนาด 0.22 และ 0.45 ไมครอน ซื้อจากบริษัท Millipore Corporation จำกัด ประเทศเยอรมันนี

เชื้อแบคทีเรียประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ซึ่งมาจาก American Type Culture and Collection สหรัฐอเมริกา และเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ซื้อจากบริษัท New England Biolabs Inc จำกัด สหรัฐอเมริกา

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 เชื้อ *H. pylori*

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ซึ่งมีส่วนประกอบของเลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ยา vancomycin ยา amphotericin B ยา polymyxin B และ ยา trimethoprim ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และยา kanamycin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจางที่มีส่วนประกอบของก๊าซไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ใน anaerobic jar (บริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร) ที่มี gas generating kit (anaero pack-microaero)

3.2.2 เชื้อ *E. coli*

เชื้อสำหรับใช้เป็น competent cells ในการวิจัยครั้งนี้ คือ NEB 5-alpha competent *E. coli* ซึ่งนำมาใช้ในกระบวนการสร้างเชื้อให้กลายพันธุ์ เชื้อ competent *E. coli* ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ luria-bertani agar โดยมียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลือกเชื้อที่กลายพันธุ์ คือ ยา ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยา kanamycin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคัดเลือกเชื้อ *E. coli* และความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการคัดเลือกเชื้อ *H. pylori*) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การสร้างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ด้วยเทคนิค Inverse PCR mutagenesis (IPCRM)

3.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม

ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกใช้เป็นต้นแบบสำหรับกระบวนการสร้างการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ถูกสกัดโดยใช้ชุดสกัด Dneasy Blood & Tissue Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ชูดเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ซึ่งมีส่วนประกอบของเลือดแกะ fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะความเข้มข้นตามขั้นตอนข้อ 3.2.1 โดยเชื้อ 1 ลูกบาศก์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสและนำเฉพาะส่วนตะกอนของเชื้อมาละลายในบัฟเฟอร์ ALT ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายข้างต้นให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer; บริษัท FINEPCR จำกัด ประเทศเกาหลีใต้) และนำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายต่างๆ ดังกล่าวโดยใช้เครื่องเขย่าสาร จากนั้นเปิดสารละลายลงใน Dneasy Mini Spin column นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำ Dneasy Mini Spin column ข้างต้นมาวางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AE ลงในคอลัมน์และนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดโดยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer (บริษัท Thermo Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การออกแบบ primer สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR และเทคนิค inverse PCR mutagenesis

ลำดับเบสของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (GenBank accession number HP0752) (126) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *fljD* หรือเรียกว่า gene specific primer (รูปที่ 3) โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input-030.htm>) เพื่อใช้ในกระบวนการ PCR นอกจากนี้ ลำดับเบสของยีนดังกล่าวยังถูกนำมาใช้ในการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะสำหรับกระบวนการ inverse PCR mutagenesis หรือเรียกว่า inverse PCR mutagenesis primer โดยพิจารณาบริเวณ ส่วนกลางของลำดับเบสของยีน *fljD* และออกแบบ forward primer และ reverse primer ให้มีทิศทางตรงข้ามกับการออกแบบ primer ปกติ และให้ inverse PCR mutagenesis primer เริ่มต้นจับกับลำดับเบสที่อยู่บริเวณส่วนกลางของยีน *fljD* ห่างกันออกไป 18 คู่เบส (รูปที่ 3) เพื่อให้ยีนบางส่วนขาดหายไปเมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยา inverse PCR mutagenesis นอกจากนี้ที่ปลาย 5' ของ inverse PCR mutagenesis primer ถูกเติมด้วยลำดับเบสซึ่งเป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III (AGATCT) และเบสกวานีน (G) จำนวน 2 โมเลกุล ตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ primer ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) primer ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ถูกสังเคราะห์โดยบริษัท BioDesign จำกัด ประเทศไทย

LOCUS NC_000915 2025 bp DNA linear CON 09-APR-2015
 DEFINITION *Helicobacter pylori* 26695 chromosome, complete genome.
 ACCESSION NC_000915 REGION: 806840..808864
 VERSION NC_000915.1 GI:15644634
 DBLINK BioProject: PRJNA57787
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE *Helicobacter pylori* 26695
 ORGANISM *Helicobacter pylori* 26695
 Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria;
 Campylobacterales; Helicobacteraceae;
 Helicobacter.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2025)
 AUTHORS Raymond,J., Thiberge,J.M., Kalach,N., Bergeret,M., Dupont,C., Labigne,A.
 and Dauga,C.
 TITLE Using macro-arrays to study routes of infection of *Helicobacter*
pylori in three families
 JOURNAL PLoS ONE 3 (5), E2259 (2008)
 PUBMED 18493595
 REMARK Publication Status: Online-Only
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2025)
 AUTHORS Wen,Y., Marcus,E.A., Matrubutham,U., Gleeson,M.A., Scott,D.R. and
 Sachs,G.
 TITLE Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*
 JOURNAL Infect. Immun. 71 (10), 5921-5939 (2003)
 PUBMED 14500513

REFERENCE 3 (bases 1 to 2025)

AUTHORS Marais, A., Mendz,G.L., Hazell,S.L. and Megraud,F.

TITLE Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era

JOURNAL Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63 (3), 642-674 (1999)

PUBMED 10477311

REFERENCE 4 (bases 1 to 2025)

AUTHORS Tomb,J.-F., White,O., Kerlavage,A.R., Clayton,R.A., Sutton,G.G., Fleischmann,R.D., Ketchum,K.A., Klenk, H.P., Gill,S., Dougherty,B.A., Nelson,K., Quackenbush,J., Zhou,L., Kirkness,E.F., Peterson, S., Loftus,B., Richardson,D., Dodson,R., Khalak,H.G., Glodek,A., McKenney,K., Fitzgerald,L.M., Lee,N., Adams,M.D., Hickey,E.K., Berg,D.E., Gocayne,J.D., Utterback,T.R., Peterson,J.D., Kelley,J.M., Karp,P.D., Smith,H.O., Fraser,C.M. and Venter,J.C.

TITLE The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*

JOURNAL Nature 388 (6642), 539-547 (1997)

PUBMED 9252185

REFERENCE 5 (bases 1 to 2025)

CONSRM NCBI Genome Project

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-SEP-2001) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

REFERENCE 6 (bases 1 to 2025)

AUTHORS Tomb,J.-F., White,O., Kerlavage,A.R., Clayton,R.A., Sutton,G.G., Fleischmann,R.D., Ketchum,K.A., Klenk,H.P., Gill,S., Dougherty,B.A., Nelson,K., Quackenbush,J., Zhou,L., Kirkness,E.F., Peterson,S., Loftus,B., Richardson,D., Dodson,R., Khalak,H.G., Glodek,A., McKenney,K., Fitzgerald,L.M., Lee,N., Adams,M.D., Hickey,E.K.,

Berg,D.E., Gocayne,J.D., Utterback,T.R., Peterson,J.D., Kelley,J.M., Cotton,M.D., Weidman,J.M., Fujii,C., Bowman,C., Waththey,L., Wallin,E., Hayes,W.S., Borodovsky,M., Karp,P.D., Smith,H.O., Fraser,C.M. and Venter,J.C.

CONSRTM NCBI Microbial Genomes Annotation Project

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-AUG-1997) The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Dr, Rockville, MD 20850, USA

COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from AE000511.

RefSeq Category: Reference Genome

CLI: Clinical Isolate

FGS: First Genome sequenced

MOD: Model Organism

UPR: UniProt Genome

COMPLETENESS: full length.

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..2025 /organism=" <i>Helicobacter pylori</i> 26695" /mol_type="genomic DNA" /strain="26695" /db_xref="taxon:85962"
gene	1..2025 /gene=" <i>fljD</i> " /locus_tag="HP0752" /db_xref="GeneID:900004"

CDS 1..2025

/gene="fliD"

/locus_tag="HP0752"

/note="flagellar cap protein; involved in flagellin assembly"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="flagellar hook-associated protein"

/protein_id="NP_207545.1"

/db_xref="GI:15645371"

/db_xref="GeneID:900004"

/translation="MAIGSLSSLGLGSKVLNYDVIDKLDKDADEKALIAPLDKKMEQNVEKQKALVEIKTLLS
 ALKGPVKTLSDYSTYISRKSNVTGDALSASVGVGVPIQDIKVDVQNLAAQGDINELGAKFSSRDDIFSQV
 DTTLKFYTQNKDYAVNIKAGMTLGDVAQSITDATNGEVMGIVMKTGGNDPYQLMVNTKNTGEDNR
 VYFGSHLQSTLTNKNALSLGVDGSGKSEVSLNLKGADGNMHEVPIMLELPESASIKQKNTAIQKAME
 QALENDPNFKNLIANGDISIDTLHGGESLIINDRRGGNIEVKGSKAKELGFLQTTTTQESDLLKSSRTIKE
 GKLEGVWSLNGQKLDLSALTKESNTSEENTDAIIQAINAKEGLSAFKNAEGKLVINSKTGMLTIKGEDA
 LGKASLKDLGLNAGMVQSYEASQNTLFMSKNLQKASDSAFTYNGVSITRPTNEVNDVISGVNITLEQ
 TTEPNKPAIISVSRDNQAIIDSLTEFVKAYNELIPKLDEDTRYDADTKIAGIFNGVGDRAIRSSLNNVFSY
 SVHTDNGVESLMKYGLSLDDKGVMMLDEAKLSSALNSNPKATQDDFFYGSDSKDMGGREIHQEGIFS
 KFNQVIANLIDGGNAKLKIYEDSLDRDAKSLTKDKENAQELLKTRYNIMADVPLPLMIKSLKPIKNSIPC
 K"

ORIGIN

1atggcaatag gttcattaag cttagtagg cttggcagta aggtttttaa ttacgatgtg attgacaagc
 71ttaaggacgc ttagtaaaag gcgttaatcg ccccttaga caagaaaatg gagcaaaatg ttgaaaaaca
 141aaaagccctt gtagaaatta aaacgtcct ttcagctcta aaaggcccg ttaaaccgtc ttcagattat
 211tccacttata tcagccgaaa aagcaatgtt acaggcgatg cgttgagtgc gagcgtgggg gttggcgtgc
 281ctattcaaga tattaagtg gatgtgcaaa atttagcgca aggcgatatt aacgaattgg gggcgaaatt

361ttcttcaaga gacgatatt ttagccaagt ggataccacg ctcaagtttt acacacaaaa caaagactac
 431gccgtaata ttaaagcagg aatgacttta ggcgatgtgg ctcaaagcat cacggacgct ^{fliDF} → accaatggcg
 501aagtgatggg tattgtgatg aaaacaggag ggaatgacc ctaccaatta atggtgaata caaaaaacac
 571cggcgaagac aaccgagtct attttggtc acacctcaa ^{fliDF} → tccacgctca ctaacaaaaa cgccctttct
 641ttgggggttg atgggagcgg aaaaagtga gtgagttga atttaaagg ggctgatggg aacatgcatg
 711aagtcccat catgctagaa ctccctgaaa gcgcttctat caaacaaaa aacaccgcaa ^{fliDR} ← tccaaaaagc
 781gatggagcag gcttagaaa atgaccctaa ttttaaaat ttgatcgcta atggggatat ttccatagac
 851actcttcag gaggggaatc ttaatcatt aatgacagcg gtgggggaaa cattgaagtt aaagggagta
 921aggctaaaga gcttgggtt ttacaaacca ccaccaaga aagcgattta ttaaaaagct ctgcacgat
 991aaaagagggg aaattagaag ggggtgtag tttgaatggc caaaaactgg atttgagtgc ttaacaaaa
 1061gagagcaaca ccagtgaaga aaacacagac gctatcattc aagcgatcaa cgctaaaggaa ggcttgatg
 1131cgttcaaaaa cgccgaagcg aagcttgtga tcaattctaa aaccggaatg ctaacgatta agggcgagga
 1201cgctttaagc aagccagtt tgaagattt gggtttaaat gctggcatgg tgcaatctta tgaagcttca
 1271caaacacgac ttttatgac taaaaattg caaaaagcga gcgattcagc attcacttat aatggggtga
 1341gcatcacacg cccactaat gaggtcaatg atgtgattag tggggtaat atcactttgg agcaaaccac
 1411agagcctaat aaacctgcca ttatcagcgt gagtagggac aatcaagcca ttatagacag ccttactgaa
 1481tttgtaaaag cctataatga gcttatccct aaactggatg aagacactcg ttatgacgct gacactaaaa
 1551tcgctgggat ttttaacggc gtgggcgata ttcgcgcgat tcgatcttct ctaataatg tgttttcta
 1621tagcgtgcat acggataatg gggtagaaag cttgatgaaa tacgggctta gtttagacga taagggcgtg
 1691atgagtttg atgaggctaa attgagtagt gcgctaaatt ctaaccctaa agcgactcaa gattttttct
 1761atgggagtg tagtaaggat atggggggca gagaaatcca ccaagagggc attttttcta aattcaatca
 1831agtcatcgct aatctcatag atggagggaa cgctaaatta aagatttatg aagattccct agacagagac
 1901gctaaaagcc tgactaaaga caaagaaaac gctcaagagc ttttaaaaac ccgctacaac attatggcgg
 1971acgttttggc gcttatgata gccaaatctc taaagccaat caaaaattca attccgtgca aatga

รูปที่ 3 ลำดับเบสของยีน *fliD* ของ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 26695 (HP0752) (126)

3.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน *fliD* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่สกัดได้จากข้อ
 3.3.1 ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *fliD* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาณ
 ดีเอ็นเอตั้งต้น 400 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *fliDF*

primer และ *fliDR* primer ปริมาณอย่างละ 50 พิโคโมล deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลต่อลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลต่อลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ปฏิกริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ตามที่แสดงในตารางที่ 2 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุมลบ นำผลผลิต PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *fliD* ควรมีขนาดเท่ากับ 292 คู่เบส

ตารางที่ 2 ปฏิกริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *fliD* การทำปฏิกริยา inverse PCR mutagenesis และการทำปฏิกริยา colony PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส) และเวลา			
	PCR	IPCRM ¹	colony PCR ²	จำนวนรอบ
Pre-Denature	93 °C, 5 นาที	95 °C, 1 นาที	93 °C, 5 นาที	1
Denature	93 °C, 1 นาที	95 °C, 15 วินาที	93 °C, 1 นาที	
Annealing	55 °C, 1 นาที	55 °C, 15 วินาที	50 °C, 1 นาที	35
Extension	72 °C, 1 นาที	72 °C, 2 นาที	72 °C, 1 นาที	
Final extension	72 °C, 10 นาที	-	72 °C, 10 นาที	1
Hold temp		4		-

¹ หมายถึงปฏิกริยา inverse PCR mutagenesis ² หมายถึงปฏิกริยา colony PCR

3.3.4 การแยกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส

นำผลผลิตจากปฏิกริยา PCR ปฏิกริยา inverse PCR mutagenesis และปฏิกริยา colony PCR ของยีน *fliD* ปริมาตร 3 ไมโครลิตรผสมกับ loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความ

เข้มข้นระหว่าง 0.7 ถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 40 ถึง 50 นาที โดยใช้ชุดอิเล็กโตรฟอเรซิส (i-MyRun electrophoresis system; บริษัท Cosmo Bio จำกัด สหรัฐอเมริกา) สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Syngene; บริษัท A Division of Synoptics จำกัด สหราชอาณาจักร) โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

3.3.5 การทำให้ผลผลิตจาก PCR บริสุทธิ์

ผลผลิตดีเอ็นเอส่วนที่เหลือจากข้อ 3.3.3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต เพื่อเป็นการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับใช้ในกระบวนการต่อไป นำผลผลิตดีเอ็นเอมาผสมกับบัฟเฟอร์ FADF ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดเตีสิ่งตัวอย่างทั้งหมดลงใน FADF column จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใสที่อยู่ก้นหลอด เติมบัฟเฟอร์ wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน FADF column แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ก้นหลอด ปั่นต่ออีก 3 นาทีเพื่อทำให้ column แห้ง นำ FADF column มาวางบน microcentrifuge tube หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมบัฟเฟอร์ elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงที่กลางเมมเบรนของ FADF column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การโคลนยีน *fliD* เข้าสู่ pGEM®T-Easy vector

นำผลผลิต PCR ของยีน *fliD* ปริมาณ 10 ไมโครกรัม โคลนใส่เข้าไปใน pGEM®T-Easy vector ปริมาณ 50 นาโนกรัม เติมบัฟเฟอร์ ligation buffer ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 ยูนิต ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น บริสุทธิ์เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 10 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation ที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน ผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ที่มียีน *fliD* บรรจุอยู่ในพลาสติกจะถูกนำไปเข้าสู่ *E. coli* DH5- α competent cells ด้วยวิธี heat-shock transformation ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ นำหลอดที่บรรจุเชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตรวางบนน้ำแข็งจนกว่าสารละลายในหลอดจะละลายทั้งหมด เติมผลผลิตจากปฏิกิริยา

ligation ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด ทำการผสมสารละลายต่างๆ ให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ จากนั้นตั้งหลอดดังกล่าวทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดดังกล่าวมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งโดยทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดดังกล่าว และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายในหลอดปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาทำการเกลี่ยลงบน luria-bertani agar ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สาร isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดบรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony screening assay โดยบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โคลนีสของ competent cells ที่มีพลาสมิดบรรจุอยู่จะมีโคลนีสสีขาว นำโคลนีสดังกล่าวไป streak ลงบน luria-bertani agar ที่มียา ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยืนยันความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis

