

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของ
Vibrio sp. ที่คัดแยกจากน้ำทะเล

STUDY ON ACYL-HOMOSERINE LACTONE SIGNAL MOLECULE OF
Vibrio sp. ISOLATED FROM SEAWATER



วิภาวี แบบประเสริฐ

WIPAWEE BAEBPRASERT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

จพ.

บัณฑิตวิทยาลัย

๑๖๕๗๗

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

๒๕๔๗

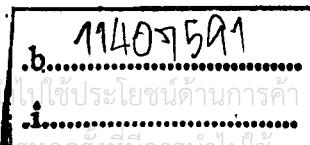
พ.ศ. ๒๕๔๗

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 51657

ISBN 974-9700-97-X

วัน,เดือน,ปี 26 ก.ค. 2547



สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร

**STUDY ON ACYL-HOMOSERINE LACTONE SIGNAL MOLECULE OF
Vibrio sp. ISOLATED FROM SEAWATER**

WIPAWEE BAEBPRASERT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2004

ISBN 974-9700-97-X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ <i>Vibrio</i> sp. ที่คัดแยกจากน้ำทะเล
นักศึกษา	นางสาววิภาวี แบบประเสริฐ
รหัสประจำตัว	43065207
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย

บทคัดย่อ

เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Acyl-homoserine lactone, AHL) เป็นโมเลกุลสัญญาณชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นสำหรับการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะผลิตขึ้นเมื่อแบคทีเรียมีความหนาแน่นของเซลล์สูง และเข้าจับกับรีเซพเตอร์แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้มีการลดลงของจำนวนประชากรของแบคทีเรีย ในงานวิจัยนี้ แบคทีเรีย 3 ไอโซเลท จาก 82 ไอโซเลท ที่ถูกคัดแยกมาจากน้ำทะเลและฟองน้ำสังเคราะห์ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหลมแท่น จังหวัดชลบุรี สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงหรือเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ โดยดูจากการเกิดปฏิกิริยากับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท จัดจำแนกอยู่ใน *Vibrio* sp. ผลการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS สนับสนุนผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ แสดงให้เห็นว่า ทั้ง 3 ไอโซเลทจัดเป็นแบคทีเรียทะเล การผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทจะเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้น และลดลงเมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเติมกลูโคส แสดงให้เห็นว่าสัญญาณควอรัมเซนซิงถูกกระตุ้นตามความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้น นอกจากนี้ได้ศึกษายีน *luxI* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *luxI* และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการโคลน pDrive และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (VanI) ของ *Vibrio anguillarum* สูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ในการนำโมเลกุลสัญญาณไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน โมเลกุลสัญญาณที่ผลิตขึ้นจะถูกย่อยโดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Variovorax paradoxus และส่งผลให้มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้น 2 เท่า นอกจากนี้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์แลคโตเนส จึงทำการสร้างพลาสมิดลูกผสมสำหรับการแสดงออกของยีน *attM* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์แลคโตเนสจาก *Agrobacterium tumefaciens* โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET30a ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เช่นกัน ทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน ชักนำทรานสฟอร์มแมนท์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสโดยการเติมสารละลาย IPTG จากการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีขนาด 37 ถึง 40 กิโลดาลตัน หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ HisTrap และพบปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์สูงสุดใน fraction ที่ 2 โดยเอนไซม์ใน fraction นี้สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตโดยไอโซเลท C-011 และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น เอนไซม์บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อ มิลลิลิตร และเวลาในการบ่มที่ 20 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 นอกจากนี้ยังพบว่า พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 2 สามารถลดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตขึ้นใน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 ได้เช่นเดียวกัน

Thesis Title	Study on Acyl-Homoserine Lactone Signal Molecule of <i>Vibrio</i> sp. Isolated from Seawater
Student	Miss.Wipawee Baebprasert
Student ID.	43065207
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Saranya Phunpruch, Dr.rer.nat

ABSTRACT

Acyl-homoserine lactone (AHL) is one of the signal molecules produced for the cell-to-cell communication in gram-negative bacteria. The signal molecule AHL is produced when bacteria reach the high cell density and subsequently bind to the receptor and induce the target gene expressions affecting in the decrease of the bacterial populations. In this work, three of 82 bacterial strains isolated from seawater and artificial sponges collected at Laem Taen, Chonburi province, were found to produce quorum sensing signal molecule or acyl homoserine lactone (AHL) based on the reaction with reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136. All of them were identified by sequence analysis of 16S ribosomal DNA gene as *Vibrio* sp. The results of the TCBS test supported the results of 16S rDNA sequences. All three strains were found to grow on GS agar without NaCl, suggesting they are marine bacteria. Production of quorum sensing signals of these 3 strains was increased by increasing the cell density and decreased when the cells reached the stationary phase. An increase of AHL level promoted by the addition of glucose indicated that the quorum sensing signals were activated according to the high cell density. The fragment of *luxI* gene encoding acyl homoserine lactone synthase was amplified, cloned into pDrive cloning vector and sequenced. The sequences showed 74% identity to acyl homoserine lactone synthase (VanI) of *Vibrio anguillarum*. The AHL signal molecule produced was degraded by *Variovorax paradoxus* as an energy source resulting in the increase of the 2-fold higher growth rate. In addition, AHL signal molecule could be cleaved by enzyme lactonase, therefore, the recombinant expression plasmid for *attM* gene encoding enzyme lactonase from *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. The

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

recombinant plasmid was transformed into the bacterial *Escherichia coli* BL21(DE3). A correct transformant was selected. The recombinant enzyme lactonase was induced by adding IPTG and analyzed with SDS-PAGE and found that this protein size was 37-40 kDa. Overexpressed enzyme lactonase was purified by using column HisTrap. It was found that the highest amount of recombinant protein was found in fraction 2. This enzyme fraction could degrade the AHL produced by isolate C-011 and affecting in the higher growth. Two mg protein/ml of purified enzyme fraction and incubation time of 20 minutes were the optimum conditions for the AHL degradation of isolate C-011. In addition, the purified enzyme fraction 2 was found to decrease the AHL signal produced from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คำแนะนำต่างๆ และประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จักมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายหน้า ข้าพเจ้ามีความทราบซึ่งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวก และคอยเอื้อเพื่อให้คำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้กำลังใจให้ความช่วยเหลือ แนะนำ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ เป็นกำลังใจสำคัญ และให้การสนับสนุนส่งเสริมทางการศึกษาแก่ข้าพเจ้า มาโดยตลอด

วิภาวี แบบประเสริฐ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญรูป.....	X
สารบัญตาราง.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 การสื่อสารในแบคทีเรีย.....	6
2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก.....	6
2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ.....	7
2.4 เอซิล โฮโมเซอรีนแลคโตน (Acyl-homoserine lactone).....	8
2.5 แบคทีเรีย <i>Vibrio</i> sp.....	13
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.6.1 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย <i>V. fischeri</i>	14
2.6.2 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย <i>V. anguillarum</i>	15
2.6.3 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย <i>P. aeruginosa</i>	16
2.6.4 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	20
3.2 สารเคมี.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	20
3.2.2 ยาปฏิชีวนะ	20
3.2.3 เอนไซม์.....	21
3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	21
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ	21
3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)	22
3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase activity).....	22
3.2.8 โปรตีนมาตรฐาน.....	22
3.2.9 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาโปรตีน	22
3.3 อุปกรณ์	23
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	24
3.5 วิธีการศึกษา	24
3.5.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล.....	24
3.5.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย.....	24
3.5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด ไฮโมเชอรินแลคโตน	25
3.5.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด ไฮโมเชอรินแลคโตน	27
3.5.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin salt agar.....	30
3.5.6 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนระหว่าง การเจริญเติบโต.....	30
3.5.7 ผลของกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณ เอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน	31
3.5.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i>	31
3.5.9 การประยุกต์ใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	42
4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล.....	43
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน....	45
4.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณ เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยวิธี cross streak assay	46
4.2.2 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณ เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า กาแลคโตซิเดส.....	48
4.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด ไฮโมเซอร์รินแลคโตน	50
4.3.1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรม	50
4.3.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	50
4.3.3 การศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS agar).....	57
4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Salt Agar (GS).....	57
4.5 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน	59
4.5.1 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนระหว่างการ เจริญเติบโต	59
4.5.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด ไฮโมเซอร์รินแลคโตน	61
4.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i>	63
4.6.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน <i>luxI</i>	63
4.6.2 การเพิ่มปริมาณยีน <i>luxI</i> โดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่.....	64
4.6.3 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> กับพลาสมิด pDrive	66
4.6.4 การทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>Escherichia coli</i> DH5 α	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	67
4.6.6 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	67
4.6.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1	68
4.7 การประยุกต์ใช้โมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตน	73
4.7.1 การเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ <i>Variovorax paradoxus</i> ใน dialyzing vessel tube.....	73
4.7.2 การใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก <i>Agrobacterium tumefaciens</i> เพื่อลดโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011	76
4.7.3 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุล สัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	93
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	99
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	99
5.2 ข้อเสนอแนะ	100
บรรณานุกรม.....	101
ภาคผนวก ก	109
ภาคผนวก ข	112
ภาคผนวก ค	114
ภาคผนวก ง.....	118
ประวัติผู้เขียน	119

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวกโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์..... 7
2.2	โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน (3oxo-C6-HSL).....8
2.3	โครงสร้างของสัญญาณโมเลกุลเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาว ของสายโซ่เอซิดแตกต่างกัน..... 10
2.4	การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน11
2.5	ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเอซิด โฮโมเซอรินแลคโตน11
3.1	การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน โดยวิธี cross streak assay26
3.2	Dialyzing vessel tube35
4.1	สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล บ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ. เมือง จ.ชลบุรี (ก), ตัวค้ำจุนฟองน้ำชนิดเซลลูโลส (ข) และลักษณะการผูกตัวค้ำจุนขณะทำการเก็บ ตัวอย่าง (ค)43
4.2	การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay และลักษณะการเกิดสีฟ้าของ <i>A. tumefaciens</i> A136 เมื่อทดสอบกับ แบคทีเรียที่เป็น positive control <i>E. coli</i> IFO3310 (ก), แบคทีเรียที่เป็น negative control <i>A. tumefaciens</i> KYC6 (ข) และตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 (ค)47
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด โฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay.....48
4.4	จีโนมิคดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 จากการแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส51
4.5	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium brve</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Marinobactor</i> sp.....53
4.6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA54
4.7	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบส ของ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011.....55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8	การเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)58
4.9	การเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร59
4.10	การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-01160
4.11	การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MB และเมื่อเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 2 และ ชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง.....62
4.12	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของ <i>Vibrio anguillarum</i> (Accession number U69677), <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number Y00509), <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number M69844) และ <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number AF170104)64
4.13	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i> ของ <i>Vibrio anguillarum</i> (Accession number U69677), <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number M96844), <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number AF170104) และ <i>Vibrio fischeri</i> (Accession number Y00509).....65
4.14	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i>66
4.15	พลาสมิดคิเอ็นเอลูกผสม68
4.16	การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>69
4.17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.170
4.18	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI ใน <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio mimicus</i> และ <i>Vibrio anguillarum</i>72
4.19	การเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ <i>V. paradoxus</i> ใน dialyzing vessel tube74

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20 การเจริญ (1) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (2) ของไอโซเลท C-011 และ <i>V. paradoxus</i> ใน dialyzing vessel tube เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเดียวกันในท่อแก้วทั้ง 2 ด้าน (ก) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ด้านหนึ่งของท่อแก้วและอีกด้านหนึ่งเพาะเลี้ยง <i>V. paradoxus</i> (ข).....	75
4.21 ขั้นตอนการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM จาก <i>A. tumefaciens</i> และชักนำให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูงเพื่อนำไปใช้ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน	78
4.22 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. tumefaciens</i> จากการแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	79
4.23 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i>	80
4.24 พลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	81
4.25 พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	83
4.26 การวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังการชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM หรือเอนไซม์แลคโตเนสใน 12 เปอร์เซ็นต์ โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE)	86
4.27 การวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังจากทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสให้บริสุทธิ์ ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE)	87
4.28 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011	89
4.29 เวลาในการย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร	90
4.30 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน (ข) ของไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MB และเมื่อเติมเอนไซม์แลคโตเนสปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 2, ชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง	92

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.31 การเจริญ (ก) และการผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตน (ข) ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> และ <i>Bacillus cereus</i> แบคทีเรียแกรมลบ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27823, <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Samonella typhimurium</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 และ ไอโซเลท C-011 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB94	
4.32 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB และเมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเอสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง97	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> sp. ชนิดต่างๆ13
3.1	สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่.....29
3.2	สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>luxI</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่.....32
3.3	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>34
3.4	สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>attM</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่.....36
3.5	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....36
3.6	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....37
4.1	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน56
4.2	ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pW11.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ระบบนิเวศหนึ่งๆ ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดอยู่ร่วมกัน สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามลำพัง จำเป็นต้องพึ่งพาอาศัยกันด้วยการติดต่อสื่อสาร โดยอาศัยท่าทางหรือสัญญาณเสียงเป็นสื่อ เพื่อทำความเข้าใจระหว่างกันและกัน เราอาจนึกไม่ถึงว่าสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวกแบคทีเรียมีความสามารถในการติดต่อสื่อสารกันได้ ทั้งภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง แบคทีเรียติดต่อซึ่งกันและกันโดยอาศัยสารเคมีเป็นตัวส่งสัญญาณ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ใช้สารโมเลกุลเล็กจำพวกโพลิโกเปปไทด์เป็นตัวส่งสัญญาณ (Dunny and Leonard, 1997) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) จะส่งสัญญาณโมเลกุลหลายชนิด (Bassler, 1999) ระบบควอรัมเซนซิง (quorum sensing) เป็นการสื่อสารระบบหนึ่งที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ และเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของประชากรเพิ่มขึ้น จะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (*N*-acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) โดยเอนไซม์ในกลุ่มของโปรตีน LuxI เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นสัญญาณโมเลกุลนี้จะอยู่ภายในเซลล์หรือถูกขับออกนอกเซลล์ และสามารถจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ในกลุ่มของโปรตีน LuxR ที่มีความจำเพาะ เมื่อสัญญาณโมเลกุลจับกับตัวรีเซพเตอร์แล้วจะไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกันออกไป และในที่สุดสามารถลดจำนวนประชากรของแบคทีเรียลงได้

ตัวอย่างงานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสง (bioluminescence) ในแบคทีเรีย *Vibrio fischeri* และ *Vibrio harveyi* แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้จะผลิตและตอบสนองต่อ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นั่นคือเมื่อเชื้อเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น จะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และสะสมอยู่ในอาหารจนกระทั่งมีปริมาณสูงพอที่จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade จะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) โดย LuxI สร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมาจับกับรีเซพเตอร์ LuxR แล้วกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้างของเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (*luxCDABE*) (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Silverman, 1984; 1987) มีรายงานวิจัยพบว่า ระบบควอรัมเซนซิงมีประโยชน์ทางการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากระบบควอรัมเซนซิงควบคุมการแสดงออกของการถอดรหัสของยีนและการหลังโปรตีนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนหรือในพืช การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงที่กลไกการก่อโรคเป็นที่ทราบกันดีในวงการแพทย์ คือการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรีย *P. aeruginosa* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนชนิด 3oxo-C12-HSL จากการทำงานของโปรตีน LasI เมื่อโมเลกุลสัญญาณเข้าจับกับรีเซพเตอร์ LasR จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อีลาสเทส (elastase) ที่ทำหน้าที่ย่อยอีลาสติน (elastin) และคอลลาเจน (collagen) และยับยั้งการทำงานของอิมมูโนโกลบูลินจี ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคเพิ่มขึ้น (Passador *et al.*, 1993) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เข้าไปเจริญในปอดจะเจริญติดกับผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อปอดและแสดงคุณสมบัติที่เรียกว่า twitching เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง มีงานวิจัยพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถผลิต 3oxo-C12-HSL จะไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Rashid *et al.*, 2000) สำหรับพาโทเจน *Agrobacterium tumefaciens* ที่ก่อให้เกิดโรคมุ่มปม (crown gall tumor) ในพืช อาศัยระบบควอรัมเซนซิงกระตุ้นการขนส่งพลาสมิด Ti เข้าสู่พืช (Zhang *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน จะแสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง (Pirhonen *et al.*, 1993) ดังนั้นการศึกษากิจกรรมควบคุมจำนวนประชากรหรือระบบควอรัมเซนซิง และการเข้าใจกลไกในการส่งสัญญาณจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการพัฒนาแนวทางการรักษาโรคแนวใหม่โดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะแต่เป็นการรบกวนความรุนแรงของการก่อโรคของแบคทีเรียแทน

มีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงเป็นจำนวนมาก แต่ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลยังมีรายงานการศึกษาไม่มากนัก ทะเลเป็นระบบนิเวศหนึ่งที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูง มีความแปรผันทั้งความกดดัน ความเค็มและอุณหภูมิ ทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวโดยการพัฒนาศรีวิทยาและเมทาบอลิซึมเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมนั้นได้ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลบางชนิดถูกค้นพบว่าผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น *Alteromonas rubra* ผลิตยาปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (McCrain and Hemscheidt, 2000) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลที่พบส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนได้ แบคทีเรีย *Vibrio fischeri* เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่มีรายงานการพบโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน (Eberhard *et al.*, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1981) และใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงจนกระทั่งถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงใน *Vibrio harveyi* ว่าเกี่ยวข้องกับการเรืองแสง (Cao and Meighen, 1989) ใน *Vibrio anguillarum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในปลาทะเล (Milton et al., 1997) และใน *Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน (Cámara et al., 2002) แต่ยังมีแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. อีกหลายสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค รวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่มีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิง ดังนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจทำการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงหรือกลไกการส่งโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เพื่อควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรียหรือลดความรุนแรงของการก่อโรค งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ในทะเลและสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จากนั้นศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เพื่อที่จะนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรแบคทีเรีย และพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในวงการแพทย์และเกษตรกรรมต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ด้วยเทคนิค cross streak assay และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส
- 1.2.2 ศึกษาชนิดและคุณลักษณะของแบคทีเรียในทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยเทคนิคทางชีวเคมีและทางชีววิทยาระดับโมเลกุล
- 1.2.3 ศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากแบคทีเรียที่คัดเลือก
- 1.2.4 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในแบคทีเรียที่คัดเลือก
- 1.2.5 ศึกษาการใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Variovorax paradoxus*
- 1.2.6 ศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในเชื้อที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณแหลมแม่เทียน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี เป็นระยะเวลา 6 วัน ตั้งแต่วันที่ 14 ถึง 19 สิงหาคม พ.ศ. 2545 และใช้ฟองน้ำชนิดเชลลูโลสเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

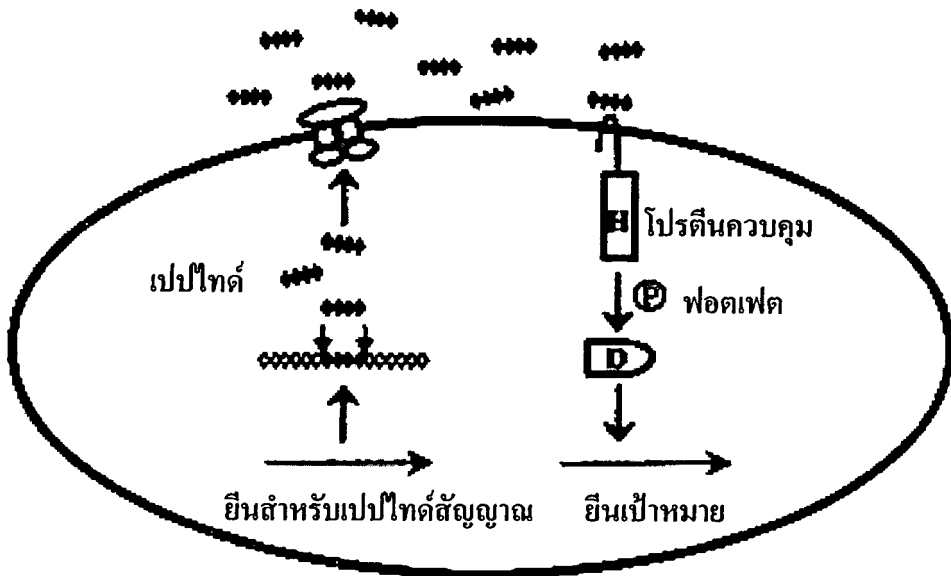
ตัวคำจุนและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เป็นอาหารคัดเลือก ทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน ขึ้นต้นด้วยเทคนิค cross streak assay โดยใช้แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain คัดเลือกเชื้อที่แสดงผลบวก (positive) มาทดสอบการผลิตและปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนในรูปของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้แล้ว จึงทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากนั้นศึกษารูปแบบของการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน นำโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นั้นไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตของเชื้อที่สามารถย่อยสารนี้ได้ เช่น *Variovorax paradoxus* ออกแบบการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดแยกได้ร่วมกับ *V. paradoxus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB และศึกษาการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต เนื่องจากมีรายงานวิจัยพบว่า เอนไซม์แลคโตนเนสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งเป็นพาโทเจนได้ และส่งผลให้ความรุนแรงของการก่อโรคลดลง จึงได้เกิดแนวความคิดในการนำยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* เข้าไปในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET30a แล้วชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์แลคโตนเนสในปริมาณสูง เพื่อนำเอนไซม์แลคโตนเนสไปใช้ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคสายพันธุ์อื่น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้ และทราบรูปแบบของการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการผลิตแบคทีเรียสายพันธุ์กลายโดยการตัดต่อยีน เพื่อควบคุมความรุนแรงของการก่อโรคและลดจำนวนประชากรแบคทีเรียต่อไปในอนาคต ซึ่งมีประโยชน์ในทางการแพทย์และเกษตรกรรม หรืออาจจะนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้

กับงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่น ศักยภาพของโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนต่อการกระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป

cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโพลิโกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กและจึงถูกส่งผ่านออกนอกเซลล์ เปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติหรือฟีโรโมน โดยมีโปรตีนเซนเซอร์สำหรับโคเนสที่เซลล์เมมเบรนเป็นตัวจดจำ เซนเซอร์ที่ได้รับสัญญาณเปปไทด์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตด้วยตัวเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทีดีน และเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุม (regulator) ที่อยู่ข้างเคียง เมื่อมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนควบคุมบริเวณกรดอะมิโนแอสปาร์เทตแล้ว โปรตีนนี้จะกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น (รูปที่ 2.1) ดังนั้น ขบวนการขนส่งสัญญาณหรือการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวกจึงจัดเป็นแบบ phosphorylase cascade โดยเรียกการควบคุมประชากรเซลล์ด้วยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้ว่า “เปปไทด์ควอรัมเซนซิง (peptide quorum sensing)” (Bassler, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997; Miller and Bassler, 2001)



รูปที่ 2.1 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวกโดยผ่าน โมเลกุลสัญญาณเปปไทด์

ที่มา : Miller and Bassler (2001)

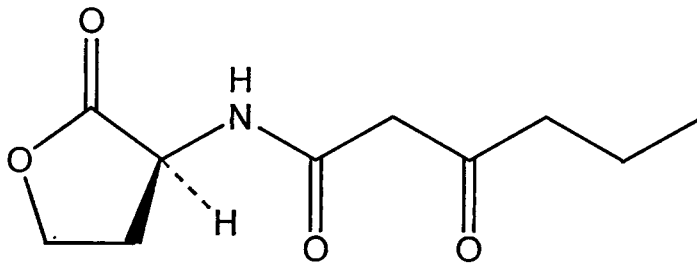
2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบมีหลายประเภท “ระบบควอรัมเซนซิง (quorum sensing)” เป็นการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียแกรมลบอาศัยระบบควอรัมเซนซิงเพื่อตอบสนองต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Fuqua *et al.*, 1994) นั่นคือ เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สัญญาณโมเลกุลที่มีชื่อว่า “เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (acyl-HSL)” และส่งสัญญาณนี้ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสัญญาณสูงถึงระดับที่สามารถจับกับรีเซพเตอร์จะเกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย และนำไปสู่การควบคุมความหนาแน่นของจำนวนประชากรในที่สุด 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

2.4 เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Acyl-homoserine lactone)

เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเป็นสัญญาณโมเลกุลขนาดเล็ก พบในแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปมีสูตรโครงสร้างเป็น 3oxo-C6-HSL ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (3oxo-C6-HSL)

