

รายงานโครงการวิจัย

งบประมาณแผ่นดินของบัณฑิตวิทยาลัย

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๔๘

การศึกษารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสของ
Agrobacterium tumefaciens เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณ
สื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบ

Study of Recombinant Enzyme Acyl-Homoserine Lactonase of
Agrobacterium tumefaciens for Controlling Growth and Communication
Signaling in Gram-Negative Bacteria

RCH
OR
96.5
๗3495

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 73047
วัน,เดือน,ปี..... 27 ส.ย. 2550

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกภัย
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์

b. 11769373
i.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตนเป็นโมเลกุลสัญญาณชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นมาสำหรับการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญถึงระดับหนึ่งจะมีการสร้างสัญญาณโมเลกุลขึ้น เข้าจับกับรีเซพเตอร์แล้วทำให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้ประชากรแบคทีเรียลดลง เอนไซม์ที่สามารถย่อยเอชิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้จึงมีความสำคัญในการกำหนดการเจริญและการตายของแบคทีเรีย เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สามารถย่อยเอชิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้โดยจะเข้าไปย่อยเอชิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่บริเวณวงแหวนแลคโตน เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสนี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีน *attM* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสจาก *Agrobacterium tumefaciens* โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET30a ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ผลการทดลองพบว่าพลาสมิด pSP3.102 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมระหว่างพลาสมิด pET30a และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง จากนั้น ทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSP3.102 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) และคัดเลือกโคลนที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน ชักนำทรานสฟอร์มเมนต์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสด้วยการเติม IPTG จากการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์มีขนาด 37-40 กิโลดาลตัน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ HisTrap จะพบรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสสูงสุดใน fraction ที่ 2 และสามารถนำไปลดโมเลกุลสัญญาณเอชิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตขึ้นใน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 ได้

QR 82, R45

คำสำคัญ: รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอชิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส ยีน *attM* *Agrobacterium tumefaciens* การติดต่อสื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Acyl-homoserine lactone (acyl-HSL) is one of signal molecules produced for cell-to-cell communication in gram-negative bacteria. The signal molecule AHL is produced when bacteria reach the threshold cell density and subsequently bind to the receptor to induce the target gene expressions affecting the decrease of bacterial populations. The enzyme responsible for AHL-inactivating activity is important for growth and death of bacteria. Acyl-homoserine lactonase is one of enzyme that can degrade AHL by digesting lactone ring. It is encoded by *attM*. In this study, the recombinant expression plasmid of *attM* encoding enzyme acyl-homoserine lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* was constructed. The PCR product of *attM* digested by *Bam*HI and *Hind*III was ligated to the expression vector pET30a digested by *Bam*HI and *Hind*III. It was found that plasmid pSP 3.102 was the recombinant plasmid of pET30a and the PCR product of *Agrobacterium tumefaciens attM* and had correct nucleotide sequences. The recombinant plasmid pSP3.102 was transformed into the bacterial *Escherichia coli* BL21(DE3). A correct transformant was selected. The recombinant enzyme acyl-homoserine lactonase was induced by adding IPTG and analyzed by SDS-PAGE. It was shown that this recombinant enzyme was 37-40 kDa in size. The recombinant acyl-homoserine lactonase was purified by using column HisTrap and showed that the highest amount of recombinant enzyme was found in fraction 2. This enzyme fraction could decrease the acyl-homoserine lactone signal produced from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823.

Keywords: Recombinant acyl-homoserine lactonase *attM* gene *Agrobacterium tumefaciens*
Cell communication in Gram-negative bacteria

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ *Agrobacterium tumefaciens* เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณสื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดีโดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณนางสาวศรินยา ใจตรง นักศึกษาปริญญาโทที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และช่วยในการทำโครงการวิจัยนี้

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูป.....	VI
สารบัญตาราง.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 การสื่อสารในแบคทีเรีย.....	4
2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ.....	4
2.3 เอชดีโฮโมเซอรินแลคโตน.....	5
2.4 เอนไซม์เอชดีโฮโมเซอรินแลคโตเนส.....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	11
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	11
3.2 สารเคมี.....	11
3.3 อุปกรณ์.....	14
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	14
3.5 วิธีการศึกษา.....	15
บทที่ 4 ผลลัพธ์และอภิปรายผล.....	25
4. 1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET30a ที่มียีน <i>attM</i> ของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
4.2 ผลการชักนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูง.....	32
4.3 การแยกเอนไซม์เอชดีโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์.....	33
4.4 การทดสอบผลของเอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณ สื่อสารเอชดีโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียแกรมลบ.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	40
บรรณานุกรม.....	41
ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	45



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของ โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน (3oxo-C6-HSL).....	5
2.2 โครงสร้างของสัญญาณโมเลกุลเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่ เอซิดแตกต่างกัน.....	6
2.3 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน.....	8
2.4 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอริน แลคโตน.....	8
2.5 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนด้วยเอนไซม์เอซิดไฮโมเซอริน แลคโตเนส.....	10
4.1 จีโนมิกส์เอ็นเอของ <i>A. tumefaciens</i> จากการแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	25
4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i>	26
4.3 พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	28
4.4 พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III	30
4.5 การวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังการชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM.....	33
4.6 การวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังจากทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ แลคโตเนสให้บริสุทธิ์.....	34
4.7 การเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน (ข) ของ แบคทีเรียแกรมลบ.....	36
4.8 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>attM</i> ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่.....	17
3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	18
3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	18



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เมื่อไม่นานมานี้ มีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติเหมือนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นั่นคือ มีความสามารถในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-to-cell communication) โดยแบคทีเรียจะผลิตและปล่อยสารเคมีออกมาเพื่อส่งสัญญาณ (signal) ถึงกันและกันและร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง แบคทีเรียแกรมบวกผลิตโมเลกุลสัญญาณประเภทเปปไทด์ขนาดเล็ก (small peptide) และแบคทีเรียแกรมลบผลิตสัญญาณโมเลกุลประเภทเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (acyl-homoserine lactone, acyl-HSL) การค้นพบการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ในสมัยแรกนั้นมีประโยชน์ในการศึกษาด้านนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ต่อมาภายหลังมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า การส่งสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมีความสำคัญต่อวงการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากสัญญาณดังกล่าวมีผลในการลดระดับความรุนแรงของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคน สัตว์ หรือของพาโทเจนในพืชได้ โดยเมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตถึงระดับหนึ่ง จะมีการสร้างสัญญาณโมเลกุลเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น สารนี้จะถูกส่งไปควบคุมยีนจำเพาะบางยีนให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนนั้นๆ จนในที่สุดเกิดการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมภายในและสามารถควบคุมประชากรได้ (Fuqua *et al.*, 1994) การลดลงของประชากรแบคทีเรียโดยอาศัยสารโมเลกุลเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซึ่งสร้างและส่งสัญญาณจากตัวของแบคทีเรียเองจัดเป็นกลไกที่เรียกว่า “ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing)”

สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถบ่งบอกถึงภาวะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเริ่มกลไกควบคุมประชากรของตัวเอง เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการกำหนดการเจริญและการตายของเชื้อแบคทีเรีย เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สามารถย่อยเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ โดยจะเข้าไปย่อยเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่บริเวณวงแหวนแลคโตน เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานการค้นพบเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Agrobacterium tumefaciens* ฯลฯ (Zhang *et al.*, 2002) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสนี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* และเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่ทำหน้าที่ย่อยวงแหวนแลคโตนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่มีการแสดงออก จากนั้นจึงชักนำให้ ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในปริมาณสูง นำเซลล์มาทำให้แตก และทำ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอริน แลคโตเนสที่บริสุทธิ์ มาใช้ทดสอบกับสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย แกรมลบชนิดต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสในปริมาณสูงเมื่อถูกชักนำ และทราบชนิดของแบคทีเรียที่มีการ ควบคุมการเจริญเติบโตด้วยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส และสามารถลดจำนวนลง เมื่อทำปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับ งานวิจัยทางการแพทย์อื่นๆ ได้ เช่น การศึกษากลไกการก่อโรคในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ต่างๆ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสื่อสารในแบคทีเรีย

ในโลกปัจจุบัน สิ่งมีชีวิตต่างๆ หลายชนิดอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ชุมชน และมีการติดต่อสื่อสารระหว่างกัน มนุษย์ก็สามารถสื่อสารระหว่างกันได้โดยอาศัยภาษาและท่าทางเป็นสื่อ ผ่านระบบกลไกจากสมองทำให้สามารถพัฒนาการสื่อสารออกมาในรูปแบบของเสียงและท่าทาง สัตว์อาศัยการสื่อสารด้วยท่าทาง สัญญาณเสียง การสัมผัส และสารเคมีที่เรียกว่าฟีโรโมน (pheromone) สำหรับแบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ยังไม่มีการพัฒนาเซลล์ขึ้นเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเหมือนสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มนุษย์อาจไม่คิดว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีการติดต่อสื่อสารกันได้ แบคทีเรียหลายชนิดอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (community) และมีการติดต่อสื่อสารระหว่างกันได้เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะส่งสัญญาณเคมีในการติดต่อสื่อสารเพื่อทำกิจกรรมบางอย่างร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถติดต่อสื่อสารระหว่างสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ โดยการตอบสนองต่อสัญญาณภายนอก (external signal) จากเซลล์ข้างเคียง ไม่ว่าเซลล์นั้นจะเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ การติดต่อสื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบต่างกับแบคทีเรียแกรมบวก โดยแบคทีเรียแกรมลบจะส่งสัญญาณโมเลกุลประเภทเอสซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตน (*N*-acyl homoserine lactone) หรือ acyl-HSL (Parsek and Greenberg, 2000) แต่แบคทีเรียแกรมบวกจะส่งสัญญาณประเภทเปปไทด์ขนาดเล็ก (Dunny and Leonard, 1997)