3.3.7 การทำ colony PCR amplification

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลน เริ่มจากเชื้อจากโคลนีสของ competent cells ที่ให้โคลนีสสีขาวมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสนำมาเพิ่มจำนวนยีน *fl/D* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 Promoter ปฏิกริยา colony PCR amplification มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 25 ไมโครลิตรประกอบไปด้วยดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครลิตร primer ที่จำเพาะกับ SP6 และ T7 promoter ปริมาณอย่างละ 50 พิโคโมล deoxynucleotide triphosphates ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลต่อลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลต่อลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต โดยนำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อถูกนำมาใช้แทนดีเอ็นเอเพื่อเป็นตัวอย่างควบคุมลบ ปฏิกริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ตามที่แสดงในตารางที่ 3 นำผลผลิตจากปฏิกริยา colony PCR amplification มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *fl/D* ควรมีขนาดเท่ากับ 467 คู่เบส

3.3.8 การสกัดพลาสมิด

เชื้อโคโลนีของ competent cells ที่ตรวจพบยีน *flID* โดยวิธี colony PCR มาเพาะเลี้ยงใน luria-bertani broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสทิ้ง และนำส่วนตะกอนไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลายดังกล่าวลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และผสมโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 ถึง 6 ครั้งทันที นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และปิเปตเฉพาะส่วนสารละลายใสลงใน QIAprep Spin column ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนสารละลายใสและนำ column ไปปั่นต่ออีกครั้งเพื่อทิ้งบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่ จากนั้นนำ column ไปวางบนหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำการชะพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรซึ่งมีส่วนประกอบของ Tris-Cl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร pH 8.5 ลงตรงกลาง column และนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer ยืนยันความถูกต้องของชิ้นส่วนยีน *flID* ที่โคลนเข้าไปด้วยวิธี restriction enzyme analysis

3.3.9 การทำ restriction enzyme analysis

นำพลาสมิดที่บรรจุยีน *flID* ซึ่งถูกสกัดในขั้นตอน 3.3.8 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* พลาสมิดที่บรรจุยีน *flID* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกบ่มร่วมกับเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 1 เท่าและบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ขนาดของชิ้นส่วนของยีน *flID* ที่ได้ควรมีขนาดเท่ากับ 327 คู่เบส และขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดออกมาควรมีขนาดเท่ากับ 2,980 คู่เบส

3.3.10 การทำ inverse PCR mutagenesis

พลาสมิดที่บรรจุยีน *flID* ถูกนำมาใช้ในกระบวนการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ การทำ inverse PCR mutagenesis โดยใช้ primer inverse PCR mutagenesis primer ที่ออกแบบไว้ใน

ขั้นตอนข้อ 3.3.2 ซึ่งผลิตจากการทำ inverse PCR mutagenesis จะได้ยีน *fliD* ที่มีเบสหายไปจำนวน 18 คู่เบส ณ ตำแหน่งที่ 101 ถึงตำแหน่งที่ 119 และมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ปรากฏอยู่บริเวณกลางยีน ปฏิบัติการ inverse PCR mutagenesis ประกอบด้วยพลาสมิดที่มียีน *fliD* จากขั้นตอน 3.3.9 ปริมาณ 400 นาโนกรัม อย่างละ 20 ไมโครโมลต่อลิตร สารละลาย MyFi mix ความเข้มข้น 2 เท่า ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ MyFi DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates dNTPs และ $MgCl_2$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ทำปฏิกริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังแสดงในตารางที่ 2 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ปริมาตร 15 ไมโครลิตรมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลิต inverse PCR mutagenesis ของยีน *fliD* ควรมีขนาดเท่ากับ 3,305 คู่เบส ผลิต inverse PCR mutagenesis ส่วนที่เหลือปริมาตร 85 ไมโครลิตร ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตดังที่ได้อธิบายในข้างต้น จากนั้นวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ด้วยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ความเข้มข้น 20 เท่า ในปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบชิ้นส่วนของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลิต inverse PCR mutagenesis ของยีน *fliD* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ควรมีขนาดเท่ากับ 3,305 คู่ นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตดังที่ได้ อธิบายในข้างต้น จากนั้นวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ด้วยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer

นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ปริมาณ 80 นาโนกรัม มาทำปฏิกริยา self-ligation โดยใช้สารละลาย ligation buffer ความเข้มข้น 10 เท่า และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 9 ยูนิต ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ บ่มเพื่อให้เกิดปฏิกริยา self-ligation ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ผลผลิตจากปฏิกริยา self-ligation ปริมาตร 5 ไมโครลิตรจะถูกนำเข้าสู่ *E. coli* DH5- α competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตรด้วยวิธี heat-shock transformation และคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดที่มีผลผลิตจากปฏิกริยา self-ligation บรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony

screening assay ตามที่ได้อธิบายในข้างต้น ยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter

นำผลผลิตจาก colony PCR amplification ปริมาตร 25 ไมโครลิตรมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ความเข้มข้น 5 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวควรมีขนาด 192 คู่เบส และ 273 คู่เบส ตามลำดับ

เลือกโคลนของ competent cell ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบข้างต้นมาทำการเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงใน luria-bertani broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสทิ้ง และนำส่วนตะกอนไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้น ยืนยันความถูกต้องของยีนที่โคลนเข้าไปอีกครั้งด้วยการนำพลาสมิดที่สกัดได้ ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I ตามรายละเอียดดังกล่าวข้างต้นตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ขนาดของชิ้นส่วนของยีน *flvD* ที่ได้ควรมีขนาด 325 คู่เบส และขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดออกมาควรมีขนาด 2,980 คู่เบส

3.3.11 การใส่ kanamycin resistance cassette (kan^R) เข้าสู่ผลผลิต inverse PCR mutagenesis

kanamycin resistance cassette ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดย GeneArt[®] บริษัท Invitrogen[™] จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของ kanamycin-resistance transposon หรือ Tn903 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอซึ่งอยู่ตรงกลางชิ้นส่วนของ transposon (central unique DNA) ขนาด 900 คู่เบสและมีหน้าที่สร้างเอนไซม์ kanamycin phosphotransferase และส่วนของ flanking repeat ขนาด 1.05 กิโลเบส (127) ในการศึกษาครั้งนี้ ลำดับเบสของ central unique DNA ขนาด 900 คู่เบสและ flanking repeat ขนาด 88 คู่เบส (ด้านละ 44 คู่เบส) ถูกนำมาใช้อ้างอิงในการสร้าง kanamycin resistance cassette

kanamycin resistance cassette ขนาด 1,000 คู่เบส นำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้เชื้อสาย พันธุ์ที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์ในการวิจัยครั้งนี้ และมีลำดับเบสดังรูปที่ 4 โดยปลายทั้งสองด้านประกอบไปด้วยลำดับเบสของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II (AGATCT) เพื่อใช้ในการเชื่อมกับผลผลิตจาก inverse PCR mutagenesis ของยีน *flhD* ที่อยู่ในพลาสมิดจากขั้นตอน 3.3.10

5'-AGATCTTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAAC
TGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGTGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTG
CTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGAT
AATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGT
TTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTG
GCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGG
TACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAG
GTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTA
TTGTCCTTTTAAACACGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTT
TGTTGATGCGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGA
AATGCATAAGCTTTTGCATTCTACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATA
ACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGA
CCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAA
CGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCT
CGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACT
TGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTTAGATCT-3'

รูปที่ 4 ลำดับเบสของ kanamycin resistance cassette (127) ตัวอักษรหนาที่ขีดเส้นใต้หมายถึง ลำดับเบสของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ตัวอักษรหนาหมายถึงลำดับเบสของ flanking repeat จำนวนด้านละ 44 คู่เบส ตัวอักษรปกติหมายถึง ลำดับเบสของ central unique DNA ขนาด 900 เบส

นำผลผลิตจาก inverse PCR mutagenesis ของยีน *flhD* ที่อยู่ในพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ความเข้มข้น 20 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1

ชั่วโมง นำผลผลิตพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ปริมาณ 80 นาโนกรัม มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้สารละลาย ligation buffer ความเข้มข้น 10 เท่า kanamycin resistance cassette ความเข้มข้น 10.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 9 เท่า ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ บ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ระหว่างผลผลิตจาก inverse PCR mutagenesis ของยีน *fliD* และ kanamycin resistance cassette ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเข้าสู่ *E. coli* DH5- α competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตรด้วยวิธี heat-shock transformation และคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดที่มีผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation บรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony screening assay ตามที่ได้อธิบายในข้างต้น ยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ T7 promoter และ SP6 promoter ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้น นำผลผลิตจากปฏิกิริยา colony PCR amplification มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรพอเรซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณของยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์ซึ่งมี kanamycin resistance cassette ควรมีขนาดเท่ากับ 1,465 คู่เบส

เลือกโคลนีของ competent cell ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบข้างต้นมาทำการเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงใน luria-bertani broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสทิ้ง และนำส่วนตะกอนไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้น ยืนยันความถูกต้องของยีนที่โคลนเข้าไปอีกครั้งด้วยการนำพลาสมิดที่สกัดได้ ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I ตามรายละเอียดดังกล่าวข้างต้นตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรพอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ขนาดของชิ้นส่วนของยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์ซึ่งมี kanamycin resistance cassette บรรจุอยู่ควรมีขนาด 1,325 คู่เบส และขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดออกมาควรมีขนาด 2,980 คู่เบส

3.3.12 การนำพลาสมิดที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค natural transformation

เกลี่ยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ปริมาณ 1 ลูบ (ประมาณ 10^8 ถึง 10^9 เซลล์) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่แช่เย็น ซึ่งมีส่วนผสมของเลือดแกะ fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะความเข้มข้นดังที่กล่าวไว้ในขั้นตอน 3.2.1 ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง ปิเปตพลาสมิดที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์จากขั้นตอน 3.3.11 ปริมาณ 2 ไมโครกรัมลงบนเชื้อและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง จากนั้นขูดเอาเชื้อทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปิเปตเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ซึ่งมีส่วนผสมของเลือดแกะ fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะความเข้มข้นดังที่กล่าวไว้ในขั้นตอน 3.2.1 และมียา kanamycin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง (ก๊าซไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์)

ทดสอบยืนยันความสำเร็จในการทำ natural transformation ด้วยวิธี PCR โดยสกัดดีเอ็นเอของเชื้อที่ขึ้นมาจากขั้นตอน 3.3.1 ใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 400 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *fljDF* primer และ *fljDR* primer ปริมาณอย่างละ 50 พิโคโมล deoxynucleotide triphosphates ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ตามที่แสดงในตารางที่ 3 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *fljD* ที่กลายพันธุ์ซึ่งมี kanamycin resistance cassette บรรจุอยู่ ควรมีขนาดเท่ากับ 1,290 คู่เบส

3.3.13 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *fljD* ด้วยเทคนิค Sequencing

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 โดยเตรียมผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ภายหลังจากการทำ natural transformation ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ primer ที่จำเพาะต่อยีน *fljD* ได้แก่ *fljDF* primer และ *fljDR* primer ปริมาตรอย่างละ 50 พิโคโมล เพื่อส่งไป

วิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger sequencing (128) โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลการทดสอบ Sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (GenBank accession number HP0752) (126) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสยีน *flaD* ด้วยโปรแกรม Standard Nucleotide BLAST (129)

3.4 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค motility assay

โคโลนีของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ที่มีอายุ 3 วัน ถูกนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* broth ปรับเชื้อที่การดูดกลืนแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 หรือประมาณ 10^8 colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายของเชื้อปริมาตร 3 ไมโครลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* soft agar ที่มีส่วนประกอบของวุ้นความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ heat-inactivated fetal bovine serum ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง สังเกตการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยดูจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวงกว้างรอบจุดที่ปิเปตเชื้อลงไป วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงและคำนวณขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยมีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร ขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ด้วยเทคนิค adhesion assay

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง (human laryngeal epithelial; HEp-2)

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ใน T75 tissue culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified of eagle's medium ผสมกับ fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และยาต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (antibiotic-antimycotic) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะถูกถ่ายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ตั้งชั้นตอนต่อไปนี้ เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกทั้งหมด ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ dulbecco's phosphate buffer saline ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นย่อยเซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวที่ยึดเกาะด้วยเอนไซม์ trypsin ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 1 ถึง 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 10 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ trypsin ใช้ปิเปตดูดตะกอนของเซลล์ขึ้นลงเบาๆ ดูดตะกอนเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่ในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลงเบาๆ ทำการนับจำนวนของเซลล์เพื่อให้มีจำนวนที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ดูดตะกอนเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ใน T75 tissue culture flask ขวดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ สังเกตความหนาแน่นของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

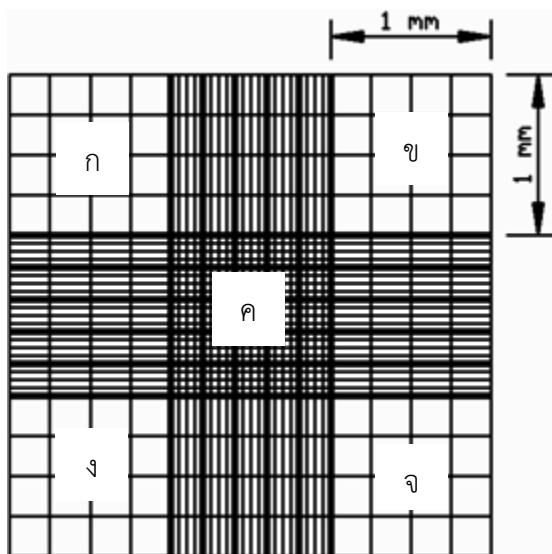
3.5.2 การนับเซลล์

เพื่อให้ได้ปริมาณของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและการทดลองขั้นต่อไป จึงทำการนับเซลล์ด้วยอุปกรณ์นับเซลล์ hemocytometer-counting chamber (รูปที่ 5) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ดูดตะกอนเซลล์ภายหลังกระบวนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสี trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลงเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ 3 ถึง 5 นาที จากนั้นดูดตะกอนเซลล์ดังกล่าวถ่ายลงใน hemocytometer-counting chamber ปิดแผ่น coverslip ทับ นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า นับเฉพาะเซลล์ที่ไม่ติดสี trypan blue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยนับเซลล์ที่อยู่ในช่องกลางและช่องมุม 4 ช่อง ดังแสดงในรูปที่ 5 คำนวณปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตรดังที่แสดงต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตใน 1 มิลลิลิตร (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times 10^4 \times \text{df}^*}{5}$$

5

*df หมายถึง dilution factor



รูปที่ 5 อุปกรณ์นับเซลล์ hemacytometer-counting chamber (22) บริเวณที่มีเครื่องหมาย ก ข ค ง และ จ คือพื้นที่ที่ถูกนำมาใช้ในการนับเซลล์

3.5.3 การย้อมเชื้อ *H. pylori* ด้วยสี fluorescein isothiocyanate (FITC)

เจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ที่มีอายุ 3 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified of eagle's medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปรับเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 หรือประมาณ 10^8 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตร เติมสีย้อม fluorescein isothiocyanate ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายใน dimethyl sulfoxide บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด นำเซลล์แบคทีเรียไปปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย dulbecco's modified of eagle's medium ที่ผสมกับ Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปั่นด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งและเหลือแต่ตะกอนเชื้อ จากนั้นเติม dulbecco's modified of eagle's medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนเชื้อ

3.5.4 การเตรียมเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori*

นำเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ที่เลี้ยงใน T75 tissue culture flask จนมีความหนาแน่นประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified of eagle's medium ผสมกับ fetal bovine serum ความเข้มข้น 10

เปอร์เซ็นต์ และยาด้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอยู่หลุมละ 2 มิลลิลิตร และมี coverslip เส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตรอยู่ที่ก้นหลุม เพื่อเป็นพื้นที่ให้เซลล์ใช้ในการยึดเกาะ ปรับปริมาณให้มีเซลล์บรรจุอยู่ในหลุมๆ ละ 3 ล้านเซลล์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เซลล์เกาะกับจานเลี้ยงเซลล์และมีความหนาแน่น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย dulbecco's phosphate buffer saline ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified of eagle's medium ซึ่งมีเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate เจือจางอยู่จากขั้นตอน 3.5.3 ปริมาตรหลุมละ 2 มิลลิลิตร เชื้อในแต่ละหลุมมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 หรือประมาณ 10^8 colony forming unit ต่อ มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ หลุมที่มีเฉพาะเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ถูกเตรียมควบคู่ไปกับหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์กับเชื้อ เพื่อใช้วัดเป็นค่าแบบคร่าวๆ ของการทดสอบในแต่ละครั้ง

3.5.5 การวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จากตัวเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2

เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อในขั้นตอน 3.5.4 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้งเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่ได้ยึดเกาะเซลล์ และล้างเซลล์ด้วย dulbecco's phosphate buffer saline ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง วัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งจากตัวเชื้อ *H. pylori* ที่เกาะบนเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 ด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader (บริษัท Biotek Synergy Mx จำกัด สหรัฐอเมริกา) โดยแสงฟลูออเรสเซนซ์ถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตรและถูกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้แปรผันตรงกับจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEP-2 บันทึกภาพของการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ติดด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (รุ่น Olympus BX50 บริษัท Olympus Corporation จำกัด ประเทศญี่ปุ่น) ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ถูกนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะโดยเทียบกับการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.6 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง