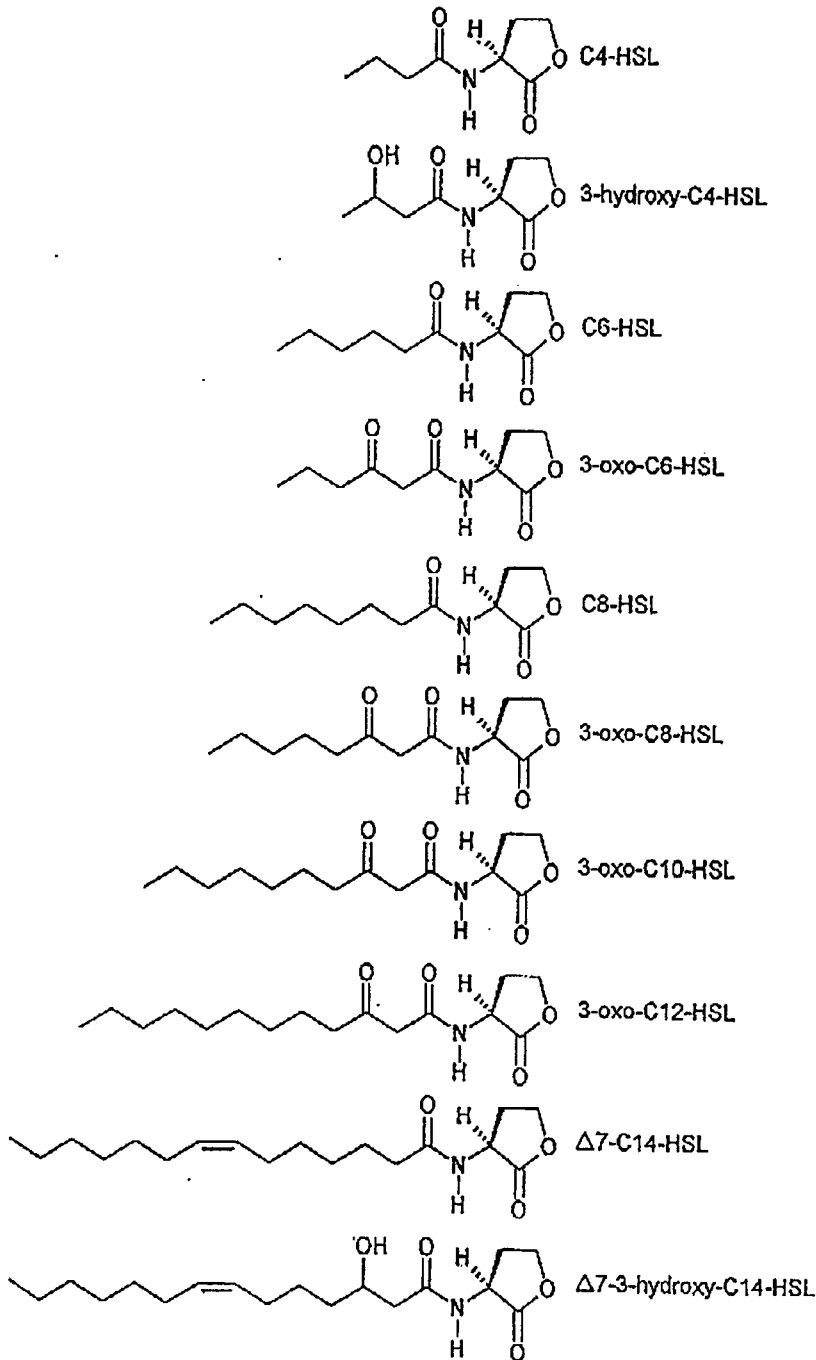
สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสังเคราะห์จากสารตั้งต้น *S*-adenosylmethionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนและ acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยมีเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (acyl-homoserine lactone synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Moré *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996) เอนไซม์เอซิลเอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกลสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ของแบคทีเรียต่างชนิดกันทำให้มีการผลิตสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน สัญญาณเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมีโครงสร้างแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่เอสซิล (acyl side chain) ตั้งแต่ 4 ถึง 16 คาร์บอนอะตอม และบริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่เอสซิลอาจอยู่ในรูปอิมิตัวหรือรูปคาร์บอนิล (O) หรือไฮดรอกซิล (OH) (Fuqua and Eberhard, 1999; Greenberg, 2000) (รูปที่ 2.3) โปรตีน Ahyl 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 และใน *Rhodobacter sphaeroides* มีโปรตีน CerI ที่สังเคราะห์ 7,8-cis-C4-HSL (Lithgow *et al.*, 2000; 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 ซึ่งจะเกิดขึ้นพร้อมกับการหลุดออกของเมธิลไทโออะดีโนซีน (methylthioadenosine) ทำให้เกิดสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น (รูปที่ 2.4) จากนั้นจะเกิดการแพร่ผ่านออกภายนอกเซลล์และสามารถจับกับรีเซพเตอร์ที่มีความจำเพาะซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxR ตัวรีเซพเตอร์ที่มีสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายและกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของยีนนั้นๆ (รูปที่ 2.5) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย

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)

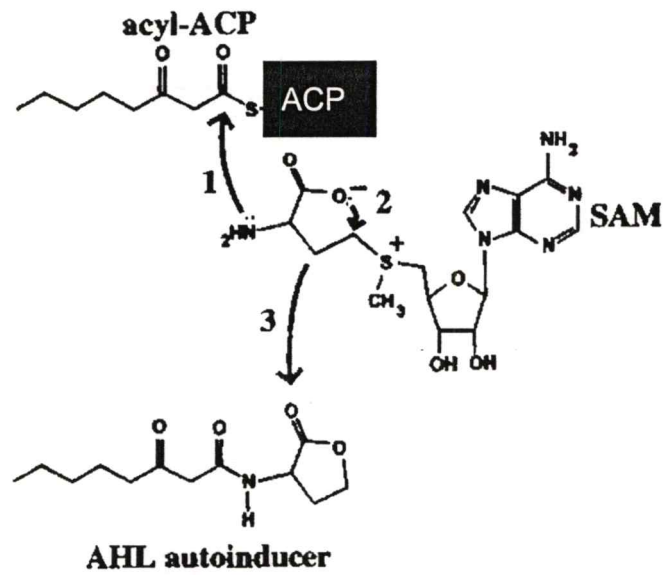
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



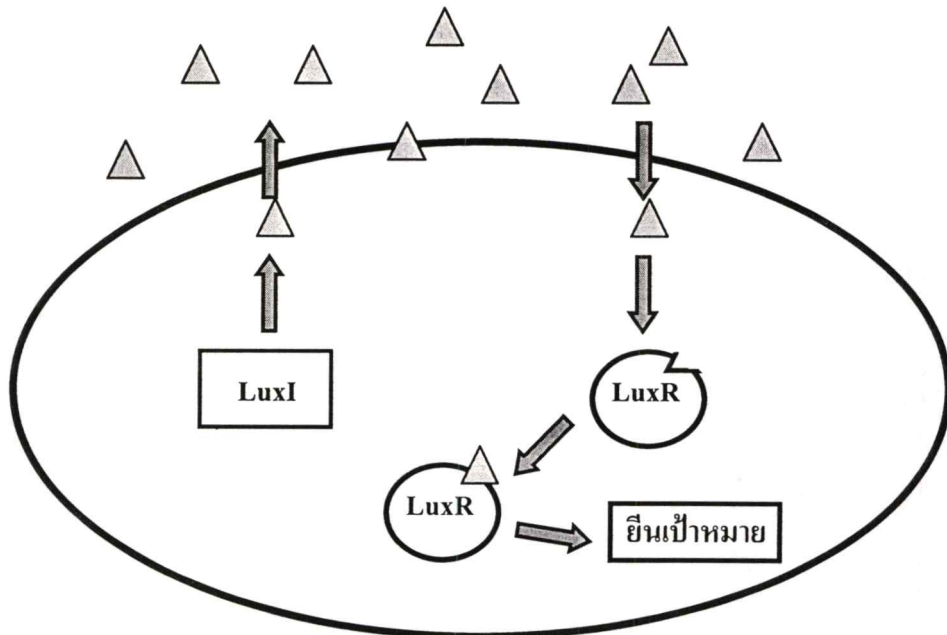
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสัญญาณโมเลกุลเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่เอสซิลแตกต่างกัน

ที่มา : Fuqua and Eberhard (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน
ที่มา : Miller and Bassler (2001)



รูปที่ 2.5 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโม-
เซอรีนแลคโตน

ที่มา : Bassler (1999)

แบคทีเรีย *V. fischeri* และ *V. harveyi* ที่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับสัตว์ทะเลจะมี กลไกตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นั่นคือเมื่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในสภาพแวดล้อมมีปริมาณสูงถึงระดับหนึ่งจะจับกับรีเซพเตอร์ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade ส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht and Silverman, 1984; 1987)

ในปัจจุบันพบว่า การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในพาโทเจนมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากระบบควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมการเจริญเติบโตและความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียในคนหรือในพืชได้ ยกตัวอย่าง เช่น เมื่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ และเจริญคิอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อปอด เซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ที่ติดกับผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด (mushroom shape) เซลล์แบคทีเรียถูกห่อหุ้มด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และมีช่องว่างที่ขอมให้สารอาหารผ่านเข้า และปล่อยของเสียออกนอกไบโอฟิล์ม เซลล์ของ *P. aeruginosa* ที่เจริญพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยาไม่สามารถเข้าไปทำลายเชื้อที่อยู่ภายในได้ ทำให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง (Parsek and Greenberg, 2000) มีรายงานการวิจัยพบว่า แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Davies *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวเฉาในข้าวโพดหวาน โดยในแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคลดลง (Beck von Bodman and Farrand, 1995) ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ของระบบควอรัมเซนซิงกับความรุนแรงของการเกิดโรคจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการแพทย์และเกษตรกรรม และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนารักษาโรคด้วยวิธีใหม่ที่ไม่ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง แต่จะไปรบกวนความสามารถในการก่อโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกักระบบควอรัมเซนซิงอาจนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

2.5 แบคทีเรีย *Vibrio* sp.

แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ (genus) Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนหรือโค้งงอ เซลล์มีขนาด 0.5-0.8×1.4-2.6 ไมครอน เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) ไม่สร้างสปอร์และไม่มีแคปซูล แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ จึงเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า “halophilic vibrio” ยกเว้น *Vibrio cholerae* และ *Vibrio mimicus* ที่เจริญได้ในอาหารที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (บุญภาวรินทร์รักษ์, 2524; Singleton, 1992) *Vibrio* บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ และบางสายพันธุ์มีพิษเนื่องจากสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในคน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	อาการของโรค				
	กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ	ติดเชื้อทางบาดแผล	การติดเชื้อทางหู	โลหิตเป็นพิษระยะที่หนึ่ง	โลหิตเป็นพิษระยะที่สอง
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cholerae</i> non-O1	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. cincinnatiensis</i>				+	
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>V. carchariae</i>		+			

+++ มีรายงานจำนวนมาก, ++ มีรายงานจำนวนปานกลาง (6-100 รายงาน), + มีรายงานจำนวนน้อย (1-5 รายงาน), (+) ข้อมูลไม่ชัดเจน

ที่มา : Pavia et al. (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *V. fischeri*

Hanzelka และ Greenberg (1995) ศึกษาความสามารถของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ติดฉลากด้วย ^3H ในการจับกับเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่มีการแสดงออกของโปรตีน LuxR จาก *V. fischeri* พบว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ติดฉลากด้วย ^3H สามารถจับกับเซลล์ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิดที่ถูกตัดบริเวณด้านปลาย C ในโปรตีน LuxR แต่ไม่จับกับเซลล์ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิดที่ถูกตัดบริเวณด้านปลาย N ในโปรตีน LuxR ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า บริเวณปลายด้าน N ในโปรตีน LuxR เป็นบริเวณเข้าจับของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน หลังจากนั้นในปี 1996 Hanzelka และ Greenberg ศึกษาการผลิต 3oxo-C6-HSL ใน *E. coli* ซึ่งได้รับพลาสมิดที่มียีน *luxI* ของ *V. fischeri* พบว่าทั้งเมทไทโอนีน (methionine) และเอส-อะดีโนซิลเมทไทโอนีน (*S*-adenosylmethionine, SAM) จำเป็นต่อการสังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL ไซโคลิวซีน (cycloleucine) ที่เป็นตัวยับยั้งในการสังเคราะห์ SAM สามารถขัดขวางการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า SAM จำเป็นต่อการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมากกว่าเมทไทโอนีน จากการวิเคราะห์ปริมาณของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตขึ้นและติดฉลากด้วย ^{15}N -เมทไทโอนีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry ทำให้ทราบแน่ชัดว่า SAM เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Schaefer และคณะ (1996) ศึกษาการแยกโปรตีน LuxI จากแบคทีเรีย *V. fischeri* ให้บริสุทธิ์ และชนิดของสารตั้งต้นของโปรตีน LuxI ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL และ C6-HSL โดยพบว่า SAM และ acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ที่มีความยาวของคาร์บอน 6 อะตอมในหมู่เอซิล (hexanoyl-ACP) มีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL และ C6-HSL มากที่สุด เมื่อมีการแทนที่ SAM ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น เมทไทโอนีน, เอส-อะดีโนซิลโฮโมซิสเทอีน, โฮโมเซอริน หรือโฮโมเซอรินแลคโตนจะไม่พบการสังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL และ C6-HSL

Hanzelka และคณะ (1999) พบว่านอกจากโปรตีน LuxI ใน *V. fischeri* ที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3oxo-C6-HSL แล้ว ยังมีโปรตีน AinS อีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน C8-HSL แต่ไม่จับโปรตีน AinS อยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม LuxI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน LuxM ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตน 3oxo-C4-HSL ในแบคทีเรีย *V. harveyi* จากการสกัดโปรตีน AinS ให้บริสุทธิ์ และศึกษาสารตั้งต้นที่โปรตีน AinS ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ พบว่าโปรตีน AinS ใช้ SAM และ octanoyl-ACP เป็นสารตั้งต้นเหมือนกันกับโปรตีน LuxI ดังนั้นจึงจัดให้โปรตีน AinS เป็นโปรตีนกลุ่มที่ 2 ของเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส

2.6.2 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *V. anguillarum*

Milton และคณะ (1997) ศึกษากระบวนการควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *V. anguillarum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเลือดเป็นพิษในปลาทะเล เช่น ปลาเทราท์ (rainbow trout) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ด้วยเทคนิค MS (Mass Spectrometry) พบว่ามีโครงสร้างเป็น 3oxo-C10-HSL จากการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ พบว่ามียีน *vanI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน VanI ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ด้าน downstream ของยีน *vanI* มีบริเวณของยีน *vanR* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน VanR ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณ นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรีย *V. anguillarum* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *vanI* ไม่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3oxo-C10-HSL ได้ ในขณะที่ความรุนแรงของการเกิดโรคในปลาเทราท์ที่เกิดจาก *V. anguillarum* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Milton และคณะ (2001) ศึกษาคุณลักษณะของระบบควอรัมเซนซิงอีกชนิดหนึ่งใน *V. anguillarum* ด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Mass spectrometry ร่วมกับการวิเคราะห์ทางเคมี โดยสามารถจัดจำแนกโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ C6-HSL และ 3hydroxy-C6-HSL สารทั้ง 2 ชนิดนี้สังเคราะห์มาจากโปรตีน VanM ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *vanM* ด้าน downstream ของยีน *vanM* มีบริเวณของยีน *vanN* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน VanN ทำหน้าที่เป็นตัวรับโมเลกุลสัญญาณ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *vanM/vanN* มีความคล้ายคลึงกับยีน *luxM/luxN* ใน *V. harveyi* *V. anguillarum* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *vanM* ไม่สามารถสังเคราะห์ C6-HSL, 3hydroxy-C6-HSL และ 3oxo-C10-HSL ได้ แสดงให้เห็นว่า C6-HSL และ 3hydroxy-C6-HSL ควบคุมการสังเคราะห์ 3oxo-C10-HSL ผ่านทางยีน *vanRI* *V. anguillarum* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *vanN* มีการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเหมือนกับสายพันธุ์แท้ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์กลายทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (protease) และไม่พบความรุนแรงของการเกิดโรคในปลาที่ติดเชื้อ

2.6.3 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *P. aeruginosa*

Pearson และคณะ (1995) ศึกษาาระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* พบว่า *P. aeruginosa* ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3oxo-C12-HSL จากโปรตีน LasI เมื่อ 3oxo-C12-HSL เข้าจับกับโปรตีน LasR จะกระตุ้นการแสดงออกของยีน *lasB* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โปรตีเอสอีลาสเทส (protease elastase) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเนื้องอกในถุงน้ำดี (cystic fibrosis) จากการศึกษา *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลาย พบว่าสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิดที่ 2 ได้ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR และ GC-MS พบว่ามีโครงสร้างเป็น C4-HSL อย่างไรก็ตาม *E. coli* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *lasI* จะมีการผลิต 3oxo-C12-HSL แต่ไม่ผลิต C4-HSL แสดงให้เห็นว่า C4-HSL ถูกสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิดที่แตกต่างไปจากการสังเคราะห์ 3oxo-C12-HSL

Parsek และคณะ (1999) ศึกษากลไกการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* โดยทำเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิดที่ 2 (RhlI) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน LuxI ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ C4-HSL ได้โดยใช้ butyryl-ACP และ SAM เป็นสารตั้งต้น

Whiteley และคณะ (1999) ทำการคัดจำแนกยีนที่ถูกควบคุมโดยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วยการสร้างห้องสมุดยีน (gene library) โดยการสอดแทรกทรานโปซอน (transposon) ที่ขาดโปรโมเตอร์ *lacZ* เข้าไปในโครโมโซมของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่สังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน พบว่ายีนที่ถูกควบคุมโดยระบบควอรัมเซนซิงมีทั้งหมด 39 ยีน และจำแนกตามรูปแบบของการควบคุมได้เป็น 4 กลุ่ม สองกลุ่มแรกตอบสนองต่อ 3oxo-C12-HSL และอีก 2 กลุ่มตอบสนองต่อทั้ง 3oxo-C12-HSL และ C4-HSL ประมาณครึ่งหนึ่งของยีนทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มอยู่ใน 7 โอเปอรอน (operon) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่ถูกควบคุมด้วยระบบควอรัมเซนซิงอีกจำนวนมากสามารถทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Rashid และคณะ (2000) ศึกษาาระบบควอรัมเซนซิงกับความรุนแรงของการเกิดโรคในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์แท้ PAO1 และสายพันธุ์กลาย PAOM5 ที่ขาดยีน *ppk* ซึ่งทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส (polyphosphate kinase, PPK) PPK มีผลต่อการเคลื่อนที่แบบ swimming, swarming และ twitching จากการศึกษา พบว่าเซลล์ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายไม่สามารถรวมตัวหนาขึ้นและพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มได้ การผลิต

โปรตีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ได้แก่ อีลาสเทส (elastase) และแรมโนลิปิด (rhamnolipid) ลดลง นอกจากนี้เมื่อทดสอบความรุนแรงของการเกิดโรคในหนุที่มีแผลพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายทำให้หนุตายเพียง 7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์แท้ทำให้หนุตายถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น PPK อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจในการควบคุมการเกิดไบโอฟิล์มโดยการรบกวนระบบควอรัมเซนซิงและนำไปสู่การผลิยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ในการต้านจุลชีพ

Pearson และคณะ (2000) ศึกษากระบวนการควอรัมเซนซิงกับการควบคุมความรุนแรงของการเกิดโรคจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* พบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *lasI* และ *rhlI* ในการสังเคราะห์ 3oxo-C12-HSL และ C4-HSL ตามลำดับ จะก่อให้เกิดโรคนิวโมเนียในหนุแรกเกิดน้อยกว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์แท้ แสดงให้เห็นว่าระบบควอรัมเซนซิงทำหน้าที่ควบคุมการเกิดโรคนิวโมเนียจาก *P. aeruginosa* ในหนุแรกเกิด

Kievit และคณะ (2001) ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มจากการทำงานของยีน *lasI* และ *rhlI* ในระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* พบว่าแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนทั้ง 2 ยีนดังกล่าว ไม่มีการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มในการเจริญเติบโตแตกต่างกับสายพันธุ์แท้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนสังเคราะห์ พบว่าเซลล์มีการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มเหมือนกันกับในสายพันธุ์แท้

2.6.4 งานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ

Beck von Bodman และ Farrand (1995) รายงานการศึกษากระบวนการควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวเฉา (Stewart's wilt) ในข้าวโพดหวาน โดยการผลิตแคปซูล (extracellular heteropolysaccharide capsule, EPS) ซึ่งทำให้พืชไม่สามารถต้านทานโรคได้ เนื่องจาก EPS กีดขวางการไหลของน้ำในระบบท่อลำเลียงของพืช จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectroscopy พบว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนที่ *E. stewartii* สังเคราะห์มีสูตรโครงสร้าง 3oxo-C6-HSL เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์และเป็นตัวรับสัญญาณ พบว่าโปรตีน EsaI และ EsaR จัดอยู่ในกลุ่ม LuxI และ LuxR ตามลำดับ *E. stewartii* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *esaI* ไม่สามารถสังเคราะห์สาร 3oxo-C6-HSL ได้ และสูญเสียความสามารถในการผลิต EPS ทำให้ลดความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในข้าวโพดหวานได้

Byers และคณะ (2002) พบว่าระบบควอรัมเซนซิงควบคุมความรุนแรงในการเกิดโรค และการผลิตยาปฏิชีวนะ carbapenem ในแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเปื่อยของหัวมันฝรั่ง แครอท และบีท *E. carotovora* สังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL และมีการสะสมในระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) แต่จะลดลงเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) การลดลงของโมเลกุลสัญญาณขึ้นอยู่กับการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะสูงขึ้นตามการเจริญเติบโต นั่นคือ สาร 3oxo-C6-HSL มีความเสถียรสูงสุดที่ค่าพีเอช 6.8 แต่การสลายตัวของสารจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น (จากค่าพีเอช 7 ไปจนถึงค่าพีเอช 8.5) นอกจากนี้ ยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสารดังกล่าวจะไม่เสถียร

Leadbetter และ Greenberg (2000) พบว่าแบคทีเรีย *Variovorax paradoxus* สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยแบคทีเรีย *V. paradoxus* สามารถย่อยวงแหวนโฮโมเซอรินแลคโตนแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน (energy source) และแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ น้ำหนักของเซลล์ (กรัมต่อโมล) สัมพันธ์กับความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl-chain) โดยน้ำหนักของเซลล์เพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่เอซิลของโมเลกุลสัญญาณที่ถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Gray และ Garey (2001) ใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับ LuxI และ LuxR 76 ชนิด จากแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่นำมาศึกษาและสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวออกเป็น 3 กลุ่มคือ α -proteobacteria, β -proteobacteria และ γ -proteobacteria

Guan และ Kamino (2001) คัดเลือกแบคทีเรียที่อยู่ในทะเล (marine bacteria) จากความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร IDSM (Iron-Deficient and Low-Nutrient Seawater-Based Liquid Medium) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ได้ ทำการนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเลที่ได้รับการเติม siderophore desferrioxamine (DEF) ร่วมกับสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3oxo-C6-HSL หรือ C8-HSL พบว่าการเติม DEF และสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนส่งผลให้มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในน้ำทะเลที่ไม่ได้เติมสารทั้ง 2 ชนิด ทำให้เพิ่มความสามารถในการจัดจำแนกและเพาะเลี้ยง heterotrophic marine bacteria ในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ ยังทำการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วในฐานข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank)

Gram และคณะ (2002) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากเกล็ดหิมะในทะเล เมื่อนำโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรเจนไอออนแลคโตนที่แบคทีเรียผลิตได้มาแยกด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) และทดสอบกับ reporter strain *A. tumefaciens* พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์จาก 43 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรเจนไอออนแลคโตนได้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรเจนไอออนแลคโตนได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน พบว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Roseobacter* sp. ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม α -proteobacteria และแบคทีเรียอีก 1 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Marinobacter* sp. ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม γ -proteobacteria

Conway และ Greenberg (2002) ศึกษากระบวนการรวมเซนซิงในแบคทีเรีย *Bukholderia vietnamiensis* G4 ที่มีความสามารถในการย่อยไตรคลอโรเอทิลีน (trichloroethylene) และโทลูอีน (toluene) และคัดแยกมาจากบ่อพักน้ำในโรงงานบำบัดน้ำเสีย จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรเจนไอออนแลคโตนที่ *B. vietnamiensis* G4 สังเคราะห์ขึ้น ด้วยเทคนิค HPLC และ GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) ทำให้ทราบว่าโครงสร้างคือ C10-HSL เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบควอรัมเซนซิง พบว่า *B. vietnamiensis* G4 มียีน *bviI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxI ทำหน้าที่สังเคราะห์ C10-HSL และมียีน *bviR* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxR ทำหน้าที่เป็นตัวรับโมเลกุลสัญญาณ นอกจากนี้ *B. vietnamiensis* สายพันธุ์กลายซึ่งขาดยีน *bviI* ไม่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ C10-HSL

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 IFO3301
- 3.1.4 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (*supE44* Δ *lac* U169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)
hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)
- 3.1.5 *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)
- 3.1.6 *Variovorax paradoxus*

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.1 Marine broth (MB) และ Marine agar (MA)
- 3.2.1.2 Luria-Bertani medium (LB)
- 3.2.1.3 AT medium
- 3.2.1.4 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS)
- 3.2.1.5 Gelatin salt agar (GS)

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

- 3.2.2.1 สเปกติโนมัซซิน (spectinomycin)
- 3.2.2.2 เตตระซัยคลิน (tetracycline)
- 3.2.2.3 แอมพิซิลลิน (ampicillin)
- 3.2.2.4 กานามัยซิน (kanamycin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 เอนไซม์

- 3.2.3.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*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)

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.4.1 แลมบ์ดา (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 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

- 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, โบรโมฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, Tris-boric-EDTA 1 เท่า)
- 3.2.5.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 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 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) (Merck, Germany)
- 3.2.5.11 ไลโซไซม์ (lysozyme)
- 3.2.5.12 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.13 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE-buffer saturated phenol)

3.2.5.14 คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)

3.2.5.15 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol)

3.2.5.16 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.5.17 เอทานอล 90 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 อะคริลาไมด์ (acrylamide) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการศึกษา

3.5.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสที่มีขนาด 125 ลูกบาศก์เซนติเมตร (5 ซม.×5 ซม.×5 ซม.) เป็นตัวจำจุน และมีอาหารคัดเลือกสูตร MA (ภาคผนวก ก1) จุ่มในน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เป็นระยะเวลา 6 วัน ตั้งแต่วันที่ 14 ถึงวันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2545 เมื่อนำตัวจำจุนซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marine agar ขึ้นจากน้ำทะเลแล้วตัดชิ้นฟองน้ำออกให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (1 ซม.×1 ซม.×1 ซม.) จากนั้นนำชิ้นฟองน้ำที่ตัดใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 30 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อบีบชิ้นฟองน้ำเพื่อให้แบคทีเรียที่อยู่ในฟองน้ำหลุดออกมาอยู่ในอาหาร เขย่าให้เข้ากันแล้วกระจายเซลล์ออกจากชิ้นฟองน้ำด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วน 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} แล้วนำ 100 ไมโครลิตรมา spread บนอาหารแข็งสูตร MA ในอัตราการเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยนำเข็มเย็บเชื้อที่ผ่านการลนไฟมาแตะเชื้อและเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 14 ชั่วโมง เมื่อแบคทีเรียเจริญจึงทำซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB ต่อไป

3.5.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α 1 โคโลนี ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เซลล์จะเจริญสูงสุดภายในเวลา 16 ชั่วโมงหลังเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารแข็งทำได้โดยเติมวุ้น Difco bacto 15 กรัมต่อ

อาหาร 1 ลิตร ในกรณีที่คัดเลือกเชื้อด้วยอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินนั้น แอมพิซิลินจะถูกเติมเข้าไปในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.5.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.5.2 มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และเก็บส่วนใส (supernatant) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

3.5.2.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. tumefaciens* A136

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

3.5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

3.5.3.1 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

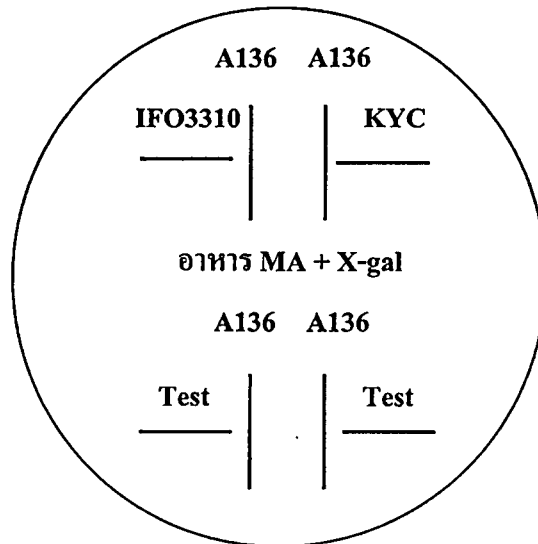
โดยวิธี cross streak assay

ลากเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ที่มีสาร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ IFO3310 เป็น positive control, *A. tumefaciens* สายพันธุ์ KYC6 เป็น negative control และ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain ดังแสดงในรูปที่ 3.1 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

3.5.3.2 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

โดยวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase activity)

เก็บเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดังในข้อที่ 3.5.2.2 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโคโนโดยวิธี cross streak assay

ทั้งส่วนใสแล้วกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT (ภาคผนวก ก3) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลิน และสเปกติโนมายซิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.4 ถึง 0.5 ปิเปตเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังในข้อ 3.5.2.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และบันทึกผลปิเปตเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเติมบัฟเฟอร์ Z (ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.06 โมลาร์, โซเดียมไคโซโครเจนฟอสเฟต 0.04 โมลาร์, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.001 โมลาร์, เบต้าเมอแคปโตเอธานอล 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 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 จากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตร ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจากสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.5.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตน

3.5.4.1 การทดสอบโดยการย้อมสีแกรม

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนในหยดน้ำที่อยู่บนสไลด์ ครึ่งเชื่อมด้วยความร้อน หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยเชื้อและทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอไดน จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอไดนให้ท่วมรอยเชื้อและทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างน้ำยาไอโอไดนด้วยน้ำแล้วตามด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 20 วินาที หยดสี safranin ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ ตรวจสอบผลดูรูปร่างและสีแกรมของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.4.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนได้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

3.5.4.2.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 loop มากระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ที่มี lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมนสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมนสารละลายฟีนอลที่อิมัตด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วยฟีนอลที่อิมัตด้วยบัฟเฟอร์ TE จนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นของฟีนอลที่อยู่ชั้นล่างกับส่วนใสที่อยู่ชั้นบน ดูดส่วนใสมาเติมนสารละลายโซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติมเอธานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดทดลองมา

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ คั่วให้แห้งลงบนกระดาษจนกระทั่งตะกอน ดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วยฟีนอลที่อิมัตด้วยบัฟเฟอร์ TE ตามด้วยฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) และคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ดีเอ็นเอ แห้งและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยซิงอะกาโรส 0.64 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการ ศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อ เซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปดูส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.5.4.2.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตที่ ได้รับการตีพิมพ์มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) จากโปรแกรม MultAlign (multiple sequence alignment by Florence Corpet) เลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในช่วงต้นและช่วงท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้สร้างไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ไปใช้ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ต่อไป

3.5.4.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

วิธีนี้เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง โดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

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
จีโนมิตีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังในข้อที่ 3.5.8.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่

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

3.5.4.2.5 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แล้วทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักรวม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด หลังจากนั้นที่เจลละลายเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักรวม ผสมให้เข้ากัน นำ QIAquick spin column ใส่ลงในเอกซอสานี่เป็นเอกซอสานี่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

collection tube ปิเปิดสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เดิมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

3.5.4.3 การทดสอบการเจริญบน Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอ โสมเซอรินแลค โคนลงบนอาหารแข็งสูตร TCBS (ภาคผนวก ก4) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

3.5.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin salt agar (GS)

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอ โสมเซอรินแลค โคนลงบนอาหารแข็งสูตร GS (ภาคผนวก ก5) มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

3.5.6 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอ โสมเซอรินแลค โคนระหว่างการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอ โสมเซอรินแลค โคนได้สูงสุดตามวิธีในข้อที่ 3.5.2.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.3.2

3.5.7 ผลของกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุก 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.3.2

3.5.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI*

แยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยวิธีในข้อที่ 3.5.4.2.1 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่ ทำการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* เข้ากับพลาสมิด pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

3.5.8.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *luxI*

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตที่ได้รับการตีพิมพ์มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) จากโปรแกรม MultAlign (multiple sequence alignment by Florence Corpet) เลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในช่วงต้นและช่วงท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้สร้างไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ไปใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกลูโซ่ต่อไป

3.5.8.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในข้อที่ 3.5.4.2.4 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94	30 วินาที } 30 รอบ
	40	
	72	
3	72	10 นาที
4	20	α

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังในข้อที่ 3.5.4.2.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ดังในข้อที่ 3.5.4.2.5 ต่อไป

3.5.8.3 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.5.4.2.5 เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pDrive ปฏิกริยา ligation mixture 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต), pDrive 50 นาโนกรัม, ผลิตภัณฑ์ PCR 40 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ligation mixture บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.8.4 การเตรียม Competent Cell และการทรานสฟอร์มเมชัน

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อที่ 3.5.2.1 ในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์) เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือนำไปใช้ทรานสฟอร์มทันที โดยเปิด competent cell 100 ไมโครลิตร และสารละลาย ligation 10 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ วางไว้ในน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที วางในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำงานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pDrive ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิด pDrive หลังจากที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินจึงทำให้ได้โคโลนีสีขาว

3.5.8.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.5.8.4 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 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 จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล และโซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Solution III ซึ่งเตรียมโดยนำไปแช่เซียมอะซิเตทเข้มข้น 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 นำส่วนใสใสหลอดใหม่เติมเอธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.8.6 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	10
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	7
ปริมาตรสุทธิ	20

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.8.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

3.5.9 การประยุกต์ใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

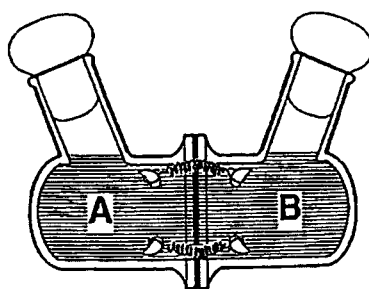
3.5.9.1 การศึกษาการใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่

คัดเลือกเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับ

Variovorax paradoxus

นำแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *V. paradoxus* ใน dialyzing vessel tube ซึ่งประกอบด้วยท่อแก้ว 2 ข้างที่ถูกกั้นด้วยเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.45 ไมครอน (μ) ท่อแต่ละข้างบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังในรูปที่ 3.2 ทำการถ่ายเชื้อที่คัดเลือกได้และ *V. paradoxus* ลงในอาหารแต่ละข้าง เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.5.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 Dialyzing vessel tube

ที่มา : Ohno *et al.* (1999)

3.5.9.2 การศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญและการผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน

3.5.9.2.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens*

นำ *A. tumefaciens* 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกติโนมายซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยวิธีในข้อที่ 3.5.4.2.1 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ในอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ดังในข้อที่ 3.5.4.2.2

3.5.9.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR

นำจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* ที่ได้จากข้อที่ 3.5.9.2.1 มาเพิ่มปริมาณยีน *attM* โดยใช้ไพรเมอร์ *attM-f* (5'-AGTTCCAAGGGAGGATCCCGAGTGACCGAT-3') ซึ่งไพรเมอร์นี้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (G/GATCC) และ *attM-r* (5'-TATCTGGCCGTAAAGCTTTCGCGTTCCTATTT-3') ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (A/AGCTT) ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR ดังในข้อที่ 3.5.4.2.4 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังในข้อที่ 3.5.4.2.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) ดังในข้อที่ 3.5.4.2.5

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

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

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

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการผลิตผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (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

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

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

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของ pET30a (Novagen, USA) มาเพาะเลี้ยงในฟลาस्क 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดทีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดทีเอ็นเอสำเร็จรูป (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำพลาสมิดทีเอ็นเอ pET30a ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

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

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.9.2.5 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 ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ 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 บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.5.9.2.6 การทรานสฟอร์มพลาสมิด pET30a-*attM* เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21 (DE3)

ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิด pET30a-*attM* ที่ได้จากข้อ 3.5.9.2.5 เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) ตามวิธีในข้อที่ 3.5.8.4 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.9.2.7 การสกัดพลาสมิด pET30a-attM และตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.9.2.6 มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis ตามวิธีในข้อที่ 3.5.8.5 ทดสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM โดยนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5.9.2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

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

3.5.9.2.9 การทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pET30a-attM

ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่มี pET30a-attM จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 นำเซลล์มาเจือจาง ในอัตราส่วน 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 จากนั้นนับจำนวนโคโลนี

3.5.9.2.10 การชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสและการทำให้บริสุทธิ์

นำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET30a-attM จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงเติมสารละลาย Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เพราะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 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 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำให้สารละลายเอนไซม์แลคโตเนสบริสุทธิ์ด้วยชุดแยกโปรตีน 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 จากนั้นจึงใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดของรูพรุน 0.45 ไมครอน ลงในคอลัมน์ ชะโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วยการเติม Binding buffer ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เติม Elution buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เพื่อชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์โดย แบ่งเก็บตัวอย่างเอนไซม์ 5 fraction fraction ละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่แยกได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยผสมสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร และสารละลาย Bradford reagent (Bio-Rad, USA) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โปรตีนด้วยเทคนิค โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส (SDS-PAGE) โดยเตรียม Stacking gel ซึ่งประกอบด้วย อะครีลาไมด์ 4.8 เปอร์เซ็นต์ T, 0.43 เปอร์เซ็นต์ C ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.125 โมลาร์ พีเอช 6.8 และ Resolving gel ซึ่งประกอบด้วย อะครีลาไมด์ 12.5 เปอร์เซ็นต์ T, 1.13 เปอร์เซ็นต์ 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, โซเดียมโดเดค-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 1 มิลลิลิตร, โบรโมฟินอลบลู 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเบต้าเมอแคปโตเอธานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยดโปรตีนมาตรฐานและสารละลายโปรตีนที่ต้องการศึกษาลงไปในช่อง ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 20 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมโปรตีนในเจลด้วยสีย้อม cromassie brilliant blue R250 และกำจัดสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย destaining

3.5.9.2.11 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เหมาะสมในการย่อย

โมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำเอนไซม์แลคโตเนสที่ได้จากข้อ 3.5.9.2.10 ปริมาณ 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัม มาบ่มร่วมกับส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยมีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำสารละลายมาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.3.2

3.5.9.2.12 เวลาที่เหมาะสมในการย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส

นำเอนไซม์แลคโตเนสที่ได้จากข้อ 3.5.9.2.3.1 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม มาบ่มร่วมกับส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยมีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำสารละลายมาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.3.2 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.9.2.13 การศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ดังในข้อที่ 3.5.2.2 เติมน้ำเอนไซม์แลคโตเนสที่ได้จากข้อ 3.5.9.2.10 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 2, 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดปริมาณ โมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กาแลคโตซิเคสดังในข้อที่ 3.5.3.2 วางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.9.3 การศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

3.5.9.3.1 การเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรีย

นำ 1 โคลนิจของแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens* A136 และไอโซเลท C-011 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใส ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเคสดังในข้อที่ 3.5.3.2

3.5.9.3.2 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

นำแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากข้อที่ 3.5.9.3.1 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 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเคสดังในข้อที่ 3.5.3.2

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเล โดยทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น ค.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี เป็นระยะเวลา 6 วัน ตั้งแต่วันที่ 14 ถึง 19 สิงหาคม พ.ศ. 2545 และใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสเป็นตัวกักจับและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เป็นอาหารคัดเลือก ทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้นต้นด้วยเทคนิค cross streak assay โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain คัดเลือกเชื้อที่แสดงผลบวก (positive) มาทดสอบการผลิตและปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนในรูปของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้แล้ว จึงทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกว่าด้วยเทคนิคทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากนั้นศึกษารูปแบบของการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน นำโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นั้นไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้เป็นแหล่งในโครเจนในการเจริญเติบโตของเชื้อที่สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณนี้ได้ เช่น *Variovorax paradoxus* ออกแบบการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดแยกได้ร่วมกับ *V. paradoxus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB และศึกษาการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต เนื่องจากมีรายงานวิจัยว่าเอนไซม์แลคโตนเนสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งเป็นพาโทเจนได้ และส่งผลให้ความรุนแรงของการก่อโรคลดลง จึงได้จึงเกิดแนวความคิดในการนำยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน โดยทำการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* เข้าไปในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET30a แล้วชักนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสในปริมาณสูง เพื่อนำเอนไซม์แลคโตนเนสไปใช้ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคสายพันธุ์อื่น

4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล

จากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณบ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี (รูปที่ 4.1 ก) เป็นระยะเวลา 6 วัน ระหว่างวันที่ 14 ถึง 19 สิงหาคม พ.ศ. 2545 ใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสเป็นตัวค้ำจุน (รูปที่ 4.1 ข) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เป็นอาหารคัดเลือก โดยใช้เชือกผูกตัวค้ำจุนให้ลอยอยู่ระดับผิวน้ำทะเลตลอดระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 4.1 ค) ทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ ดังวิธีในข้อที่ 3.5.1 พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 82 ไอโซเลท ตั้งชื่อและศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีในแต่ละไอโซเลท ลักษณะของโคโลนีแสดงในภาคผนวก ค



ก



ข



ค

รูปที่ 4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล บ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี (ก), ตัวค้ำจุนฟองน้ำชนิดเซลลูโลส (ข) และลักษณะการผูกตัวค้ำจุนขณะทำการเก็บตัวอย่าง (ค)

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 82 ไอโซเลท มีลักษณะภายนอกของโคโลนีที่แตกต่างกันเมื่อมองด้วยตาเปล่า และเมื่อวิเคราะห์จากรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ โคโลนีกลม รูปร่างไม่แน่นอน และโคโลนีแผ่กระจาย นอกจากรูปร่างของโคโลนีที่แตกต่างกันแล้ว สีของโคโลนียังมีความแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่จะพบโคโลนีสีขาว สีครีม และสีเหลืองนวล มีเพียงบางไอโซเลทเท่านั้นที่มีสีของโคโลนีแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด เช่น สีแดง หรือสีชมพู จากผลข้างต้นบ่งชี้ว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ในปี ค.ศ. 1989 Fuhrman และคณะ รายงานว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลมีปริมาณมากถึง 10^9 ถึง 10^{10} เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตรของน้ำทะเล แบคทีเรียที่พบในน้ำทะเลนั้นมีหลายชนิด เช่น *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Sarcina* sp., *Spirillum* sp. และ *Vibrio* sp. ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำทะเล ได้แก่ ความเค็ม, ความลึก, ความเป็นกรดด่าง และสารอาหารในน้ำทะเล เป็นต้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

การเก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลนิยมใช้อาหารสูตรสมบูรณ์ Marine agar (MA) ตามสูตรของ Zobell (1946) ดังแสดงในภาคผนวก ก1 ซึ่งมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียในทะเล และมีสารอาหารหลักเกือบ 2 เท่าของน้ำทะเล มีเปปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจน และยีสต์สกัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโต มีรายงานการวิจัยในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อาหารสูตร MA อยู่จำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น Guan และ Kamino (2001) ได้เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากทะเลโดยนำน้ำทะเลมากรองผ่านเมมเบรนเพื่อแยกแพลงก์ตอน แล้วคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/10 MA หรือ Iron-Deficient and Low-Nutrient Seawater-Based Liquid Medium (IDSM) ในขณะที่ Gram และคณะ (2002) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากเกล็ดหิมะในน้ำทะเลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA

ในการศึกษานี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ในการเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเล ซึ่งพบว่า เชื้อราที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ แต่ไม่พบแพลงก์ตอนสัตว์ เนื่องจากแพลงก์ตอนสัตว์ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ ไม่พบแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรียต้องการธาตุอาหารนอกเหนือจากที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เช่น แมงกานีส, สังกะสี, โคบอลต์ ฯลฯ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA จึงอาจจะไม่เหมาะสมต่อการคัดแยกแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในทะเลได้ โดยในการเก็บตัวอย่าง ทำในเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน มีฝนตกประปราย มีเมฆมากและแสงแดดน้อย ทำให้แพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรียได้รับแสงที่มีความเข้มต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) จึงทำให้มีการเจริญเติบโตช้าและมีปริมาณน้อย สำหรับสถานที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้นเป็นบริเวณที่มีเสายึดเกาะ ทำให้สะดวกต่อการผูกตัวกำจุนเพื่อเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้ง่าย และเป็นบริเวณที่ระดับน้ำไม่ตื้นหรือลึกจนเกินไป จึงน่าจะเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในทะเล รวมทั้งแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำทะเล

การเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการศึกษานี้สามารถคัดแยกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลและทำให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จำนวน 82 ไอโซเลท จากนั้นจึงนำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

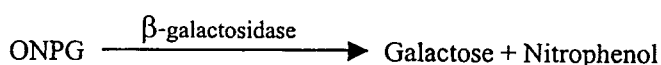
ตัวอย่างแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ทั้ง 82 ไอโซเลท ไปทำการทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนต่อไป

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน สามารถทำได้โดยการทดสอบกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่เป็น reporter strain ซึ่งมี 2 วิธีคือ cross streak assay และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

วิธี cross streak assay เป็นวิธีที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยดูจากการเกิดสีฟ้าในแบคทีเรียที่เป็น reporter strain *A. tumefaciens* A136 ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 มียีน *luxR* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน LuxR ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ ยีน *luxR* จะอยู่ติดกับโปรโมเตอร์ (promotor) ของ *lacZ* แต่ภายในเซลล์ขาดยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จึงไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua and Winans, 1996) เมื่อรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ หรือจากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ จะมีกลไกไปกระตุ้นการทำงานของ *lacZ* ให้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ออกมาย่อยสาร X-gal ที่อยู่ในอาหารที่ใช้ทดสอบ ส่งผลให้เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 เป็นสีฟ้า

เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็น reporter enzyme ในการติดตามและศึกษาการแสดงออกของยีน และใช้ศึกษาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ โดยการรวมโปรโมเตอร์ที่สนใจเข้ากับยีนของเบต้ากาแลคโตซิเดส วิธีการหาคิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำได้โดยวัดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารสีเหลืองของ Nitrophenol จากการย่อยสารตั้งต้น ONPG (Ortho-nitrophenyl- β -galactoside) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีด้วยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรวัฒน์, 2536) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ



วิธีการวัดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในรูปของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เป็นการวัดโมเลกุลสัญญาณในเชิงปริมาณ สามารถบอกได้ว่าการผลิตโมเลกุลสัญญาณมากหรือน้อย แตกต่างจากวิธี cross streak assay ซึ่งเป็นการวัดโมเลกุลสัญญาณใน

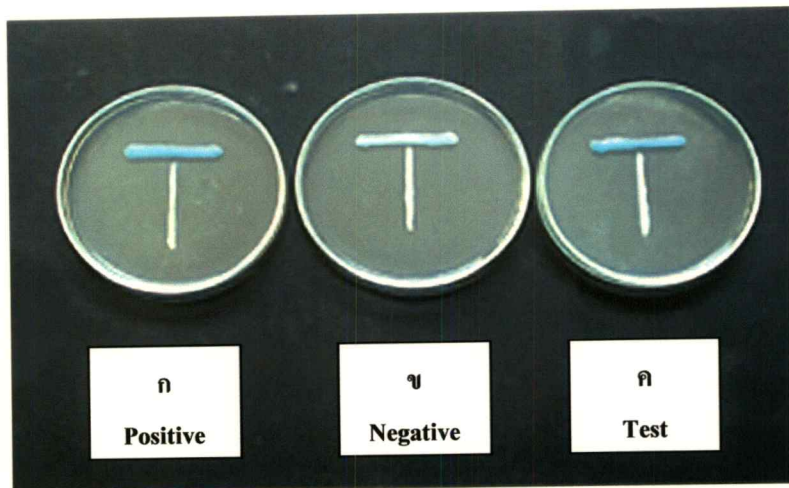
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชิงคุณภาพ จึงสามารถบ่งบอกได้เพียงว่ามีหรือไม่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์ริน-แลคโตนเท่านั้น วิธี cross streak assay จึงเหมาะที่จะใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนในเบื้องต้น

4.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยวิธี cross streak assay

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่บริสุทธิ์ทั้ง 82 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay โดยนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาลากตั้งฉากกับ *A. tumefaciens* A136 บนอาหาร MA ที่มี X-gal และสังเกตการเกิดสีฟ้าของเชื้อ *A. tumefaciens* A136 ผลที่ได้แสดงเครื่องหมายดังนี้ เมื่อไม่เกิดสีฟ้าแสดงผลเป็น - เมื่อเกิดสีฟ้าน้อยมากแสดงผลเป็น + เมื่อเกิดสีฟ้าน้อยแสดงผลเป็น ++ เมื่อเกิดสีฟ้าปานกลางแสดงผลเป็น +++ เมื่อเกิดสีฟ้ามากแสดงผลเป็น ++++ และเมื่อเกิดสีฟ้าเข้มแสดงผลเป็น +++++ พบว่า ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 82 ไอโซเลท มีลักษณะการเกิดสีฟ้าของ *A. tumefaciens* A136 ที่แตกต่างกัน โดยสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า จำนวน 28 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้าน้อยมากถึงปานกลาง จำนวน 39 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้ามากถึงสีฟ้าเข้ม จำนวน 15 ไอโซเลท (ภาคผนวก ก) จากการทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control *Escherichia coli* IFO3310 พบว่า *E. coli* IFO3310 ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 (รูปที่ 4.2 ก) ในขณะที่แบคทีเรียที่เป็น negative control *A. tumefaciens* KYC6 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า (รูปที่ 4.2 ข) และเมื่อทดสอบกับไอโซเลท C-011 พบว่า ไอโซเลท C-011 ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 เช่นเดียวกับ positive control (รูปที่ 4.2 ค)

ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลกลุ่มที่ 1 จำนวน 28 ไอโซเลท ไม่ทำให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 แสดงว่ารีเซพเตอร์ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ไม่ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน จึงไม่มีการกระตุ้นการทำงานของ *lacZ* และไม่มีการผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสออกมาย่อยสาร X-gal ดังนั้นตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มนี้จึงจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้

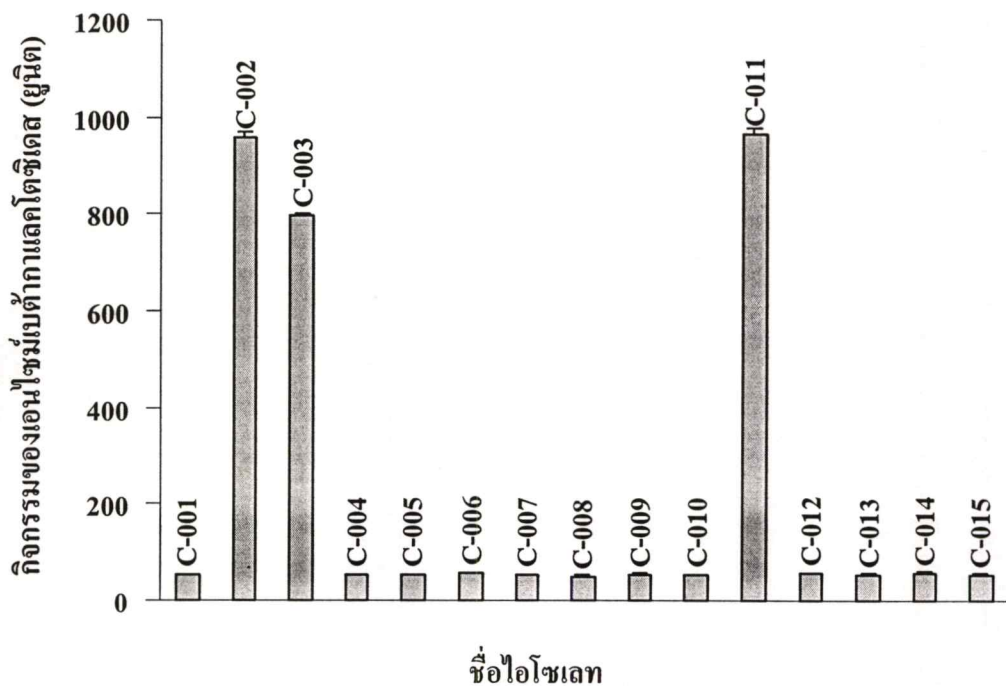


รูปที่ 4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay และลักษณะการเกิดสีฟ้าของ *A. tumefaciens* A136 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control *E. coli* IFO3310 (ก), แบคทีเรียที่เป็น negative control *A. tumefaciens* KYC6 (ข) และตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 (ค)

ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 2 จำนวน 39 ไอโซเลท ทำให้เกิดสีฟ้าอ่อนที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ส่วนตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ไอโซเลท ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเชื้อเท่ากัน สีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ที่มีความเข้มของสีแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนในแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 น่าจะเกิดจากปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 มากกว่าจากตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 อย่างไรก็ตาม ผลการคัดเลือกด้วยวิธี cross streak assay เป็นเพียงการทดสอบขั้นพื้นฐานเชิงคุณภาพ ไม่สามารถให้ผลในเชิงปริมาณได้ และอาจจะเกิดความผิดพลาดได้จากการที่ *A. tumefaciens* A136 อาจมีความว่องไวต่อ X-gal ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ได้ โดยที่ไม่ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ ดังนั้นจึงทำการเลือกตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท ซึ่งคาดว่าสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้ ไปทำการทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน โดยทดสอบกับ reporter strain *A. tumefaciens* A136 และวัฏจักรกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ผลิตขึ้นต่อไป

4.2.2 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโม-เซอร์รินแลคโตนโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลกลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ไอโซเลท ที่ได้จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay มาทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า มีตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลเพียง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เท่านั้น ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้ โดยมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส 955, 797 และ 967 ยูนิตตามลำดับ (รูปที่ 4.3) ไอโซเลท C-002 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสใกล้เคียงกับไอโซเลท C-011 ในขณะที่ไอโซเลท C-003 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่ำกว่าไอโซเลททั้งสอง



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay

กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่พบในไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 สูงกว่าตัวอย่างแบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่เหลือ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในระดับต่ำ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการคัดเลือกด้วยวิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ได้นี้ แตกต่างจากผลที่ได้จากการคัดเลือกด้วยวิธี cross streak assay ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 แต่เมื่อทดสอบด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสกลับพบว่า มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจาก *A. tumefaciens* A136 มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับสาร X-gal บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบด้วยวิธี cross streak assay

สาเหตุที่คัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้เพียง 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 82 ไอโซเลท อาจเนื่องมาจากตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่างนั้น มีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 แบบนี้จะให้โมเลกุลสัญญาณที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมลบอาศัยสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (Fuqua *et al.*, 1994) แต่แบคทีเรียแกรมบวกอาศัยสัญญาณเปปไทด์ขนาดเล็ก (Dunny and Leonard, 1997) ดังนั้นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวนหนึ่งจะไม่ส่งผลให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 และไม่สามารถวัดปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งคือ *A. tumefaciens* A136 อาจมีความจำเพาะกับบางโครงสร้างของสายโซ่เอซิลเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะไม่สามารถตรวจสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนบางโครงสร้างที่ผลิตจากบางไอโซเลทได้ นอกจากนี้การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆหลายประการได้แก่ ชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ดังนั้นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้เพียง 3 ไอโซเลท อาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ไม่เหมาะสม ทำให้มีปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนปริมาณน้อย รีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ไม่สามารถตรวจวัดได้หรือตรวจวัดได้เพียงเล็กน้อย

การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในการศึกษานี้ด้วยวิธี cross streak assay และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส สามารถคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในปริมาณสูงได้ทั้งสิ้น 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

จากนั้นจึงนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท ไปศึกษาลักษณะรูปร่างและชนิดของแบคทีเรียต่อไป

4.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตน

4.3.1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรม

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 มาย้อมแกรม ดังวิธีในข้อที่ 3.5.4.1 พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีผนังเซลล์ติดสีแดงของ safranin แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ รูปร่างโค้งงอ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua *et al.*, 1994; Bassler, 1999; De Kievit and Iglewski, 2000; Parsek and Greenberg, 2000)

4.3.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

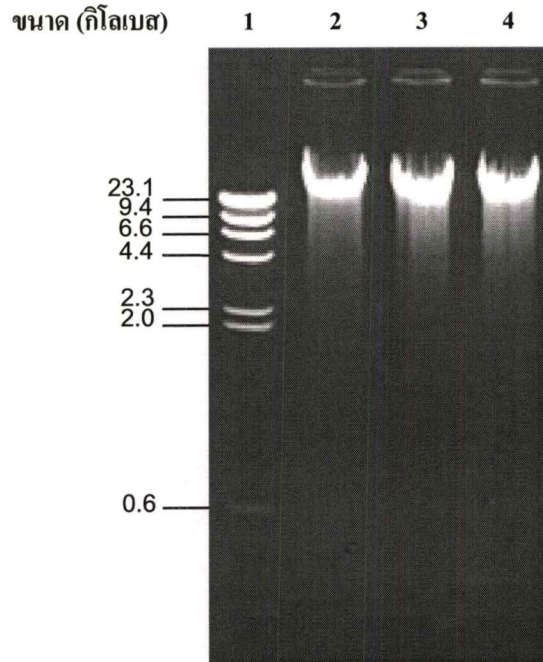
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกชนิดของตัวอย่างแบคทีเรียทำได้โดยสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 แล้ววิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่ แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 600 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยโปรแกรม Blast server

4.3.2.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบว่า แลบจีโนมิคดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ที่สกัดได้มีเพียงแถบเดียวโดยอยู่เหนือระดับของแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 กิโลเบส จีโนมดีเอ็นเอของทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณสูง



รูปที่ 4.4 จีโนมดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 จากการแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟเรซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส
 เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 เลน 2 คือ จีโนมดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002
 เลน 3 คือ จีโนมดีเอ็นเอของไอโซเลท C-003
 เลน 4 คือ จีโนมดีเอ็นเอของไอโซเลท C-011

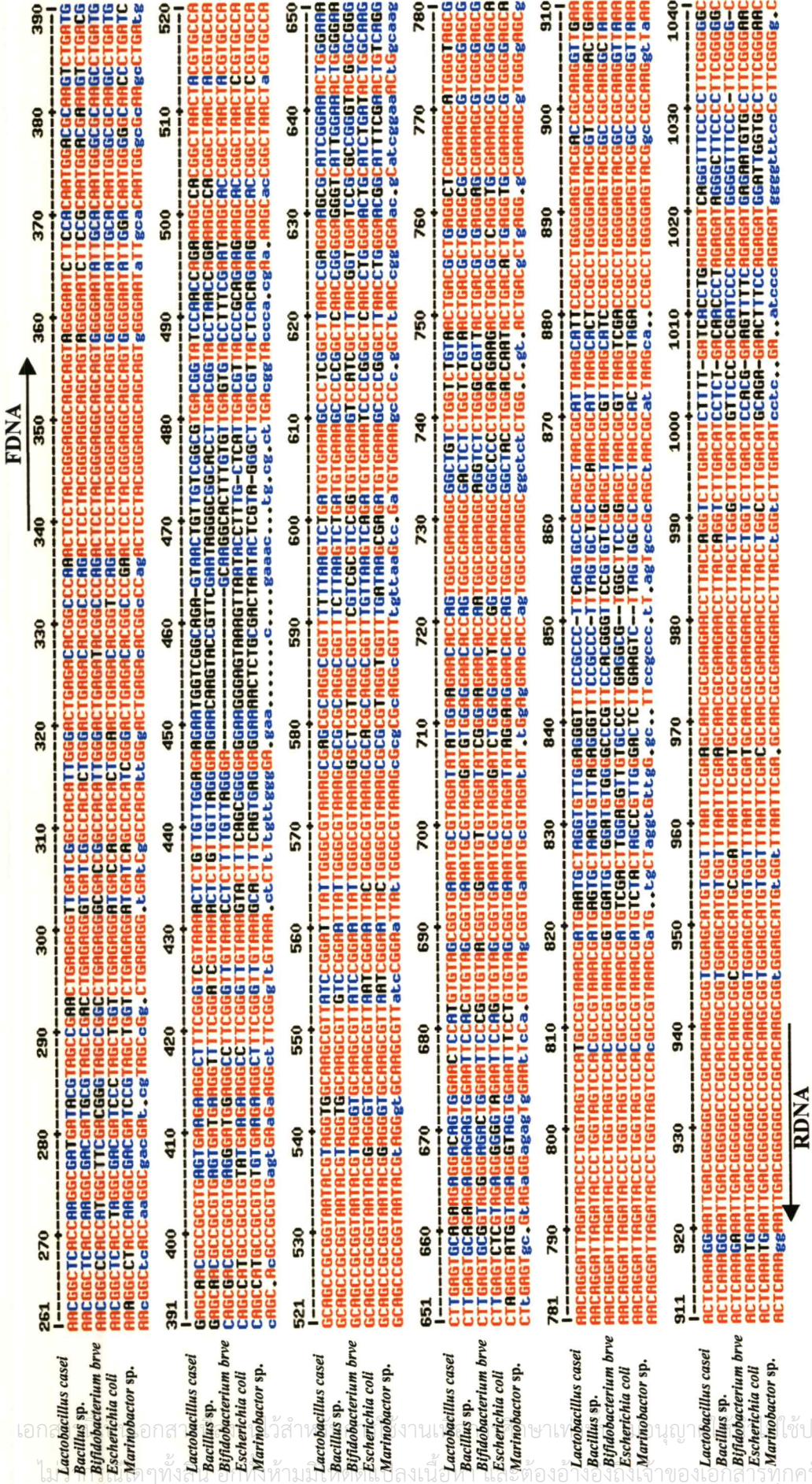
4.3.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA เริ่มจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตชนิดต่างๆ ที่มีรายงานฐานข้อมูลของธนาคารยีน โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *Bacillus* sp. และ *Bifidobacterium brve* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Marinobactor* sp. คัดเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 2 บริเวณ (ช่วงต้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และช่วงท้าย) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงต้นมาออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ระหว่างตำแหน่งที่ 339 ถึง 356 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า FDNA (รูปที่ 4.5) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงท้ายมาออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 3' ระหว่างตำแหน่งที่ 921 ถึง 940 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TTGTGCGGGCCCCGTC AAT-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า RDNA (รูปที่ 4.5) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง FDNA และ RDNA เป็นไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันสูง จึงน่าจะเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้ง 2 ด้าน ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

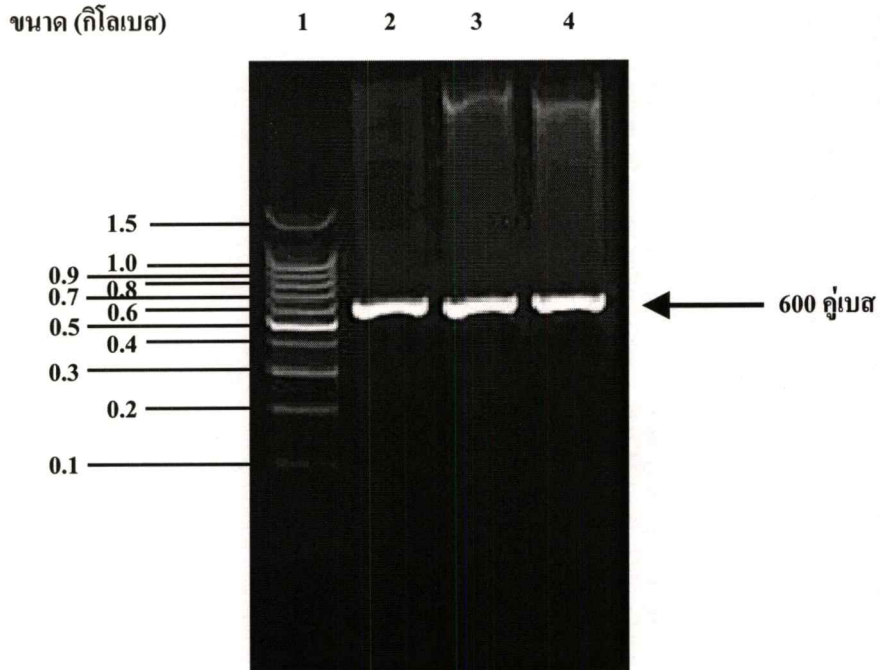
4.3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR รวมทั้งไพรเมอร์ FDNA และ RDNA แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้อุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 3 ไอโซเลท 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.6) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับ 600 คู่เบส จึงได้ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไทป์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสามไอโซเลทจาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม Blast server



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus casei*, *Bacillus sp.*, *Bifidobacterium brve*, *Escherichia coli* และ *Marinobactor sp.*

ตัวอักษรสีแดง, สี่น้ำเงิน และสีเขียวแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ผลิตกัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

เลน 2 คือ ผลิตกัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002

เลน 3 คือ ผลิตกัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-003

เลน 4 คือ ผลิตกัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-011

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท C-002 และไอโซเลท C-011 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เหมือนกันทั้งหมด และมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากไอโซเลท C-003 เพียง 3 เบส จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน โดยไอโซเลท C-002 และ C-011 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบสของแต่ละไอโซเลทกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.1

	1	10	20	30	40	50	60	70
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT							
C-003	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT							
Consensus	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT							
	71	80	90	100	110	120	130	140
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGATATCGTTAATAGCGGTATCTTT							
C-003	GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGATATCGTTAATAGCGGTATCTTT							
Consensus	GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGATATCGTTAATAGCGGTATCTTT							
	141	150	160	170	180	190	200	210
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	TGACGTTAGCTGCAGAAAGACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGGC							
C-003	TGACGTTAGCTGCAGAAAGACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGGC							
Consensus	TGACGTTAGCTGCAGAAAGACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGGC							
	211	220	230	240	250	260	270	280
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCT							
C-003	GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCT							
Consensus	GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCT							
	281	290	300	310	320	330	340	350
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	CAACCTCGGAATTGCATTTGAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGC							
C-003	CAACCTCGGAATTGCATTTGAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGC							
Consensus	CAACCTCGGAATTGCATTTGAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGC							
	351	360	370	380	390	400	410	420
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	GGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCAGCCCTGGACAGATACGACACTCA							
C-003	GGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCAGCCCTGGACAGATACGACACTCA							
Consensus	GGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCAGCCCTGGACAGATACGACACTCA							
	421	430	440	450	460	470	480	490
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	GATGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTG							
C-003	GATGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTG							
Consensus	GATGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTG							
	491	500	510	520	530	540	550	560
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	GAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGC							
C-003	GAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGC							
Consensus	GAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGC							
	561	570	580	590	599			
C-002	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
C-011	AAGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAA							
C-003	AAGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAA							
Consensus	AAGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAA							

รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบส ของไอโซเลท

C-002, C-003 และ C-011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ไอโซเลท	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
C-002 และ C-011	<i>Vibrio fluvialis</i> (NCTC 11327T)	100
	<i>Vibrio fluvialis</i> (ATCC 33809T)	99
	<i>Vibrio furnissii</i> (ATCC 35016T)	99
	<i>Vibrio corallilyticus</i>	98
C-003	<i>Vibrio furnissii</i> (ATCC 35016T)	99
	<i>Vibrio fluvialis</i> (NCTC 11327T)	99
	<i>Vibrio metschnikovii</i> (NCTC 11170)	98
	<i>Vibrio tubiashi</i> (ATCC 19109T)	98

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. โดยไอโซเลท C-002 และไอโซเลท C-011 จัดเป็นแบคทีเรีย *Vibrio fluvialis* สำหรับไอโซเลท C-003 จัดเป็นแบคทีเรีย *Vibrio furnissii* หรือ *Vibrio fluvialis* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เท่ากัน (99 เปอร์เซ็นต์) เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนหรือสามารถส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงได้เมื่อประชากรแบคทีเรียมีความหนาแน่นสูง ระบบควอรัมเซนซิงค้นพบครั้งแรกว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเรืองแสงของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล *V. fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht *et al.*, 1983) และเป็นแบบอย่างในการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในปัจจุบัน *V. fischeri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ร่วมกับปลาและปลาหมึก หรืออยู่แบบอิสระในน้ำทะเล เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูงจะเกิดการเรืองแสงโดยขึ้นอยู่กับกระบวนการสะสมโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน (Eberhard *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* สายพันธุ์อื่น ได้แก่ *V. harveyi* (Bassler *et al.*, 1993) *V. anguillarum* (Milton *et al.*, 1997) และ *V. cholerae* (Zhu *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ในปัจจุบันนี้นอกจาก *Vibrio* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้ว ยังไม่พบรายงานการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนจาก *Vibrio* สายพันธุ์อื่นๆ

เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* จึงนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar) ต่อไป

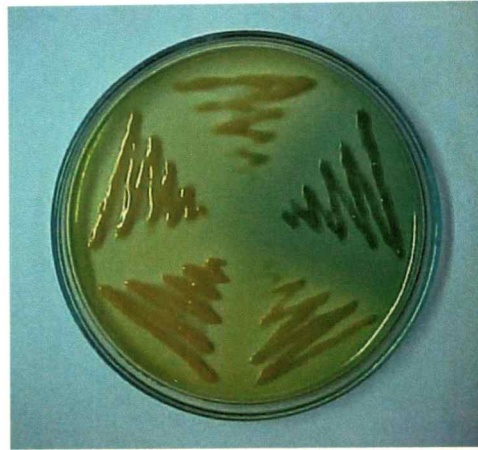
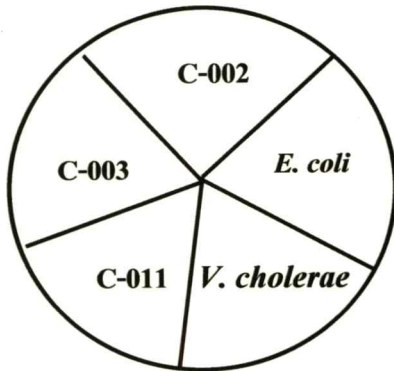
4.3.3 การศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TCBS เป็นอาหารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการแยกเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. ซึ่งมีหลักการคือ ในอาหารสูตร TCBS ประกอบด้วยสารไทโอซัลเฟต (thiosulfate), ซิเตรท (citrate) ที่มีความเข้มข้นสูงและมีความเป็นกรดต่ำสูงซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะไปมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ประกอบด้วยเชื้อ coliform และ proteus นอกจากนี้สารออกซิบิลด์ (oxbile) และคลอเลท (cholate) ยังยับยั้งการเจริญระยะแรกของ Enterococci แบคทีเรียในกลุ่ม coliform บางชนิดสามารถเจริญได้แต่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ แต่แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทั้งหมด สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ทำให้เกิดกรดและเปลี่ยนสีของไทมอลบลู (thymol blue) และโบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue) เป็นสีเหลือง (Kobayashi *et al.*, 1963)

จากการเขี่ยตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยมี *V. cholerae* เป็น positive control และ *E. coli* เป็น negative control พบว่าโคโลนีของไอโซเลท C-002, C-003 C-011 และ *V. cholerae* มีสีเหลือง ในขณะที่โคโลนีของ *E. coli* มีสีเขียว (รูปที่ 4.8) ผลการทดลองที่ได้สามารถสนับสนุนผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ว่าทั้งสามไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* และสามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ทำให้เกิดกรดและเกิดการเปลี่ยนสีของไทมอลบลูและโบรโมไทมอลบลูเป็นสีเหลืองเหมือนกับ *V. cholerae* สำหรับ *E. coli* ซึ่งเป็น negative control โคโลนีเกิดสีเขียวเนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ จึงไม่เกิดกรดและไม่เกิดการเปลี่ยนสีไทมอลบลูและโบรโมไทมอลบลู ทำให้โคโลนีมีสีเขียว

4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Salt Agar (GS)

อาหารเลี้ยงเชื้อ GS เป็นอาหารที่ใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม โดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหาร GS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ

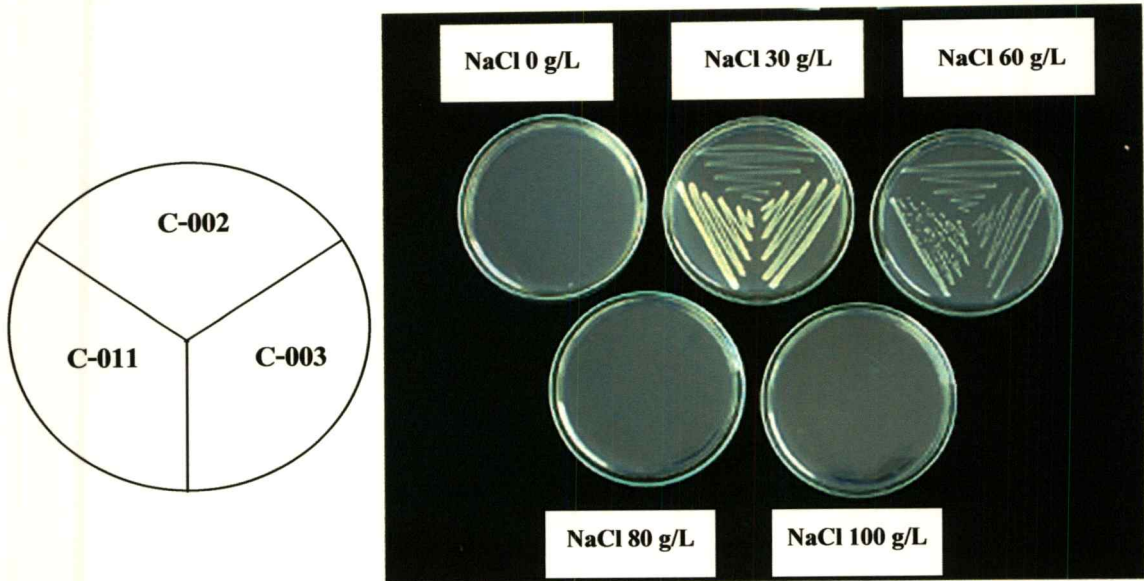


รูปที่ 4.8 การเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

(Simpson *et al.*, 1987) จากการเชื้อตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ C-002, C-003 และ C-011 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยจะเจริญดีที่สุดบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรได้ (รูปที่ 4.9)

ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ไม่สามารถเจริญบนอาหาร GS ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ แสดงว่าทั้ง 3 ไอโซเลทต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโต จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล (Marine bacteria) ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร แต่จะเจริญได้ดีบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร (Guan and Kamino, 2001) เนื่องจากไอโซเลททั้งสามไม่สามารถเจริญบนอาหาร GS ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ จึงจัดไอโซเลททั้งสามเป็น Marine bacteria นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร จึงจัดเป็น Halophilic vibrio แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหาร GS มากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และตายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

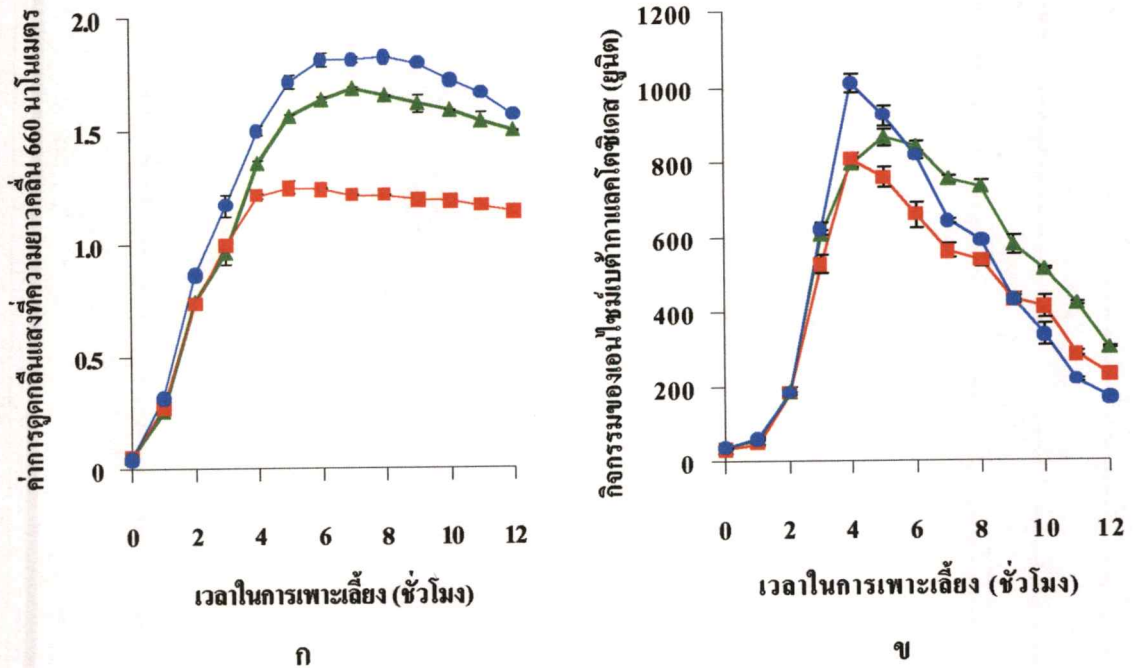


รูปที่ 4.9 การเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร

4.5 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

4.5.1 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโต

จากการเพาะเลี้ยงตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ในทุกชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นไอโซเลท C-003 จะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ไอโซเลท C-002 และ C-011 มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันและสูงกว่าไอโซเลท C-003 อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.10 ก) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่คล้ายคลึงกัน โดยในชั่วโมงแรกของการเจริญ ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในไอโซเลททั้งสาม หลังจากชั่วโมงที่ 2 ของการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมีปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ของการ



รูปที่ 4.10 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002 (—▲—), C-003 (—■—) และ C-011 (—●—)