2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

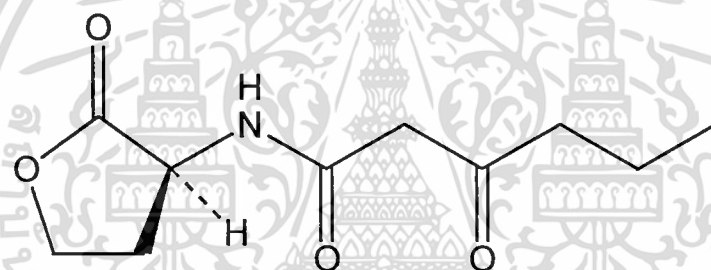
การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบมีหลายประเภท “ระบบควอรัมเซนซิง (quorum sensing)” เป็นระบบการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งของแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสำคัญและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียแกรมลบอาศัยระบบควอรัมเซนซิงเพื่อตอบสนองต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากร (Fuqua *et al.*, 1994) นั่นคือ เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สัญญาณโมเลกุลที่มีชื่อว่า “เอสซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตน (acyl-HSL)” และส่งสัญญาณนี้ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสัญญาณสูงถึงระดับที่สามารถจับกับรีเซพเตอร์จะเกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย และนำไปสู่การควบคุมความหนาแน่นของจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประชากรในที่สุด มีรายงานว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilm formation) การสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst formation) การเคลื่อนที่ (swarming) การส่งถ่ายพลาสมิด (plasmid conjugal transfer) และชีวสังเคราะห์ของยาปฏิชีวนะ (antibiotic biosynthesis) โดยขึ้นกับชนิดของเชื้อ (Crepsi, 2001) สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer) ได้ ในกรณีที่สารนี้ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งตัวเอง นอกจากนี้สัญญาณดังกล่าวอาจแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปยังเซลล์อื่นๆ โดยทำหน้าที่เทียบเท่ากับฟีโรโมน (pheromone) ได้อีกด้วย

2.3 เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Acyl-homoserine lactone)

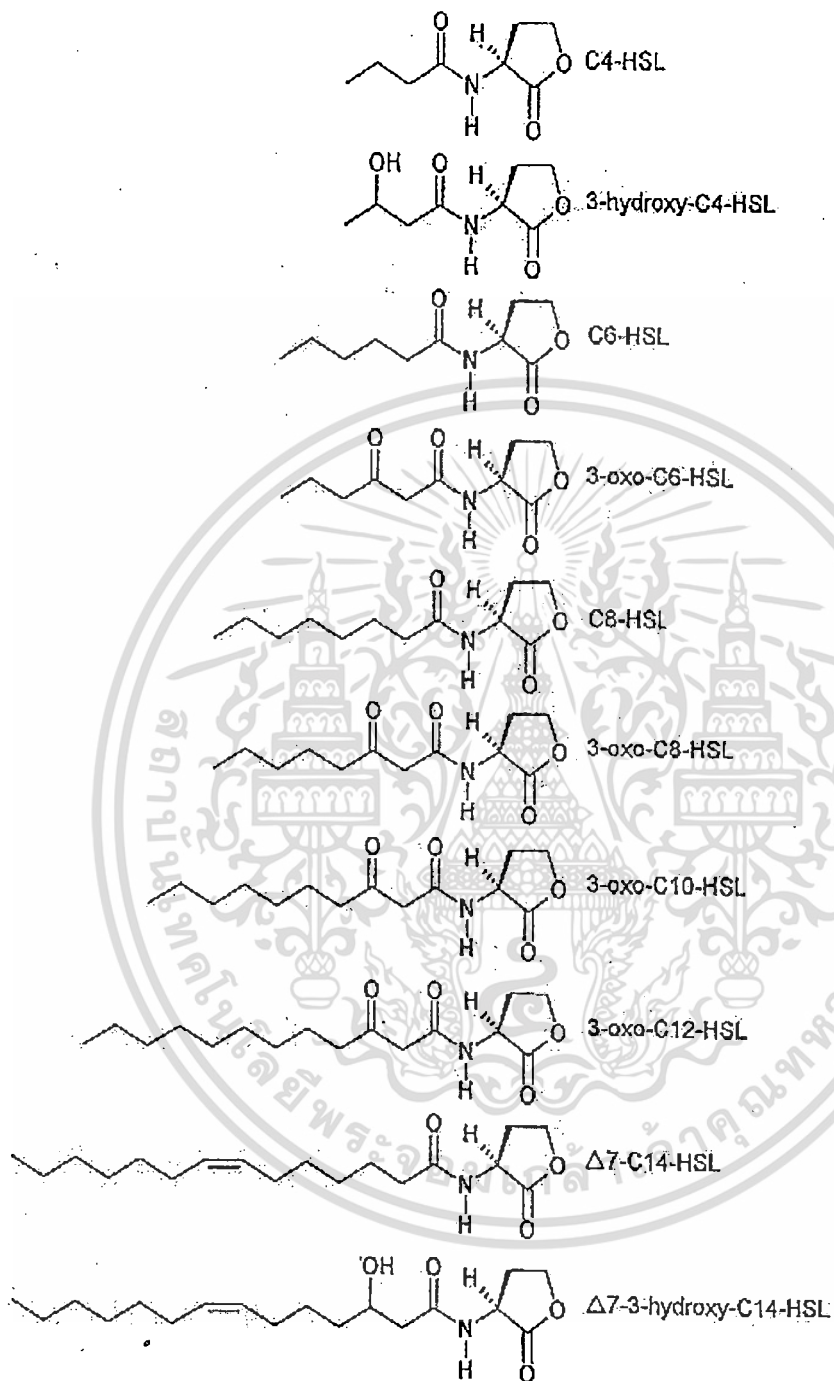
เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเป็นสัญญาณโมเลกุลขนาดเล็ก พบในแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปมีสูตรโครงสร้างเป็น 3oxo-C₆-HSL (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณ 3oxo-C₆-HSL

สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสังเคราะห์จากสารตั้งต้น *S*-adenosylmethionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนและ acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยมีเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (acyl-homoserine lactone synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Moré *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ของแบคทีเรียต่างชนิดกันทำให้มีการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมีโครงสร้างแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) ตั้งแต่ 4 ถึง 16 คาร์บอนอะตอม และบริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่เอซิลอาจอยู่ในรูปอิมิดหรือรูปคาร์บอนิล (O)

หรือไฮดรอกซิล (OH) (Fuqua and Eberhard, 1999; Greenberg, 2000) (รูปที่ 2.2) โปรตีน AhyI เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของสัญญาณ โมเลกุลเอซิล โฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่เอซิลแตกต่างกัน

ที่มา : Fuqua and Eberhard (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

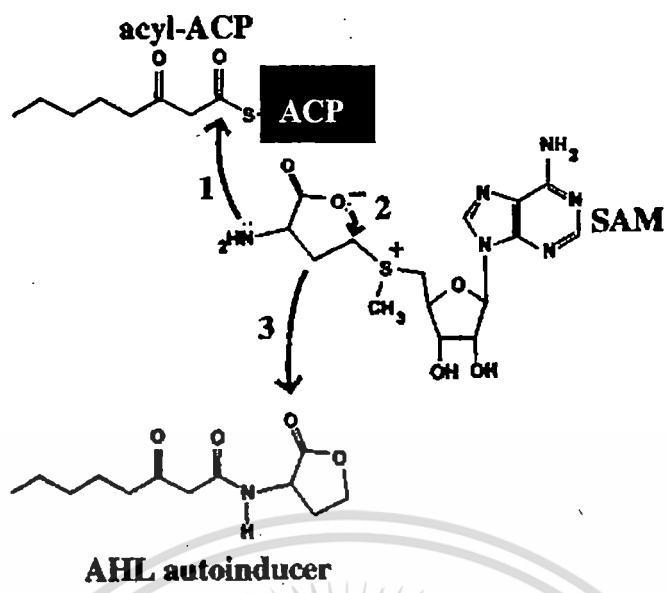
ในแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* จะสังเคราะห์ C4-HSL ซึ่งสามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ (Swift *et al.*, 1997) โปรตีน LuxI ในแบคทีเรีย *V. fischeri* สังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL (Eberhard *et al.*, 1981) และโปรตีน LasI ในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สังเคราะห์ 3oxo-C12-HSL (Pearson *et al.*, 1994) ที่สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้เช่นเดียวกันแต่ในอัตราเร็วที่ช้ากว่า นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีพันธะคู่ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 ในสายโซ่เอสซิลของแบคทีเรียบางชนิด เช่น ใน *Rhizobium leguminosarum* มีโปรตีน Cini ที่สังเคราะห์ 3hydroxy-7-cis-C4-HSL (Lithgow *et al.*, 2000) และใน *Rhodobacter sphaeroides* มีโปรตีน CerI ที่สังเคราะห์ 7,8-cis-C4-HSL (Puskas *et al.*, 1997)