3.6.1 การสร้างไบโอฟิล์มด้วยเทคนิค pellicle assay

เจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ที่มีอายุ 3 วัน ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมของ β -cyclodextrin (BCD) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตรให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 หรือประมาณ 10^8 colony forming unit ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ในสภาวะอยู่กับที่ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง (ก๊าซไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์)

3.6.2 การวัดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงกึ่งปริมาณ

ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ในเชิงกึ่งปริมาณ โดยสังเกตลักษณะไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้น ได้แก่ pellicle (คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่มลอยบนพื้นผิวของเหลวบริเวณระหว่างของเหลวกับอากาศ) และ attached biofilm (คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่เกาะบนผิวแก้วบริเวณระหว่างของเหลวกับอากาศ) และบันทึกผลทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยบันทึกระดับการสร้างไบโอฟิล์มทั้งในรูปแบบของ pellicle และ attached biofilm ดังนี้ (-) หมายถึง ไม่สามารถสังเกตเห็นการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 รูปแบบดังที่กล่าวข้างต้น (+) หมายถึง พบการสร้าง pellicle หรือ attached biofilm เป็นเยื่อบางๆ (++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมบริเวณส่วนกลางของพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดบาง (++++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดหนา การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

3.6.3 การวัดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet

ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ในเชิงปริมาณ ด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลองครบ 7 วัน ดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง คงเหลือแต่ส่วนของไบโอฟิล์มที่เกาะข้างพื้นผิว

แก้วของหลอดทดลอง หรือ attached biofilm ล้างไบโอฟิล์มด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ปริมาตร 11 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำหลอดทดลองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสี crystal violet ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้ไบโอฟิล์มติดสี ดูดสี crystal violet ทิ้งและนำหลอดทดลองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างไบโอฟิล์มด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ปริมาตร 11 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายเอทานอลต่ออะซีโตนในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ปริมาตร 11 มิลลิลิตร และตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดสารละลายของสีที่ถูกชะออกมาใส่ใน cuvette และนำไปวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดความเข้มของแสง (spectrophotometer; บริษัท Hitachi จำกัด ประเทศไทย) หลอดทดลองที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมของ β -cyclodextrin (BCD) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ถูกเตรียมควบคู่ไปกับหลอดทดลองที่ใส่เชื้อ เพื่อใช้วัดเป็นค่าแบคทีเรียของการทดสอบในแต่ละครั้ง ค่าความเข้มของแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อถูกแสดงโดยค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่ไม่มีเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.7 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

3.7.1 การเตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจดังนี้ เพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสองสายพันธุ์ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลองให้มีอายุตั้งแต่ 1 ถึง 7 วัน โดยมีรายละเอียดตามขั้นตอน 3.6.1 เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการบ่มเชื้อ ดูดเก็บ pellicle ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ใส่ในหลอดใหม่ สำหรับหลอดทดลองที่ไม่มีการสร้าง pellicle ให้ดูดเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระที่ก้นหลอดใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขณะเดียวกันทำการเก็บโคโลนีที่มีอายุ 3 วันของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ ทำการ

เจือจางใน phosphate buffer saline เพื่อนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างสามมิติของเชื้อในขั้นตอนนี้ด้วย นำ pellicle เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระและสารละลายเชื้อที่เก็บได้จากโคโลนีไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นส่งสิ่งตัวอย่างทั้งหมดไปทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.7.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สิ่งตัวอย่างที่เตรียมในขั้นตอน 3.7.1 ถูกทำการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย ทำการตรึงสิ่งตัวอย่างด้วยสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสิ่งตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง ดูดสารละลายของเหลวทิ้งหมดทิ้ง ทำการขจัดน้ำออกจากสิ่งตัวอย่างโดยผ่านเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 30, 50, 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ลำดับละ 10 นาที และที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำสิ่งตัวอย่างไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤตและวางบนแท่น เคลือบสิ่งตัวอย่างด้วยทองและแพลเลเดียม ทำการบันทึกภาพสามมิติของโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JSM-7610F บริษัท JEOL จำกัด ประเทศญี่ปุ่น)

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการทดสอบต่างๆ ระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดย Student's t-test โดยค่า p-value ที่ระดับน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การสร้าง *H. pylori* ที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis

4.1.1 สารพันธุกรรมของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้

ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกสกัดเพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในกระบวนการสร้างการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.1 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย และวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้เท่ากับ 210.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.94 ดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดมีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนถัดไป

4.1.2 primer ที่ถูกออกแบบ

primer ที่ถูกออกแบบขึ้นในงานวิจัยนี้ได้แก่ gene specific primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* และ inverse PCR mutagenesis primer ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการสร้างการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* ในการออกแบบ primer ได้ใช้ลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (126) เป็นต้นแบบ นำ primer ที่ถูกออกแบบขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) พบว่า primer ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *fliD* ได้แก่ *fliDF* (*fliD* forward primer) ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 488 ถึง 507 ประกอบด้วยเบส GC 50 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature; T_m) 58.33 องศาเซลเซียส ขณะที่ *fliDR* (*fliD* reverse primer) ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 779 ถึง 759 ประกอบด้วยเบส GC 40 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 55.65 องศาเซลเซียส

primer สำหรับ inverse PCR mutagenesis ได้แก่ *inflIDF* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 610 ถึง 624 ประกอบด้วยเบส GC 47.83 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 59.76 องศาเซลเซียส และ *inflIDR* ถูกออกแบบโดยอ้างอิงจากลำดับเบสที่ตำแหน่ง 591

ถึง 577 ประกอบด้วยเบส GC 47.83 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิหลอมเหลว 58.05 องศาเซลเซียส รายละเอียดของ primer ต่างๆ ถูกแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *fliD* ปฏิกิริยา inverse PCR mutagenesis และปฏิกิริยา colony PCR และขนาดของผลผลิตที่ได้ตามลำดับ

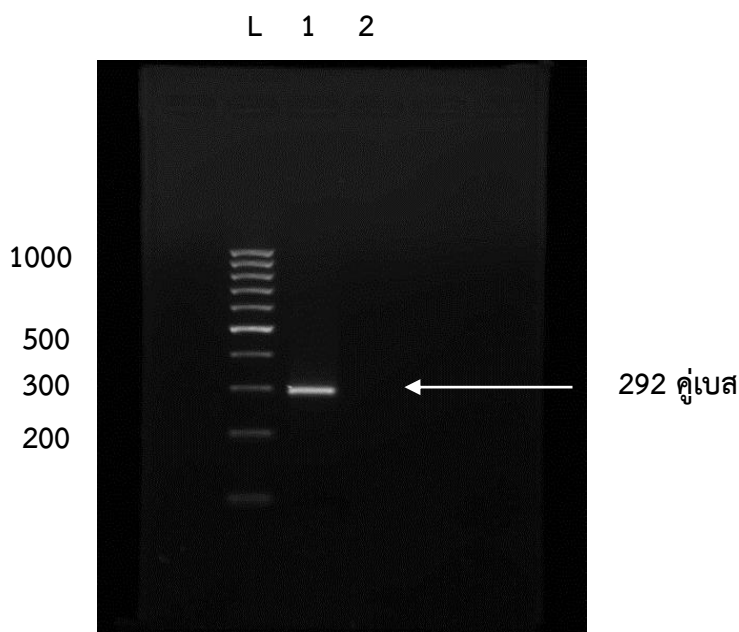
ชื่อ primer	ยีน	เทคนิค PCR	ลำดับเบส primer (5'-3')	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ (Tm) (องศาเซลเซียส)	ขนาดผลผลิต (คู่เบส)
<i>fliD</i> F	<i>fliD</i>	PCR	GCTACCAATGGCGAAGTGAT	488	56.99	292
<i>fliD</i> R	<i>fliD</i>	PCR	CTTTTTGGATTGCGGTGTTT	779		
<i>inflid</i> F	<i>fliD</i> mutant	IPCRM ¹	GGAGATCTATCCACGCTCACTAA	610	58.91	3,305
<i>inflid</i> R	<i>fliD</i> mutant	IPCRM	GGAGATCTTAGACTCGGTTGTCT	591		
SP6 promoter	SP6 promoter	Colony PCR ²	ATTTAGGTGACACTATAGAA	อ้างอิงจาก (130)	41.91	175
T7 promoter	T7 promoter	Colony PCR	TAATACGACTCACTATAGGG			

¹ หมายถึงปฏิกิริยา inverse PCR mutagenesis ² หมายถึงปฏิกิริยา colony PCR

4.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน *fliD* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณยีน *fliD* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *fliD* ได้แก่ *fliD*F primer และ *fliD*R primer ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.3 ของบทวัสดุและวิธีในการ

ดำเนินงานวิจัย ตรวจสอบผลผลิต PCR บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาด กับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *fljD* มีขนาดเท่ากับ 292 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 6



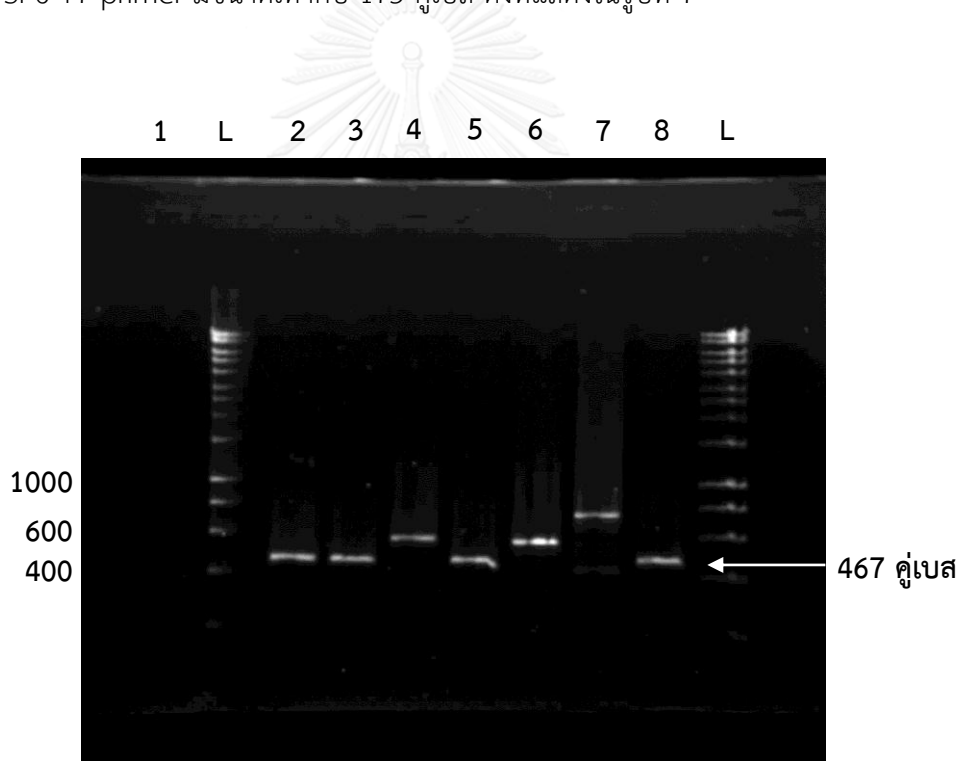
รูปที่ 6 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 1 คือผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แถวที่ 2 คือตัวควบคุมลบ

4.1.4 การโคลนยีน *fljD* เข้าสู่ pGEM[®]T-Easy vector

ผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกโคลนเข้าสู่ pGEM[®]T-Easy vector ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ถูกนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells และโคลนที่มีพลาสมิดที่มียีน *fljD* บรรจุอยู่ถูกคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white colony screening assay โดยโคลนดังกล่าวมีสีขาวภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น

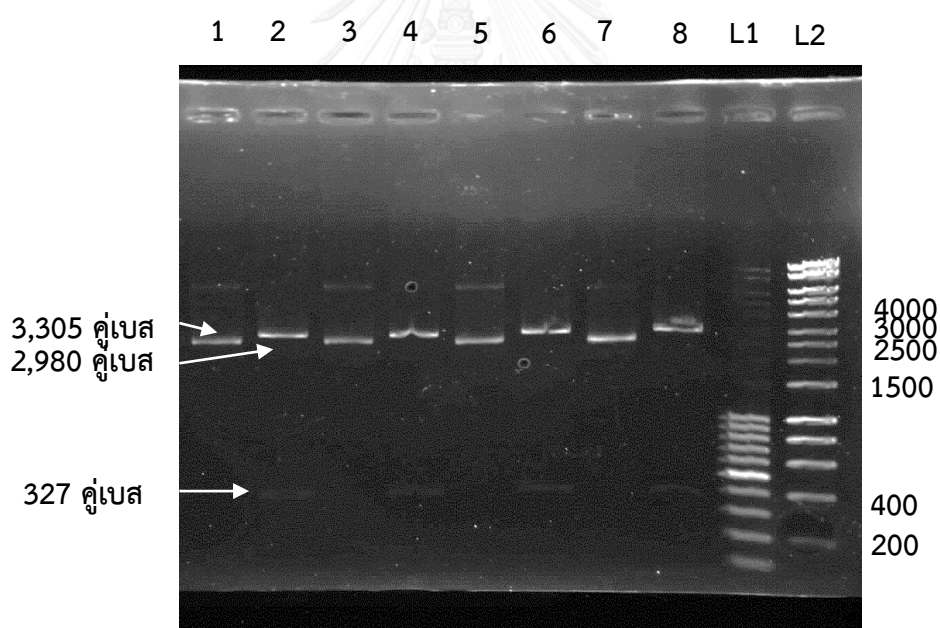
เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis

โคลนีสีขาวถูกเลือกมาจำนวน 7 โคลนและถูกกำหนดให้มีรหัส D1 ถึง D7 ตามลำดับ เพื่อนำมายืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter และทำปฏิกิริยา colony PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ตรวจสอบผลผลิต colony PCR บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พลาสมิด D1, D2, D4 และ D7 ที่มียีน *fliD* บรรจุอยู่พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต colony PCR ของยีน *fliD* มีขนาดเท่ากับ 467 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fliD* มีขนาดเท่ากับ 292 คู่เบสและลำดับเบสที่เกิดจาก SP6-T7 primer มีขนาดเท่ากับ 175 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter ตรวจสอบผลผลิต colony PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือตัวควบคุมลบ แถวที่ 2 ถึง 8 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิด D1 ถึง D7 ตามลำดับ

โคลนีสีขาวของพลาสมิด D1, D2, D4 และ D7 ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification ถูกนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี restriction enzyme analysis ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.8 และ 3.3.9 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พลาสมิดที่ได้มีขนาดเท่ากับ 3,307 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fliD* มีขนาดเท่ากับ 292 คู่เบส และพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ตามลำดับ ภายหลังจากการบ่มพลาสมิดร่วมกับเอนไซม์ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากพลาสมิด D1, D2, D4 และ D7 ได้แก่ แถบของยีน *fliD* มีขนาดเท่ากับ 327 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fliD* และลำดับเบสบางส่วนของพลาสมิดที่เกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* ขนาดเท่ากับ 292 และ 35 คู่เบส ตามลำดับ และแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 2,980 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 8

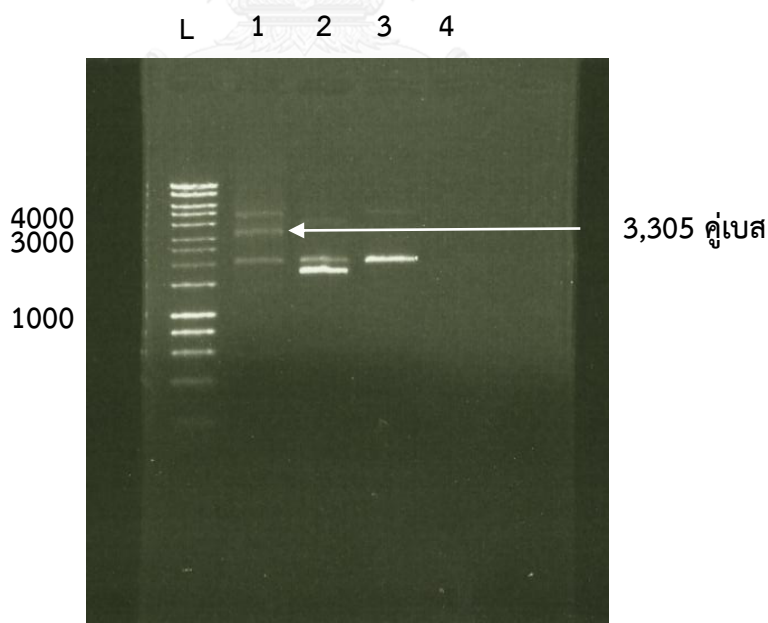


รูปที่ 8 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* เข้าสู่พลาสมิดภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และ 10 กิโลเบส ตามลำดับ แถวที่ 1, 3, 5 และ 7 คือพลาสมิด D1, D2, D4 และ D7 ตามลำดับ ที่บรรจุยีน *fliD* ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 คือ

ผลผลิต restriction enzyme analysis ของพลาสมิด D1, D2, D4 และ D7 ตามลำดับ ที่มียีน *fljD* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI*