เพาะเลี้ยงในไอโซเลท C-003 และ C-011 และในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในไอโซเลท C-002 หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.10 ข)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน โดยในช่วงการเจริญระยะ lag phase และช่วงต้นของ log phase แบคทีเรียที่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนในปริมาณน้อย เมื่อแบคทีเรียเจริญถึงระยะ log phase การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตขึ้นเมื่อเข้าจับกับรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์แล้วจะมีกลไกไปเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนและรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไปชักนำให้เกิดการสร้างโมเลกุลสัญญาณด้วยสัญญาณจากตัวเอง ดังนั้นจึงจัดโมเลกุลสัญญาณนี้ว่าเป็น autoinducer เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase จะมีกลไกไปยับยั้งการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนทำให้มีปริมาณลดลงจนกระทั่งถึงระดับต่ำสุด ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Fuqua และคณะ (1994) และ Winan และ Bassler (2002) ที่รายงานว่า เมื่อแบคทีเรียแกรมลบเจริญเติบโตจะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน แล้วสะสมจนถึงระดับหนึ่ง (threshold level) แล้วจะมีกลไกใน

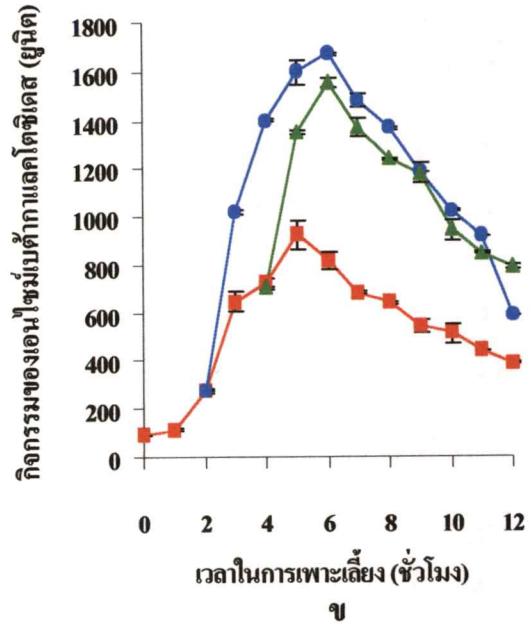
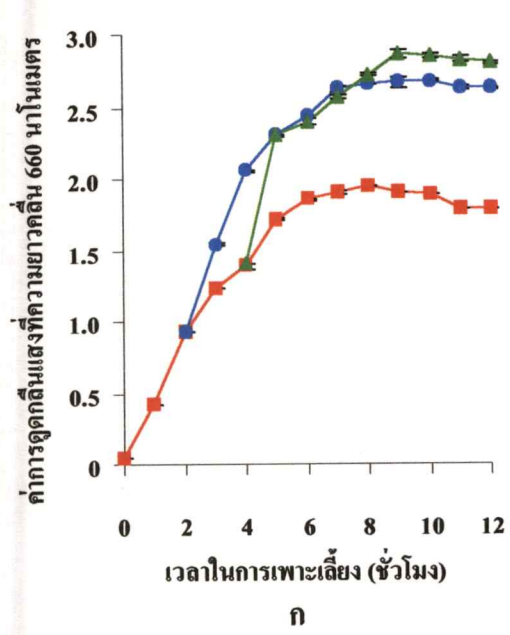
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระตุ้นการทำงานอื่นเป้าหมายเพื่อตอบสนองต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากรแบคทีเรีย จากผลการทดลอง ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่คล้ายคลึงกัน โดยพบว่าไอโซเลท C-011 มีการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับไอโซเลท C-002 แต่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสูงกว่า จึงคัดเลือกไอโซเลท C-011 มาทำการศึกษาการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตนต่อไป

4.5.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตน

จากการศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จากการเติมสารละลายกลูโคสลงไปในการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในทุกชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อไม่มีการเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหาร MB เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จึงเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากการเติมสารละลายกลูโคสลงในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า และเข้าสู่ระยะ stationary phase ซ้ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (รูปที่ 4.11 ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าในสภาวะปกติพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดประมาณ 800 ยูนิต เมื่อเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติถึง 2 เท่า โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุด 1,667 ยูนิต และ 1,560 ยูนิต เมื่อเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 4.11 ข)

เมื่อเปรียบเทียบการเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงกับสภาวะปกติ พบว่าการเติมสารละลายกลูโคสทั้ง 2 ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง ต่างก็ส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติ การเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 5



รูปที่ 4.11 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MB (—■—) และเมื่อเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 2 (—●—) และชั่วโมงที่ 4 (—▲—) ของการเพาะเลี้ยง

จากนั้นอัตราการเจริญของเชื้อลดลงและเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 5 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าการเติมสารละลายกลูโคสทั้งในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว การเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอน ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและส่งผลให้มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นจากสภาวะปกติอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตาม การเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 หรือ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน

การเติมสารละลายกลูโคสทั้งในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงส่งผลให้มีการกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติถึง 2 เท่า และมีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนเพิ่มสูงขึ้นตามความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในระบบควอร์รัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบว่า ความเข้มข้น

ของโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโซโมเซอรินแลคโคโคนจะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียสูงขึ้น (Nealson and Hastings, 1979; Miller and Blassler, 2001)

แบคทีเรียไอโซเลท C-011 สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโซโมเซอรินแลคโคโคนได้ แสดงว่าไอโซเลท C-011 ต้องมียีน *luxI* ซึ่งทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโซโมเซอรินแลคโคโคนหรือเอสซีไอโซโมเซอรินแลคโคโคนซินเทส จึงได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ของไอโซเลท C-011 ต่อไป

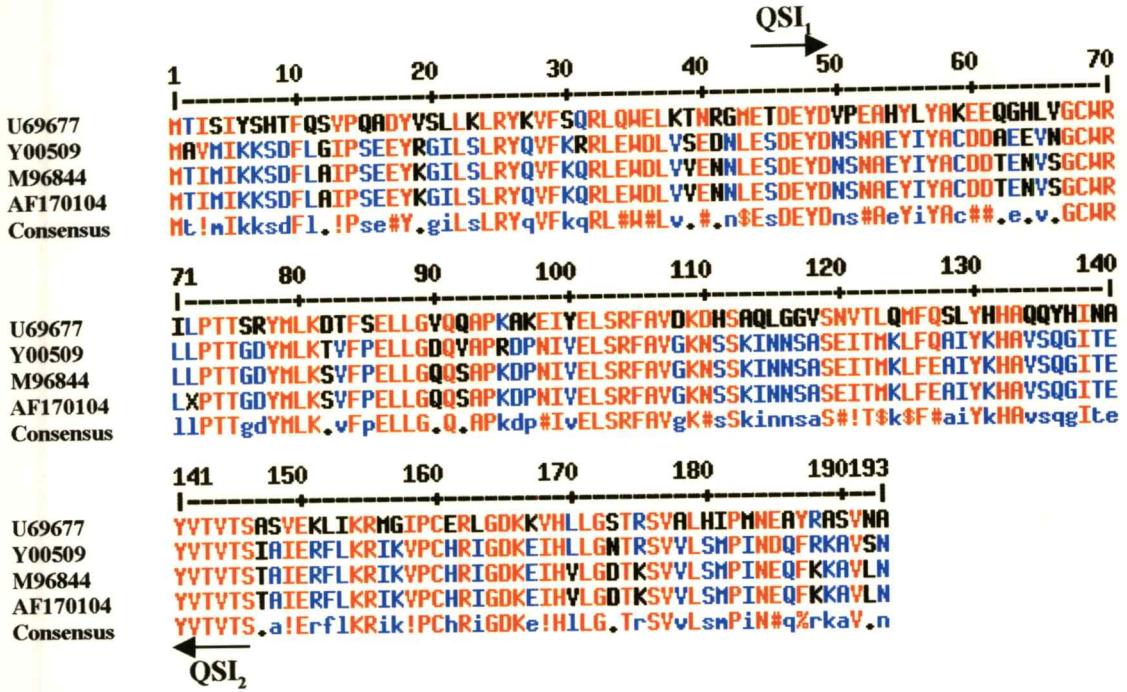
4.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI*

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์เอสซีไอโซโมเซอรินแลคโคโคนซินเทส ของไอโซเลท C-011 สามารถทำได้โดยนำจีโนมิคดีเอ็นเอของไอโซเลท C-011 มาทำเพิ่มปริมาณยีน *luxI* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่กับไพริเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีน *luxI* หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิด pDrive จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทำการตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server

4.6.1 การออกแบบไพริเมอร์ของยีน *luxI*

ออกแบบไพริเมอร์โดยนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LuxI ในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของธนาคารยีนมาเปรียบเทียบกัน จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LuxI ของ *Vibrio anguillarum* (Accession number U69677), *Vibrio fischeri* (Accession number M96844), *Vibrio fischeri* (Accession number AF170104) และ *Vibrio fischeri* (Accession number Y00509) และคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันในช่วงต้นและช่วงท้ายมาออกแบบไพริเมอร์ นำลำดับกรดอะมิโนช่วงต้นมาออกแบบไพริเมอร์ด้านปลาย 5' โดยอยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 44 ถึง 49 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ E(S/T)DEYD (รูปที่ 4.12) เมื่อเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 130 ถึง 146 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GA(A/G)(A/T)C(A/T)GATGAGTA(T/C)GA-3' ให้ชื่อไพริเมอร์ว่า QSI, (รูปที่ 4.13) สำหรับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่นำมาออกแบบไพริเมอร์ด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

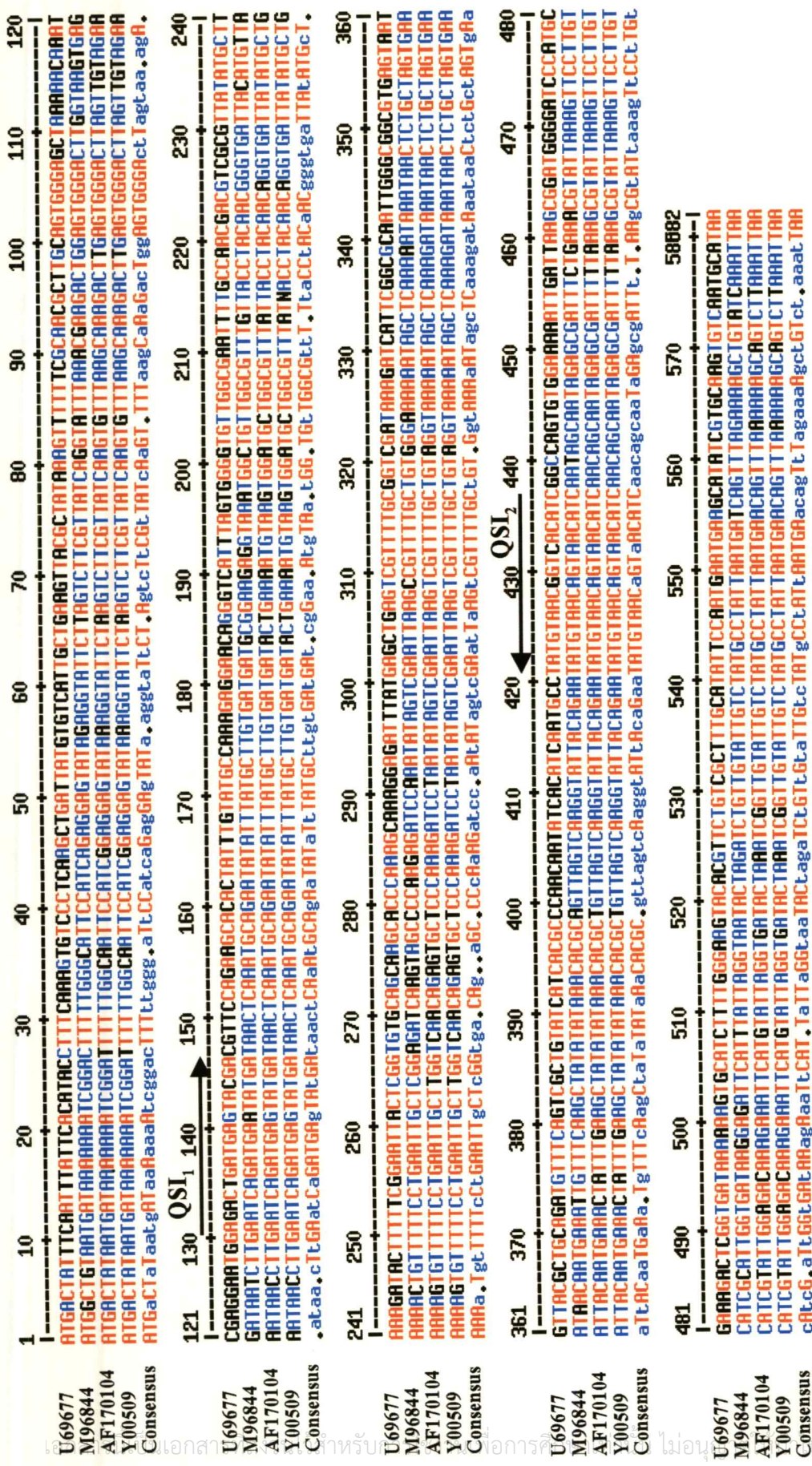


รูปที่ 4.12 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนซินเทสของ *Vibrio anguillarum* (Accession number U69677), *Vibrio fischeri* (Accession number Y00509), *Vibrio fischeri* (Accession number M96844) และ *Vibrio fischeri* (Accession number AF170104) ตัวอักษรสีแดง, สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน, คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ

ปลาย 3' อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 141 ถึง 146 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ YVTVTS (รูปที่ 4.12) และเมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 421 ถึง 437 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GATGT(T/G)AC(T/C)GTTACATA-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า QSI₂ (รูปที่ 4.13) นำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้ง QSI₁ และ QSI₂ ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ของไอโซเลท C-011 โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับควรมีขนาด 307 คู่เบส

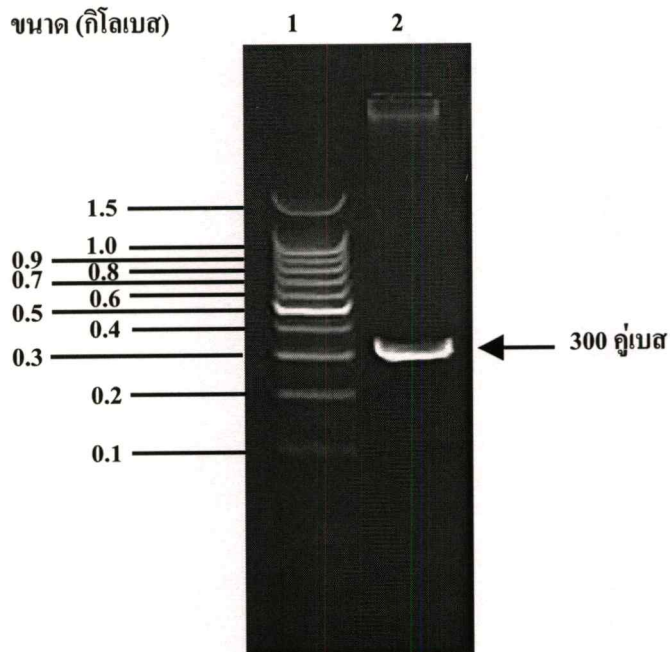
4.6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยเทคนิคปฏิกิริยาถูโซ

จากการเพิ่มปริมาณยีน *luxI* ของไอโซเลท C-011 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR โดยเติมไพรเมอร์ QSI₁ และ QSI₂ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้อุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นใน 1 เบอร์เซนต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (รูปที่ 4.14) ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ (307 คู่เบส) จึงทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ให้



รูปที่ 4.13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyJ* ของ *Vibrio anguillarum* (Accession number U69677), *Vibrio fischeri* (Accession number M96844), *Vibrio fischeri* (Accession number AF170104) และ *Vibrio fischeri* (Accession number Y00509) ตัวอย่างบริสุทธิ์แดง, สีน้ำเงิน และสีน้ำตาลแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน, คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ

ไม่วารณใด่างั้งสัน อักทังหำมมีให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ผลิตรหัส PCR ของยีน *luxI*

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

เลน 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน *luxI* ของไอโซเลท C-011

บริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) แล้วทำการเชื่อมผลิตรหัส PCR กับพลาสมิด pDrive ต่อไป

4.6.3 การเชื่อมผลิตรหัส PCR ของยีน *luxI* กับพลาสมิด pDrive

นำชิ้นส่วนผลิตรหัส PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ QSI₁ และ QSI₂ ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 คู่เบสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณ 40 นาโนกรัม มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบสปริมาณ 50 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase พลาสมิดลูกผสมที่ได้คือพลาสมิด pDrive ที่มีผลิตรหัส PCR ขนาดประมาณ 300 คู่เบส

4.6.4 การทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* DH5 α

จากการนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ QSI₁ และ QSI₂ กับพลาสมิด pDrive มาทำการถ่ายโอนไปยังเซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มจากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารแข็ง LB ที่

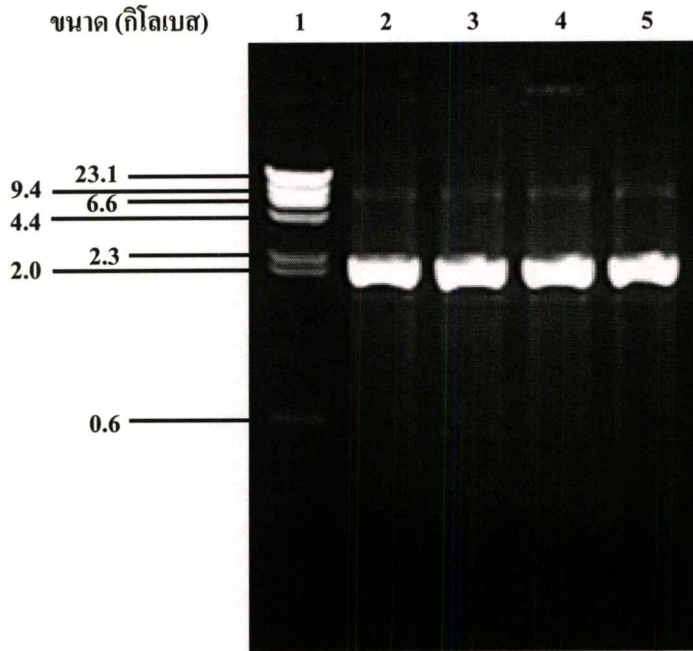
มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวเนื่องจากเวกเตอร์ pDrive (ดูภาพผนวก ข2 ประกอบ) มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งมีบริเวณ multiple cloning site อยู่บนยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ (α peptide) ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site ยีนดังกล่าวจะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินได้ จากการทรานสฟอร์มเมชันคัดเลือกโคโลนีสีขาว 4 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.6.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

จากการนำโคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis ตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pWI1.1, pWI1.2, pWI1.3 และ pWI1.4 นำมาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าพลาสมิด pWI1.1, pWI1.2, pWI1.3 และ pWI1.4 มีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.15) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมต่อไป

4.6.6 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pWI1.1, pWI1.2, pWI1.3 และ pWI1.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ใน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เชื่อมเข้าไป พบว่าทุกพลาสมิดปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 3,800 คู่เบส และ 300 คู่เบส (รูปที่ 4.16) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,800 คู่เบสเป็นแถบของพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 300 คู่เบส ที่ทำการเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด pDrive จากผลการ



รูปที่ 4.15 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

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

เลน 2 คือ พลาสมิด pWI1.1

เลน 3 คือ พลาสมิด pWI1.2

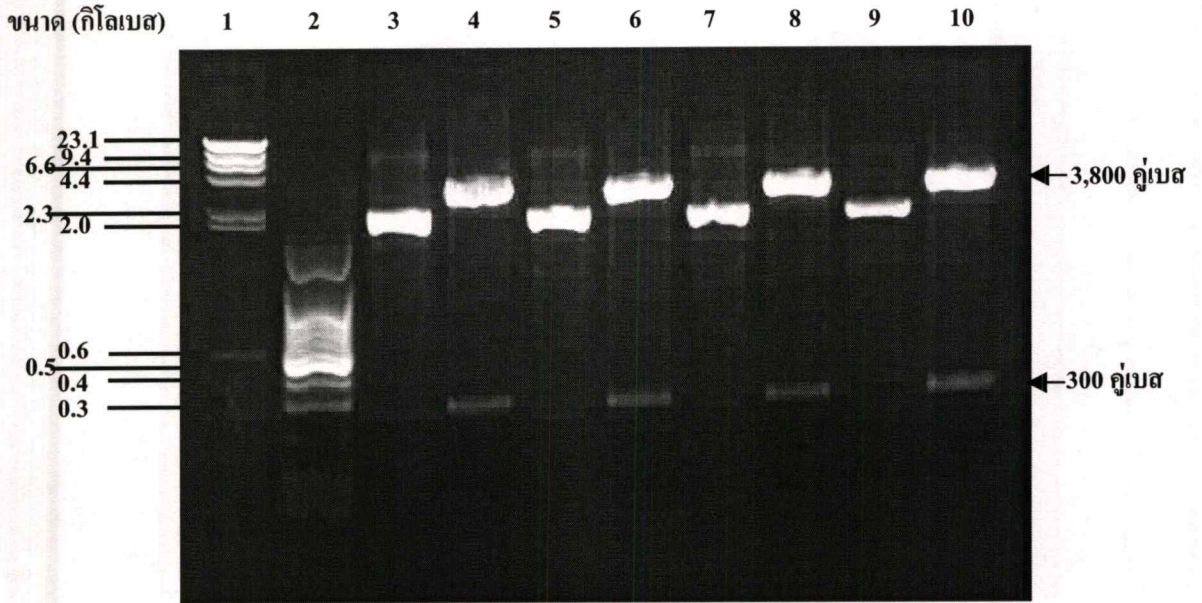
เลน 4 คือ พลาสมิด pWI1.3

เลน 5 คือ พลาสมิด pWI1.4

ทดลองแสดงให้เห็นว่า การตัดพลาสมิด pWI1.1, pWI1.2, pWI1.3 และ pWI1.4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสี่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จึงเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pWI1.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.6.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1

จากการนำพลาสมิด pWI1.1 ที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์คู่ QSI₁ และ QSI₂ ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่ามีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จึงนำพลาสมิด pWI1.1 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 เป็นไพรเมอร์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 308 คู่เบส (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.16 การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- เลน 2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- เลน 3 คือ พลาสมิด pWI1.1
- เลน 4 คือ พลาสมิด pWI1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- เลน 5 คือ พลาสมิด pWI1.2
- เลน 6 คือ พลาสมิด pWI1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- เลน 7 คือ พลาสมิด pWI1.3
- เลน 8 คือ พลาสมิด pWI1.3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- เลน 9 คือ พลาสมิด pWI1.4
- เลน 10 คือ พลาสมิด pWI1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

QSI ₁												
1	GAG E	TCA S	GAT D	GAG E	TAC Y	GAT D	ATT I	CCG P	AGA R	GCC A	30	
31	CAC H	TAC Y	CTC L	TAT Y	GCC A	AAA K	GGC G	GAT D	GAA E	GGG G	60	
61	CAC H	CTT L	ATT I	GGC G	TGC C	TGG W	CGC R	ATT I	CTG L	CCG P	90	
91	ACC T	ACA T	CAG Q	AGC S	TAC Y	ATG M	CTC L	AAA K	GAT D	ACC T	120	
121	TTT F	CCC P	GAG E	CTT L	CTG L	GGC G	GAC D	GTT V	CAG Q	GCA A	150	
151	CCG P	CAA Q	GGT G	GAG E	CGT R	ATC I	TAT Y	GAA E	CTC L	AGT S	180	
181	CGC R	TTT F	GCG A	GTC V	GAT D	AAG K	GAG E	TTT F	TCT S	GCT A	210	
211	CAG Q	TCG S	GGT G	GGG G	GTC V	AGC S	AAT N	GTC V	ACG T	ATG M	240	
241	AAG K	ATG M	TTT F	CAG Q	TCG S	CTG L	TAC Y	CAC H	CAT H	GCG A	270	
QSI ₂												
271	CAG Q	AGT S	CAG Q	GGG G	ATT I	GAA E	CGC R	TAT Y	GTA V	ACA T	300	
301	GTC V	ACA T	TC									308

รูปที่ 4.17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิติลโฮโมเซรีนแลคโตนซินเทส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม LuxI โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ชนิดของแบคทีเรีย	กรดอะมิโน	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Vibrio anguillarum</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (VanI)	74
<i>Vibrio fischeri</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (LuxI)	61
<i>Vibrio cholerae</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (LuxI)	61
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (LuxI)	60
<i>Vibrio mimicus</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (LuxI)	58
<i>Burkholderia fungorum</i>	N-acyl homoserinelactone synthase	48
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (MupI)	47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (LasI)	43
<i>Microbulbifer degradans</i>	N-acyl homoserinelactone synthase	42
<i>Mesorhizobium loti</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (TraI)	40
<i>Pseudomonas putida</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (PpuI)	40
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Autoinducer synthase	36
<i>Burkholderia mallei</i>	Autoinducer synthase	36
<i>Aeromonas hydrophila</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (AhyI)	36
<i>Aeromonas salmonicida</i>	N-acyl homoserinelactone synthase (AsaI)	36

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสที่จัดอยู่ในกลุ่ม LuxI ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ต่างๆ โดยมีความเหมือนกับโปรตีนเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* มากที่สุด คือมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน VanI ใน *Vibrio anguillarum* สูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจเอกสารพบว่า มีรายงานการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม LuxI ส่วนใหญ่มีจำนวนกรดอะมิโน 190 ถึง 230 ตัวและมีลำดับกรดอะมิโนไม่เหมือนกันทั้งหมด โดยมีความเหมือนกันน้อยกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ (Fuqua and Eberhard, 1999) จากผลที่กล่าวมาข้างต้น บ่งชี้ได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pWI1.1 น่าจะเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสจากการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโน เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI ของแบคทีเรียเฉพาะในสกุล *Vibrio*