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แบ่งเซลล์และมีจำนวนประชากรหนาแน่นขึ้น โปรตีน LuxI จะกระตุ้นการสังเคราะห์สารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น โดยโปรตีน LuxI ทำให้สารตั้งต้น SAM จับกับ acyl-ACP ด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของสายโซ่เอสซิล แล้วเกิดการย้ายหมู่แลคโตน (lactonization) ของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นพร้อมกับการหลุดออกของเมทิลไทโออะดีโนซีน (methylthioadenosine) ทำให้เกิดสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น (รูปที่ 2.3) จากนั้นจะเกิดการแพร่ผ่านออกภายนอกเซลล์และสามารถจับกับรีเซพเตอร์ที่มีความจำเพาะซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxR ตัวรีเซพเตอร์ที่มีสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายและกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของยีนนั้นๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย (รูปที่ 2.4)

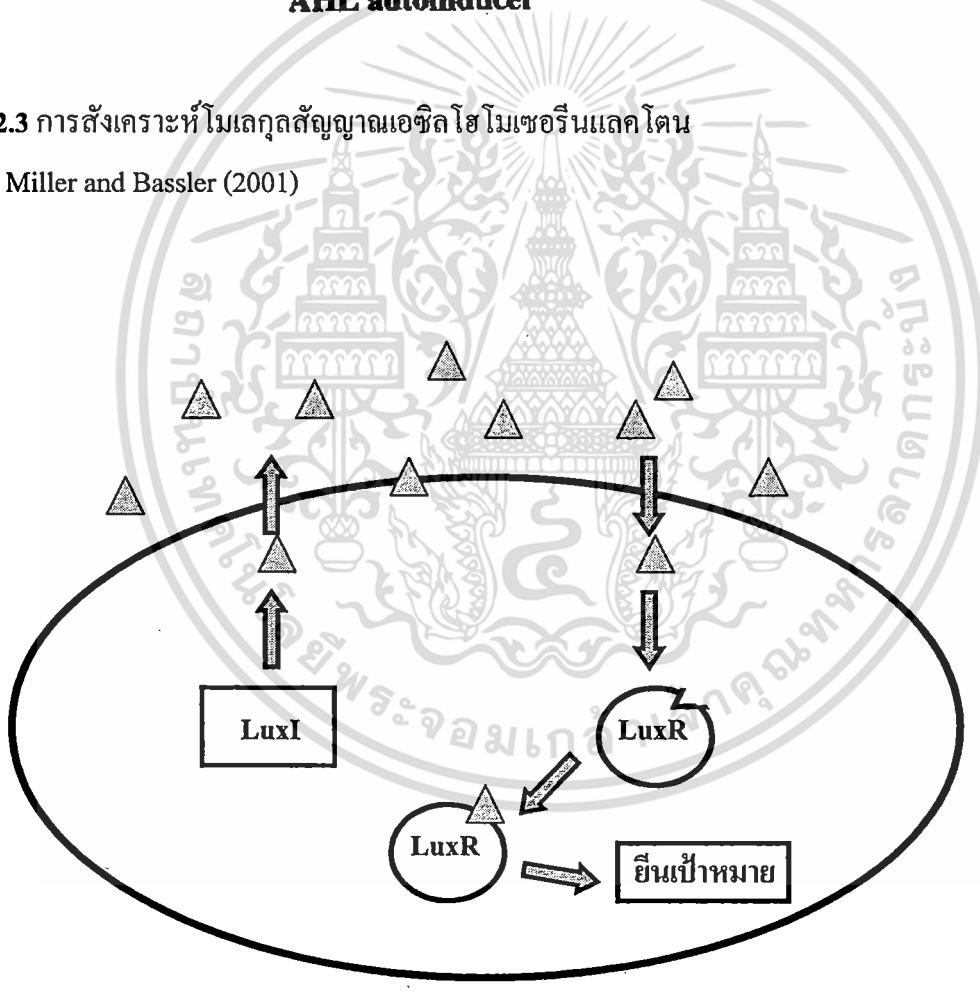
จากการศึกษาโปรตีน LuxR ใน *V. fischeri* พบว่าโปรตีน LuxR มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 2 โดเมน (domain) คือ ด้านปลาย N (amino-terminal domain) ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Slock *et al.*, 1990) และจะจับกับโมเลกุลสัญญาณเมื่อความเข้มข้นของโมเลกุลสัญญาณสูงถึงระดับนาโนโมลาร์ (nanomolar) (Kaplan and Greenberg, 1985) ด้านปลาย C (carboxyl-terminal domain) เป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอสำหรับกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย (Choi and Greenberg, 1991)

ในปัจจุบันพบว่า การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในพาโทเจนมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากระบบควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมการเจริญเติบโตและความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียในคนหรือในพืชได้ ยกตัวอย่าง เช่น เมื่อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ และเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อปอด เซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ที่ติดกับผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน
ที่มา : Miller and Bassler (2001)



รูปที่ 2.4 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโม-
เซอรีนแลคโตน

ที่มา : Bassler (1999)

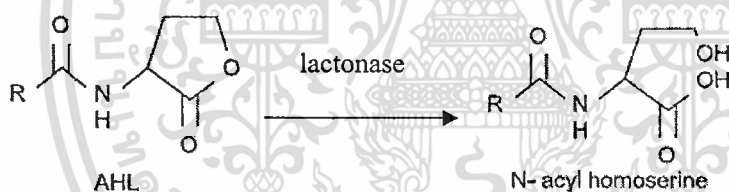
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด (mushroom shape) เซลล์แบคทีเรียถูกห่อหุ้มด้วยสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) และมีช่องว่างที่ยอมให้สารอาหารผ่านเข้า และปล่อยของเสียออกนอกไบโอฟิล์ม เซลล์ของ *P. aeruginosa* ที่เจริญพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยาไม่สามารถเข้าไปทำลายเชื้อที่อยู่ภายในได้ ทำให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง (Parsek and Greenberg, 2000) มีรายงานการวิจัยพบว่า แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตน จะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Davies et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวเฉาในข้าวโพดหวาน โดยในแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนจะมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคลดลง (Beck von Bodman and Farrand, 1995) ดังนั้น การศึกษาความสัมพันธ์ของระบบควอรัมเซนซิงกับความรุนแรงของการเกิดโรค จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการแพทย์และเกษตรกรรม และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการรักษาโรคด้วยวิธีใหม่ที่ไม่ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง แต่จะไปรบกวนความสามารถในการก่อโรค นอกจากนี้ การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนและอื่นต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบควอรัมเซนซิงอาจนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

2.4 เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนเอส

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนเอสถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 240B1 เอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiA* (*aiiA* มาจาก AHL inactivating activity) สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนโดยจะย่อยบริเวณวงแหวนแลคโตน เกิดเป็นสารประกอบเอซิลโฮโมเซอร์ินดังรูป 2.5 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดความเข้มข้นของ *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone จาก 20 ไมโครโมลาร์เหลือเพียง 5 ไมโครโมลาร์ ภายในเวลา 10 นาที (Dong et al., 2001) นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ *AiiA* ในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หลายสปีชีส์ รวมทั้ง *Bacillus cereus* และ *Bacillus mycoides* และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *AiiA* พบว่ามีความคล้ายคลึงถึงร้อยละ 90 (Defoirdt et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่าแบคทีเรียแกรมลบก็มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์ินแลคโตนเอสได้เช่นเดียวกัน โดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์นี้จากยีน *attM* ซึ่งโดยปกติแล้วจะถูกกดตันโดย native transcription factor AttI ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อทำการ knock out ยีน *attJ* พบว่ากระบวนการสังเคราะห์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสก็จะเริ่มขึ้น (Zhang *et al.*, 2002) โปรตีน AttM ที่ได้นี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน AiiA ร้อยละ 35 (Dong *et al.*, 2002) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสเหล่านี้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก มีความยาวของกรดอะมิโน 250-260 หน่วย จึงนับได้ว่าเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการทำลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผลิตมาจากเชื้อก่อโรคบางชนิด การแสดงออกของโปรตีน AiiA ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Erwinia carotovora* พบว่า AiiA จะระงับการปล่อยสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนออกนอกเซลล์ และลดการสังเคราะห์เอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่ เพคเทสที่จับออกนอกเซลล์ (extracellular pectase) ไลเอส (lyase) เพคตินไลเอส (pectin lyase) และพอลิกลาแลคทูโรเนส (polygalacturonase) เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคในพืชอีกด้วย (Molina *et al.*, 2003) นอกจากนี้ ยังมีการทดลองนำยีน *aiiA* ของแบคทีเรียเข้าไปเพิ่มจำนวนในจีโนมของใบยาสูบและมันฝรั่ง โดยอาศัยกระบวนการทรานสฟอร์มเมชันใน *Agrobacterium* sp. เพื่อให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสในพืชทั้งสอง โดยหวังว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะช่วยให้พืชป้องกันการการบุกรุกจากเชื้อ *E. carotovora* ได้ (Dong *et al.*, 2001)