4.1.5 การทำ inverse PCR mutagenesis

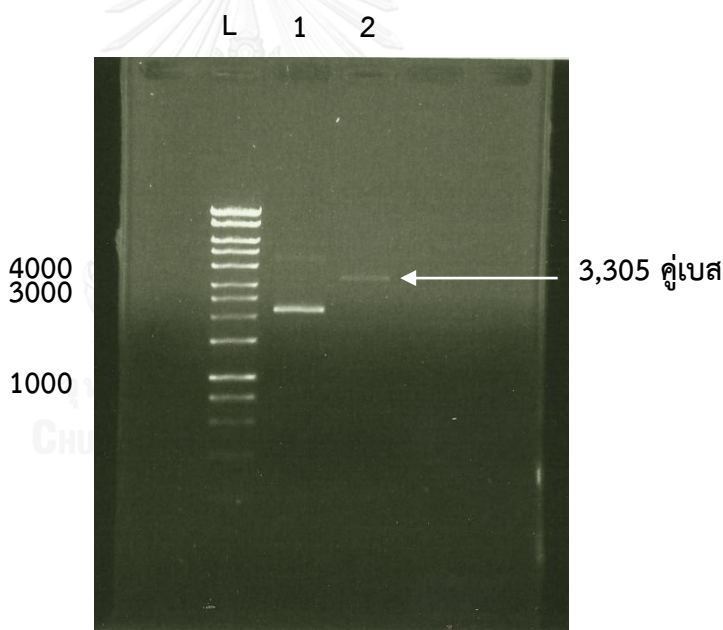
เลือกพลาสมิด D1, D2 และ D4 ที่บรรจุยีน *fljD* มาเข้าสู่กระบวนการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *fljD* ได้แก่ *InfljDF* primer และ *InfljDR* primer ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.10 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพบว่าผลผลิต inverse PCR mutagenesis มีลำดับเบสหายไปจำนวนทั้งสิ้น 18 คู่เบสและมีลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* ปรากฏอยู่บริเวณกลางยีน ณ ตำแหน่งที่ 101 ถึงตำแหน่งที่ 119 ตรวจสอบผลผลิต inverse PCR mutagenesis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบว่าพลาสมิด D1 มีแถบดีเอ็นเอของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ของยีน *fljD* มีขนาดเท่ากับ 3,305 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fljD* ที่กลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 290 คู่เบส และพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 9 จึงตั้งรหัสพลาสมิดดังกล่าวที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์ว่าพลาสมิด $\Delta D1$



รูปที่ 9 ผลผลิต inverse PCR mutagenesis จากการทำให้ยีน *fljD* กลายพันธุ์ ตรวจสอบผลผลิต inverse PCR mutagenesis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7

เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 ถึง 3 คือผลผลิต inverse PCR mutagenesis ของพลาสมิด D1, D2 และ D4 ตามลำดับ แถวที่ 4 คือตัวควบคุมลบ

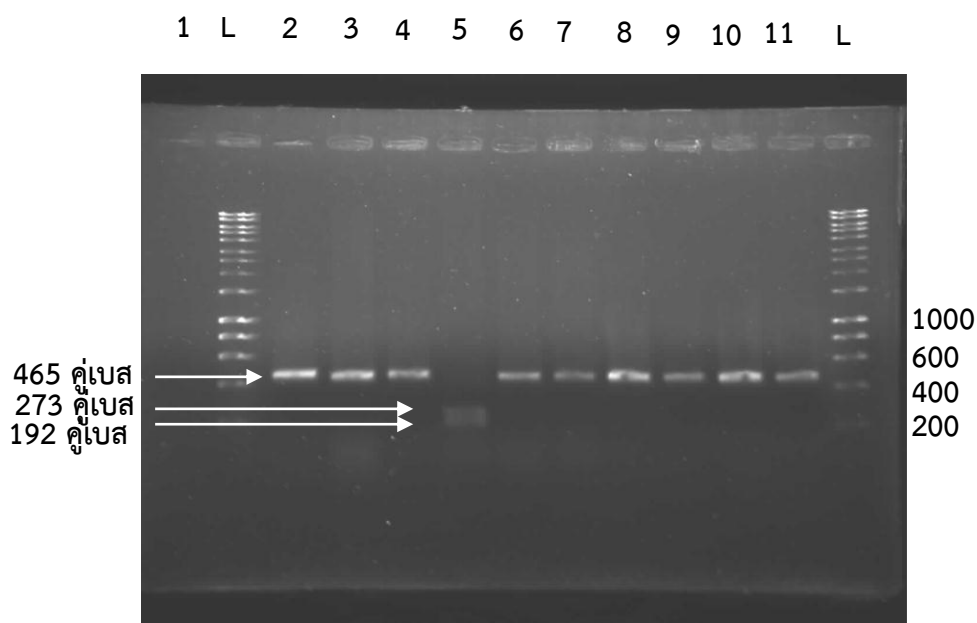
นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ของพลาสมิด $\Delta D1$ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III ความเข้มข้น 20 เท่า ในปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบชิ้นส่วนของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเทคนิค อิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ของยีน *fl*iD ที่กลายพันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III มีขนาดเท่ากับ 3,305 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fl*iD ที่กลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 290 คู่เบส และพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือพลาสมิด $\Delta D1$ ที่บรรจุยีน *fl*iD ที่กลายพันธุ์ ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III แถวที่ 2 คือผลผลิต restriction enzyme analysis ของพลาสมิด $\Delta D1$ ที่มียีน *fl*iD ที่กลายพันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III

นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III มาทำปฏิกิริยา self-ligation ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.10 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ผลผลิตจากปฏิกิริยา self-ligation ถูกนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells โคลนีนที่มีพลาสมิดที่มียีน *fliD* ภายพันธุ์บรรจุอยู่ถูกคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white colony screening assay โดยโคลนดังกล่าวมีสีขาวภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis

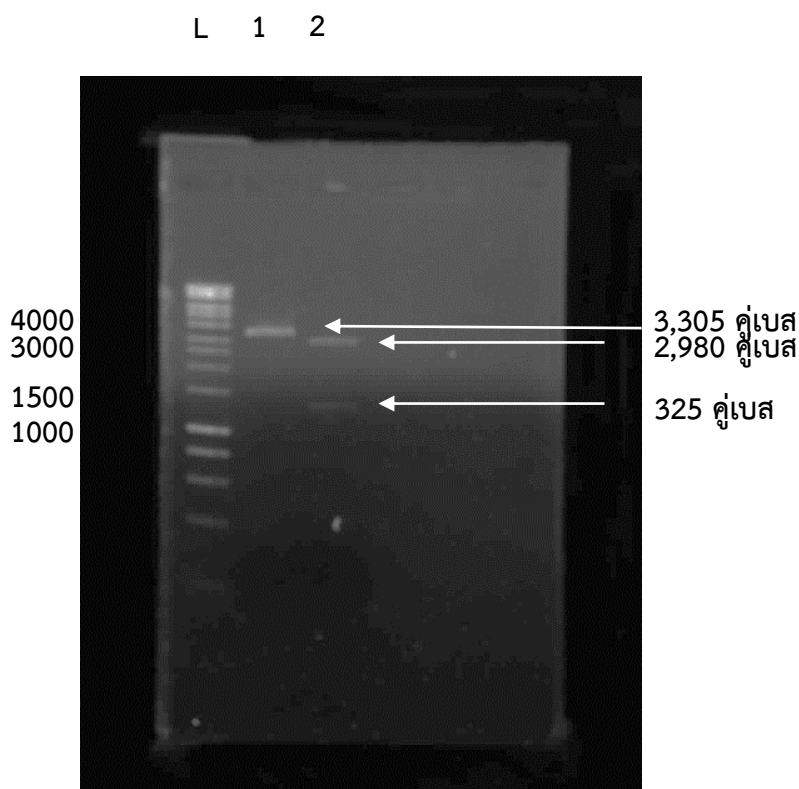
โคลนีสีขาวถูกเลือกมาจำนวน 5 โคลนีนและถูกกำหนดให้มีรหัส Δ D11 ถึง Δ D15 ตามลำดับ เพื่อนำมายืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter และทำปฏิกิริยา colony PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ผลผลิต colony PCR ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III เพื่อยืนยันตำแหน่งตัดจำเพาะดังกล่าว ตรวจสอบผลผลิต colony PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบว่าพลาสมิด Δ D12 มีแถบดีเอ็นเอของยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์ถูกตัดออกเป็น 2 แถบ ได้แก่ แถบที่มีขนาดเท่ากับ 192 และ 273 คู่เบส ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 ผลผลิต colony PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *fl*ID ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter ตรวจสอบผลผลิต colony PCR ด้วยเทคนิค อิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือตัวควบคุมลบ แถวที่ 2, 4, 6, 8, และ 10 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิด Δ D11 ถึง Δ D15 ตามลำดับที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III แถวที่ 3, 5, 7, 9, และ 11 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิด Δ D11 ถึง Δ D15 ตามลำดับที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III

โคลนนี้สีขาวของพลาสมิด Δ D12 ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fl*ID ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification ถูกนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี restriction enzyme analysis ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.8 และ 3.3.9 ของบทวิศดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พลาสมิดที่ได้มีขนาดเท่ากับ 3,305 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fl*ID มีขนาดเท่ากับ 290 คู่เบส และพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ตามลำดับ ภายหลังจากการบ่มพลาสมิดร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 2,980 คู่เบส และแถบของยีน

fljD ที่กลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 325 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fljD* ที่กลายพันธุ์และลำดับเบส บางส่วนของพลาสมิดที่เกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* ขนาด 290 และ 35 คู่เบส ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 12



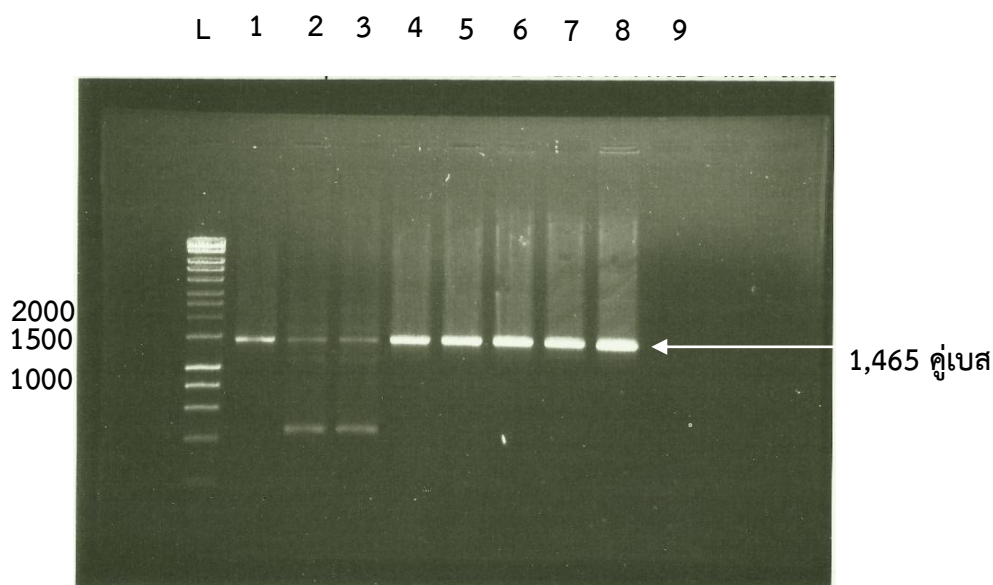
รูปที่ 12 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลน ยีน *fljD* ที่กลายพันธุ์เข้าสู่พลาสมิดภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* ตรวจสอบ ผลผลิต restriction enzyme analysis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือผลผลิต restriction enzyme analysis ของพลาสมิด $\Delta D12$ ที่มียีน *fljD* ที่กลายพันธุ์ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* แถวที่ 2 คือ พลาสมิด $\Delta D12$ ที่มียีน *fljD* ที่กลายพันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI*

4.1.6 การใส่ kanamycin resistance cassette เข้าสู่ยีน *fljD* ที่กลายพันธุ์

พลาสมิด $\Delta D12$ ที่มียีน *fljD* ที่กลายพันธุ์และได้รับการยืนยันด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII*

และนำมาทำปฏิกิริยา ligation กับ kanamycin resistance cassette ที่มีขนาดเท่ากับ 1,000 คู่เบส ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.11 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ถูกนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells โคลนที่มีพลาสมิดที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette บรรจุอยู่ถูกคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white colony screening assay โดยโคลนดังกล่าวมีสีขาวภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis

โคลนสีขาวถูกเลือกมาจำนวน 8 โคลนและถูกกำหนดให้มีรหัส $\Delta D121$ ถึง $\Delta D128$ ตามลำดับ เพื่อนำมายืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter และทำปฏิกิริยา colony PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ตรวจสอบผลผลิต colony PCR บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบว่าทุกพลาสมิดมีแถบดีเอ็นเอของยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette มีขนาดเท่ากับ 1,465 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 290 คู่เบส ลำดับเบสที่เกิดจาก SP6-T7 primer มีขนาดเท่ากับ 175 คู่เบสและ kanamycin resistance cassette มีขนาดเท่ากับ 1,000 คู่เบสดังที่แสดงในรูปที่ 13

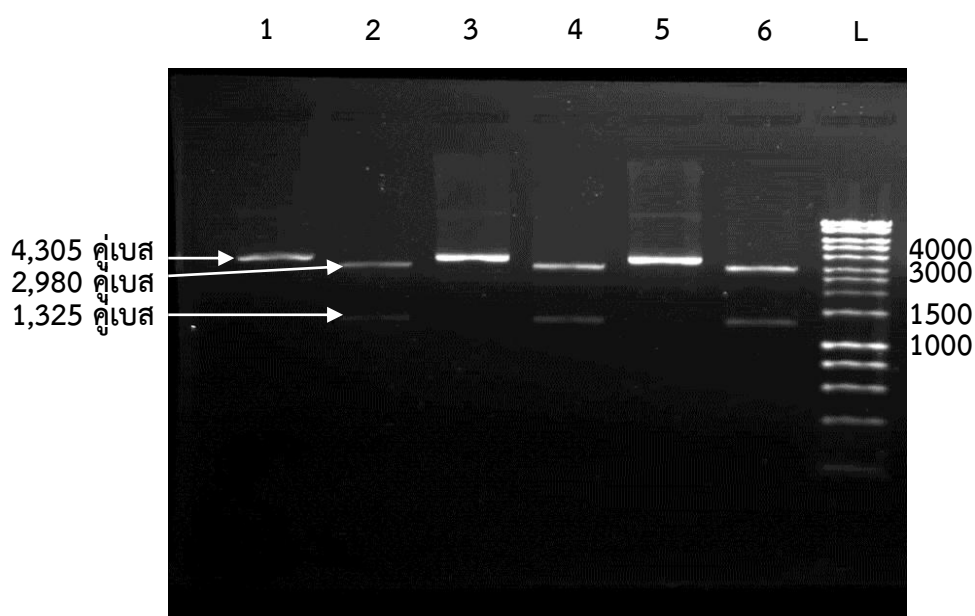


รูปที่ 13 ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter ตรวจสอบผลผลิต colony PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 ถึง 8 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิด $\Delta D121$ ถึง $\Delta D128$ ที่มียีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette ตามลำดับ แถวที่ 9 คือตัวควบคุมลบ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เลือกโคลนที่มีพลาสมิด $\Delta D124$, $\Delta D125$ และ $\Delta D127$ ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี restriction enzyme analysis ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.8 และ 3.3.9 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ภายหลังจากการบ่มพลาสมิดร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบว่าทุกพลาสมิดมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ได้แก่ แถบของยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette มีขนาดเท่ากับ 1,325 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์ ลำดับเบสบางส่วนของพลาสมิดที่เกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI*

และ kanamycin resistance cassette ขนาดเท่ากับ 290, 35, และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ และ แลบดีเอ็นเอของพลาสมิดมีขนาดเท่ากับ 2,980 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 14

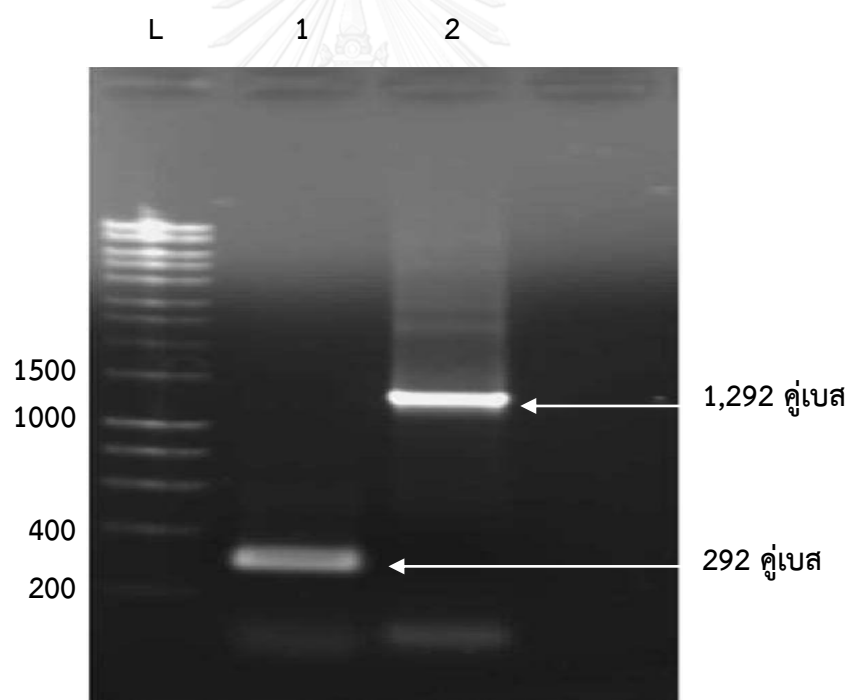


รูปที่ 14 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลน ยีน *fliD* ที่กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette เข้าสู่พลาสมิดหลังจากตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1, 3 และ 5 คือพลาสมิด $\Delta D124$, $\Delta D125$ และ $\Delta D127$ ตามลำดับที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* แถวที่ 2, 4 และ 6 คือผลผลิต restriction enzyme analysis ของพลาสมิด $\Delta D124$, $\Delta D125$ และ $\Delta D127$ ตามลำดับที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์และมี kanamycin resistance cassette ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI*