ได้แก่ *Vibrio anguillarum* (Accession number U69677), *Vibrio fischeri* (Accession number M96844 Y00509 AF170104) และลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *Vibrio mimicus* (Accession number AY292976.1), *Vibrio parahaemolyticus* (Accession number AY292965.1) และ *Vibrio cholerae* (Accession number AY292964.1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pW11.1 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI ใน *Vibrio fischeri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio anguillarum* ตัวอักษรสีแดง, สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน, คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกันตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI ใน *Vibrio* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม LuxI จากแบคทีเรียสกุลเดียวกันก็ยังมี ความแตกต่างกัน การนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LuxI ใน *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนไม่ครบขี้นมาเปรียบเทียบด้วย ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LuxI ในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* มีบริเวณอนุรักษ์ที่ทำให้โปรตีนใน กลุ่มนี้มีหน้าที่เหมือนกัน คือสังเคราะห์เอนไซม์เอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส เนื่องจาก โปรตีน LuxI ใน *Vibrio* แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงทำให้สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ เอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างต่างกัน และกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมายที่แตกต่างกันได้ ยกตัวอย่างเช่น *V. fischeri* มีโปรตีน LuxI ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ 3oxo-C6-HSL และไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

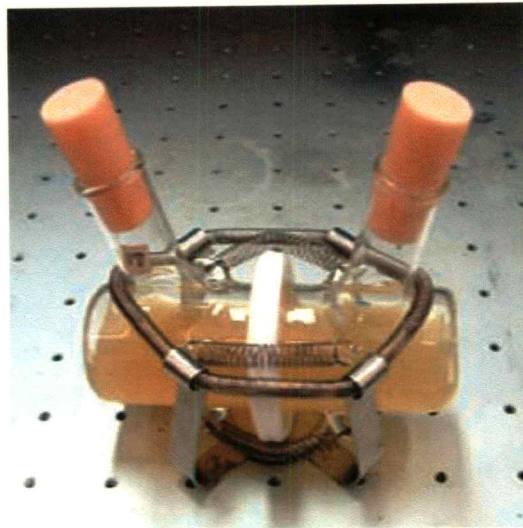
กระตุ้นการทำงานของยีน *luxICDABE* ส่งผลให้เกิดการเรืองแสง (Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht *et al.*, 1983) *V. anguillarum* มีโปรตีน VanI ทำหน้าที่สังเคราะห์ 3oxo-C10-HSL ซึ่งยังไม่ทราบถึงกลไกการกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมาย (Milton *et al.*, 1997; 2001) จากการตรวจสอบพบว่า มีโปรตีนอีกชนิดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิดใหม่ และมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากโปรตีน LuxI จึงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของโปรตีน AI-2 (autoinducer 2) (Bassler *et al.*, 1997) แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่มีรายงานว่าพบโปรตีนในกลุ่ม AI-2 คือ *V. harveyi* โดย AI-2 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสง และ *V. cholerae* ซึ่ง AI-2 เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการก่อโรคในหนูแรกเกิด (Zhu *et al.*, 2002)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไพโรเมอร์ที่ทำการออกแบบเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* เป็นไพโรเมอร์ที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณยีน *luxI* ในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เนื่องจากถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูลของธนาคารยีนสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pW11.1 เป็นชิ้นส่วนของยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

4.7 การประยุกต์ใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

4.7.1 การเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ *Variovorax paradoxus* ใน dialyzing vessel tube

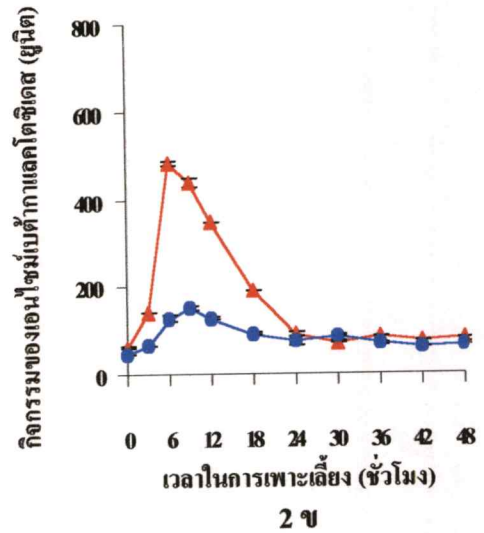
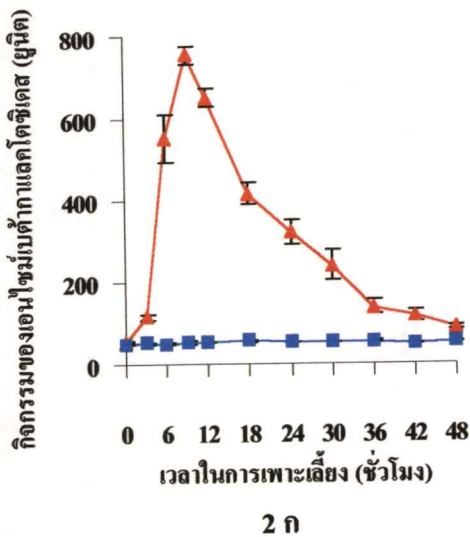
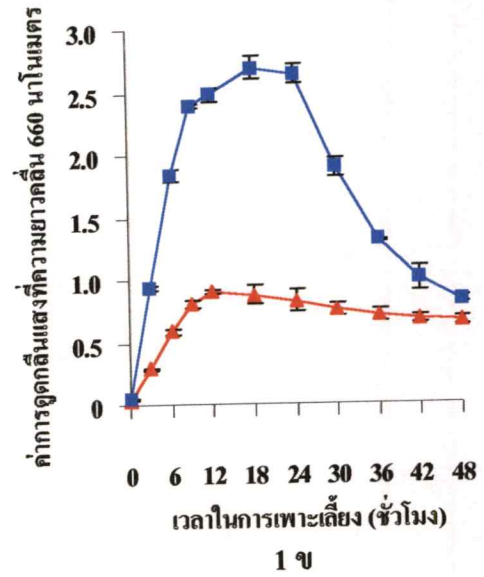
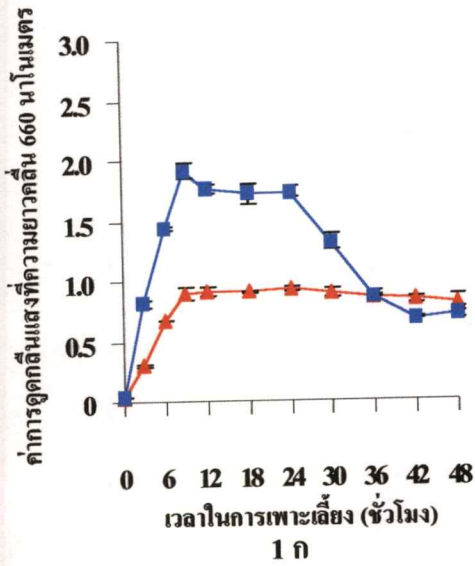
เนื่องจากมีงานวิจัยพบว่า โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของเชื้อ *Variovorax paradoxus* และส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้น (Leadbetter *et al.*, 2000) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 มาทดสอบกับเชื้อ *V. paradoxus* โดยทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ *V. paradoxus* ใน dialyzing vessel tube (รูปที่ 4.19) ซึ่งประกอบด้วยท่อแก้ว 2 ข้าง ที่กั้นด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และยอมให้สารอาหารผ่านเข้าออก แต่เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดร่วมกันได้โดยใช้สารอาหารร่วมกัน



รูปที่ 4.19 การเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ *V. paradoxus* ใน dialyzing vessel tube

จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ร่วมกับ *V. paradoxus* ใน dialyzing vessel tube โดยท่อแก้วแต่ละข้างบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อไอโซเลท C-011 และ *V. paradoxus* ลงในอาหารแต่ละข้าง โดยมีชุดควบคุมของไอโซเลท C-011 ซึ่งถ่ายเชื้อไอโซเลท C-011 ลงในท่อแก้วทั้ง 2 ข้าง และชุดควบคุมของ *V. paradoxus* ซึ่งถ่ายเชื้อ *V. paradoxus* ลงในท่อแก้วทั้ง 2 ข้าง เพาะเลี้ยงโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าในสถานะที่ทำการเลี้ยงไอโซเลท C-011 และ *V. paradoxus* เพียงชนิดเดียวนั้น *V. paradoxus* มีอัตราการเจริญสูงกว่าไอโซเลท C-011 ประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 4.20 1ก) เนื่องจาก *V. paradoxus* เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ได้ดีกว่าไอโซเลท C-011 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าไอโซเลท C-011 มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดประมาณ 800 ยูนิต ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ *V. paradoxus* ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (รูปที่ 4.20 2ก) เนื่องจาก *V. paradoxus* ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน จึงไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน พบว่า *V. paradoxus* มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นจากชุดควบคุม โดยมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 แล้วจึงเข้าสู่ stationary phase (รูปที่ 4.20 2ก) ในขณะที่ชุดควบคุมมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.20 1ก) เนื่องจาก *V. paradoxus* สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ได้ โมเลกุลสัญญาณจะแพร่ผ่านเมมเบรนเข้ามาสู่ด้านที่เพาะเลี้ยง *V. paradoxus* เมื่อเชื้อย่อย



รูปที่ 4.20 การเจริญ (1) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (2) ของไอโซเลท C-011 (—▲—) และ *V. paradoxus* (—●—) ใน dialyzing vessel tube เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเดียวกันในท่อแก้วทั้ง 2 ด้าน (ก) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ด้านหนึ่งของท่อแก้ว และอีกด้านหนึ่งเพาะเลี้ยง *V. paradoxus* (ข)

โมเลกุลสัญญาณและนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญ ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้น ส่วนไอโซเลท C-011 มีการเจริญเติบโตเหมือนชุดควบคุม

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *V. paradoxus* มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่ำกว่าในชุดควบคุม (รูปที่

4.20 2ข) เนื่องจากโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้แพร่ผ่านเมมเบรนจากด้านที่มีไอโซเลท C-011 ไปยังด้านที่มีเชื้อ *V. paradoxus* ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสใน *V. paradoxus* สูงขึ้นกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 4.20 2ข) แต่มีปริมาณไม่สูงมากนัก เนื่องจากโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนถูกย่อยโดย *V. paradoxus*

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า *V. paradoxus* สามารถนำโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Leadbetter and Greenberg (2000) ที่รายงานว่า *V. paradoxus* สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย แล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งไนโตรเจนในการเจริญได้

4.7.2 การใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสจาก *Agrobacterium tumefaciens* เพื่อลดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011

โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน สามารถบ่งบอกถึงสภาวะที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงและเริ่มควบคุมประชากรของตัวเอง เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรีย เอนไซม์แลคโตนเนสเป็นหนึ่งในเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ โดยจะทำการย่อยบริเวณวงแหวนแลคโตน มีรายงานการค้นพบเอนไซม์แลคโตนเนสในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* เป็นต้น (Dong et al., 2001; Dong et al., 2002; Lee et al., 2002; Reimmann et al., 2002; Zhang et al., 2002) เอนไซม์แลคโตนเนสจาก *A. tumefaciens* ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ได้เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว และทำหน้าที่ย่อยแลคโตนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ในโครงการวิจัยนี้ จึงได้สนใจที่จะศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการสร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จากการใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสของยีน *attM* ที่แสดงออกใน *E. coli* BL21(DE3) โดยเริ่มจากสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อเชื่อมด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เช่นเดียวกัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a มาถ่ายโอนไปยังภายในเซลล์ของแบคทีเรียให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) คัดเลือกโคลนที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันจากคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blat server ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิดแสดงออกลูกผสม แล้วชักนำให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูงด้วยสารละลาย IPTG แยกเซลล์และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech, USA) นำเอนไซม์แลคโตเนสไปใช้ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอชไอโซเมอร์แลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคสายพันธุ์อื่น ขั้นตอนสามารถเขียนสรุปได้ในรูปที่ 4.21

4.7.2.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET30a ที่มียีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens*

4.7.2.1.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens*

จากการเพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอ นำมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าปรากฏแถบจีโนมดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่อยู่เหนือระดับของแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 กิโลเบส และมีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.22) แสดงให้เห็นว่าจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ นำจีโนมดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

4.7.2.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR

จากการนำจีโนมดีเอ็นเอของ *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

สกัดจีโนมดีเอ็นเอ *A. tumefaciens*



เพิ่มปริมาณยีน *attM* ด้วยเทคนิค PCR

สกัดพลาสมิด pET30a



ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัดพลาสมิด pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Bam*HI และ *Hind*III

*Bam*HI และ *Hind*III



ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3)



คัดเลือก *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิดแสดงออกถูกผสม



เพาะเลี้ยงและชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูง

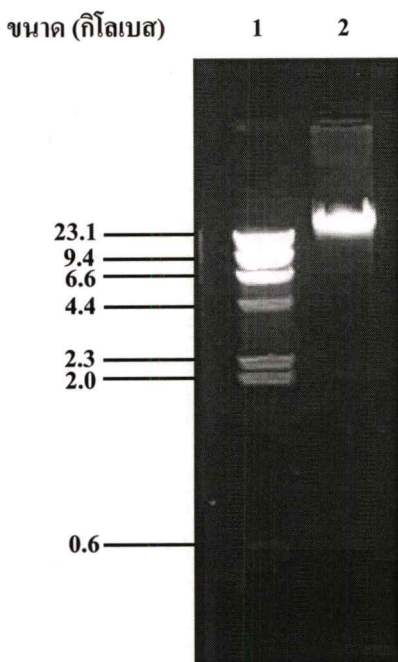


ทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสให้บริสุทธิ์



นำไปใช้ลดโมเลกุลสัญญาณเอชไอวีโมเชอรินแลคโตน

รูปที่ 4.21 ขั้นตอนการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM จาก *A. tumefaciens* และชักนำให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสในปริมาณสูงเพื่อนำไปใช้ในการลดโมเลกุลสัญญาณเอชไอวีโมเชอรินแลคโตน

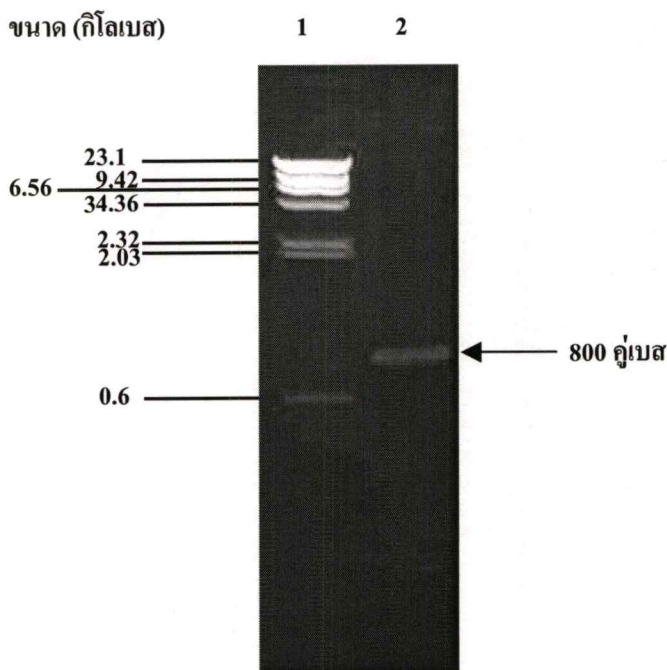


รูปที่ 4.22 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens* จากการแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
เลน 2 คือ จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. tumefaciens*

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าได้แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.23) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ต้องการ (840 คู่เบส) และไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะอื่นๆ จึงทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ต่อไป

4.7.2.1.3 การตัดผลิตภัณฑ์ 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



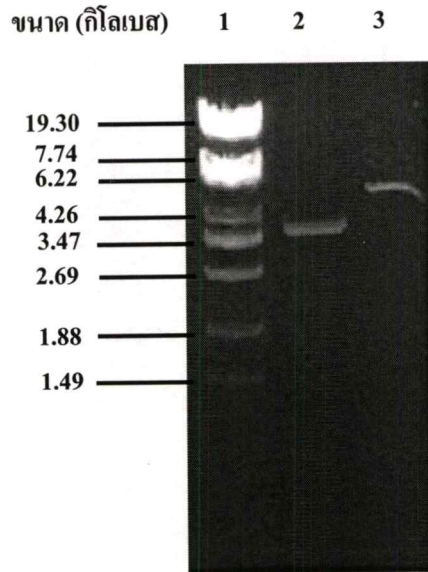
รูปที่ 4.23 ผลิตรัณฑ์ PCR ของยีน *attM*

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
เลน 2 คือ ผลิตรัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens*

4.7.2.1.4 การสกัดพลาสมิด pET30a และการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII*

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 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Marker6 พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอของ pET30a มีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส (รูปที่ 4.24 เลนที่ 2) ทำการแยกแถบพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) จากนั้นตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* วิเคราะห์ผลิตรัณฑ์ที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าภายหลังการตัดปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,400 คู่เบส (รูปที่ 4.24 เลนที่ 3) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pET30a บนแผนที่ยีน (5,420 คู่เบส) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 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

จากรูปที่ 4.24 พบว่าพลาสมิด 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 นอกจากนี้แถบพลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มีเพียง 1 แถบ แสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pET30a ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III อย่างสมบูรณ์

4.7.2.1.5 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a

จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ปริมาณ 40 นาโนกรัม กับพลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ปริมาณ 50 นาโนกรัม ในปฏิกิริยา ligation 10 ไมโครลิตร โดยเติมบัพเฟอร์ ligation 1 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต) และนำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) ต่อไป

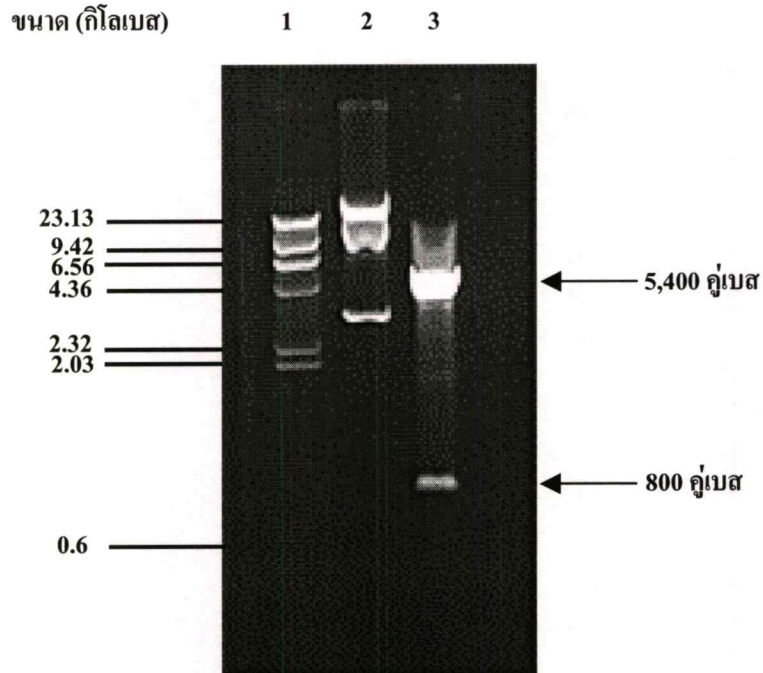
4.7.2.1.6 การทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่เชื่อมกับพลาสมิด pET30a เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันจากคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน เนื่องจากพลาสมิด pET30a มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (ภาคผนวก ข) เลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำ 1 โคโลนีที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขำบคืน เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.7.2.1.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR

จากการนำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยค่า (Alkali lysis) วิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 23,100, 9,420 และ 4,000 คู่เบส (รูปที่ 4.25 เลน 2) ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR แล้ววิเคราะห์ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,400 คู่เบส และ 800 คู่เบส แถบดีเอ็นเอขนาด 5,400 คู่เบส เป็นแถบของพลาสมิด pET30a (5,420 คู่เบส) และแถบขนาดประมาณ 800 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* (840 คู่เบส) (รูปที่ 4.25 เลน 3) เรียกพลาสมิดที่ได้ว่า pSP3.102

จากรูปที่ 4.25 ในเลน 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 ซึ่งเป็นแถบ



รูปที่ 4.25 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

ดีเอ็นเอของพลาสมิด pET30a และผลิตภัณฑ์ PCR จากการวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 4.25 เลน3) ทำให้ทราบว่า พลาสมิด pSP3.102 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pET30a ที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จึงนำพลาสมิด pSP3.102 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อไป

4.7.2.1.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ *attM*-f และ *attM*-r ในพลาสมิด pSP3.102 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาด 840 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blat server พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *attM* ใน *A. tumefaciens* ทั้งหมด (ไม่ได้แสดงผล) แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pSP3.102 เป็นชิ้นส่วนของยีน *attM* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโฮโมเซอริเนแลคโตน หลังจากนั้นจึงนำ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 ไปทดสอบความเสถียรของพลาสมิดก่อนการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM เพื่อผลิตเอนไซม์แลคโตนเนสในปริมาณสูงต่อไป

4.7.2.1.9 ผลการทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pSP3.102

พลาสมิด pET30a จะมีความเสถียรเมื่ออยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียให้อาศัย 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 ซ้ำมกิ้น 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 บน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็งสูตร LB+Km พบว่ามีจำนวน 28 โคโลนี ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกับเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LB แสดงให้เห็นว่า *E. coli* BL21(DE3) เกือบทั้งหมด ($28-29 \times 10^6$ โคโลนี) มีพลาสมิด pSP3.102 ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินได้

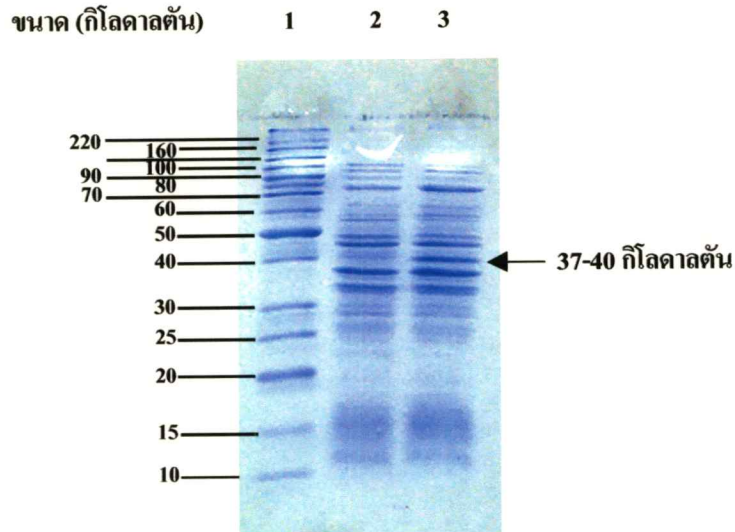
จากการนำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 10^5 มา spread บนอาหารแข็งสูตร LB+IPTG และ LB+IPTG+Km พบว่า *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 ไม่สามารถเจริญบนอาหารทั้ง 2 แบบ เนื่องจากสาร IPTG จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และชักนำให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสแทน

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

4.7.2.1.10 ผลการชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส

จากการนำ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pSP3.102 จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงชักนำให้เชื้อมีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสโดยเติมสารละลาย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นแตกเซลล์ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของ Amplitude เก็บส่วนใสโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford จากนั้นตรวจสอบโปรตีนก่อนและหลังการชักนำในโพลีอะคริลาไมด์เจลลดิลิเคโตรโพรเซซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ ดังวิธีในข้อที่ 3.5.8.2 โดยในแต่ละเลนหยอดสารละลายให้มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม เปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, USA) พบว่าภายหลังการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM จะสังเกตเห็นแถบโปรตีน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 37 ถึง 40 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.26 เลน3) เข้มข้นกว่าโปรตีนที่สกัดก่อนการชักนำ (รูปที่ 4.26 เลน2) แถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมีขนาดใกล้เคียงกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดโปรตีนที่ต้องการ คือ 37.8 กิโลดาลตัน (ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* และโปรตีนที่มาจาก การถอดรหัสช่วงเริ่มต้นและช่วงปลายของ pET30a) จึงสรุปได้ว่า pSP3.102 สามารถชักนำให้ สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM หรือเอนไซม์แลคโตเนสจากการชักนำด้วยสารละลาย IPTG ได้นำสารละลายเอนไซม์เอนไซม์แลคโตเนสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยชุดคอลัมน์แยกโปรตีน HisTrap



รูปที่ 4.26 การวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังการชักนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM หรือ เอนไซม์แลคโตเนสใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ เอสดีเอส (SDS-PAGE)

เลน 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

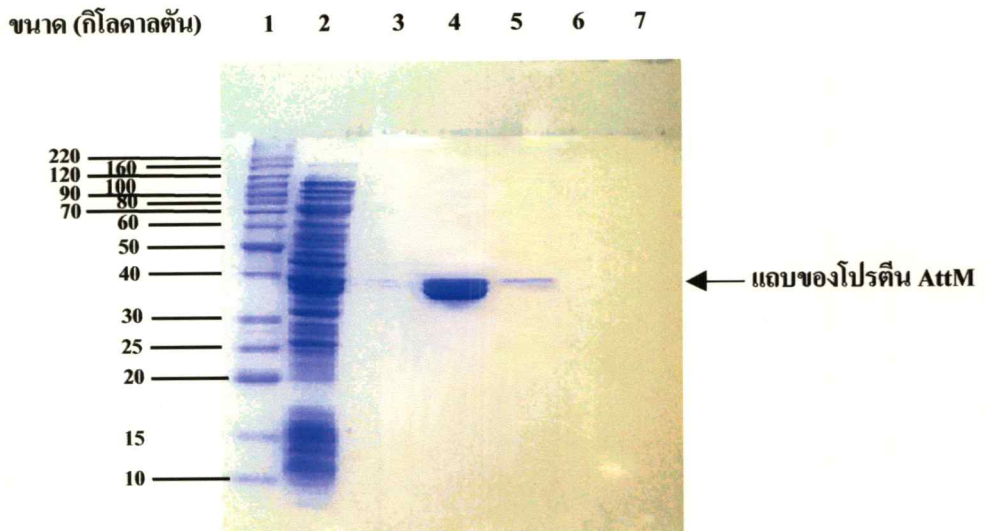
เลน 2 คือ แถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ก่อนการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM

เลน 3 คือ แถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ภายหลังการชักนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM

ด้วย IPTG

จากการนำสารละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสมาทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้ ชุดคอลัมน์แยกโปรตีน HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech, USA) โดยใส่สารละลายเอนไซม์ ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดของรูพรุน 0.45 ไมครอน ลงในคอลัมน์ที่มีสารละลาย nickel salt แล้วชะโปรตีนที่ถูกจับอยู่ในคอลัมน์ด้วย elution buffer ทำการแบ่งเก็บสารละลายที่ชะ ออกมา 5 fraction โดยทำการเก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละ fraction เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE เปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder และสารละลายโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ HisTrap ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 20 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าใน fraction ที่ 1 มีแถบของโปรตีนเล็กน้อย เนื่องจากโปรตีนยังไม่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (รูปที่ 4.27 เลน 3) ใน fraction ที่ 2 มีแถบของโปรตีนที่ต้องการมากที่สุด เนื่องจากโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction นี้ (รูปที่ 4.27 เลน 4) ใน fraction ที่ 3 พบแถบของโปรตีนเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากโปรตีนบางส่วนยังถูกชะออกจากคอลัมน์ไม่หมด (รูปที่ 4.27 เลน 5) สำหรับใน fraction ที่ 4 และ 5 ไม่พบแถบของโปรตีน เพราะโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์จนหมดใน fraction ที่ 3 แล้ว (รูปที่ 4.27 เลน 4 และ 5)



รูปที่ 4.27 การวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังจากทำรีคอมบิแนนท์เออนไซม์แลคโตเนสให้บริสุทธิ์ ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE)

เลน 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

เลน 2 คือ แถบโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ HisTrap

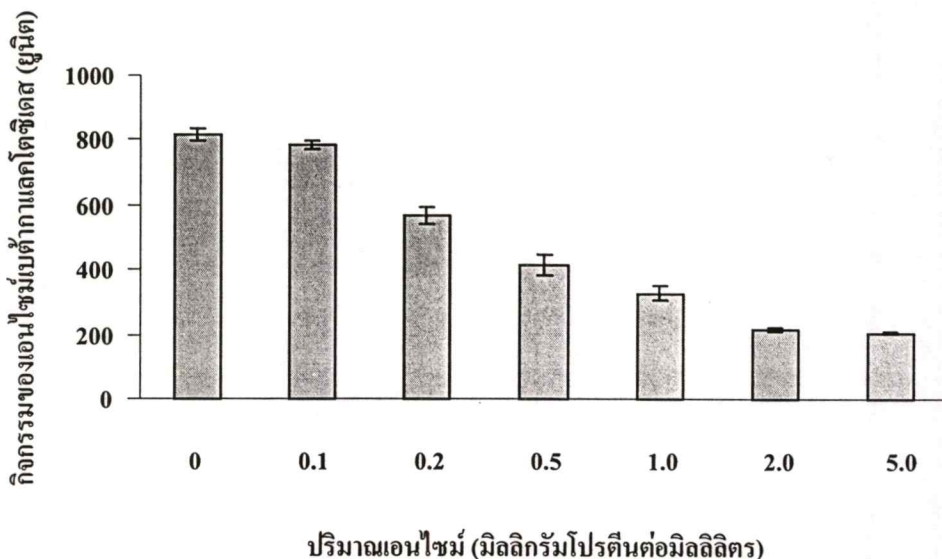
เลน 3-7 คือ แถบโปรตีนที่ได้จากการชะ fraction ที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ ในปริมาณที่เท่ากัน

จากรูปที่ 4.27 จะพบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จาก fraction ที่ 2 มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยสังเกตได้จากการลดลงของแถบโปรตีนอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนก่อนผ่านคอลัมน์ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นน้อยลงเนื่องจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์ใน fraction ที่ 2 ไปทดสอบกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนต่อไป

4.7.2.1.11 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนสที่เหมาะสมต่อการย่อย โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011

จากการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนใน fraction ที่ 2 ที่มีปริมาณโปรตีน 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัม มาบ่มรวมกับส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ในปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่เหลืออยู่ จากการวัดของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของ *A. tumefaciens* A136 ที่ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนพบว่าเมื่อไม่มีการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ลงไปในส่วนของไอโซเลท C-011 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมีค่าสูงสุดคือ 815 ยูนิต เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ลงไปในส่วนของไอโซเลท C-011 ให้มีปริมาณโปรตีนสุดท้ายเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลงเหลือ 784, 565, 415, 327, 219 และ 196 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.28)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Zhang และคณะ (2002) ที่พบว่าเอนไซม์แลคโตนเนสซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* สามารถย่อยวงแหวนแลคโตนของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่มีโครงสร้าง 3oxo-C8-HSL ได้ จากรูปที่ 4.28 จะเห็นได้ว่าปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนสที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงตามลำดับ เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ให้มีปริมาณโปรตีนสุดท้ายเท่ากับ 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่ำที่สุดและมีปริมาณที่

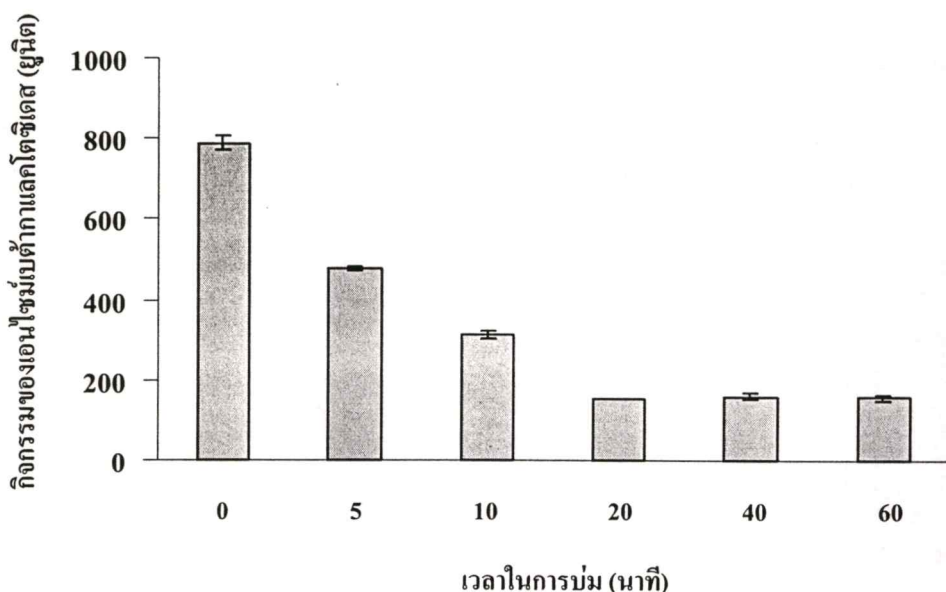


รูปที่ 4.28 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011

ใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณเอนไซม์แลคโตเนส 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร สามารถย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนได้โดยไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) (ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณเอนไซม์แลคโตเนสที่น้อยที่สุดที่สามารถย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ได้ คือปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มาทำการศึกษาเวลาที่ เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนต่อไป

4.7.2.12 เวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัณฐานเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ด้วยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2

เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ลงไปในส่วนใสของไอโซเลท C-011 ให้มีปริมาณโปรตีนสุดท้ายเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าที่เวลา 0, 5, 10, 20, 40 และ 60 นาทีของการบ่ม มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส 788, 476, 314, 155, 160 และ 157 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.29)



รูปที่ 4.29 เวลาในการย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 โดยริคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 4.29 จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงเมื่อเวลาที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น โดยหลังจากนาทีที่ 20 ของการบ่ม กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสคงที่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่เวลา 20, 40 และ 60 นาทีของการบ่ม ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยริคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 คือ 20 นาที

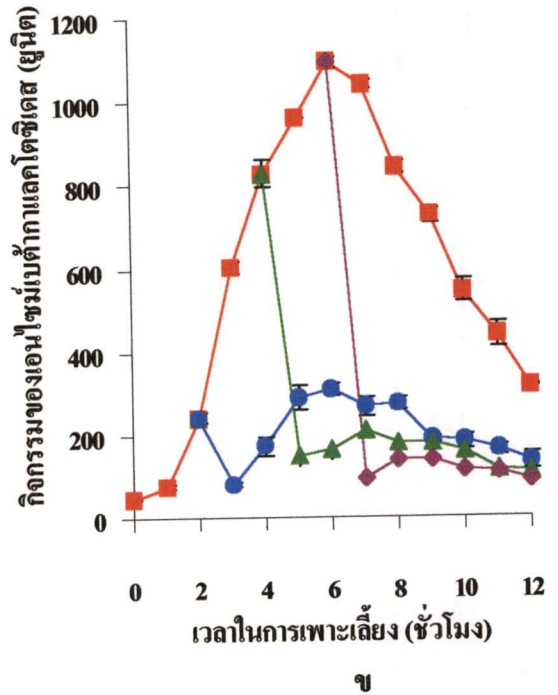
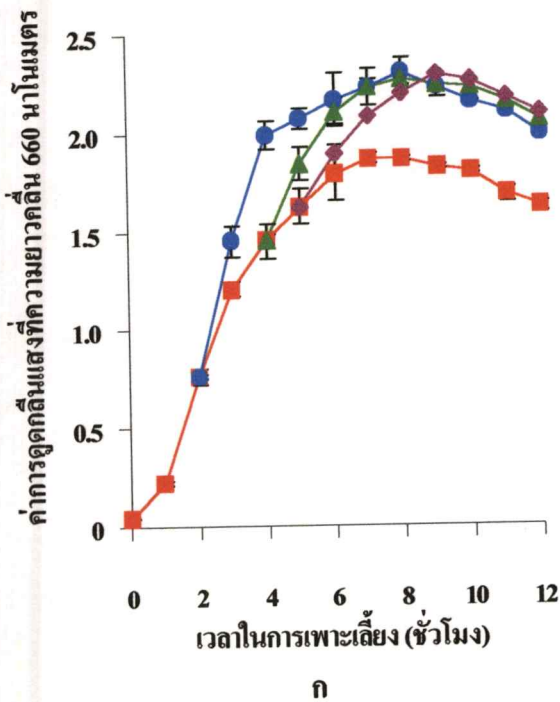
จากผลการศึกษาปริมาณของริคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนและเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 สามารถสรุปได้ว่าริคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร และเวลาของการบ่ม 20 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 ดังนั้นจึงนำริคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนจาก fraction ที่ 2 ไปทดสอบกับเชื้อไอโซเลท C-011 ระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาผลของริคอมบิแนนท์เอนไซม์ต่อการเจริญและการลดลงของโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนต่อไป

4.7.2.13 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสต่อการเจริญและปริมาณโมเลกุล สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของไอโซเลท C-011

จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ในอาหารเหลว MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 2, 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ในทุกชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อไม่มีการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ไอโซเลท C-011 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีระยะ lag phase เพียง 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 6 อัตราการเจริญเริ่มลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.30ก) นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น และเมื่อมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสปริมาณสูงจนถึงระดับที่สามารถควบคุมจำนวนประชากรของตัวเองได้แล้ว ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสก็จะลดลง (รูปที่ 4.30ข)

เมื่อทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ในปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรลงในเชื้อไอโซเลท C-011 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาที่ 2 พบว่าไอโซเลท C-011 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.30 ก) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าภายหลังการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงจนถึงระดับต่ำสุดภายใน 1 ชั่วโมงแรกของการเติม หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสก็จะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดคือประมาณ 300 ยูนิตในช่วงเวลาที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และจะลดลงในช่วงเวลาที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.30 ข) จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสใน fraction ที่ 2 สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของไอโซเลท C-011 ได้ โดยเมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในช่วงเวลาที่ 2 หรือระยะเริ่มต้นของ lag phase โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่เพิ่งจะเริ่มผลิตจะมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น การเจริญของเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้มีการผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้นอีกครั้ง เพื่อควบคุมจำนวนประชากร แต่จะเห็นได้ว่าปริมาณโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตขึ้นต่ำกว่าสภาวะปกติ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เติมลงไปยังคงอยู่ หลังจากนั้นเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase หรือควบคุมจำนวนประชากรได้แล้ว ปริมาณโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสโตรเจน (ข) ของไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MB (■) และเมื่อเติมเอนไซม์แลคโตเนสปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 2 (●), ชั่วโมงที่ 4 (▲) และชั่วโมงที่ 6 (◆) ของการเพาะเลี้ยง

สัญญาณเอสโตรเจนจึงลดลง และรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เติมเข้าไปอาจหมดหน้าที่การทำงานเมื่อระยะเวลาของการบ่มเพิ่มขึ้น

เมื่อทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ลงในเชื้อไอโซเลท C-011 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 6 พบว่าไอโซเลท C-011 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 7 และชั่วโมงที่ 9 ตามลำดับ จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.30ก) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าภายหลังการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงจนถึงระดับต่ำสุดภายใน 1 ชั่วโมงแรกของการเติม หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะคงที่ (รูปที่ 4.30ข) จากผลการทดลองจะเห็นว่า การเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในไอโซเลท C-011 ที่มีระยะการเจริญช่วง log phase (ชั่วโมงที่ 4) หรือช่วงท้ายของ log phase (ชั่วโมงที่ 6) ทำให้โมเลกุลสัญญาณเอสโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตขึ้นในปริมาณสูงมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น การเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นของเชื้อไม่ส่งผลให้มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสโมเซอร์ริน-แลคโตนเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เนื่องจากในการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสในชั่วโมงที่ 4 และ ชั่วโมงที่ 6 นั้น เชื้อมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณสูงในระดับที่จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายและนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อแล้ว ทำให้ไม่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณดังกล่าวเพิ่มขึ้นอีก

การเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสในช่วงระยะเวลาของการเจริญช่วงต่างๆ มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรีย จากการตรวจเอกสาร พบว่าแบคทีเรีย *V. fluvialis* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งพบในผู้ที่รับประทานอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *V. fluvialis* (Kolb et al., 1997) ดังนั้นการศึกษาการลดโมเลกุลสัญญาณเอสโมเซอร์รินแลคโตนโดยเอนไซม์แลคโตนเนสอาจจะสามารถเป็นแนวทางในการศึกษาวิธีการควบคุมประชากร รวมถึงการลดความรุนแรงของการก่อโรคได้ในอนาคต และสามารถนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเชื้อก่อโรคอื่นๆ เช่น *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Samonella typhimurium* และ *Yersinia enterocolitica* ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่าความรุนแรงของการก่อโรคจากแบคทีเรียดังกล่าวถูกควบคุมโดยระบบควอรัมเซนซิง (Suga and Smith, 2003) ดังนั้นการยับยั้งหรือลดปริมาณการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสโมเซอร์รินแลคโตนโดยเอนไซม์แลคโตนเนสจึงอาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมความรุนแรงของการเกิดโรค ในการทดลองต่อไปจึงนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสไปทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นต่อไป

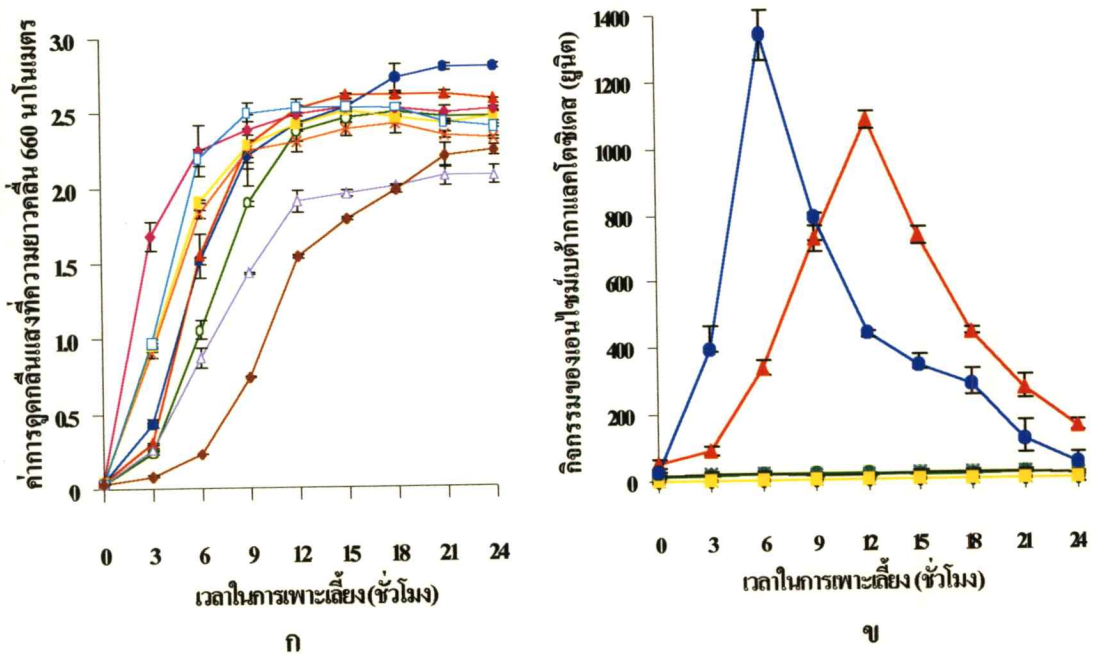
4.7.3 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

4.7.3.1 การเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสโมเซอร์รินแลคโตน

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens* A136 และ ไอโซเลท C-011 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทุก 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกัน โดยมีช่วง lag phase สั้น มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงประมาณชั่วโมงที่ 9 ถึง 12 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary ยกเว้น *A. tumefaciens* A136 ที่มีระยะ lag phase นานกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.31ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตน พบว่ามีเพียง *P. aeruginosa* ATCC 27823 และไอโซเลท C-011 ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสหรือโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตน โดย *P. aeruginosa* ATCC 27823 จะเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตน ในชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นจนมีปริมาณสูงสุด 1,083 หน่วย ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นโมเลกุลสัญญาณจะลดลง (รูปที่ 4.31ข) สำหรับไอโซเลท C-011 จะเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตนในชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นจนมีปริมาณสูงสุด 1,390 หน่วย ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.31ข) หลังจากนั้นปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตนลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากโมเลกุลสัญญาณมีปริมาณสูงถึงระดับที่สามารถควบคุมจำนวนประชากรของตัวเองได้แล้ว



รูปที่ 4.31 การเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรีนแลคโตน (ข) ของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* (◆), *Bacillus subtilis* (×) และ *Bacillus cereus* (■) แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 (▲), *Vibrio cholerae* (□), *Escherichia coli* (△), *Salmonella typhimurium* (○), *Agrobacterium tumefaciens* A136 (◆) และ ไอโซเลท C-011 (●) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

จากผลการทดลอง ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน แต่จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติไปกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น ซึ่งขบวนการขนส่งสัญญาณของแบคทีเรียแกรมบวกโดยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้เรียกว่า “เปปไทด์ควอรัมเซนซิง (peptide quorum sensing)” (Kleerebezem *et al.*, 1997; Novick and Muir, 1999)

จากการตรวจเอกสารพบว่า เฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Parsek and Greenberg, 2000) แต่แบคทีเรียแกรมลบที่ทำการศึกษาก็ได้แก่ *V. cholerae*, *E. coli*, *S. typhimurium* และ *A. tumefaciens* A136 นั้นไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 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 พบว่ามีโครงสร้างของสัญญาณแตกต่างจากโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โมเลกุลสัญญาณ AI-2 ไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์ LuxR ของเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่สร้างจาก reporter strain A136 ที่ใช้ในการศึกษา ทำให้ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ สำหรับ *V. cholerae* นั้นผลิตโมเลกุลสัญญาณ AI-2 เช่นเดียวกับ *E. coli* และ *S. typhimurium* (Cámara *et al.*, 2002)

จากการทดลอง ไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสใน *A. tumefaciens* A136 แสดงให้เห็นว่า *A. tumefaciens* A136 ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยปกติแล้ว *A. tumefaciens* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้าง 3oxoC8-HSL ได้ (Piper *et al.*, 1993) แต่เนื่องจากแบคทีเรีย *A. tumefaciens* A136 เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการตัดยีน *traI* ออกเพื่อใช้เป็น reporter strain ในการทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จึงเหลือแต่ยีน *traR* ที่รวมอยู่กับโปรโมเตอร์ของ *lacZ* จึงทำให้ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua and Winans, 1996)

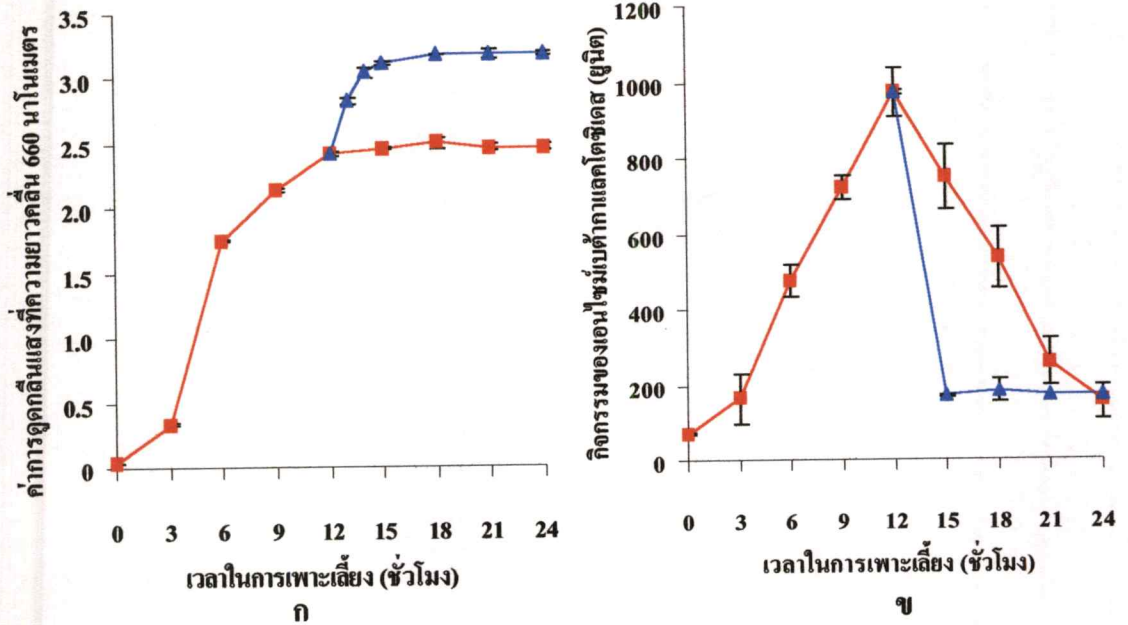
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนในแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27823, *V. cholerae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *A. tumefaciens* A136 และไอโซเลท C-011 พบว่า *P. aeruginosa* ATCC 27823 และไอโซเลท C-011 สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้โดยมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเมื่อความหนาแน่นเซลล์เพิ่มสูงขึ้น จึงทำการศึกษารลดโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ATCC 27823 ด้วยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสจาก fraction ที่ 2 ต่อไป

4.7.3.2 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนใน *P. aeruginosa* ATCC 27823

จากการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ATCC 27823 ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทุก 3 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าก่อนการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจาก fraction ที่ 2 เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีระยะ lag phase สั้น หลังจากชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 6 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.32ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จนมีปริมาณสูงสุด 1,016 ยูนิต ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.32ข)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *P. aeruginosa* ATCC 27823 สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้ จากการตรวจเอกสาร พบว่าแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน 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 ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตและมีจำนวน



รูปที่ 4.32 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของ *P. aeruginosa* ATCC 27823 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (—■—) และเมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (—▲—)

ประชากรเพิ่มสูงขึ้น โดยเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในการเจริญช่วงต้นระยะ log phase และมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในการเจริญช่วงท้ายของระยะ log phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase จากนั้นปริมาณโมเลกุลสัญญาณจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งน่าจะเกิดจากโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่เชื้อผลิตขึ้นในระดับที่มากพอเข้าไปจับกับรีเซพเตอร์ LasR หรือ RhlR ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ แล้วมีกลไกไปกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้มีการตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์โดยการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งเมื่อสามารถควบคุมจำนวนประชากรได้แล้วปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะลดลง

เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ATCC 27823 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 15 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.32 ก) จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าภายหลังการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบต้ากามาแลคโตซิเดสลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับต่ำสุดภายใน 1 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากามาแลคโตซิเดสจะมีค่าคงที่ (รูปที่ 4.32 ข)

จากผลการทดลองพบว่า ริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสใน fraction ที่ 2 นอกจากจะสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 แล้วยังสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ATCC 27823 ได้อีกด้วย แสดงให้เห็นว่า ริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากเชื้อที่แตกต่างกันและมีโครงสร้างที่แตกต่างกันได้ แบคทีเรีย *V. fischeri* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3oxo-C6-HSL (Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht *et al.*, 1983) แบคทีเรีย *V. anguillarum* ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3oxo-C10-HSL (Milton *et al.*, 1997) ส่วน *P. aeruginosa* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3oxo-C12-HSL (Pearson *et al.*, 1994) และ C4-HSL (Pearson *et al.*, 1995) จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน และโมเลกุลสัญญาณสามารถถูกย่อยด้วยริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสได้ ดังนั้นริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสจึงน่าจะ สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์อื่นๆ ได้