รูปที่ 2.5 การสลาย โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส

ที่มา : Defoidt *et al.* (2004)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

- 3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 (Ti)(pCF218)(pCF372)
- 3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ KYC6 (*traM::Tn5-gusA* harboring pCF218)
- 3.1.3 *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.2 Luria-Bertani medium (LB)
- 3.2.1.3 AT medium

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

- 3.2.2.1 สเปกติโนไมซิน (spectinomycin)
- 3.2.2.2 เตตราไซคลิน (tetracycline)
- 3.2.2.3 แอมพิซิลลิน (ampicillin)
- 3.2.2.4 กานามัยซิน (kanamycin)

3.2.3 เอนไซม์

- 3.2.3.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)
- 3.2.3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Promega, USA)
- 3.2.3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (Promega, USA)
- 3.2.3.5 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)
- 3.2.3.6 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.4.1 แลम्บ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Promega, USA)
- 3.2.4.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) (Promega, USA)
- 3.2.4.3 Marker 6 (ขนาด 400, 900, 1,490, 1,880, 2,690, 3,470, 4,260, 6,220, 7,740 และ 19,330 คู่เบส) (Takara, Japan)

3.2.5 เกล็ดำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

- 3.2.5.1 อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.5.2 เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.5.3 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)
- 3.2.5.4 สีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) (ซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโมไฟนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, Tris-boric-EDTA 1 เท่า)
- 3.2.5.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 5 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.5.6 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)
- 3.2.5.7 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.8 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.9 บัฟเฟอร์ CaCl_2 (CaCl_2 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.5.10 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.5.11 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) (Merck, Germany)
- 3.2.5.12 ไลโซไซม์ (lysozyme)
- 3.2.5.13 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)
- 3.2.5.14 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE-buffer saturated phenol)
- 3.2.5.15 คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)
- 3.2.5.16 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol)
- 3.2.5.17 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.5.18 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์

3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

- 3.2.6.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (Qiagen, Germany)
- 3.2.6.2 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany)
- 3.2.6.3 ชุดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.6.4 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Promega, USA)

3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase activity)

- 3.2.7.1 O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG) (Sigma Aldrich, Germany)
- 3.2.7.2 บัฟเฟอร์ Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 โมลาร์, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 โมลาร์, KCl 0.01 โมลาร์, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 โมลาร์, β -mercaptoethanol 0.05 โมลาร์)
- 3.2.7.3 คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)
- 3.2.7.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.2.8 โปรตีนมาตรฐาน

- 3.2.8.1 BenchMark™ Protein Ladder (ขนาด 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 และ 10 กิโลดาลตัน) (Invitrogen, USA)

3.2.9 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาโปรตีน

- 3.2.9.1 อะคริไรไมด์ (acrylamide) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.9.2 บิส-อะคริไรไมด์ (bis-acrylamide) (Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.9.3 บัฟเฟอร์ Electrode 5 เท่า (Tris-HCl 0.125 โมลาร์, glycine 7.2 เปอร์เซ็นต์, SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์)
- 3.2.9.4 โบรโมฟินอลบลู (bromophenol blue)
- 3.2.9.5 สีย้อมโปรตีน (cromassie brilliant blue R-250 0.25 เปอร์เซ็นต์, methanol 5 เปอร์เซ็นต์, acetic acid 7.5 เปอร์เซ็นต์)
- 3.2.9.6 บัฟเฟอร์ Sample (Tris-HCl 0.5 โมลาร์, SDS 10 เปอร์เซ็นต์, glycerol 10 เปอร์เซ็นต์, bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์, β -mercaptoethanol 5 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.9.7 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) (Bio-Rad, USA)

3.2.9.8 Bradford Reagent (Bio-Rad, USA)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) Hirayama, Hiclave HV-50, Japan
- 3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle, Z383K, Germany
- 3.3.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ISSCO, HS123, Thailand
- 3.3.4 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) Gallenkamp, T490188, UK
- 3.3.5 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) Scientific promotion, Binder control, Japan
- 3.3.6 เครื่องผสมสาร (vortex) Genies 2, USA
- 3.3.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan
- 3.3.8 คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
- 3.3.9 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator ultrasonic cleanser) Vibracell, A064400, USA
- 3.3.10 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงแบบหัว probe (sonicator ultrasonic) Vibracell, CV-33, USA
- 3.3.11 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) Perkin Elmer, DNA thermal cycler 480, USA
- 3.3.12 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) Pharmacia, GNA100, Sweden
- 3.3.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) Cyberscan, 2000, Singapore
- 3.3.14 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) Bio-Rad, model 1000, USA
- 3.3.15 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (thermo-block) Biosan, TDB-120 Thermostat, Germany
- 3.3.16 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล (documentation gel analysis) Syngene, BTS-20-M Germany
- 3.3.17 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.3.18 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปดูส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.5.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR

นำจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* ที่ได้จากข้อที่ 3.5.1.1 มาเพิ่มปริมาณยีน *attM* โดยใช้ไพรเมอร์ *attM-f* (5'-AGTCCAAGGGAGGATCCCGAGTGACCGAT-3') ซึ่งไพรเมอร์นี้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (G/GATCC) และไพรเมอร์ *attM-r* (5'-TATCTGGCCGTAAGCTTGC GCGTTCTATTT-3') ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (A/AGCTT) ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมิคดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังในข้อที่ 3.5.1.2

ตารางที่ 3.1 ภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94	30 วินาที } 30 รอบ
	55	
	72	
3	72	10 นาที
4	20	α

3.5.1.4 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมนัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด หลังจากนั้นเจลละลายเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน collection tube เปิดสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมนัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมนัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.5.1.5 การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	2
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> (100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	10
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	6
ปริมาตรสุทธิ	20

3.5.1.6 การเตรียม expression vector pET30a และการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของ pET30a (Novagen, USA) มาเพาะเลี้ยงในพลาสติก 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด คีเอ็นเอสำเร็จรูป (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III โดยมี ส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a (100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	10
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	6
ปริมาตรสุทธิ	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.7 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a

ทำการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เข้ากับพลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยในปฏิกิริยา ligation mixture 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัพเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต), พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III 50 นาโนกรัม, ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III 40 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ligation mixture ไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.1.8 การทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET30a-*attM* เข้าสู่เซลล์ให้

อาศัย *E. coli* BL21 (DE3)

ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิด pET30a-*attM* ที่ได้เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเข็นตรีฟิวจ์ ตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัพเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์) เขย่าให้เข้ากัน จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัพเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือนำไปใช้ทรานสฟอร์มทันที โดยปีเปิด competent cell 100 ไมโครลิตร และสารละลาย ligation 10 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเข็นตรีฟิวจ์ วางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที วางในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เตรียมปฏิบัติขณะกานามัยชินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันโดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยชินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.1.9 การสกัดพลาสมิด pET30a-attM และตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkali lysis โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที กระจายเซลล์ด้วยสารละลาย Solution I ที่ประกอบด้วย ซูโครส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl (พีเอช 8) 25 มิลลิโมลาร์ และอีดีทีเอ (พีเอช 8) 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Solution II ที่ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Solution III ซึ่งเตรียมโดยนำไปแช่เย็บอะซิเตทเข้มข้น 5 โมลาร์ 60 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 10 วินาที ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสใส่หลอดใหม่เติมเอธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทดสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* โดยนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5.1.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

3.5.1.11 การทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pET30a-attM

เพาะเลี้ยง *E. coli* ที่มี pET30a-attM จำนวน 1 โคโลนี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 นำเซลล์มาเจือจางในอัตราส่วน 10^{-5} และ 10^{-6} นำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^{-5} มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ร่วมกับยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร และอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และนำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^{-6} มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB และอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้น นับจำนวนโคโลนี

3.5.2 การชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูง

นำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET30a-attM จำนวน 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงเติมสารละลาย Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเข็นตรีฟิวจ์ ตั้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แดกเซลล์ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของ Amplitude ให้เวลาในการปล่อยคลื่นเสียง 5 วินาที สลับกับการหยุดปล่อยคลื่นเสียง 5 วินาที เป็นเวลาทั้งหมด 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำให้สารละลายเอนไซม์แลคโตเนสบริสุทธิ์ต่อไป

3.5.3 การทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโอโมเซอร์รินแลคโตเนสให้กับบริสุทธิ์