4.1.7 การนำพลาสมิดที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค natural transformation

เลือกพลาสมิด $\Delta D124$ ที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์นำมาโคลนเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค natural transformation ตามขั้นตอนใน ข้อ 3.3.12 ของบทวิศุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย โคลนินของเชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์

อยู่ภายในเซลล์ถูกคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่มีส่วนประกอบของ เลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ และมียา kanamycin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอ จากโคลนของเชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *flid* กลายพันธุ์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการยืนยัน ความสำเร็จของการทำ natural transformation ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *flid* ได้แก่ *flidF* primer และ *flidR* primer ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา PCR ตาม ขั้นตอนในข้อ 3.3.3 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ตรวจสอบผลผลิต PCR บนเจลอะกา โรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็น เอของผลผลิต PCR ของยีน *flid* ที่มีการกลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 1,290 คู่เบส ขณะที่ยีน *flid* ของ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีขนาดเท่ากับ 292 คู่เบส ดังที่แสดงในรูปที่ 15 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ในงานวิจัยนี้ถูกตั้งชื่อว่า VT124



รูปที่ 15 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *flid* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือผลผลิต PCR ของยีน *flid* เชื้อ *H. pylori*

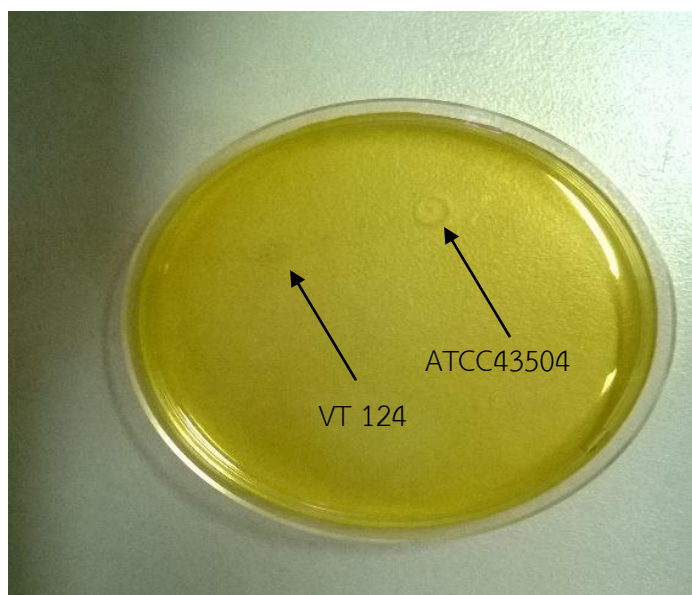
สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แถวที่ 2 คือผลผลิต PCR ของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* แถวที่ 3 คือตัวควบคุมลบ

4.1.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *fliD* ด้วยเทคนิค Sequencing

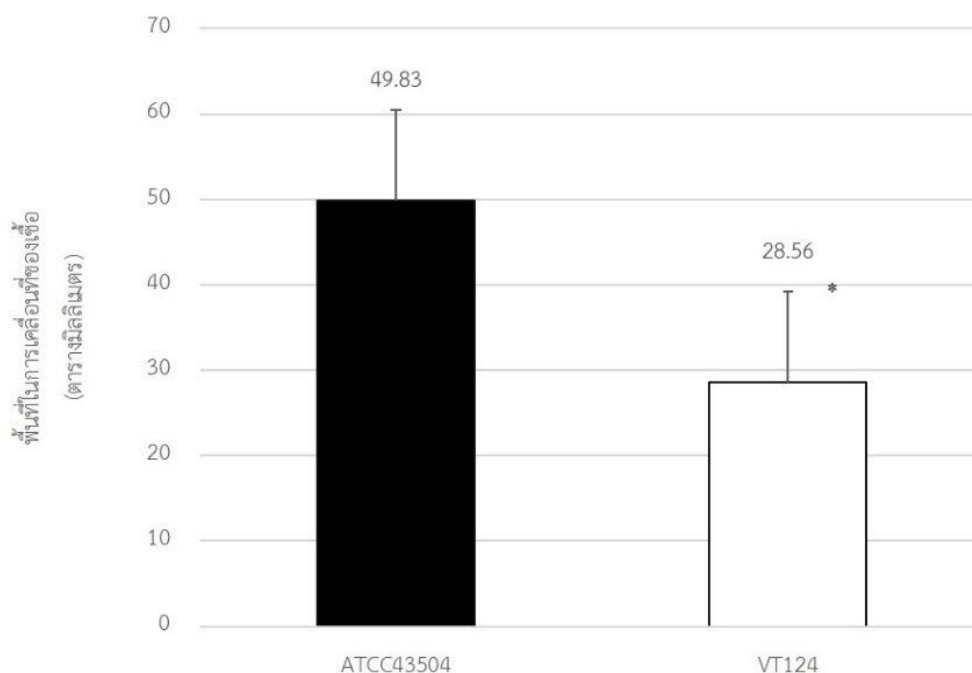
ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sequencing ซึ่งใช้วิธีของ Sanger โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ ผลจากเทคนิค Sequencing ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (GenBank accession number HP0752) (126) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน *fliD* ด้วยโปรแกรม Standard Nucleotide BLAST (129) ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีความสอดคล้องกับลำดับเบสอ้างอิงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ลำดับเบสของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีความสอดคล้องกับลำดับเบสอ้างอิงถึง 99 เปอร์เซ็นต์

4.2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD*

ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ต่อการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* โดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* soft agar ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจางตามขั้นตอนในข้อ 3.4 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ซึ่งสามารถสังเกตได้จากวงที่เกิดขึ้นจากการที่เชื้อเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้นบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 16) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงดังกล่าวเพื่อคำนวณขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ โดยมีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร ขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* เคลื่อนที่ได้สั้นกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value เท่ากับ 0.013) โดยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีค่าเฉลี่ยขนาดพื้นที่ของวงที่เชื้อเคลื่อนที่เท่ากับ 28.56 ตารางมิลลิเมตร ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยขนาดของพื้นที่ของวงที่เชื้อเคลื่อนที่เท่ากับ 48.83 ตารางมิลลิเมตร ดังที่แสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 16 การเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* วงที่เกิดขึ้นจากการเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้นบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella soft agar ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (VT124)

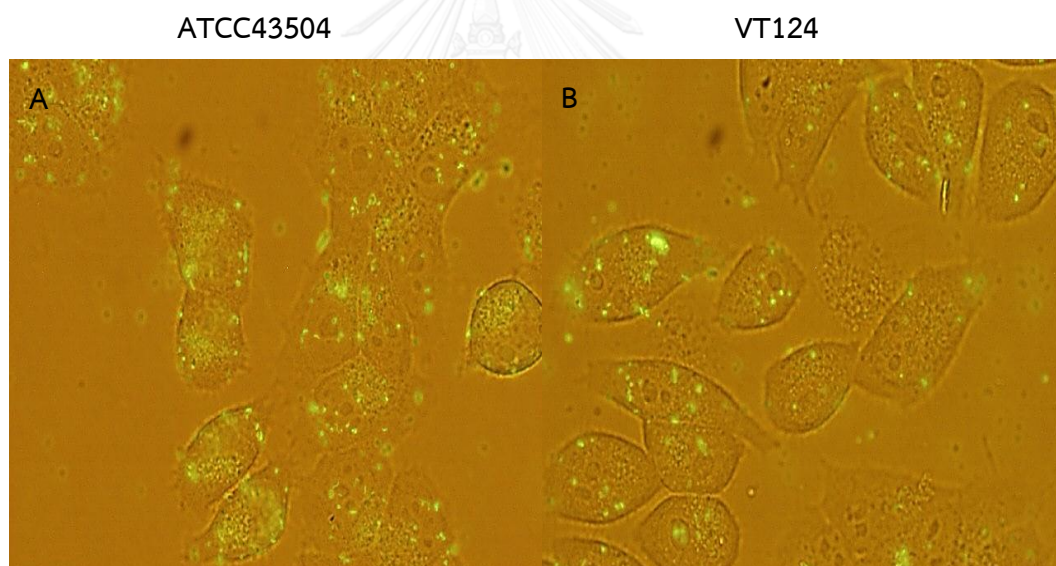


รูปที่ 17 ขนาดพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ค่าเฉลี่ยขนาดพื้นที่ของวงแปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ กราฟแท่งสีดำแสดงพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (VT124) พื้นที่ในการเคลื่อนที่ (ตารางมิลลิเมตร) คำนวณจากเส้นผ่าศูนย์กลางของวงที่สังเกตเห็น ขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ และนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย *หมายถึง p-value ที่ระดับ 0.013 ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

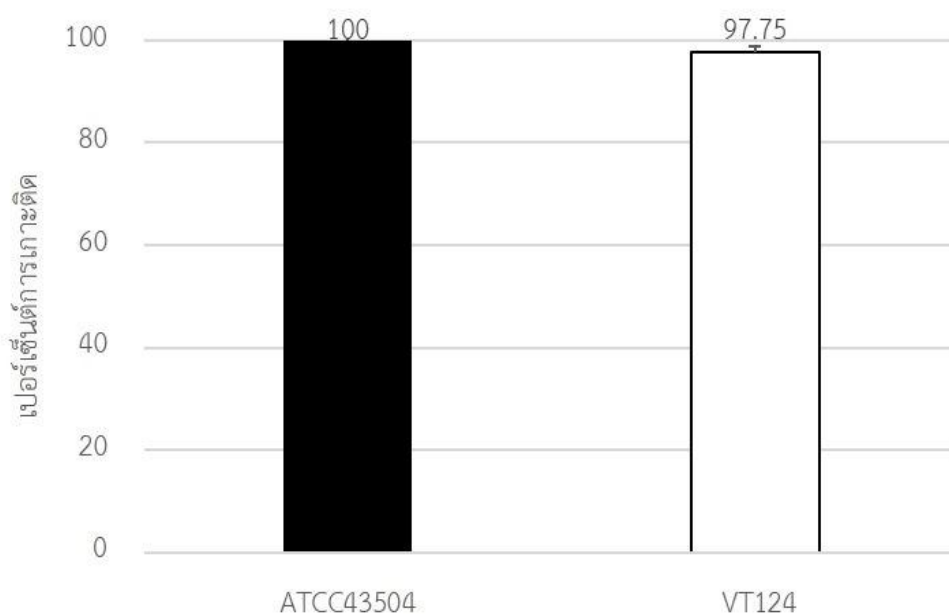
4.3 ความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD*

ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ต่อการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิตัวด้วย fluorescein isothiocyanate ร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 ตามขั้นตอนในข้อ 3.5 ของบทวิศดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิว

กล้องเสียง HEp-2 ได้และไม่สามารถเกาะบนบริเวณก้นหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ได้ (รูปที่ 18) วัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งแปรผันตรงกับจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะเซลล์เยื่อบุกช่องเสียง HEp-2 ค่าเฉลี่ยปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีค่าเท่ากับ 354.5 และในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเท่ากับ 390 นำค่าที่ได้จากการวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะโดยเทียบกับการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สามารถยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกช่องเสียง HEp-2 ไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (p-value มากกว่า 0.05) โดยที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะเท่ากับ 97.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 18 ภาพการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* จากกล้องฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 400 เท่า A: และ B: คือเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ตามลำดับ ที่ถูกย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate

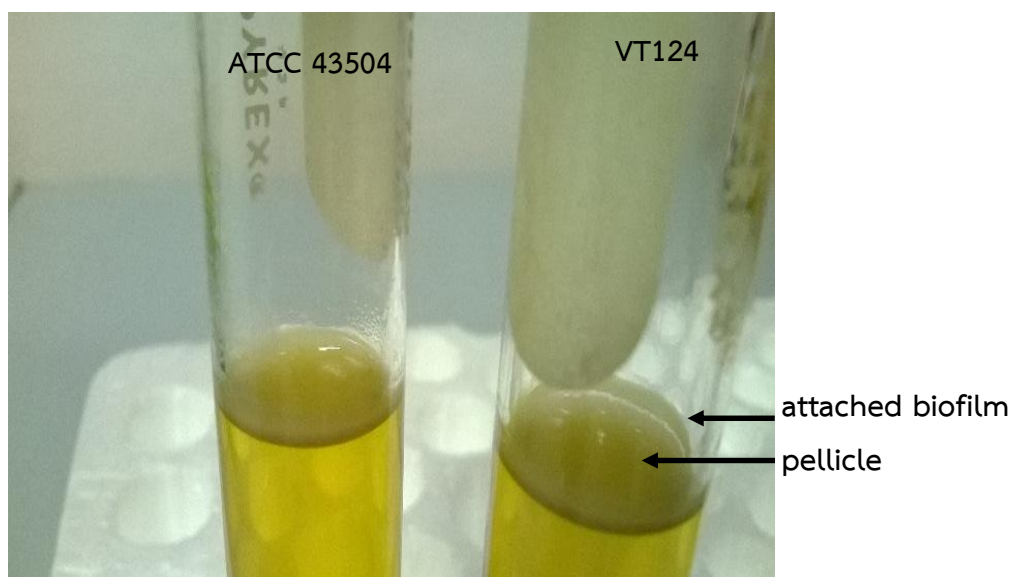


รูปที่ 19 การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* กราฟแท่งสีดำแสดงเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* (VT124) เปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* คำนวณจากค่าเฉลี่ยปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากตัวเชื้อโดยเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ และนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

4.4 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid*

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ด้วยเทคนิค pellicle assay ตามขั้นตอนในข้อ 3.6 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างไบโอฟิล์ม ณ บริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ (air-liquid interface) โดยพบไบโอฟิล์ม 2 ลักษณะ ได้แก่ pellicle ซึ่งหมายถึงไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่มลอยบนพื้นผิวของเหลวเชื้อ และ attached biofilm ซึ่ง

หมายถึงไบโอฟิล์มที่เกาะกับผิวแก้วด้านในหลอดทดลอง รูปที่ 20 แสดงไบโอฟิล์มทั้ง 2 ลักษณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* สร้างขึ้น โดยบันทึกภาพไบโอฟิล์ม ณ วันที่ 7 ของการบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 20 ลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ที่สร้างขึ้น ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay pellicle หมายถึงไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่มลอยบนพื้นผิวของเหลวบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ attached biofilm หมายถึงไบโอฟิล์มที่เกาะกับผิวแก้วด้านในหลอดทดลองบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ ATCC43504 คือเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 VT124 คือเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD*

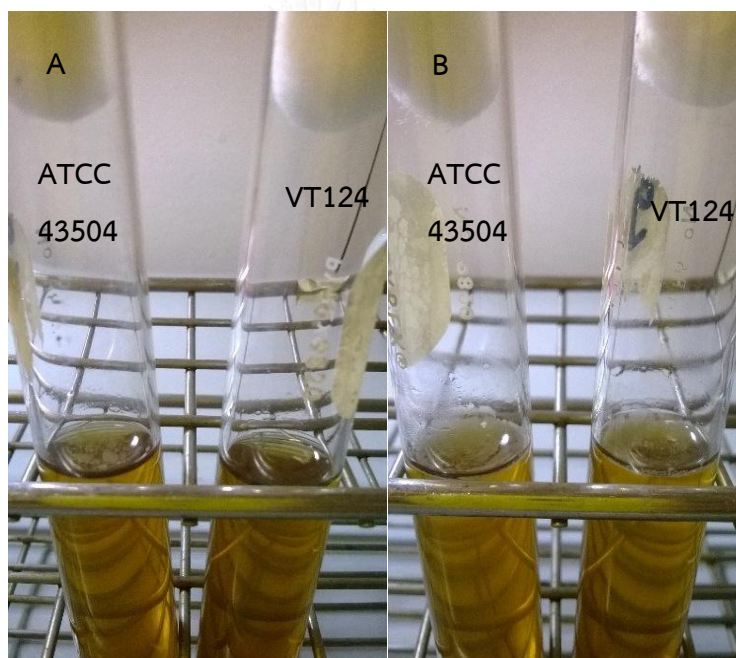
4.4.1 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* เมื่อศึกษาเชิงกึ่งปริมาณ

ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงกึ่งปริมาณโดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay วัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยสังเกตและบันทึกระดับไบโอฟิล์มทั้งใน

ลักษณะของ pellicle และ attached biofilm ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ตามขั้นตอนในข้อ 3.6.2 ของบทวัสดุและวิธีในการดำเนินงานวิจัย พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เริ่มสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 3 ของการบ่ม และสามารถสร้าง pellicle และ attached biofilm ที่สมบูรณ์ในวันที่ 4 ของการบ่ม (รูปที่ 21) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* เริ่มสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 4 ของการบ่ม ตารางที่ 4 แสดงระดับของไบโอฟิล์มทั้ง 2 ลักษณะที่บันทึกได้ในแต่ละวันของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสองสายพันธุ์