เมื่อเติมริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ทำให้โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตอยู่ในระดับสูงสุดลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ลดลง ทำให้โมเลกุลสัญญาณไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายในการควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อได้ เพราะฉะนั้นจึงทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นกว่าในกรณีที่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนตามปกติ จากผลดังกล่าว เราสามารถใช้ประโยชน์จากริกอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสในการควบคุมจำนวนประชากรแบคทีเรียโดยการลดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่เชื้อผลิตขึ้น และนำไปสู่การศึกษาการลดความรุนแรงของการก่อโรคในแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสายพันธุ์อื่นๆ โดยไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยการทำให้ปฏิกิริยากับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 พบว่าเมื่อคัดเลือกโดยเทคนิค cross streak assay สามารถจัดกลุ่มได้แบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า จำนวน 28 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้าน้อยมากถึงปานกลาง จำนวน 39 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้ามากถึงสีฟ้าเข้ม จำนวน 15 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท คือ C-002, C-003 และ C-011 ที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้

5.1.2 จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน โค้งงอ เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน (GenBank) พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดยไอโซเลท C-002 และ C-011 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Vibrio fluvialis* ทั้งหมด ไอโซเลท C-003 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio fluvialis* 99 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TCBS ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และ ไอโซเลททั้ง 3 จัดเป็น Marine bacteria เนื่องจากไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

5.1.3 แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน ตามการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนมีปริมาณสูงมากพอที่จะควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อได้แล้ว โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนจะลดลงอย่างรวดเร็ว การเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโต และมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนเพิ่มสูงขึ้นจากสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าสัญญาณควอรัมเซนซิงถูกกระตุ้นผ่านความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส โดยออกแบบไพรเมอร์ของยีน *luxI* แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ ยีน *luxI* จากนั้นโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการโคลน pDrive และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตนซินเทส (VanI) ของ *Vibrio anguillarum* สูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์

5.1.5 จากการเพาะเลี้ยง *Variovorax paradoxus* ร่วมกับไอโซเลท C-011 ใน dialyzing vessel tube พบว่า *V. paradoxus* สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจาก ไอโซเลท C-011 และนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโต ส่งผลให้ เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นจากสภาวะปกติ 2 เท่า

5.1.6 จากการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AttM จาก *Agrobacterium tumefaciens* และชักนำ ด้วยสารละลาย IPTG เพื่อให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสในปริมาณสูง และวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสมีขนาด 37-40 กิโลดาลตัน เมื่อ นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ HisTrap พบว่ารีคอมบิ-แนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสมีปริมาณสูงสุดใน fraction ที่ 2

5.1.7 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีน ต่อ มิลลิลิตร และเวลาที่ใช้ในการบ่ม 20 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโมเลกุลสัญญาณ เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของไอโซเลท C-011

5.1.8 รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตนเนสจาก fraction ที่ 2 ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม โปรตีนต่อ มิลลิลิตรสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ *P. aeruginosa* ATCC 27823 ได้และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีความสำคัญอีกหลายสายพันธุ์ ยังไม่มีรายงานการผลิตและ กลไกการควบคุมโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ดังนั้นการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจาก น้ำทะเลในบริเวณอื่นๆ น่าจะทำให้พบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิล โฮโมเซอรินแลคโตนได้ นอกเหนือจากที่มีรายงานการศึกษามาแล้ว

5.2.2 ลำดับนิพจน์โอไทค์ของจีน h_{xxI} ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปศึกษาค้นคว้าวิจัย โดยการตัดต่อยีนเพื่อผลิตแบคทีเรียสายพันธุ์กลายและศึกษาลักษณะของสายพันธุ์กลายที่ได้ เพื่อควบคุมความรุนแรงของการก่อโรคและลดจำนวนประชากรแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- บุญญา วรินทร์รักษ์. 2524. แบคทีเรียที่ก่อโรค. กรุงเทพฯ : วิกตอรี การพิมพ์.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โอเคียนสโตร์.
- วัฒนาวลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และ พันธุวิศวกรรม. เล่มที่ 2. นครปฐม : โรงพิมพ์สารานุกรมสุขุมลฐานอาเซียน.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E and Silverman, M.R. 1993. "Intercellular signalling in *Vibrio harveyi* sequence and function of genes regulating expression of luminescence." Mol. Microbiol. 9 : 773-786.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P. and Stevens, A.M. 1997. "Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*." J. Bacteriol. 179 : 4043-4045.
- 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.
- Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P.C. and Welch, M. 2002. "Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule." J. Bacteriol. 184(4) : 1163-1171.
- Ca'mara, M., Hardman, A., Williams, P. and Milton, D. 2002 "Quorum sensing in *Vibrio cholerae*." Nature Genetics. 32 : 217-218.
- Cao, J. and Meighen, E.A. 1989. "Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*." J. Biol Chem. 264 : 21670-21676.
- 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.
- Conway, B.A. and Greenberg, E.P. 2002. "Quorum-sensing and quorum-sensing genes in *Bukholderia vietnamiensis*." J. Bacteriol. 184(4) : 1187-1191.
- 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.
- De Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. 2000. "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship." *Infect. Immun.* 68 : 4839-4849.
- 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 homoserine lactonase." *Nature*. 411 : 813-819.
- Dong, Y.H., Gust, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L. and Zhang, L.H. 2002. "Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 1745-1759.
- 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., Neelson, K.H. and Oppenheimer, N.J. 1981. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. 20 : 2444-2449.
- Engebrecht, J., Neelson, K. and Silverman, M. 1983. "Bacterial bioluminescence : isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*." *Cell*. 32 : 773-781.
- Engebrecht, J. and Silverman, M. 1984. "Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81 : 4154-4158
- Engebrecht, J. and Silverman, M. 1987. "Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence." *Nucleic Acids Res.* 15 : 10455-10467.
- Fuhrman, J.A., Sleeter, T.D., Carlson, C.A. and Proctor L.M. 1989. "Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological significance." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57 : 207-217.
- 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.
- Gram L., Grossart, H.P., Schlingloff, A. and Kjørboe, T. 2002. "Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Rosebacter* strains isolated from marine snow." *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8) : 4111-4116.
- Gray, K.M. and Garey, J.R. 2001. "The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators." *Microbiol.* 147 : 2379-2387.
- Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria." *J. Microbiol.* 38(3) : 117-121.
- Guan, L.L. and Kamino, K. 2001. "Bacterial response to siderophore and quorum sensing chemical signals in the seawater microbial community." *BMC Microbiol.* 1(27) : 1471-1481.
- Hanzelka, B.L. and Greenberg, E.P. 1995. "Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain." *J. Bacteriol.* 177(3) : 815-817.
- Hanzelka, B.L. and Greenberg, E.P. 1996. "Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis." *J. Bacteriol.* 178(17) : 5291-5294.
- Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E. and Greenberg, E.P. 1999. "Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein." *J. Bacteriol.* 181(18) : 5766-5770.
- 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.
- Kievit, T.R.D., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. and Iglewski, B.H. 2001. "Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms : their role and expression patterns." *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4) : 1865-1873.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1997. "Quorum sensing by peptide pheromones and two component signal-transduction system in gram-positive bacteria." *Mol. Microbiol.* 24 : 895-904.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. and Kuwahara, S. 1963. "A new selective isolation medium for the *Vibrio* group ; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium)." *Jpn. J. Bacteriol.* 18 : 387-392.

- Kolb, E.A., Epper, S.C. and Klein, J.D. 1997. “*Vibrio fluvialis*: an under recognized enteric pathogen in infants?” Southern. Med. Journal. 90(5) : 544-545.
- Leadbetter, J.R. and Greenberg, E.P. 2000. “Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*.” J. Bacteriol. 182(24) : 6921-6926.
- Lee, S.J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.K., Koo, B.T. and Lee, J.K. 2002. “Genes encoding the N-acyl homoserine lactone degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*.” Appl. Environ. Microbiol. 68 : 3919-3924.
- 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.
- McCrain, M. and Hemscheidt, T. 2000. Isolation of an antibiotic found in the marine bacterium *Alteromonas rubra*. [Online]. Available :https://www.marbec.org/education/msurf_2000.asp
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. “Quorum sensing in bacteria.” Annu. Rev. Microbiol. 55 : 165-199.
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1997. “Quorum sensing in *Vibrio anguillarum* : characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone.” J. Bacteriol. 179(9) : 3004-3012.
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M. and Williams, P. 2001. “The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone.” J. Bacteriol. 183(12) : 3537-3547.
- 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.
- Nealson, K.H. and Hastings, J.W. 1979. “Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance.” Microbiol. Rev. 43 : 496-498.
- Novick, R.P. and Muir, T.W. 1999. “Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other gram positive bacteria.” Curr. Opin. Microbiol. 2 : 40-45.
- Ohno, M., Okana, I., Watsuji, T., Kakinoma, T., Ueda, K. and Beppu, T. 1999. “Establishing the independent culture of a strictly symbiotic bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from its supporting *Bacillus* strain.” Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(6) : 1083-1090.

- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan JR, J.E. and Greenberg, E.P. 1999. "Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 : 4360-4365.
- 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.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H. 1993. "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene requires cell-to-cell communication." *Science.* 260(21) : 1127-1130.
- Pavia, A.T., Bryan, J.A., Maher, K.L., Hester Jr, T.R. and Farmer, J.J. 1989. "*Vibrio carchariae* infection after a shark bite." *Ann. Intern. Med.* 111 : 85-86.
- 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.
- Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H. and Prince, A. 2000. "*Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signalling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection." *Infection and Immunity.* 68(7) : 4331-4334.
- Piper, K.R., Beck von Bodman, S. and Farrand, S.K. 1993. "Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature.* 362 : 448-450.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. and Palva, E.T. 1993. "A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*." *EMBO Journal.* 12: 2467-2476.
- 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.

- Rashid, M.H., Rumhaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. and Kornberg, A. 2000. "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(17) : 9636-9641.
- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillae, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., De'faga, G. and Haas, D. 2002. "Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. Microbiology. 148 : 923-932.
- 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.
- Simpson, L.M., White, V.K., Zane, S.F. and Oliver, J.D. 1987. "Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*." Infect. Immun. 55 : 269-272.
- Singleton, P. 1992. **Introduction to bacteria**. 2 edition. England : John Wiley and Sons.
- 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.
- Suga, Hiroaki. and Smith, K.M. 2003. "Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target." Curr. Opin. Microbiol. 7 : 586-591.
- 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.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S. and Stewart, G.S.A.B. 1997. "Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* : identification of the LuxRI homologues AhyRI and AsaRI and their cognate signals molecules." J. Bacteriol. 179 : 5271-5281.
- Whiteley, M., Lee, K.M. and Greenberg, E.P. 1999. "Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(24) : 13904-13909.

- Williams, P. 1997. "Quorum sensing in *Vibrio anguillarum* : characterization of the *vaI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone." *J. Bacteriol.* 179(9) : 3004-3012.
- Winan, S.C. and Bassler, B.L. 2002. "Mob psychology." *J. Bacteriol.* 184 : 873-883.
- Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A. and Tate, ME. 1993. "*Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones." *Nature.* 362:446-448.
- Zhang, H.B., Wang L.H. and Zhang, L.H. 2002. "Genetic control of quorum sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(7) : 4638-4643.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L. and Mekalanos, J.J. 2002. "Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(5) : 3129-3134.
- Zobell, C.E. 1946. **Marine Microbiology.** Chronica Botanica, Watham, MA.

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marine Broth (MB) และ Marine agar (MA)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. เปปโตน	5
2. ยีสต์สกัด	1
3. เฟอร์ริซิเตรท	0.1
4. โซเดียมคลอไรด์	19.45
5. แมกนีเซียมคลอไรด์	5.9
6. แคลเซียมคลอไรด์	1.8
7. โบรอนเตียมคลอไรด์	0.55
8. โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.16
9. โบรอนเตียมโบรไมด์	0.08
10. โซเดียมซัลเฟต	3.24
11. สตรอนเตียมคลอไรด์	0.034
12. กรดบอริก	0.022
13. โซเดียมซิติเกต	0.004
14. โซเดียมฟลูโอไรด์	0.0024
15. แอมโมเนียมไนเตรท	0.0016
16. ไดโซเดียมฟอสเฟต	0.008

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.6 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (อาหาร
เลี้ยงเชื้อสูตร MA เติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

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

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

3. 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 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. ยีสต์สกัด	5
2. มีทเปปโตน	5
3. โซเดียมไทโอซัลเฟต	10
4. โซเดียมคลอไรด์	3
5. โซเดียมคลอไรด์	10
6. ไทมอลบลู	0.040
7. เคซีนเปปโตน	5
8. โซเดียมซิเตรท	10
9. เกลื่อน้ำดี	5
10. ซูโครส	20
11. เฟอริกซิเตรท	1
12. บรอมไทมอลบลู	0.040
13. ไข่	15

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.6 ± 0.2 ให้ความร้อนและปล่อยให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที ปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

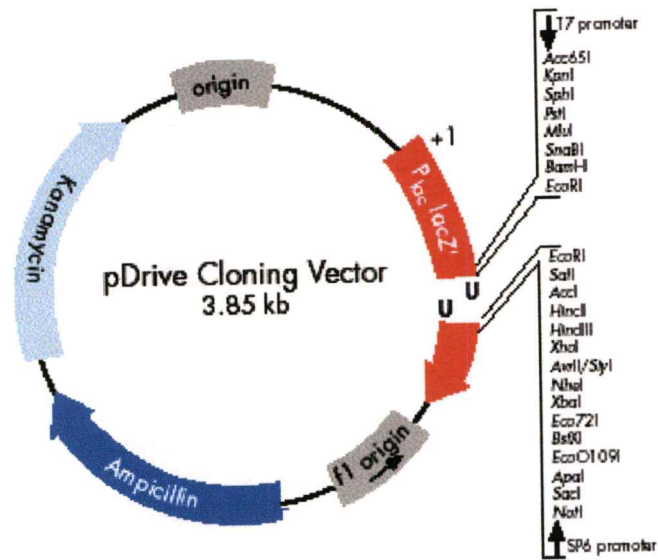
5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Gelatin Salt Agar (GS)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. ยีสต์สกัด	1
2. เปปโตน	4
3. เจลลาติน	15
4. โซเดียมคลอไรด์	30
5. ไข่	15

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

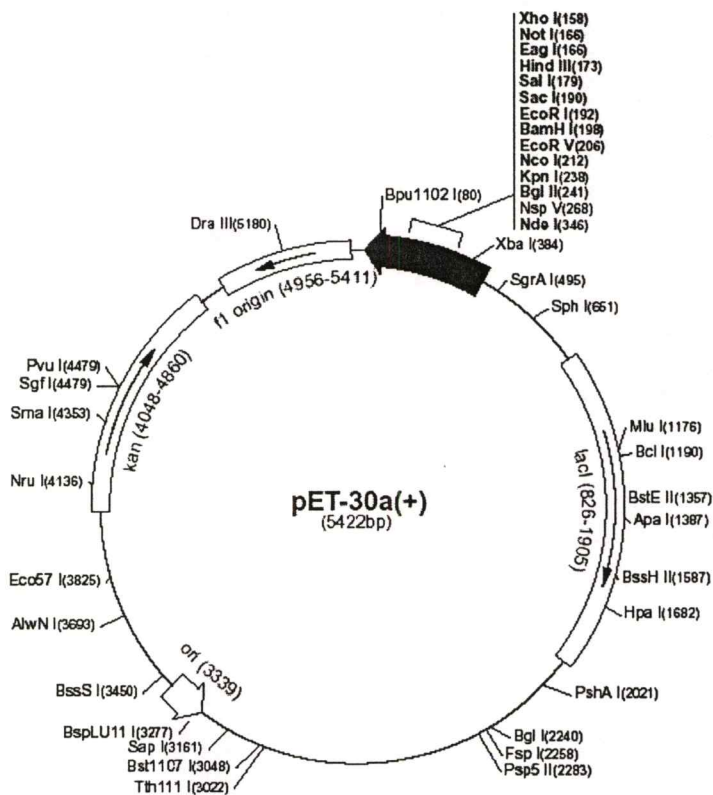
ภาคผนวก ข

1. แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แผนที่ยีนของพลาสมิด pET-30a (Novagen, USA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
กลุ่มที่ 1			
1.	A-001	-	โคโลนีกลม สีส้มซีด ทึบแสง ผิวมันวาว ขอบใส
2.	A-002	-	โคโลนีกลม สีเหลือง โปร่งแสง ผิวมันวาว
3.	A-003	-	โคโลนีกลม ขนาดเล็กมาก สีขาว โปร่งแสง
4.	A-004	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก บริเวณกลางโคโลนีทึบแสง
5.	A-005	-	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง
6.	A-006	-	โคโลนีกลม สีขาว ขอบใส กลางโคโลนีมีวงสีเข้มที่ ทึบแสง
7.	A-007	-	โคโลนีกลม สีครีม โปร่งแสง มีจุดบริเวณกลาง โคโลนี
8.	A-008	-	โคโลนีกลม สีขาวครีม โปร่งแสง
9.	A-009	-	โคโลนีแผ่กระจาย โปร่งแสง ผิวค้ำ
10.	A-010	-	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีม โปร่งแสง
11.	A-011	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก ขอบใส มีวงทึบแสงบริเวณ กลางโคโลนี
12.	A-012	-	โคโลนีกลม สีเหลืองนวล โปร่งแสง
13.	A-013	-	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง
14.	A-014	-	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง
15.	A-015	-	ไม่เป็นโคโลนี กระจายปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ สี ครีม
16.	A-016	-	ไม่เป็นโคโลนี กระจายปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ สีครีม
17.	A-017	-	โคโลนีกลม ใส โปร่งแสง ผิวมันเยิ้ม
18.	A-018	-	โคโลนีกลม ใส โปร่งแสง ผิวมันวาว

ตารางที่ 1 ลักษณะ โคลนีย์ของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอซิดไฮโมเซอร์รีนแลค โคนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะ โคลนีย์
19.	A-019	-	โคโลนีกกลม สีขาว ทึบแสง ขอบใส ผิวมันวาว
20.	A-020	-	โคโลนีกกลม สีไข่มุก โปร่งแสง
21.	A-021	-	โคโลนีกกลม สีครีม ผิวมันวาว
22.	A-022	-	โคโลนีกกลม ขนาดเล็ก สีขาวไข่มุก โปร่งแสง
23.	A-023	-	ไม่เป็นโคโลนีย์ โปร่งแสง
24.	A-024	-	โคโลนีกกลม สีไข่มุก โปร่งแสง
25.	A-025	-	โคโลนีกกลม สีขาวครีม ทึบแสง ขอบใส บางโคโลนีย์ไม่มีรูปร่าง
26.	A-026	-	โคโลนีกกลม สีขาว โปร่งแสง
27.	A-027	-	โคโลนีกกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง
28.	A-028	-	โคโลนีกกลม สีส้ม ขอบใส ผิวมันวาว
กลุ่มที่ 2			
1.	B-001	++	โคโลนีกกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนีย์
2.	B-002	+++	ไม่มีรูปร่าง ใส โปร่งแสง
3.	B-003	+	โคโลนีกกลม สีส้มอ่อน ทึบแสง ขอบขาว ผิวมันวาว
4.	B-004	+	โคโลนีกกลม สีครีม ทึบแสง มีขอบ
5.	B-005	+++	โคโลนีกกลม สีครีม โปร่งแสง เมื่อโตเต็มที่โคโลนีย์ ใส ทึบแสง มีวงบริเวณกลางโคโลนีย์
6.	B-006	+++	โคโลนีกกลม สีครีม ทึบแสง ผิวมันเยิ้ม
7.	B-007	++	โคโลนีกกลมเล็ก สีครีม โปร่งแสง ผิวมันวาว
8.	B-008	+++	โคโลนีกกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวมันวาว
9.	B-009	+++	ไม่มีรูปร่าง สีขาวใส โปร่งแสง
10.	B-010	++	โคโลนีกกลม สีเหลืองนวล โปร่งแสง ผิวมันวาว
11.	B-011	+++	โคโลนีกกลม ขนาดเล็ก สีขาว โปร่งแสง
12.	B-012	+++	โคโลนีกกลม สีขาวครีม ทึบแสง ขอบใส
13.	B-013	+++	โคโลนีกกลม สีขาวขุ่น
14.	B-014	++	โคโลนีกกลม สีขาวครีม โปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโคโคนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
15.	B-015	++	ไม่เป็นโคโลนี สี โปร่งแสง ผิวด้าน
16.	B-016	++	ไม่เป็นโคโลนี สีครีม มีรอยหยักที่ขอบ ผิวมันเยิ้ม
17.	B-017	++	ไม่เป็นโคโลนี สีเหลืองนวล ขอบหยัก
18.	B-018	+	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว โปร่งแสง
19.	B-019	+	โคโลนีกลม สีเหลือง ไข่ไก่ โปร่งแสง ผิวมันวาว
20.	B-020	++	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง
21.	B-021	+	โคโลนีกลมใส ขนาดเล็กมาก มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
22.	B-022	+++	โคโลนีกลม สีขาวครีม ผิวมันวาว
23.	B-023	+++	โคโลนีกลม สี โปร่งแสง มีวงบริเวณกลางโคโลนี
24.	B-024	+++	โคโลนีกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนี โปร่งแสง ขอบไม่เรียบ
25.	B-025	++	โคโลนีกลม สีขาวครีม โปร่งแสง
26.	B-026	+	โคโลนีกลม สีพีช ผิวมันวาว
27.	B-027	+	โคโลนีกลมใหญ่ สีไข่ไก่ ขอบใส ผิวมันเยิ้ม
28.	B-028	+++	โคโลนีกลมใหญ่ สีขาว ขอบใส มีจุดบริเวณกลางโคโลนี ผิวมันเยิ้ม
29.	B-029	++	โคโลนีกลม สีขาว ขอบใส มีจุดที่บริเวณกลางโคโลนี มีเส้นแบ่งโคโลนี ผิวมันเยิ้ม
30.	B-030	+++	โคโลนีกลม สีชมพู ขอบขาว ผิวมันวาว
31.	B-031	+++	โคโลนีกลม สีขาวครีม
32.	B-032	+++	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
33.	B-033	+	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง ขอบใส
34.	B-034	+++	โคโลนีกลม ขนาดเล็กมาก สีขาวไข่ไก่ โปร่งแสง
35.	B-035	++	โคโลนีกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนี โปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะ โคลนีย์ของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอสซิลไฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะ โคลนีย์
36.	B-036	+	โคลนีย์กลม สีขาวครีม ทึบแสง ผิวมันวาว
37.	B-037	+++	โคลนีย์กลม สีขาว ทึบแสง ขอบใส
38.	B-038	++	โคลนีย์กลม สีเหลืองอ่อน ขอบขาว ผิวมันวาว
39.	B-039	+	โคลนีย์กลม สีเหลืองอ่อน ทึบแสง
กลุ่มที่ 3			
1.	C-001	+++++	โคลนีย์กลม สีเหลืองนวล ทึบแสง
2.	C-002	+++++	โคลนีย์กลม สีไขไก่ ทึบแสง
3.	C-003	+++++	โคลนีย์กลม สีครีม ขอบขาว
4.	C-004	+++++	โคลนีย์กลม ทึบแสง ขอบใส
5.	C-005	++++	โคลนีย์มี 2 แบบ คือ 1. กลม 2. ไม่มีรูปร่าง สีครีม โปร่งแสง
6.	C-006	+++++	โคลนีย์กลม สีขาว โปร่งแสง ขอบใส ผิวมันวาว
7.	C-007	++++	โคลนีย์กลม สีไขไก่ ผิวมันวาว
8.	C-008	+++++	โคลนีย์กลม ขนาดเล็ก สีขาวครีม โปร่งแสง
9.	C-009	+++++	โคลนีย์กลม สีแดง ขอบขาว ผิวมันวาว
10.	C-010	++++	โคลนีย์กลม สีเหลืองเข้ม ผิวมันวาว
11.	C-011	+++++	โคลนีย์กลม สีครีมใส มีจุดบริเวณกลาง โคลนีย์
12.	C-012	++++	โคลนีย์กลม ขนาดเล็ก สีขาวไขไก่ โปร่งแสง
13.	C-013	++++	โคลนีย์มี 2 แบบ คือ 1. กลม 2. ไม่มีรูปร่าง มีแฉก ที่ขอบ โคลนีย์ สีใส ผิวมันเยิ้ม
14.	C-014	++++	โคลนีย์มี 2 แบบ คือ 1. กลม สีครีม มีจุดบริเวณ กลาง โคลนีย์ 2. ไม่มีรูปร่าง ซ้อนกันหลายชั้น ด้านนอกใส
15.	C-015	++++	โคลนีย์กลม สีครีม ขอบใส โปร่งแสง

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี **Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)** ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลทางสถิติของปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011

เอนไซม์แลคโตเนส (มิลลิกรัมโปรตีน ต่อมิลลิลิตร)	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0
กิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส (ยูนิต)	813.49 ^a	786.21 ^a	561.08 ^b	430.16 ^c	324.16 ^d	219.34 ^c	196.71 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลทางสถิติของเวลาที่เหมาะสมในการบ่มต่อการย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนที่ผลิตจากไอโซเลท C-011 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคโตเนส

เวลา (นาที)	0	5	10	20	40	60
กิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส (ยูนิต)	788.76 ^a	476.85 ^b	314.80 ^c	155.81 ^d	160.62 ^d	157.47 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสไม่มีความแตกต่างกัน

ประวัติผู้เขียน

นางสาววิภาวี แบบประเสริฐ เกิดเมื่อวันที่ 9 มีนาคม พ.ศ. 2521 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 257/7 หมู่ที่ 3 ซอยสงวนวงศ์ ถนนพระยาเสด็จ ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในปี พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2547