ทำสารละลายเอนไซม์แลคโตเนสให้กับบริสุทธิ์ด้วยชุดแยกโปรตีน HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech, USA) โดยในทุกขั้นตอนให้ของเหลวไหลผ่านคอลัมน์ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อนาที เตรียมคอลัมน์โดยล้างคอลัมน์สำเร็จรูปของ HisTrap ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย nickel salt ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม Binding buffer ลงในคอลัมน์ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อปรับภายในคอลัมน์ให้มีสถานะที่พร้อมจะจับกับเอนไซม์ จากนั้น จึงใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดของรูพรุน 0.45 ไมครอน ลงในคอลัมน์ จะโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วยการเติม Binding buffer ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เติม Elution buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เพื่อจะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์โดยแบ่งเก็บตัวอย่างเอนไซม์ 5 ส่วนๆ ละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่แยกได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยผสมสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร และสารละลาย Bradford reagent (BioRad, USA) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE) โดยเตรียม Stacking gel ซึ่งประกอบด้วยอะครีลาไมด์ 4.8 %T, 0.43 %C ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.125 โมลาร์ พีเอช 6.8 และ Resolving gel ซึ่งประกอบด้วย อะครีลาไมด์ 12.5 %T, 1.13 %C ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.375 โมลาร์ พีเอช 8.8 เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลมาไว้ใน chamber เติม electrode buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสมสารละลายโปรตีน 10 ไมโครลิตร กับสีย้อม 20 ไมโครลิตร (Tris-HCl 0.5 โมลาร์, โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 1 มิลลิลิตร, โบรโมฟีโนลบลู 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเบต้าเมอแคปโตเอทานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยอดโปรตีนมาตรฐานและสารละลายโปรตีนที่ต้องการศึกษาลงไปในช่อง ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 20 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมโปรตีนในเจลด้วยสีย้อม cromassie brilliant blue R250 และกำจัดสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย destaining

3.5.4 การทดสอบผลของเอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์สัญญาณสื่อสาร เอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียแกรมลบ

3.5.4.1 การเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนของ แบคทีเรีย แกรมลบ

นำแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ *Agrobacterium tumefaciens* A136 จำนวน 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ดังนี้

3.5.4.1.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. tumefaciens* A136

นำเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกติโนมายซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.4.1.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase activity)

เก็บเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดังในข้อที่ 3.5.4.1.1 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกติโนมายซิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.4 ถึง 0.5 ปิเปิดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังในข้อ 3.5.2.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปป้อมที่ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้น นำเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และบันทึกผลปิเปตเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเติมบัฟเฟอร์ Z (ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.06 โมลาร์, โซเดียมไคไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 โมลาร์, โบแทสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.001 โมลาร์, เบต้าเมอร์แคปโตเอธานอล 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside (ONPG) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้น นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตร ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจากสมการ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส} = \frac{1,000 \times [A_{420} - (1.75 \times A_{550})]}{\text{เวลา (นาที)} \times 0.1 \times A_{660}}$$

3.5.4.2 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

นำเบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากข้อที่ 3.5.4.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

บทที่ 4

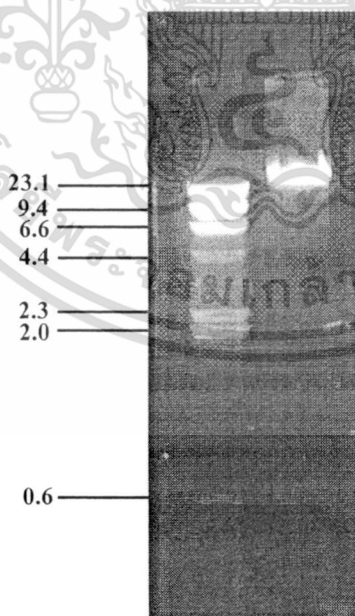
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET30a ที่มียีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens*

4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens*

จากการเพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อ เซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวนปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าปรากฏแถบจีโนมิคดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่อยู่เหนือระดับของแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 กิโลเบส และมีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร (รูปที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

ขนาด (กิโลเบส) 1 2



รูปที่ 4.1 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* จากการแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

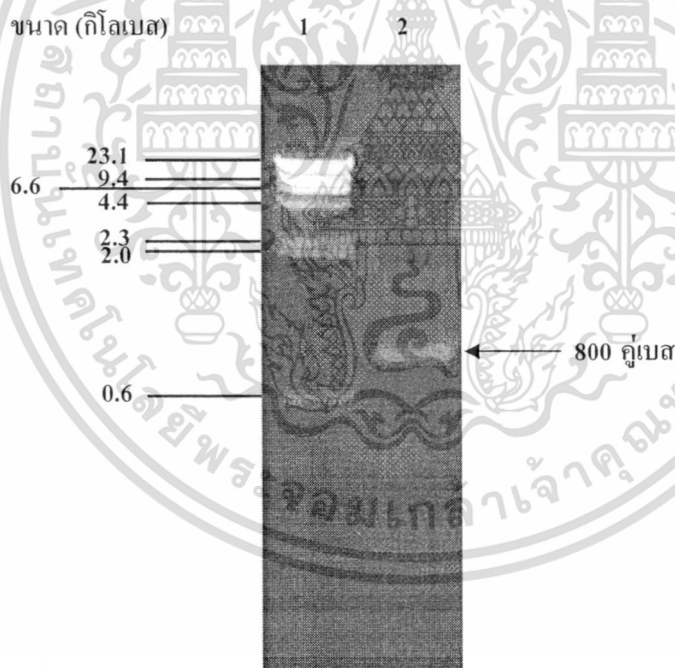
เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 2 คือ จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* มาเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ *attM-f* และ *attM-r* ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing) ที่ 55 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.23) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ต้องการ (840 คู่เบส) และไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะอื่นๆ จึงทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด แยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* ต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens*

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

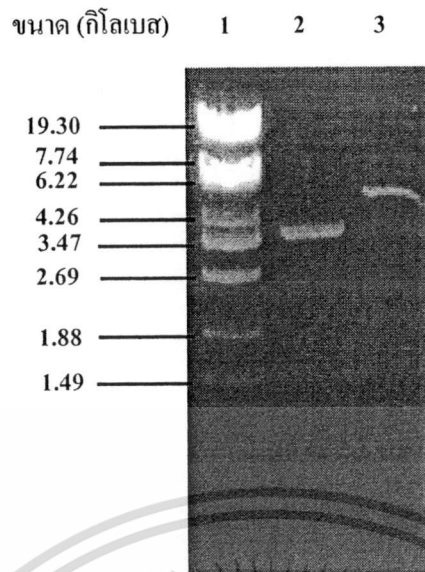
จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ attM-f และ attM-r มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เช่นเดียวกันได้

4.1.4 ผลการสกัดพลาสมิด pET30a และการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Bam*HI และ *Hind*III

จากการนำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pET30a มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA) แล้ววิเคราะห์ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิส ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Marker 6 พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอของ pET30a มีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส (รูปที่ 4.3 เลนที่ 2) ทำการแยกแถบพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) จากนั้น ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าภายหลังการตัดปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,400 คู่เบส (รูปที่ 4.3 เลนที่ 3) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pET30a บนแผนที่ยีน (5,420 คู่เบส) (ภาคผนวก ข) จากผลการทดลองพบว่า พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มีแถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดสูงกว่าพลาสมิด pET30a ก่อนทำการตัด เนื่องจากก่อนทำการตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III นั้น พลาสมิด pET30a อยู่ในรูปขดเกลียว (supercoil) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ 1 ตำแหน่งในบริเวณเดียวกัน (ภาคผนวก ข) จะได้พลาสมิด pET30a ที่อยู่ในรูปเส้นตรง (linear) เมื่อวิเคราะห์จากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลนั้น ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดเกลียวจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเส้นตรง จึงทำให้พบแถบพลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III สูงกว่าแถบของพลาสมิด pET30a นอกจากนี้ แถบพลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มีเพียง 1 แถบ แสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pET30a ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Marker 6

เลน 2 คือ พลาสมิด pET30a

เลน 3 คือ พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

4.1.5 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a

จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ปริมาณ 40 นาโนกรัมกับพลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ปริมาณ 50 นาโนกรัม ในปฏิกิริยา ligation 10 ไมโครลิตร โดยเติมบัพเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) ต่อไป

4.1.6 ผลการทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่เชื่อมกับพลาสมิด pET30a เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3)

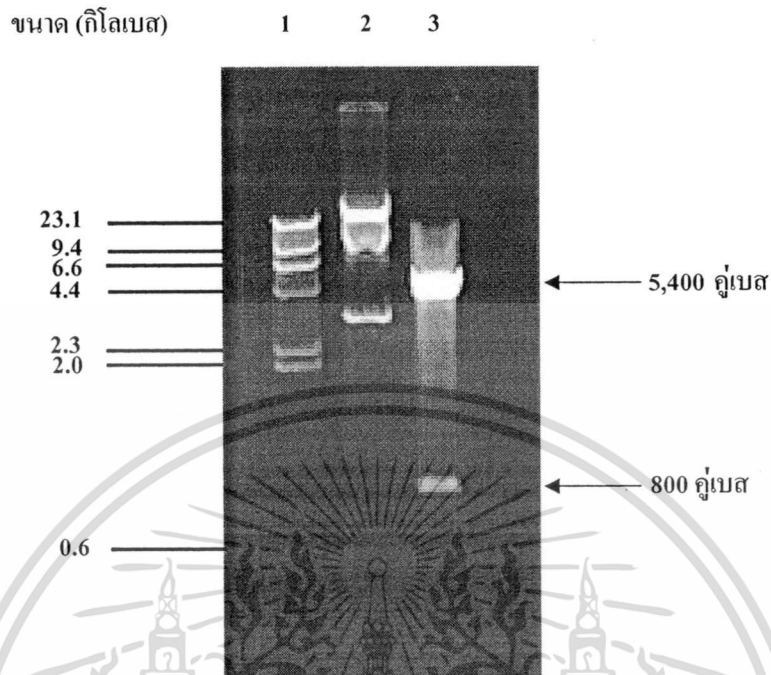
นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันจากคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน เนื่องจากพลาสมิด pET30a มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำ 1 โคโลนีที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกลงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ข้ามคืน เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.1.7 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR

จากการนำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis) วิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 23,100, 9,420 และ 4,000 คู่เบส (รูปที่ 4.4 เลขที่ 2) ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR แล้ววิเคราะห์ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,400 คู่เบส และ 800 คู่เบส แถบดีเอ็นเอขนาด 5,400 คู่เบสเป็นแถบของพลาสมิด pET30a (5,420 คู่เบส) และแถบขนาดประมาณ 800 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* (840 คู่เบส) (รูปที่ 4.4 เลขที่ 3) เรียกพลาสมิดที่ได้ว่า pSP3.102 จากรูปที่ 4.4 ในเลขที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอขนาดสูงกว่า 23,100 คู่เบส คาดว่าเป็นแถบของจีโนมดีเอ็นเอของ *E. coli* BL21(DE3) สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 9,420 คู่เบส คาดว่าเป็นแถบของพลาสมิด pET30a ที่อยู่ในรูปวงกลม จึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดเกลียวที่เคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของอะกาโรสเจลได้ดีกว่าและพบว่ามีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pET30a และผลิตภัณฑ์ PCR จากการวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 4.4 เลขที่ 3) ทำให้ทราบว่าพลาสมิด pSP3.102 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pET30a ที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จึงนำพลาสมิด pSP3.102 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อไป



รูปที่ 4.4 พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 2 คือ พลาสมิด pSP3.102

เลน 3 คือ พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

4.1.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ attM-f และ attM-r ในพลาสมิด pSP3.102 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาด 840 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *attM* ใน *A. tumefaciens* ทั้งหมด (ไม่ได้แสดงผล) แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pSP3.102 เป็นชิ้นส่วนของยีน *attM* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอสซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลสแตยูณเอสซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน หลังจากนั้น จึงนำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 ไปทดสอบความเสถียรของพลาสมิดก่อนการเพาะเลี้ยงเพื่อชัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM เพื่อผลิตเอนไซม์เอสซิลโฮโมเซอรินแลคโคเนสในปริมาณสูงต่อไป

4.1.9 ผลการทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pSP3.102

พลาสมิด pET30a จะมีความเสถียรเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียให้อาศัย ถึงแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตาม ปัญหาการสูญเสียพลาสมิดสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อยีนที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET30a ควบคุมการผลิตสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียให้อาศัย ส่งผลให้พลาสมิดมีความเสถียรลดลงในขณะที่เซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต โดยจะเกิดการแบ่งเซลล์ที่ไม่มีพลาสมิดเพิ่มขึ้นเพื่อลดจำนวนพลาสมิดที่สร้างสารพิษลง การทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pSP3.102 ที่อยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) ทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 แบบ ดังนี้

1. อาหารแข็ง LB (LB)
2. อาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร (LB+Km)
3. อาหารแข็ง LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ (LB+IPTG)
4. อาหารแข็ง LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ร่วมกับยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร (LB+IPTG+Km)

จากการทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pSP3.102 โดยทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงนำเซลล์มาเจือจางในอัตราส่วน 10^6 และ 10^5 นำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^6 มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB และอาหารแข็งสูตร LB+Km นำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^5 มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB+IPTG และอาหารแข็งสูตร LB+IPTG+Km ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนับจำนวนโคโลนี พบว่าเมื่อนำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^6 มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 29 โคโลนี แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 มีจำนวน 29×10^6 โคโลนี เมื่อนำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^6 มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB+Km พบว่ามีจำนวน 28 โคโลนี ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกับเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร

ไม่ว่าการณ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

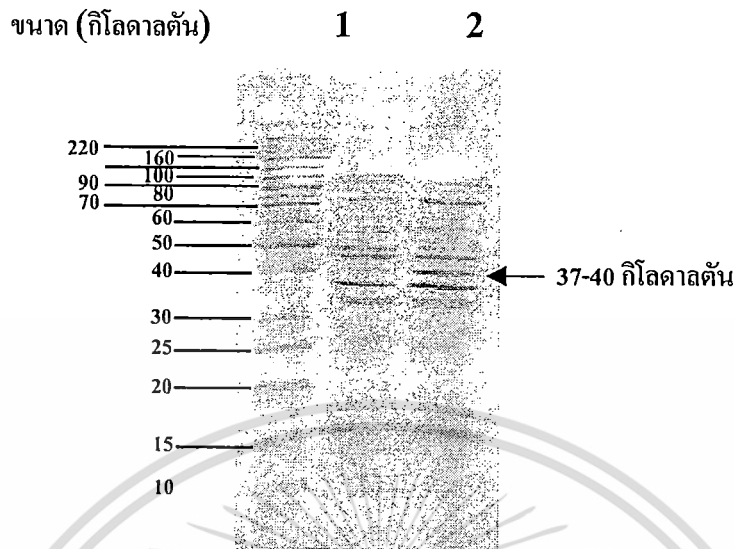
LB แสดงให้เห็นว่า *E. coli* BL21(DE3) เกือบทั้งหมด ($28-29 \times 10^6$ โคโลนี) มีพลาสมิด pSP3.102 ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินได้ จากการนำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^{-5} มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB+IPTG และ LB+IPTG+Km พบว่า *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 ไม่สามารถเจริญบนอาหารทั้ง 2 แบบ เนื่องจาก IPTG จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และชักนำให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสแทน จากผลการเจริญของเชื้อบนอาหารทั้ง 4 ชนิด สามารถสรุปได้ว่า *E. coli* BL21 (DE3) มีพลาสมิด pSP3.102 ซึ่งมีความเสถียร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB และ LB+Km และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสได้ด้วยสารละลาย IPTG จึงนำ *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pSP3.102 มาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูงต่อไป

4.2 ผลการชักนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูง

จากการนำ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pSP3.102 จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงชักนำให้เชื้อมีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสโดยเติมสารละลาย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นแตกเซลล์ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของ Amplitude เก็บส่วนใสโดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford จากนั้นตรวจสอบโปรตีนก่อนและหลังการชักนำในพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ ดังวิธีในข้อที่ 3.5.3 โดยในแต่ละเลนหยอดสารละลายให้มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม เปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, USA) พบว่าภายหลังการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM จะสังเกตเห็นแถบโปรตีน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 37 ถึง 40 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.5 เลนที่ 3) เข้มข้นกว่าโปรตีนที่สกัดก่อนการชักนำ (รูปที่ 4.5 เลนที่ 2) แถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดโปรตีนที่ต้องการคือ 37.8 กิโลดาลตัน (ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* และโปรตีนที่มาจากการถอดรหัสช่วงเริ่มต้นและช่วงปลายของ pET30a) จึงสรุปได้ว่า pSP3.102 สามารถชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM หรือเอนไซม์เอซิลโซโมเซอรินแลคโตเนสจากการชักนำด้วยสารละลาย IPTG ได้ นำสารละลายเอนไซม์เอซิลโซโมเซอรินแลคโตเนสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยชุดคอลัมน์แยกโปรตีน HisTrap

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังการชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM หรือ เอนไซม์แลคโตเนสใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ เอสดีเอส (SDS-PAGE)

เลน 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

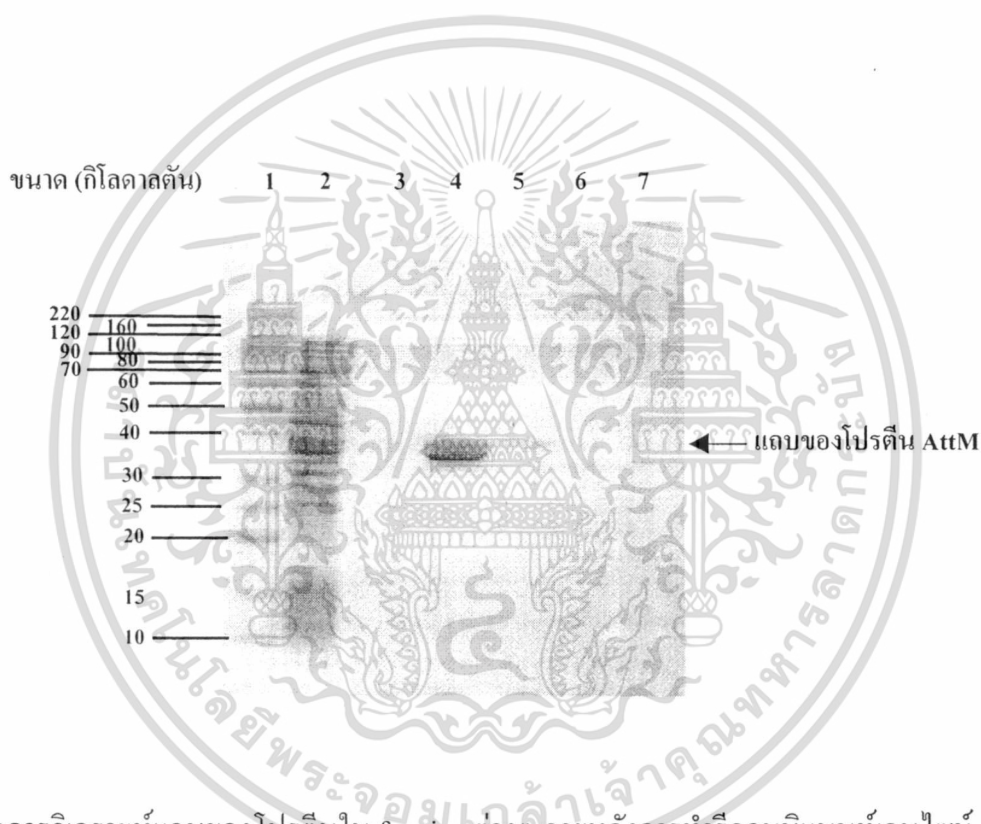
เลน 2 คือ แถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ก่อนการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM

เลน 3 คือ แถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ภายหลังการชักนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM ด้วย IPTG

4.3 ผลการทำเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์

จากการนำสารละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสมาทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยใช้ชุดคอลัมน์แยกโปรตีน HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech, USA) โดยใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดของรูพรุน 0.45 ไมครอน ลงในคอลัมน์ที่มีสารละลาย nickel salt แล้วจะโปรตีนที่ถูกจับอยู่ในคอลัมน์ด้วย elution buffer ทำการแบ่งเก็บสารละลายที่ชะออกมา 5 fraction โดยทำการเก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละ fraction มา 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE เปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder และสารละลายโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ HisTrap ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 20 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าใน fraction ที่ 1 มีแถบของโปรตีนเล็กน้อย เนื่องจากโปรตีนยังไม่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (รูปที่ 4.6 เลนที่ 3) ใน fraction ที่ 2 มีแถบของโปรตีนที่ต้องการมากที่สุด เนื่องจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction นี้ (รูปที่ 4.6 เลนที่ 4) ใน fraction ที่ 3 พบแถบของโปรตีนเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากโปรตีนบางส่วนยังถูกชะออกจากคอลัมน์ไม่หมด (รูปที่ 4.6 เลนที่ 5) สำหรับใน fraction ที่ 4 และ 5 ไม่พบแถบของโปรตีน เพราะโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ทั้งหมดใน fraction ที่ 3 แล้ว (รูปที่ 4.6 เลนที่ 4 และ 5) จากผลการทดลอง พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จาก fraction ที่ 2 มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยสังเกตได้จากการลดลงของแถบโปรตีนอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นน้อยลงเนื่องจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์ใน fraction ที่ 2 ไปทดสอบกับ โมเลกุลสัญญาณเอชิลโฮโมเซอรินแลคโตสต่อไป



รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังจากทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสให้บริสุทธิ์ ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE)

เลน 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

เลน 2 คือ แถบโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ HisTrap

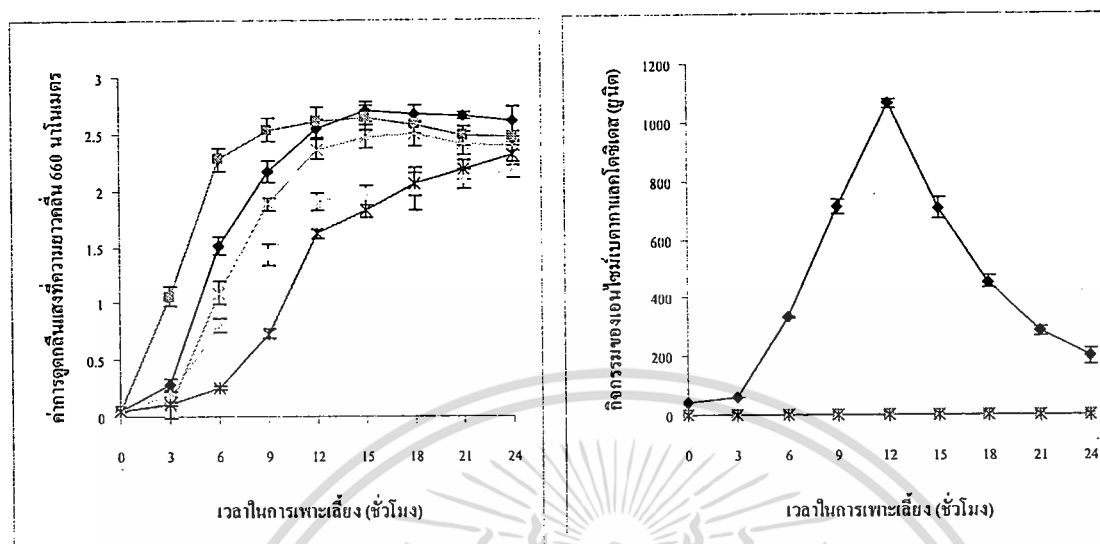
เลน 3-7 คือ แถบโปรตีนที่ได้จากการชะ fraction ที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ ในปริมาณที่เท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบผลของเอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ฮีมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

4.4.1 ผลการเจริญและการผลิตโมเลกุลฮีมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ *Agrobacterium tumefaciens* A136 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทุก 3 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกัน โดยมีช่วง lag phase สั้น มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงประมาณชั่วโมงที่ 9 ถึง 12 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นอัตราการเจริญลดลง เข้าสู่ระยะ stationary ยกเว้น *A. tumefaciens* A136 ที่มีระยะ lag phase นานกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7 ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อศึกษาการผลิตโมเลกุลฮีมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่ามีเพียง *P. aeruginosa* ATCC 27823 ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสหรือโมเลกุลฮีมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดย *P. aeruginosa* ATCC 27823 จะเริ่มผลิตโมเลกุลฮีมในชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นจนมีปริมาณสูงสุด 1,083 ยูนิต ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นโมเลกุลฮีมจะลดลง (รูปที่ 4.7 ข) เนื่องจากโมเลกุลฮีมมีปริมาณสูงถึงระดับที่สามารถควบคุมจำนวนประชากรของตัวเองได้แล้ว



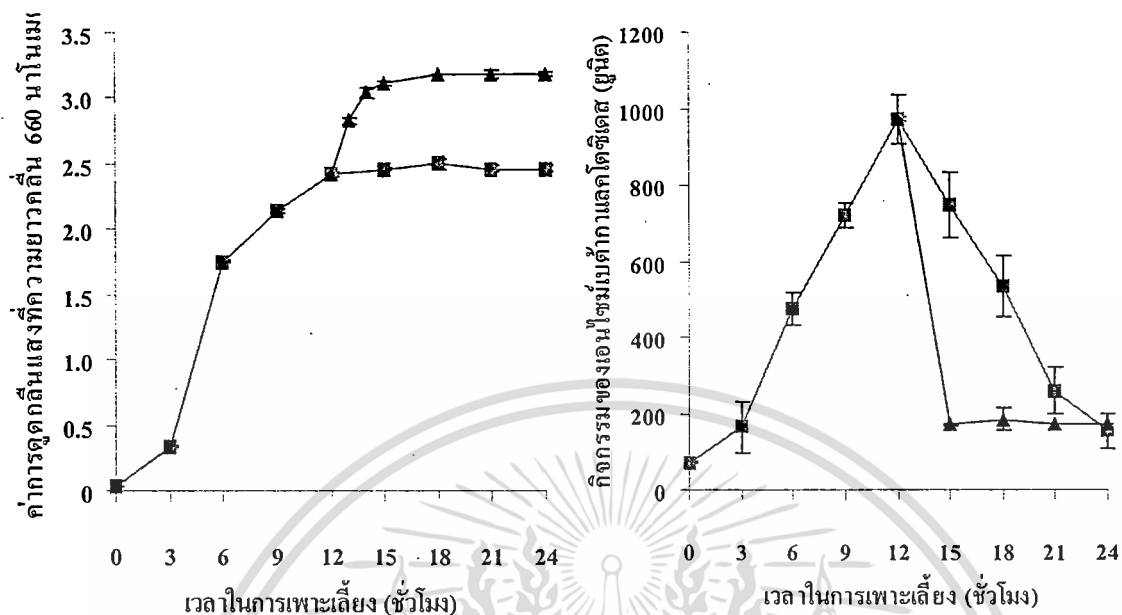
รูปที่ 4.7 การเจริญ (ก) และการผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน (ข) ของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 (◆), *Vibrio cholerae* (■), *Escherichia coli* (○), *Samonella typhimurium* (×) และ *Agrobacterium tumefaciens* A136 (×) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