วันที่ 3

วันที่ 4



รูปที่ 21 pellicle และ attached biofilm ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ที่สร้างขึ้นในวันที่ 3 และ 4 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay A: และ B: คือไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* (VT124) ณ วันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ระดับของ pellicle และ attached biofilm ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ที่ถูกสังเกตุและบันทึกในแต่ละวัน รวมระยะเวลา 7 วันของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay

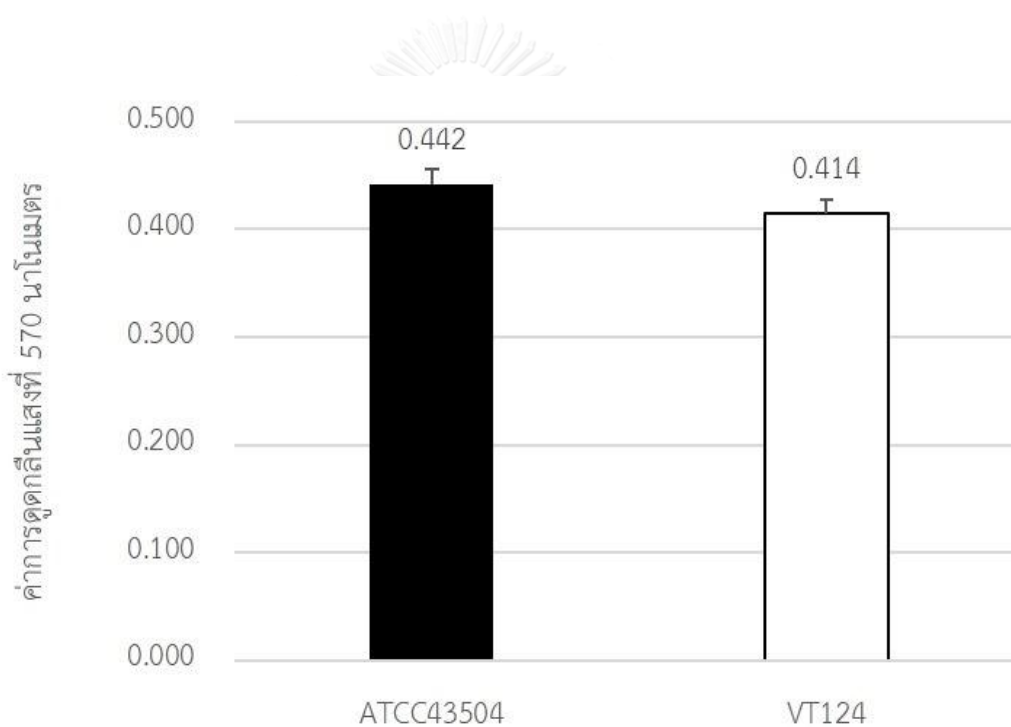
วันที่	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504		เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fliD</i>	
	pellicle	attached biofilm	pellicle	attached biofilm
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	+	-	-
4	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ (-) หมายถึงไม่สามารถสังเกตเห็นการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 รูปแบบดังที่กล่าวข้างต้น (+) หมายถึงพบการสร้าง pellicle หรือ attached biofilm เป็นเยื่อบางๆ (++) หมายถึงพบการสร้าง pellicle ปกคลุมบริเวณส่วนกลางของพื้นผิวของเหลวหรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดบาง (+++) หมายถึงพบการสร้าง pellicle ปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของเหลวหรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดหนา เกณฑ์ดังกล่าวอ้างอิงมาจากการงานวิจัยของ Pattiyathaneer ในปี ค.ศ. 2009 (22) การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

4.4.2 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* เมื่อศึกษาเชิงปริมาณ

ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณโดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังจากวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay วัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยการย้อม attached

biofilm ด้วยสี crystal violet และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ตามขั้นตอนในข้อ 3.6.3 ของบทวิธีและวิธีในการดำเนินงานวิจัย ค่าความเข้มของแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อคำนวณจากค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่เป็นแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (p-value มากกว่า 0.05) โดยที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีค่าเฉลี่ยปริมาณของไบโอฟิล์มที่วัดได้เท่ากับ 0.414 ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยปริมาณของไบโอฟิล์มที่วัดได้เท่ากับ 0.442 ดังที่แสดงในรูปที่ 22

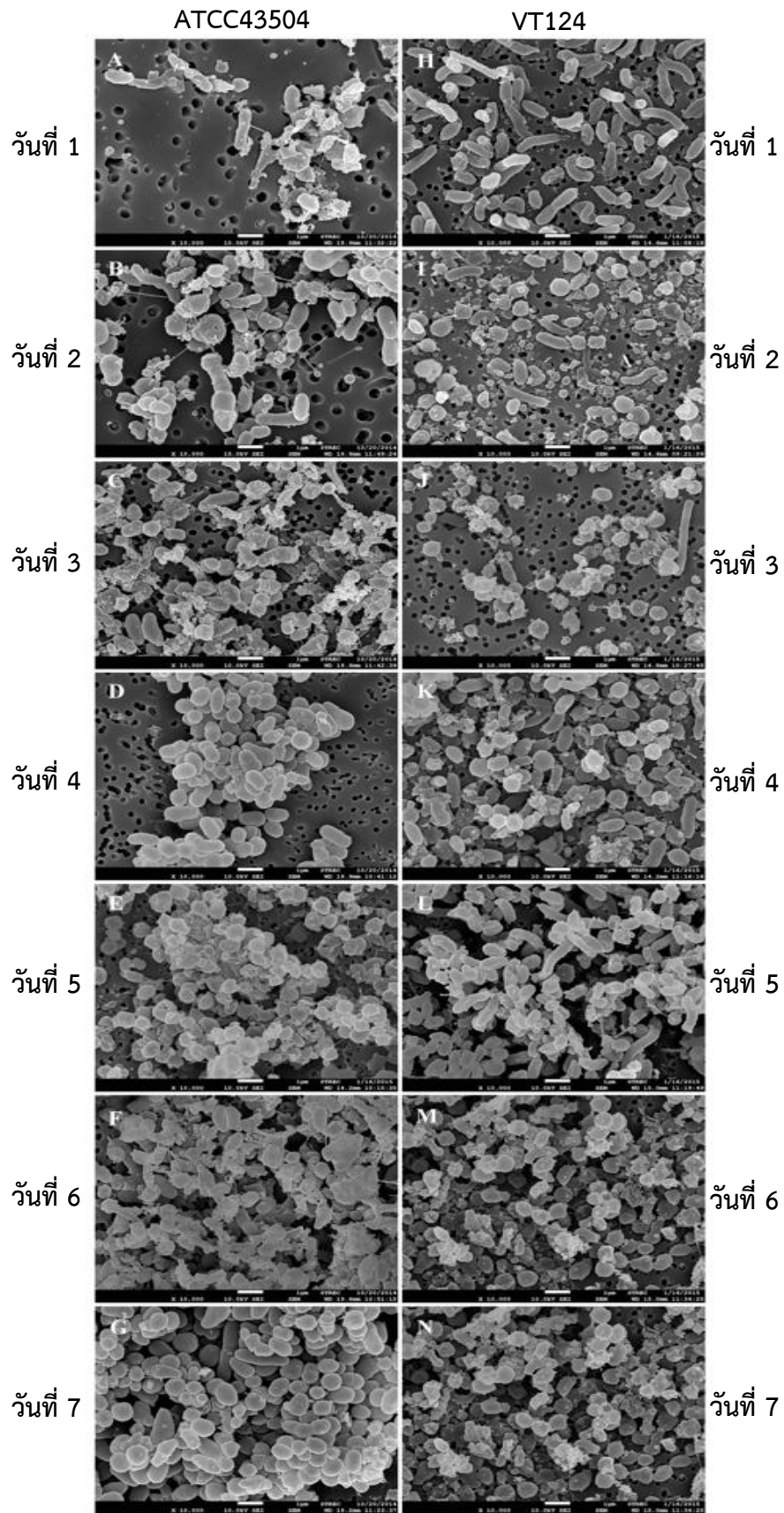


รูปที่ 22 ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* กราฟแท่งสีดำแสดงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* (VT124) ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อคำนวณจากค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่เป็นแบคทีเรีย การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ และนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

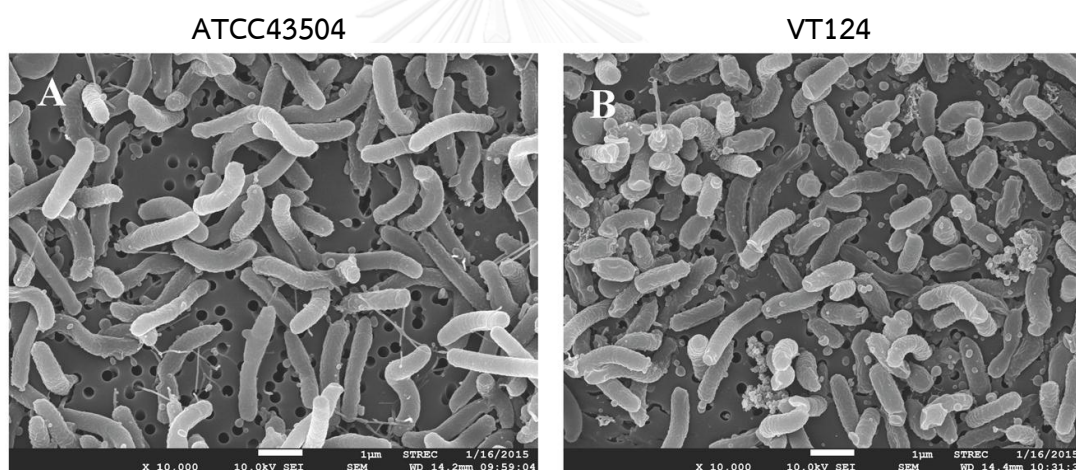
4.5 ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD*

ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ต่อลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay และเก็บ pellicle ของเชื้อที่สร้างขึ้นในแต่ละวัน ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการบ่มตามขั้นตอนในข้อ 3.7 ของบทวัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย โดยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถเก็บ pellicle ของวันที่ 3 ถึง 7 ของการบ่ม และสามารถเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระแทนการเก็บ pellicle ของวันที่ 1 และ 2 ของการบ่ม ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สามารถเก็บ pellicle ของวันที่ 4 ถึง 7 ของการบ่ม และสามารถเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระแทนการเก็บ pellicle ของวันที่ 1 ถึง 3 ของการบ่ม พบว่ารูปร่างของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (รูปที่ 23A ถึง 23G) และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* (รูปที่ 23H ถึง 23N) มีลักษณะเปลี่ยนจากรูปแท่งไปเป็นรูปกลมเมื่อไบโอฟิล์มมีอายุมากขึ้น เมื่อสังเกตลักษณะโครงสร้างสามมิติของเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ไม่พบลักษณะโครงสร้างของไบโอฟิล์มในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 23A และ 23B และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ไม่พบลักษณะโครงสร้างของไบโอฟิล์มในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 23H ถึง 23J โดยเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เก็บมาศึกษา ณ วันดังกล่าวเป็นเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระ

ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มสามารถพบได้ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 23C และ 23G โดยเชื้อมีรูปร่างกลมและเกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่นภายใต้โครงสร้างของ extracellular matrix ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียด และมีความหนาแน่นของโครงสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อไบโอฟิล์มมีอายุมากขึ้น ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มที่แตกต่างออกไป กล่าวคือเชื้อมีรูปร่างกลมเกาะเป็นกลุ่มหลวมอยู่แบบกระจายและมีปริมาณเส้นใยที่เชื่อมต่อกันแต่ละเซลล์ที่น้อยกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ดังแสดงในรูปที่ 23K และ 23N นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างสามมิติของรูปร่างเซลล์จากโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* ที่มีอายุ 3 วันทั้งสองสายพันธุ์ โดยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีเซลล์ที่เป็นแท่งยาวและมีแฟลเจลลาเป็นสายยาวจำนวนมาก (รูปที่ 24A) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีเซลล์ที่เป็นแท่งสั้นและมีแฟลเจลลาเป็นสายสั้น (รูปที่ 24B)



รูปที่ 23 ภาพสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ในช่วงระยะเวลาต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า A: และ B: คือเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ณ วันที่ 1 และวันที่ 2 ตามลำดับ C: ถึง G: คือ pellicle ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ณ วันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ตามลำดับ H: ถึง J: คือเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ณ วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ตามลำดับ K: ถึง N: คือ pellicle ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ณ วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ตามลำดับ ขนาดของวัตถุที่เห็นในภาพเทียบได้กับสเกล (bars) ขนาด 1 ไมครอน



รูปที่ 24 ภาพสามมิติของรูปร่างเซลล์จากโคลนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ที่มีอายุ 3 วันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า A: และ B: คือเซลล์จากโคลนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ที่มีอายุ 3 วันตามลำดับ ขนาดของวัตถุที่เห็นในภาพเทียบได้กับสเกล (bars) ขนาด 1 ไมครอน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมมักอาศัยอยู่ร่วมกันกับจุลินทรีย์อื่นๆ ในโครงสร้างที่เรียกว่าไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความซับซ้อน สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวต่างๆ ที่เหมาะสม และสร้างสารที่เรียกว่า exopolysacchhalide ขึ้นมาเพื่อปกคลุมเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มเหล่านั้น (12) ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ตรงเคียดต่างๆ เช่น ในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ถูกสร้างจากเซลล์ฟาโกไซต นอกจากนี้การสร้างไบโอฟิล์มยังสามารถป้องกันตัวเชื้อจากการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะและทำให้การรักษาการติดเชื้อเป็นไปได้ยากขึ้น (12, 17, 18) การที่เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในขณะที่อยู่ในร่างกายของมนุษย์ (12-16) ก่อให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังหรือการรักษาที่ล้มเหลวตามมา (15) ไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการแพร่กระจายเชื้อมาสู่คน มีรายงานพบไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในแหล่งน้ำทั่วไปตามธรรมชาติ รวมถึงในระบบการจัดการน้ำประปาและน้ำดื่ม (13, 131, 132) โดยพบไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เกาะอยู่ภายในท่อที่ใช้สำหรับขนส่งน้ำดื่ม (132) ดังนั้นการดื่มน้ำที่ปนเปื้อนไบโอฟิล์มของเชื้ออาจก่อให้เกิดการติดเชื้อ *H. pylori* ได้

ขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมถึงเชื้อ *H. pylori* มีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือเริ่มจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยอาจเป็นกระบวนการที่ผันกลับได้หรือผันกลับไม่ได้ จากนั้นแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นเพื่อสร้างเป็นโคโลนีขนาดเล็กจำนวนมากภายในไบโอฟิล์ม ซึ่งการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวภายในไบโอฟิล์มหรือเข้าการยึดเกาะเพิ่มเติมของเชื้อแบคทีเรียอิสระจากภายนอกไบโอฟิล์มสามารถทำให้เกิดการเจริญของโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียยังสามารถแยกตัวออกจากไบโอฟิล์มเดิมและสร้างไบโอฟิล์มใหม่ที่ตำแหน่งอื่นๆ โดยขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น แหล่งอาหารหรือพื้นที่ผิวในการยึดเกาะที่เหมาะสมกับตัวเชื้อ (63, 66) ปัจจุบันมีการค้นพบและอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลซึ่งควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ อาทิเช่น การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ถูกควบคุมโดย *icaADBC* operon ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์สาร poly N-acetylglucosamine (PIA/PNAG) ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีความจำเป็นของไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าว (133-135) ขณะที่การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholera* ถูกควบคุมโดยระบบ quorum sensing ทำให้เกิดการ

แสดงออกของยีนต่างๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์ exopolysacchhalide อาทิเช่น ยีน *hapR* และยีน *vpsR* (136) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยังมีจำกัดและไม่สามารถนำมาอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน

ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ เป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (14, 88, 137) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแฟลเจลลาไม่เพียงแต่มีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยในการสัมผัสกับพื้นผิวทำให้เกิดการยึดเกาะระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิวนั้นๆ (7) โปรตีน flagellin เป็นโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะหรือที่รู้จักกันในชื่อของโปรตีน adhesin ที่สำคัญชนิดหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อหุ้มของลำไส้ (6) พบว่าแฟลเจลลามีส่วนช่วยในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียในบางสายพันธุ์ อาทิเช่น เชื้อ *Vibrio* spp. (7) เชื้อ *E. coli* (8) และเชื้อ *Aeromonas* spp. (9) ในเชื้อ *H. pylori* พบว่าภายหลังจากการวิเคราะห์แยกโปรตีนของเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับเชื้อในสภาวะที่ลอยอยู่อย่างอิสระ พบโปรตีน Flid มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม (22) ด้วยเหตุผลทั้งหมดดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการศึกษาบทบาทของยีน *flid* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในครั้งนี้

โปรตีน Flid เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะกับเชื้อ *H. pylori* มากถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างจากโปรตีน Flid ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งในระดับพันธุกรรมและระดับโปรตีน โปรตีน Flid ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวแทนโปรตีนในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay จากการศึกษาพบว่าการใช้โปรตีน Flid เป็นตัวชี้วัดในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. pylori* มีความจำเพาะและความไวมากกว่า 99 และ 97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (138) โปรตีน Flid มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะกับเชื้อ *C. jejuni* มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์และสามารถพบแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวในซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อ (139) โปรตีน Flid จึงเป็นตัวแทนโปรตีนที่มีความสำคัญในการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *C. jejuni* ในไก่ที่ยังไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน (139) เนื่องจากมีการศึกษาการให้วัคซีนที่มีแอนติเจนของเชื้อ *C. jejuni* ในไก่ที่ยังไม่ติดเชื้อพบว่าสามารถป้องกันการอยู่อาศัยของเชื้อ *C. jejuni* ภายในลำไส้ของไก่ภายหลังจากได้รับวัคซีน (140)