จากการตรวจเอกสารพบว่า แบคทีเรียแกรมลบสามารถผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Parsek and Greenberg, 2000) แต่แบคทีเรียแกรมลบที่ทำการศึกษานี้ ได้แก่ *V. cholerae*, *E. coli*, *S. typhimurium* และ *A. tumefaciens* A136 นั้นไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน จากรายงานของ Surette และ Bassler (1998) พบว่าทั้ง *E. coli* และ *S. typhimurium* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณขนาดเล็กเมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีกลูโคส และโมเลกุลสัญญาณดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงกลุ่มที่ 2 ซึ่งเรียกว่า AI-2 (autoinducer 2) และในปี ค.ศ. 1999 Surette และคณะ ศึกษาโมเลกุลสัญญาณ AI-2 ของ *E. coli*, *S. typhimurium* และ *V. harveyi* โดยใช้แบคทีเรีย *V. harveyi* ที่มีความจำเพาะกับโมเลกุลสัญญาณ AI-2 พบว่ามีโครงสร้างของสัญญาณแตกต่างจากโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสัญญาณ AI-2 ไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์ LuxR ของเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่สร้างจาก reporter strain A136 ที่ใช้ในการศึกษา ทำให้ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ สำหรับ *V. cholerae* นั้นผลิตโมเลกุลสัญญาณ AI-2 เช่นเดียวกับกับ *E. coli* และ *S. typhimurium* (Cámara et al., 2002) ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง ไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสใน *A. tumefaciens* A136 แสดงให้เห็นว่า *A. tumefaciens* A136 ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน โดยปกติแล้ว *A. tumefaciens* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่มีโครงสร้าง 3oxoC8-HSL ได้ (Piper *et al.*, 1993) แต่เนื่องจากแบคทีเรีย *A. tumefaciens* A136 เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการตัดยีน *traI* ออกเพื่อใช้เป็น reporter strain ในการทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน จึงเหลือแต่ยีน *traR* ที่รวมอยู่กับโปรโมเตอร์ของ *lacZ* จึงทำให้ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้ (Fuqua and Winans, 1996)

4.4.2 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนใน *P. aeruginosa* ATCC 27823

จากการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ATCC 27823 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทุก 3 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าก่อนการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจาก fraction ที่ 2 เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีระยะ lag phase สั้นหลังจากชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 6 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.8 ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จนมีปริมาณสูงสุด 1,016 ยูนิต ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.8 ข)



รูปที่ 4.8 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของ *P. aeruginosa* ATCC 27823 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (—■—) และเมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (—▲—)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *P. aeruginosa* ATCC 27823 สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีเอสไอโมเซอรินแลคโตนได้ จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่าแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีเอสไอโมเซอรินแลคโตน 2 ชนิด คือ 3oxo-C12-HSL โดยมีโปรตีน LasI ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ (Pearson *et al.*, 1994) และ C4-HSL โดยมีโปรตีน RhII เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ (Pearson *et al.*, 1995) ในการทดลองนี้พบว่า *P. aeruginosa* ATCC 27823 ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีเอสไอโมเซอรินแลคโตน เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตและมีจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้น โดยเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีเอสไอโมเซอรินแลคโตนในการเจริญช่วงต้นระยะ log phase และมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในการเจริญช่วงท้ายของระยะ log phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase จากนั้น ปริมาณโมเลกุลสัญญาณจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งน่าจะเกิดจากโมเลกุลสัญญาณเอสซีเอสไอโมเซอรินแลคโตนที่เชื้อผลิตขึ้นในระดับที่มากพอเข้าไปจับกับรีเซพเตอร์ LasR หรือ RhIR ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ แล้วมีกลไกไปกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้มีการตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์โดยการยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเชื้อ ซึ่งเมื่อสามารถควบคุมจำนวนประชากรได้แล้วปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนจะลดลง

เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ATCC 27823 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงช่วงเวลาที่ 15 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงเวลาที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.8 ก) จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าภายหลังการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตเนส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับต่ำสุดภายใน 1 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าคงที่ (รูปที่ 4.8 ข) จากผลการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตเนสใน fraction ที่ 2 สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ATCC 27823 ได้ นอกจากนี้ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ น่าจะสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจากเชื้อที่แตกต่างกัน และมีโครงสร้างที่แตกต่างกันได้ เนื่องจากย่อยบริเวณวงแหวนแลคโตนซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีในสัญญาณโมเลกุลทุกชนิด

เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ทำให้โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตอยู่ในระดับสูงสุดลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะปกติ ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ลดลง ทำให้โมเลกุลสัญญาณไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายในการควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อได้ เพราะฉะนั้นจึงทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นกว่าในกรณีที่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนตามปกติ จากผลดังกล่าว เราสามารถใช้ประโยชน์จากรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในการควบคุมจำนวนประชากรแบคทีเรีย โดยการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่เชื้อผลิตขึ้น และนำไปสู่การศึกษาการลดความรุนแรงของการก่อโรคในแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนสายพันธุ์อื่นๆ โดยไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET30a ที่มียีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens*

พลาสมิด pSP3.102 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pET30a ที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens* และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องทั้งหมด

5.2 สรุปผลการชักนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูง

จากการนำพลาสมิด pSP3.102 มาชักนำด้วยสารละลาย IPTG เพื่อให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสในปริมาณสูง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสมีขนาด 37-40 กิโลดาลตัน

5.3 สรุปผลการทำเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ HisTrap พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสมีปริมาณสูงสุดใน fraction ที่ 2

5.4 สรุปผลการทดสอบผลของเอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณสื่อสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของแบคทีเรียแกรมลบ

รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อ มิลลิลิตรสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของ *P. aeruginosa* ATCC 27823 ได้และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น

บรรณานุกรม

- Bassler, B.L. 1999. "How bacteria talk to each other : regulation of gene expression by quorum sensing." *Curr. Opin. Microbiol.* 2 : 582-587
- Beck von Bodman, S. and Farrand, S. 1995. "Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-Acylhomoserine lactone autoinducer." *J. Bacteriol.* 177(17) : 5000-5008.
- Camara, M., Hardman, A., Williams, P. and Milton, D. 2002 "Quorum sensing in *Vibrio cholerae*." *Nature Genetics.* 32 : 217-218.
- Choi, S.H. and Greenberg, E.P. 1991. "The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 11115-11119.
- Crespi, B.J. 2001. "The evolution of social behavior in microorganisms." *Trends in Ecology and Evolution.* 16(4) : 178-183.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costeton, J.W. and Greenberg, E.P. 1998. "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." *Science.* 280 : 295-298.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. and Verstraete, W. 2004. "Disruption of bacterial quorum sensing : an unexplored strategy to fight infections in aquaculture." *Aquaculture.* 240 : 69-88.
- Dunny, G.M. and Leonard, B.A. 1997. "Cell-cell communication in gram positive bacteria." *Annu. Rev. Microbiol.* 51 : 527-564.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, X.T. and Zhang, L.H. 2001. "Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoderine lactonase." *Nature.* 411 : 813-819.
- Dong, Y.-H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.-L., Zhang, L.-H. 2002. "Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species.:" *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 1754- 1759.
- Dunny, G.M. and Leonard, B.A. 1997. "Cell-cell communication in gram positive bacteria." *Annu. Rev. Microbiol.* 51 : 527-564.

- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neilson, K.H. and Oppenheimer, N.J. 1981. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochemistry. 20 : 2444-2449.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. "Quorum sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators." J. Bacteriol. 176 : 269-275.
- Fuqua, W.C. and Winans, S.C. 1996. "Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10." Mol. Microbiol. 20 : 1199-1210.
- Fuqua, C. and Eberhard A. 1999. Cell-Cell Signaling in Bacteria. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria." J. Microbiol. 38(3) : 117-121.
- Kaplan, H.P and Greenberg, E.P. 1985. "Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system." J. Bacteriol. 163 : 1210-1214.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. and Downie, J.A. 2000. "The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* control a network of quorum sensing loci." Mol. Microbiol. 37 : 81-97.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. "Quorum sensing in bacteria." Annu. Rev. Microbiol. 55 : 165-199.
- Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. and Winans, S.C. 1996. "Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of a defined substrates." Science. 272 : 1655-1658
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., De'fago, G., 2003. "Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism." FEMS Microbiol. Ecol. 45 : 71– 81.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(16) : 8789-8793.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D. and Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1994. "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 : 197-201.
- Pearson, J.P. Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1995. "A second N-acylhomoserine lactone synthase signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 1490-1494.
- Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S. and Schaefer, A.L. 1997. "A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J. Bacteriol. 179 : 7530-7537
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan JR, J.E. and Greenberg, E.P. 1996. "Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing : Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 9505-9509
- Slock, J.D., VanRiet, D., Kolibachuk, D. and Greenberg, E.P. 1990. "Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR proteins defined by mutational analysis." J. Bacteriol. 172 : 3974-3979.
- Surette, M.G. and Bassler, B.L. 1998. "Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Samonella typhimurium*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 : 7046-7050.
- Surette, M.G., Miller, M.B. and Bassler, B.L. 1999. "Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 : 1639-1644.
- Zhang, H.-B., Wang, L.-H., Zhang, L.-H. 2002. "Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 : 4638-4643.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. แบคโททริปโตน	10
2. ยีสต์สกัด	5
3. โซเดียมคลอไรด์	10

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT Medium

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ต่อลิตร)
1. แอมโมเนียมซัลเฟต	2 กรัม
2. กลูโคส	2 กรัม
3. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	10.7 กรัม
4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.16 กรัม
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.010 มิลลิกรัม
6. เฟอร์ริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.005 มิลลิกรัม
7. แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.75 มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