ในการศึกษานี้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *flid* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis โดยเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วสำหรับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา โดยสามารถกำหนดตำแหน่งของลำดับเบสที่ต้องการให้หายไปและยังสามารถเพิ่มลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะไปยัง

ตำแหน่งที่ต้องการบนดีเอ็นเอได้ (141) เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับ allelic recombination แล้วทำให้ได้ เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ตามลักษณะที่ต้องการและสามารถใช้ได้กับเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและ แกรมลบ (142) งานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้เทคนิค inverse PCR mutagenesis ร่วมกับ allelic recombination เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ อาทิเช่น เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (133) เชื้อ *Yersinia enterocolitica* (141) เชื้อ *E. coli* (143) เชื้อ *L. monocytogenes* (88) และเชื้อ *P. aeruginosa* (144) เป็นต้น การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้ เทคนิค natural transformation ในการนำพลาสมิดที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถึงแม้เทคนิคดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเทคนิค electroporation (145) แต่เทคนิค natural transformation ไม่ทำลายเซลล์ของเชื้อและไม่ส่งผล ให้เชื้อตาย (146)

ยีน *fliD* มีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโปรตีน Flid หรือโปรตีน HAP2 มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า flagellar capping protein หุ้มอยู่บริเวณส่วนปลายสุดของเส้นแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย (19) โปรตีน Flid มีความสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน flagellin ก่อให้เกิด เรียงตัวกันเป็นสายพิวลาเมนต์ที่สมบูรณ์ในการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย (20) เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ไม่สามารถสร้างโปรตีน Flid และสังเคราะห์โปรตีน flagellin ได้ จึงทำให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ (147, 148) ขณะที่เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* พบว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้แต่มีอัตราที่ช้าลง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว (149) ในปี ค.ศ. 1999 Kim และคณะ (19) ได้ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* ในการควบคุมการเคลื่อนที่และการอยู่ อาศัยในชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหาร พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีแฟลเจลลาที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ กล่าวคือมีแฟลเจลลาที่สั้นลงและกระเปราะที่อยู่ตรงส่วน ปลายของแฟลเจลลาหายไปส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (19) นอกจากนี้แฟลเจลลาของเชื้อ *C. sakazakii* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีลักษณะของกระเปราะสั้นลงและพบชิ้นส่วนของแฟล เจลลาที่ขาดออกจากกัน (125) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ ของยีน *fliD* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ แบบส่องกราดแสดงให้เห็นถึงแฟลเจลลาของเชื้อที่มีขนาดสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่เชื้อไม่สามารถผลิตโปรตีน Flid ทำให้มี ผลต่อกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน flagellin และเกิดการเรียงตัวของสายพิวลาเมนต์ที่ไม่ สมบูรณ์ในการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย (20)

นอกจากหน้าที่ในการเคลื่อนที่แล้ว ยีน *fliD* ยังมีส่วนช่วยในการยึดเกาะของเชื้อ *P. aeruginosa* บนเยื่อเมือกเสมหะของมนุษย์ และเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ส่งผลให้เชื้อดังกล่าวไม่สามารถยึดเกาะบนชั้นเยื่อเมือกได้ (122) โปรตีน FliD เป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารของโฮสต์ของเชื้อ *H. pylori* (19) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ข้อมูลจากการศึกษาในหลอดทดลองที่ผ่านมาของเชื้อ *C. difficile* ที่มียีน *fliD* กลายพันธุ์ พบว่าเชื้อดังกล่าวยังสามารถยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวเซลล์ลำไส้ได้ดีขึ้น (123) โดยอาจเกิดจากการที่เชื้อเคลื่อนที่ได้ช้าลงเนื่องมาจากการสร้างแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ จึงมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์เยื่อบุผิวได้นานขึ้นและสามารถยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผิวนั้นได้ (150) ในทางกลับกันการศึกษาในสัตว์ทดลองกลับพบว่าโปรตีน FliD ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะบริเวณลำไส้ของหนูแฮมสเตอร์ เนื่องจากพบว่าเชื้อ *C. difficile* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* และเชื้อสายพันธุ์ปกติสามารถยึดเกาะบริเวณลำไส้ได้ไม่แตกต่างกัน (150) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้โปรตีน FliD ของเชื้อ *H. pylori* อาจไม่มีผลต่อการช่วยยึดเกาะกับพื้นผิวของเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ในปี ค.ศ. 2000 Clyne และคณะได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* กับการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ/หรือ *flaB* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน flagellin ยังสามารถยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารได้ (151) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pattiyathane ในปี ค.ศ. 2009 ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ของเชื้อ *H. pylori* ไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาการยึดเกาะของเชื้อบนเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 (22) ในทางตรงกันข้ามเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaB* ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แฟลเจลลา มีความสามารถในการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารของมนุษย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (151) นอกจากนี้การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง อาจถูกควบคุมด้วยยีน *fliQ* และพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *fliQ* ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการสร้างแฟลเจลลาและการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* (111) ส่งผลให้การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* บนเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 (22) และ เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร AGS (111) ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวของเชื้อ *H. pylori* ในครั้งนี้ใช้เซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 เป็นโมเดลในการศึกษา เนื่องจากมีข้อมูลพบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถยึดเกาะบนเซลล์ดังกล่าวได้มากกว่าและนานกว่าการยึดเกาะบนเซลล์โมเดลอื่นๆ ได้แก่ เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร AGS เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร MKN-45 และเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร AZ-521 เนื่องจากเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 มี receptor ที่จำเพาะต่อเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* มากกว่าในเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารดังกล่าวทั้งหมด (152)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในหลอดทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่สามารถพบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคดังกล่าว (10, 23) รูปแบบของไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นสามารถพบได้ทั้ง pellicle และ attached biofilm โดยเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ (10, 22) ลักษณะของ pellicle ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศสามารถพบได้ในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. jejuni* (23) เชื้อ *B. subtilis* (93) เชื้อ *Shewanella oneidensis* (153) เชื้อ *P. aeruginosa* (154) เชื้อ *Salmonella enterica* (155) และเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (156) การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยังสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มให้ยึดเกาะบนแผ่นสไลด์แก้ว ซึ่งถูกวางในงานพลาสติกชนิด polystyrene เทคนิคดังกล่าวใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay โดยสามารถพบไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่ภายในวันที่ 5 วันของการบ่ม (14, 22) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มบนแผ่นสไลด์แก้วต้องมีการเตรียมอุปกรณ์ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยากกว่าเทคนิค pellicle assay (22) โมเดลอื่นๆ ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การสร้างไบโอฟิล์มบนเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมของมนุษย์โดยเชื้อ *Neisseria meningitidis* (157) และการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* โดยเชื้อ *Yersinia pseudotuberculosis* (158)

ยีน *fliD* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าในช่วงเริ่มต้นของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* มีการแสดงออกของยีน *fliD* มากขึ้น (124) ขณะที่เชื้อ *C. sakazakii* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ภายหลังจากวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet (18) นอกจากนี้ยีน *fliD* แล้ว ยีนอื่นๆ ที่อยู่บน *fliD* operon ได้แก่ ยีน *flaG* และยีน *fliS* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์เช่นกัน พบว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวทั้งสองส่งผลให้เชื้อ *C. jejuni* สร้าง pellicle ได้ลดลง (23, 159) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของยีน *fliS* กลับส่งผลให้เชื้อ *Y. pseudotuberculosis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้นบนพื้นผิวของหนอนตัวกลม (158) เมื่อศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เปรียบเทียบปริมาณโดยสังเกตลักษณะไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ได้แก่ pellicle และ attached biofilm ด้วยเทคนิค pellicle assay พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* สร้างไบโอฟิล์มทั้งสองลักษณะช้ากว่าเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 1 วัน โดยเริ่มสังเกตเห็นการสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เริ่มสังเกตเห็นลักษณะ

ไบโอฟิล์มทั้งสองในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เหตุการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับกรณีการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. jejuni* ที่ยื่นแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *fliA* ยีน *flaA* ยีน *flaB* และยีน *flaG* ถูกยับยั้งการทำงาน พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้าง pellicle ได้แต่เริ่มมีการสร้างที่ช้ากว่าเชื้อ *C. jejuni* สายพันธุ์ปกติ (24) เช่นเดียวกับเชื้อ *B. subtilis* ที่มียื่นแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *ccpA* ยีน *codY* ยีน *sigD* และยีน *sinR* ที่กลายพันธุ์ พบว่าเชื้อดังกล่าวสร้าง pellicle ได้ช้ากว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ (160)

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เจริญปริมาณด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลองครบ 7 วัน พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ในเชื้อ *L. monocytogenes* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *luxS* สามารถสร้างไบโอฟิล์มที่มีความแข็งแรงและสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวแก้วได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ (88) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *luxS* ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับที่สูงขึ้น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ (14) จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่ยีน *luxS* ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อาจทำหน้าที่คล้ายกันในการยับยั้งการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์ม นอกจากนี้เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fucT* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมน้ำตาล fucose บน lipooligosaccharide ของแอนติเจน Lewis (161) และยีน *cagE* ยังสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวแก้วได้ดีและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในระดับที่สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ (14) ขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *clpA* ยีน *ppk* และยีน *hpaA* ทำให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ (14) การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างยีน *flgR* ยีน *fliQ* และยีน *flaA* ซึ่งเป็นยื่นแฟลเจลลา กับความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flgR* ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* สร้างไบโอฟิล์มลดลง ขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *fliQ* และยีน *flaA* ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าว (22) แม้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* จะไม่มีผลต่อปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีนดังกล่าวอาจมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่ช้าลงเนื่องมาจากการสร้างสายพิลามেন্টของแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์ (20)

การวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีเทคโนโลยีขั้นสูง และยังเป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำสูง (162) สีย้อม crystal violet เป็นสีที่มีประจุบวกซึ่งจะจับกับประจุลบของพื้นผิวของโมเลกุลต่างๆ รวมถึงน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ extracellular matrix ของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่ (162) อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น เชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตและไม่มีชีวิตสามารถย้อมติดสีชนิดนี้ทำให้ไม่สามารถคัดแยก

ความแตกต่างระหว่างเชื้อดังกล่าวในไบโอฟิล์มได้ (163) นอกจากนี้การวัดปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคอื่นๆ ได้แก่เทคนิค MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (14) เทคนิค XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]-reduction assay (162) เทคนิค resazurin assay (163) สี SYTO[®] 9 (164) สี fluorescein diacetate (FDA) (164) และสี 1,9-dimethyl methylene blue (DMMB) (163)

การศึกษาวិเคราะห์ทางโปรตีนโอมิกส์ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชักนำทางเคมีและการเคลื่อนที่ที่แสดงออกมากขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญในสภาวะไบโอฟิล์ม ทั้งโปรตีน FlaA ที่พบในเชื้อ *C. jejuni* (159) หรือโปรตีน FlgL และโปรตีน FlgE ที่พบในเชื้อ *Shewanella livingstonensis* ที่อาศัยอยู่ในสภาวะที่มีความหนาแน่นซึ่งไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั่วไป (165) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* เมื่อดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มพบการแสดงออกที่มากขึ้นของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ โปรตีน FlgL (flagellar hook-associated protein 3) โปรตีน FlgE (flagellar hook protein) โปรตีน FlaA (flagellinA) โปรตีน FlgD (flagellar hook assembly protein) รวมถึงโปรตีน Flid (flagellar capping protein) (22) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาบทบาทของโปรตีนหรือยีนที่เกี่ยวข้องดังกล่าวต่อความสัมพันธ์ในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดถูกนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ อาทิเช่น เชื้อ *C. jejuni* (159) เชื้อ *Streptococcus mutans* (166) เชื้อ *P. aeruginosa* (167) เชื้อ *S. epidermidis* (168) และเชื้อ *E. coli* (169) เป็นต้น เนื่องจากเป็นกล้องที่มีความละเอียดและกำลังขยายสูง (166) ผลของการศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* และสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นถึงลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เรียงตัวเกาะกลุ่มกันอยู่ในไบโอฟิล์มและถูกปกคลุมด้วย extracellular matrix เชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียด ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญของโครงสร้างไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่ (14) ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (22, 170) การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* มีลักษณะคล้ายกับการสร้างไบโอฟิล์มที่พบในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น กล่าวคือเชื้อที่อยู่อย่างอิสระเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิวและมีการเพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มก้อนจนกลายเป็นโคโลนีขนาดเล็กและสร้างเป็นไบโอฟิล์มที่มีลักษณะเป็นโครงสร้างสามมิติ (22) แบคทีเรียที่อยู่ในโคโลนีของไบโอฟิล์มที่พบมีลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงจากรูปร่างแท่งเป็นรูปร่างกลม โดยเฉพาะอย่างยิ่งไบโอฟิล์มที่มีอายุมากขึ้นจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างกลมจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับแบคทีเรียในไบโอฟิล์มที่มีอายุน้อย การเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าวอาจสัมพันธ์กับการที่แบคทีเรียปรับเข้าสู่สภาวะหยุดเจริญเติบโตชั่วคราว (170) ซึ่งเป็นสภาวะของเชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตแต่ไม่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้เนื่องจากเชื้อหยุดปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมต่างๆ ทำให้หยุดการเจริญเติบโต ทั้งนี้สภาวะดังกล่าวมีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น (171) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายสายพันธุ์สามารถดำรงอยู่ในสภาวะหยุดเจริญเติบโตชั่วคราว (170) ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ การขาดสารอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษ (172) เชื้อแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าว ได้แก่ เชื้อ *Campylobacter* spp. เชื้อ *E. coli* เชื้อ *Francisella tularensis* เชื้อ *H. pylori* เชื้อ *Legionella pneumophila* เชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เชื้อ *P. aeruginosa* เชื้อ *Salmonella* spp. เชื้อ *Shigella* spp. เชื้อ *V. cholera* เชื้อ *V. parahaemolyticus* และเชื้อ *Vibrio vulnificus* (172) โดยมีการสันนิษฐานว่าเชื้อที่ดำรงอยู่ในสภาวะหยุดเจริญเติบโตชั่วคราวอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (172)

ในขณะที่กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ตามที่ได้อธิบายข้างต้น ในทางตรงกันข้ามการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในระดับเซลล์ กล่าวคือเซลล์ของเชื้อมีการเกาะกลุ่มกันแบบหลวมๆ ถูกปกคลุมด้วย extracellular matrix ที่ไม่หนาแน่น และเชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียดจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีการศึกษาพบว่าโปรตีน EspE ที่ควบคุมการสร้าง extracellular polymeric substance ของเชื้อ *Bacillus subtilis* มีหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเชื้อเช่นกัน โดยเมื่อเชื้อดังกล่าวมีการสร้าง extracellular polymeric substance เพื่อใช้ในการสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อจะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจาก rotor ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแฟลเจลลาถูกยึดไว้จึงทำให้ไม่เกิดการหมุน (92) ดังนั้นโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* จากการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้นี้ แสดงให้เห็นว่ายีน *flhD* ซึ่งควบคุมการทำงานของแฟลเจลลาอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง extracellular polymeric substance สำหรับใช้ในการสร้างไบโอฟิล์มเพื่อปกคลุมตัวเชื้อ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่ยืนยันว่ายีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง extracellular polymeric substance ของเชื้อ *H. pylori* รวมไปถึงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาข้อมูลนำมาใช้อธิบายถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว นอกจากนี้แม้ว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ยังคงสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีผลต่อการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์มซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากเซลล์ของเชื้อสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะระหว่างกันภายในไบโอฟิล์ม (82)



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน *fliD* ต่อการเคลื่อนที่ การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อ
บุผิวและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยีน *fliD* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน Flid ซึ่งม
ีความสำคัญในการสร้างแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ของเชื้อแบคทีเรีย การกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีผลต่อ
การเคลื่อนที่ที่ลดลงของเชื้อ *H. pylori* แต่ไม่พบว่ามีผลต่อการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกช่อง HEP-2
อย่างไรก็ตามแม้ว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายของยีน *fliD* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ใน
ปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แต่พบว่าการกลายพันธุ์
ของยีน *fliD* มีผลต่อการชะลอการสร้างไบโอฟิล์มและการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์ม
ทั้งนี้โปรตีน Flid มีแนวโน้มที่สามารถถูกนำมาใช้เป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาหรือวัคซีน
เพื่อใช้รักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* ที่มีสาเหตุมาจากการสร้างไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ตาม
ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายกลไกในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของ
เชื้อ *H. pylori* ได้อย่างครบถ้วน และยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. Marshall B, Gilman R. *Helicobacter pylori* infections. In: Guerrant R, Walker D, Weller P, editors. Tropical infectious diseases principles, pathogens and practice. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 300-9.
2. Johannes GK, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology Reviews. 2006;19(3):449-90.
3. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. World Journal of Gastrointestinal Oncology. 2012;4(7):156-69.
4. IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans/World Health Organisation, International Agency for Research on Cancer; 1994. 1-241 p.
5. Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. Infection and Immunity. 2002;70(4):1984-90.
6. McSweegan E, Walker RI. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. Infection and Immunity. 1986;53(1):141-8.
7. McCarter LL. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2001;65(3):445-62.
8. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology. 1998;30(2):285-93.
9. Santos PG, Santos PA, Bello AR, Freitas-Almeida AC. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. Letters in Applied Microbiology. 2011;52(1):49-55.
10. Pattiyathanee P, Vilaichone R-k, Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. African Journal of Biotechnology. 2009;8(19):5106-15.

11. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;25:S90-S4.
12. Cammarota G, Sanguinetti M, Gallo A, Posteraro B. Review article: biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012;36(3):222-30.
13. Andersen L, Rasmussen L. *Helicobacter pylori* -coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009;56:112-5.
14. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(10):3124-32.
15. Cammarota G, Branca G, Ardito F, Sanguinetti M, Ianiro G, Cianci R, et al. Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2010;8(9):817-20.e3.
16. Coticchia JM, Sugawa C, Tran VR, Gurrola J, Kowalski E, Carron MA. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2006;10(6):883-9.
17. Stark RM, Gerwig GJ, Pitman RS, Potts LF, Williams NA, Greenman J, et al. Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology*. 1999;28(2):121-6.
18. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(11):699-709.
19. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(22):6969-76.
20. Spohn G, Scarlato V. Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: Mobley H, Mendz G, Hazell S, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001.
21. Leying H, Suerbaum S, Geis G, Haas R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Molecular Microbiology*. 1992;6(19):2863-74.

22. Pattiyathanee P, Vilaichone R, Chaichanawongsaroj N. Inhibitory activity of curcumin against *Helicobacter pylori* biofilms : the role of flagellar genes and comparative proteomics analysis [Doctoral dissertation]. Graduate School: Chulalongkorn University; 2009.
23. Joshua GWP, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV, Wren BW. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology (Reading, England)*. 2006;152(2):387-96.
24. Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2003;54(S3):23-41.
25. Robin WJ, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*. 1983;321(8336):1273-5.
26. Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *Journal of Clinical Pathology*. 1975;28(8):639-46.
27. Andersen L, Wadström T. Basic Bacteriology and Culture. In: Mobley H, Mendz G, Hazell S, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
28. Safaei H, Rahimi E, Zandi A, Rashidipour A. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of *H. pylori* antigens in the milk and faeces of cows. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2011;16(2):184-7.
29. Wen M, Yamada N, Zhang Y, Matsuhisa T. Morphological changes of *Helicobacter pylori* after antibacterial therapy: an electron microscope study. *Medical Electron Microscopy*. 1997;30(3):131-7.
30. Saito N, Konishi K, Kato M, Takeda H, Asaka M, Ooi H. Coccoid formation as a mechanism of species-preservation in *Helicobacter pylori*: an ultrastructural study. *The Hokkaido Journal of Medical Science* 2008;85(5):291-5.
31. Saito N, Ooi H, Konishi K, Shoji E, Kato M, Asaka MM. Coccoid *Helicobacter pylori* can directly adhere and invade in agminated formation to human gastric epithelial cells. *Advances in Microbiology*. 2012;2(2):112-6.
32. Zun-Wu Z, Farthing MJG. Molecular mechanisms of *H. pylori* associated gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 1999;5(5):369-74.

33. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection*. 2000;2(1):55-60.
34. D'Elis MM, Andersen LP. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2009;14:21-8.
35. Azevedo N, Huntington J, Goodman K. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. In: Graham D, Megrand F, Malfertheiner P, editors. *Helicobacter*. 14. Oxford: Blackwell publishing; 2009. p. 1-7.
36. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(17):2105-11.
37. Khan A, Farooqui A, Kazmi SU. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2011;6(03).
38. Marshall B, Barrett L, Prakash C, McCallum R, Guerrant R. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*. 1990;99(3):697-702.
39. McGEE DJ, Coker C, Testerman TL, Harro JM, Gibson SV, Mobley HLT. The *Helicobacter pylori flbA* flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of *H. pylori* and *Proteus mirabilis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2002;51(11):958-70.
40. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 1992;37(2):123-7.
41. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Borén T, Koletzko S, et al. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infection and Immunity*. 2009;77(9):3782-90.
42. Evans DJ, Evans DG. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter*. 2000;5(4):183-95.
43. Costa A, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. In: Graham D, Megrand F, Malfertheiner P, editors. *Helicobacter*. Oxford: Blackwell publishing; 2009.

44. Eskandari-Nasab E, Sepanjnia A, Moghadampour M, Hadadi-fishani M, Rezaeifar A, Asadi-Saghandi A, et al. Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in *Helicobacter pylori*-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2013;45(5):342-9.
45. Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;25(3):479-86.
46. International programme on chemical safety [Internet]. 1999 [cited 16-06-2013]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/iarc/monoeval/eval.html>.
47. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
48. Singh K, Ghoshal UC. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer: An Asian enigma. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(9):1346-51.
49. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* infection: a clinical overview. *Digestive and Liver Disease*. 2008;40(8):619-26.
50. Fuccio L, Zagari RM, Minardi ME, Bazzoli F. Systematic review: *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007;25(2):133-41.
51. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007;56(6):772-81.
52. Miura S, Hokari R. Seeking an optimal eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27(1):7-9.
53. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(8):1808-25.
54. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, et al. Second Asia-Pacific Consensus guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009;24(10):1587-600.
55. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter*. 2007;12(4):275-8.

56. Vakil N. *H. pylori* treatment: new wine in old bottles? *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(1):26-30.
57. Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, Kato M, Lee M, Wu JY, et al. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(7):2169-78.
58. Hunt R, Thomson AB. Canadian *Helicobacter pylori* consensus conference. Canadian Association of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 1998;12(1):31-41.
59. Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Annals of Internal Medicine*. 2002;136(1):13-24.
60. Gisbert JP, Calvet X. Review article: non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;34(6):604-17.
61. Molina-Infante J, Perez-Gallardo B, Fernandez-Bermejo M, Hernandez-Alonso M, Vinagre G, Duenas C, et al. Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;31(10):1077-84.
62. Ryder MA. Catheter-related infections: it's all about biofilm. *Topics in Advanced Practice Nursing eJournal*. 2005;5(3).
63. Costerton J, Cheng K, Geesey G, Ladd T, Nickel J, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41:435-64.
64. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):167-93.
65. Oliveira A, Cunha M. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative *staphylococci*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2008;14:572-96.
66. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 2000;54:49-79.

67. Ando E, Monden K, Mitsuhashi R, Kariyama R, Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*. 2004;58(4):207-14.
68. Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR. Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLOS ONE*. 2010;5(4):e10146.
69. Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y, et al. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLOS ONE*. 2011;6(4):e18514.
70. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*. 2013;121:1-58.
71. Stewart PS, Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
72. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
73. Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1988;22(5):667-74.
74. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(6):2467-73.
75. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):95-108.
76. Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N. Dynamics and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(4):1168-74.
77. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35:322-32.
78. Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(34):12503-8.

79. Allegrucci M, Sauer K. Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(5):2030-8.
80. Yarwood JM, Paquette KM, Tikh IB, Volper EM, Greenberg EP. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(22):7961-7.
81. Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, West SE, et al. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*. 1999;34(5):1082-93.
82. Yang F-L, Hassanbhai AM, Chen H-Y, Huang Z-Y, Lin T-L, Wu S-H, et al. Proteomannans in biofilm of *Helicobacter pylori* ATCC 43504. *Helicobacter*. 2011;16(2):89-98.
83. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*. 2004;51(3):675-90.
84. Drouet EB, De Montclos HP, Andujar M, Boude M, Grimaud JA, Denoyel GA. Partial characterization of an external polysaccharide of *Helicobacter pylori* by using an immunoglobulin M monoclonal antibody. *Infection and Immunity*. 1993;61(6):2732-6.
85. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(2):114-22.
86. Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 2004;52(4):917-24.
87. Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 1994;176(8):2272-81.
88. Sela S, Frank S, Belausov E, Pinto R. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(8):5653-8.
89. Day AS, Jones NL, Lynett JT, Jennings HA, Fallone CA, Beech R, et al. *cagE* is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulceration in children. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(4):1370-5.

90. Ogawa N, Tzeng C-M, Fraley CD, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(23):6687-93.
91. O'Toole G, Klier R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 1998;30:295 - 304.
92. Guttenplan SB, Blair KM, Kearns DB. The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation. *PLoS Genetics*. 2010;6(12): e1001243.
93. Houry A, Briandet R, Aymerich S, Gohar M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*. 2010;156(4):1009-18.
94. Prehistoric origins of stomach ulcers uncovered [Internet]. *Scientific Blogging; Science 2.0*. 2007 [cited 13-09-2015]. Available from: http://www.science20.com/news/prehistoric_origins_of_stomach_ulcers_uncovered.
95. Geis G, Leying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27(3):436-41.
96. Morimoto YV, Minamino T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules*. 2014;4(1):217-34.
97. Macnab RM, Ornston MK. Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *Journal of Molecular Biology*. 1977;112(1):1-30.
98. Ueno T, Oosawa K, Aizawa S-I. M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *Journal of Molecular Biology*. 1992;227(3):672-7.
99. Suzuki H, Yonekura K, Namba K. Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *Journal of Molecular Biology*. 2004;337(1):105-13.

100. Khan IH, Reese TS, Khan S. The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(13):5956-60.
101. Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *Journal of Molecular Biology*. 1994;235(4):1261-70.
102. Yamaguchi S, Aizawa S, Kihara M, Isomura M, Jones CJ, Macnab RM. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 1986;168(3):1172-9.
103. Wilson ML, Macnab RM. Co-overproduction and localization of the *Escherichia coli* motility proteins MotA and MotB. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(7):3932-9.
104. Blair D, Berg H. Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*. 1988;242(4886):1678-81.
105. Block SM, Berg HC. Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature*. 1984;309(5967):470-2.
106. Stolz B, Berg HC. Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1991;173(21):7033-7.
107. Morimoto YV, Che Y-S, Minamino T, Namba K. Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. *FEBS Letters*. 2010;584(6):1268-72.
108. Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(11):6436-41.
109. Berg HC. Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophysical Journal*. 1995;68(4):163S-7S.
110. Schmitz A, Josenhans C, Suerbaum S. Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *Journal of Bacteriology*. 1997;179(4):987-97.

111. Foynes S, Dorrell N, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ, et al. Functional analysis of the roles of FliQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiology Letters. 1999;174(1):33-9.
112. Ryan KA, Karim N, Worku M, Penn CW, O'Toole PW. *Helicobacter pylori* flagellar hook-filament transition is controlled by a FliK functional homolog encoded by the gene HP0906. Journal of Bacteriology. 2005;187(16):5742-50.
113. Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. Journal of Bacteriology. 1993;175(11):3278-88.
114. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. Journal of Bacteriology. 1995;177(11):3010-20.
115. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infection and Immunity. 1996;64(7):2445-8.
116. Ottemann KM, Miller JF. Roles for motility in bacterial-host interactions. Molecular Microbiology. 1997;24(6):1109-17.
117. Alm RA, Ling L-SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 1999;397(6715):176-80.
118. Spohn G, Scarlato V. Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. Journal of Bacteriology. 1999;181(2):593-9.
119. Niehus E, Gressmann H, Ye F, Schlapbach R, Dehio M, Dehio C, et al. Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. Molecular Microbiology. 2004;52(4):947-61.
120. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 1997;388(6642):539-47.

121. Yokoseki T, Kutsukake K, Ohnishi K, Iino T. Functional analysis of the flagellar genes in the *fliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology (Reading, England)*. 1995;141 (Pt 7):1715-22.
122. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and Immunity*. 1998;66(3):1000-7.
123. Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, et al. Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(3):1178-83.
124. Manos J, Arthur J, Rose B, Tingpej P, Fung C, Curtis M, et al. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(12):1454-65.
125. Hartmann I, Carranza P, Lehner A, Stephan R, Eberl L, Riedel K. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(7):2251-61.
126. *fliD* flagellar hook-associated protein [*Helicobacter pylori* 26695] [cited 12-11-2015]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=HP0752>.
127. Young R, Grillo D, Isberg R, Way J, Syvanen M. Transposition of the kanamycin-resistance transposon Tn903. *Molecular and General Genetics MGG*. 1980;178(3):681-9.
128. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975;94(3):441-8.
129. Standard Nucleotide BLAST [cited 05-07-2015]. Available from: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
130. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems [Internet]. 2015 [cited 21-10-2015]. Available from: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>.

131. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 1996;110(4):1031-5.
132. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water research*. 2001;35(6):1624-6.
133. Cue D, Lei MG, Lee CY. Activation of sarX by Rbf is required for biofilm formation and *ica*ADBC expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2013;195(7):1515-24.
134. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*. 1999;67(10):5427-33.
135. Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;5:14.
136. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. 2003;50(1):101-4.
137. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(9):3234-40.
138. Khalifeh Gholi M, Kalali B, Formichella L, Göttner G, Shamsipour F, Zarnani Ah, et al. *Helicobacter pylori* FliD protein is a highly sensitive and specific marker for serologic diagnosis of *H. pylori* infection. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013;303(8):618-23.
139. Yeh H-Y, Hiatt KL, Line JE, Seal BS. Characterization and antigenicity of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellar capping protein FliD. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(4):602-9.
140. Buckley AM, Wang J, Hudson DL, Grant AJ, Jones MA, Maskell DJ, et al. Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*. 2010;28(4):1094-105.
141. Wren BW, Henderson J, Ketley JM. A PCR-based strategy for the rapid construction of defined bacterial deletion mutants. *BioTechniques*. 1994;16(6):994-6.
142. Dorrell N, Gyselman VG, Foynes S, Li SR, Wren BW. Improved efficiency of inverse PCR mutagenesis. *BioTechniques*. 1996;21(4):604, 6, 8.

143. Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Analytical Biochemistry*. 1997;254(2):157-78.
144. Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, Lory S, et al. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(9):2880-90.
145. Zeng X, He L-H, Yin Y, Zhang M-J, Zhang J-Z. Deletion of *cagA* gene of *Helicobacter pylori* by PCR products. *World Journal of Gastroenterology* 2005;11(21):3255-9.
146. Weaver JC. Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods in Molecular Biology*. 1995;47:1-26.
147. Homma M, Iino T. Excretion of unassembled hook-associated proteins by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 1985;164(3):1370-2.
148. Ikeda T, Yamaguchi S, Hotani H. Flagellar growth in a filament-less *Salmonella fliD* mutant supplemented with purified hook-associated protein 2. *Journal of biochemistry*. 1993;114(1):39-44.
149. McCarter LL. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(6):1595-609.
150. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*. 2011;79(10):4061-7.
151. Clyne M, Ocroinin T, Suerbaum S, Josenhans C, Drumm B. Adherence of isogenic flagellum-negative mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* to human and ferret gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2000;68(7):4335-9.
152. Nishihara K, Nozawa Y, Nomura S, Kitazato K, Miyake H. Analysis of *Helicobacter pylori* binding site on HEp-2 cells and three cell lines from human gastric carcinoma. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1999;13(5):555-61.
153. Liang Y, Gao H, Chen J, Dong Y, Wu L, He Z, et al. Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*. *BMC Microbiology*. 2010;10(291).
154. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology*. 2006;8(11):1997-2011.

155. Anriany YA, Weiner RM, Johnson JA, De Rezende CE, Joseph SW. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(9):4048-56.
156. Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*. 2005;55(4):1160-82.
157. Brock Neil R, Shao JQ, Apicella MA. Biofilm formation on human airway epithelia by encapsulated *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Microbes and Infection*. 2009;11(2):281-7.
158. Xu S, Peng Z, Cui B, Wang T, Song Y, Zhang L, et al. FlhS modulates FlgM activity by acting as a non-canonical chaperone to control late flagellar gene expression, motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Environmental Microbiology*. 2014;16(4):1090-104.
159. Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T-L, Foss M, Lau PC, Sanders G, et al. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(12):4312-20.
160. Kobayashi K. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(13):4920-31.
161. Rasko DA, Wang G, Palcic MM, Taylor DE. Cloning and characterization of the $\alpha(1,3/4)$ fucosyltransferase of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(7):4988-94.
162. Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)*. 2003;149(Pt 2):353-62.
163. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;72(2):157-65.
164. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;63(3):287-95.

165. Kawamoto J, Kurihara T, Kitagawa M, Kato I, Esaki N. Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles : life under extreme conditions*. 2007;11(6):819-26.
166. Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, et al. Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express*. 2015;5(1):6.
167. van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Qvortrup K, Jensen PØ, Høiby N, et al. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants *in vivo*. *Infection and Immunity*. 2012;80(8):2601-7.
168. Otto M. Staphylococcal biofilms. In: Romeo T, editor. *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 207-28.
169. Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio*. 2013;4(5).
170. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T, Giulio MD, Lannutti SN, et al. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2008;43(2):178-85.
171. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry Biokhimiia*. 2005;70(2):267-74.
172. Ozcakir O. Viable but non-culturable form of bacteria. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2007;41(3):477-84.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรฤทัย ทองเกิด เกิดเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2533 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิก และอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 ซึ่ง ในขณะที่ศึกษานั้นได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนสำหรับผู้สมัครที่ไม่ผ่านการ คัดเลือกทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ยังได้มีโอกาสไปเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง Role of fliD gene in a regulation of Helicobacter pylori biofilm formation ในรูปแบบด้วยวาจา ในงานประชุม International Anatomical and Biomedical Scientific Conference 2015 (IABS2015) ณ เมือง Serdang ประเทศ มาเลเซีย เมื่อวันที่ 18 ถึง 20 สิงหาคม 2558 โดยได้รับทุนสนับสนุนการไปเสนอผลงาน วิชาการในต่างประเทศ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย