

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแบบที่เรียกน้ำทะเล  
ที่ผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง



นางสาววิริยา ศรีตีมารัตน์  
นางสาวสุพิชชา วัฒนะประเสริฐ  
นางสาวอริศรา เพชรพันธุ์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 58541

วัน,เดือน,ปี 25 ๘ ๒ ๒๕๔๙

ปีการศึกษา 2546

b.....  
i.....

Isolation and Characterization of Quorum Sensing Signal  
Producing Bacteria from Seawater



Miss Wiraya Srisimarat

Miss Supichar Wattanaprasert

Miss Arisara Petpun

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Bachelor of Science  
Department of Applied Biology  
Faculty of Science  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkang

Academic year 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การคัดแยกและการศึกษาคูณลักษณะของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิต  
 สัญญาณควอรัมเซนซิง

นักศึกษา นางสาววิรยา ศรีสิมารัตน์ รหัสประจำตัว 43050194  
 นางสาวสุพิชชา วัฒนะประเสริฐ รหัสประจำตัว 43050204  
 นางสาวอริศรา เพชรพันธุ์ รหัสประจำตัว 43050210

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
 สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
 อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ ผศ.ดวงใจ โอรัชกุล	

.....  
 (รศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิต สัญญาณควอรัมเซนซิง	
นักศึกษา	นางสาววิรยา ศรีสิมารัตน์	รหัสประจำตัว 43050194
	นางสาวสุพิชชา วัฒนประเสริฐ	รหัสประจำตัว 43050204
	นางสาวอริศรา เพชรพันธุ์	รหัสประจำตัว 43050210
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย	

#### บทคัดย่อ

แบคทีเรียสามารถติดต่อสื่อสารระหว่างกันโดยผลิตและส่งสัญญาณโมเลกุลบางชนิด “ควอรัมเซนซิง” เป็นการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ประเภทหนึ่งที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมลบสามารถผลิตและส่งสัญญาณโมเลกุลประเภทเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (AHL) เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่จำเพาะต่อสัญญาณ และในที่สุดจะส่งไปควบคุมจำนวนประชากรซึ่งกลไกทั้งหมดจะตอบสนองเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง ในโครงการพิเศษนี้ได้ทำการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากน้ำทะเลและฟองน้ำตั้งแคระห์จากน้ำบริเวณเกาะขาม จังหวัดชลบุรี พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทจากทั้งหมด 46 ไอโซเลทที่พบการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิง หรือ AHL จากการเกิดปฏิกิริยากับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 และเมื่อวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA พบว่าไอโซเลททั้งสองจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของ *Vibrio* sp. และผลที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางชีวเคมีบนอาหารแข็ง TCBS แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร gelatin salt agar ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 30 กรัม ต่อลิตร แต่ไม่เจริญเติบโตบนอาหาร gelatin salt agar ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 กรัม ต่อลิตร แสดงว่าทั้งสองไอโซเลทจัดเป็นกลุ่มของ *Vibrio* sp. ที่ชอบเค็ม เมื่อนำไอโซเลท 038 มาศึกษาการผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิงหรือ AHL พบว่าการผลิต AHL จะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น และการผลิต AHL จะลดลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase การเติมกลูโคสในอาหารยังกระตุ้นการเพิ่มระดับของสัญญาณ AHL บ่งชี้ว่าสัญญาณควอรัมเซนซิงถูกกระตุ้นตามความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ได้นำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โคลนผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 309 คู่เบสและนำมาวิเคราะห์ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ใช้ในการสร้าง autoinducer หรือ AHL (VanI) ของเชื้อ *Vibrio anguillarum* สูงสุดถึง 74 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Special Project Title</b>	Isolation and Characterization of Quorum Sensing Signal Producing Bacteria from Seawater
<b>Name</b>	Miss Wiraya Srisimarat Miss Supichar Wattanaprasert Miss Arisara Petpun
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Academic year</b>	2003
<b>Special Project Advisor</b>	Dr. Saranya Phunpruch

### ABSTRACT

Bacteria can communicate each other by producing and releasing some signal molecules. "Quorum Sensing" is one type of the cell-to-cell communication in gram-negative bacteria. These bacteria can produce and release acyl-homoserine (AHL) as signal molecules in order to modulate a variety of specific sets of self-regulated gene expression and finally control their own population in response to the high cell density. In this study, two of 46 bacterial strains isolated from seawater and artificial sponges collected at Kham Island, Chonburi province, were found to produce quorum sensing signals or AHL based on the reaction with reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136. They were identified by sequence analysis of 16S ribosomal DNA gene as *Vibrio* sp. and the result was confirmed by biochemical analysis of TCBS agar. They were found to grow on gelatin salt agar with 10 and 30 g/l NaCl but hardly grow on gelatin salt agar without NaCl and with 100 and 200 g/l NaCl, suggesting they are halophilic Vibrios. Isolate 038 was selected to study the quorum sensing signal or AHL production. The AHL production was increased by increasing the cell density and decreased when the cell reached the stationary phase. An increase of AHL level promoted by the addition of glucose in the medium indicated that the quorum sensing signals were activated according to the higher cell density. In addition, the fragment of *luxI* homologous gene encoding acyl-homoserine lactone synthase was amplified by PCR reaction. The 309 bp of PCR product was cloned and characterized. It was shown by an amino acid alignment that it has the highest similarity (74%) to autoinducer synthesis protein (VanI) of *Vibrio anguillarum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับโอกาสและคำแนะนำ  
แนวทางการทำวิจัยจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย คณะกรรมการ  
โครงการพิเศษ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ และผศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่ได้ให้ความรู้และประสบการณ์  
ที่เป็นประโยชน์มาโดยตลอด ด้วยเหตุนี้จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างยิ่ง สำหรับกำลังใจ  
ที่มอบให้เสมอมา นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน พี่วิภาวี แบบประเสริฐ  
และพี่ชมภรณ์ ธงเพ็ง ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่  
มีส่วนร่วมในทุกด้านทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี

วิริยา ศรีติมารัตน์  
สุพิชชา วัฒนประเสริฐ  
อริศรา เพชรพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	4
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 การสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย	6
2.2 การสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง	6
2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง	8
2.3.1 ยีนในกลุ่ม <i>luxI</i>	8
2.3.2 ยีนในกลุ่ม <i>luxR</i>	10
2.4 สังคมในทะเล (marine community)	10
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย	12
2.5.1 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	12
2.5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ	13
2.5.3 ตัวพาหะในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	15
2.5.4 การทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation)	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์	17
3.2 พลาสมิด	17
3.3 อุปกรณ์	17
3.4 สารเคมี	18
3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะและเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการพิเศษ	19
3.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker)	19
3.7 วิธีการทดลอง	20
3.7.1 การเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล ทราบ สัตว์ทะเล และคัดแยกแบคทีเรีย	20
3.7.2 การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิต สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน	20
3.7.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดสอบ สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน	20
3.7.2.2 การเตรียมเชื้อ Reporter strain Agrobacterium tumefaciens สายพันธุ์ A136	20
3.7.2.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส	21
3.7.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	22
3.7.3.1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี	22
3.7.3.1.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย โดยการย้อมแกรม	22
3.7.3.1.2 การทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar)	22
3.7.3.1.3 การทดสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย	22
3.7.3.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rDNA	23
3.7.3.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	23
3.7.3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วย เทคนิคอะลาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3.2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR	24
3.7.3.2.4 การตกตะกอนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR	25
3.7.3.2.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ บริเวณ 16S rDNA	26
3.7.4 การศึกษาการผลิตสัญญาณ AHL ระหว่างการเจริญ	26
3.7.5 ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสาร AHL และการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	26
3.7.6 การศึกษายีน <i>luxI</i> ที่เกี่ยวข้องกับ การผลิตสาร AHL	27
3.7.6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>luxI</i> โดยเทคนิค PCR	27
3.7.6.2 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> ให้บริสุทธิ์	28
3.7.6.3 การเตรียม competent cell ของ E.coli DH5 $\alpha$	28
3.7.6.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)	29
3.7.6.5 การทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation)	29
3.7.6.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ความร้อน	30
3.7.6.7 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	30
3.7.6.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i> จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	31
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล</b>	
4.1 การเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล ทราบยีสต์ และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย	32
4.2 การคัดเลือกและการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร AHL	33
4.3 การศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม	34
4.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	35
4.4.1 ผลจากการสกัดแยกจีโนมดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	35
4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16 S rDNA โดยเทคนิค PCR	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA	37
4.5 การทดสอบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีวเคมี	38
4.5.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS	38
4.5.2 การทดสอบผลของเกลือ โซเดียมคลอไรด์	39
ต่อการเจริญของแบคทีเรีย	
4.6 การศึกษาการผลิตสัญญาณ AHL ระหว่างการเจริญเติบโต	40
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสาร AHL	41
และการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	
4.8 การศึกษา ยีน <i>luxI</i> ที่ถอดและแปลรหัสเป็น	43
เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส	
4.8.1 การเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอของยีน <i>luxI</i> โดยเทคนิค PCR	43
4.8.2 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ของบริเวณยีน <i>luxI</i> ให้บริสุทธิ์	44
4.8.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)	45
4.8.4 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation)	45
4.8.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pVASa	46
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	
4.8.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ <i>luxI</i>	47
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก 1	56
ภาคผนวก 2	57
ภาคผนวก 3	58
ภาคผนวก 4	59
ภาคผนวก 5	60
ภาคผนวก 6	61
ภาคผนวก 7	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน	11
ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA	25
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน <i>luxI</i>	27
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation	29
ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิดที่เอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>	31
ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างในบริเวณต่างๆ ของเกาะขาม	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	รูปแบบทั่วไปของระบบการสื่อสารแบบควอรัมเซนซิง	7
รูปที่ 2.2	ตัวอย่างของสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน	9
รูปที่ 2.3	การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ	14
รูปที่ 2.4	การทรานสฟอร์มเมชัน	16
รูปที่ 4.1	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของ ไอโซเลท 021 (■) ไอโซเลท 038 (▲) และไอโซเลทอื่นๆ (●)	34
รูปที่ 4.2	ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย	35
รูปที่ 4.3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ 16 S rDNA	36
รูปที่ 4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA	37
รูปที่ 4.5	การทดสอบแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Vibrio</i> sp. บนอาหารแข็ง TCBS	39
รูปที่ 4.6	การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 บนอาหารแข็ง GSA	40
รูปที่ 4.7	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (●) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (▲) ของไอโซเลท 038	41
รูปที่ 4.8	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ก) และกิจกรรม ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของไอโซเลท 038 เมื่อมีการ เติมกลูโคส (▲) และไม่เติมกลูโคส (●)	42
รูปที่ 4.9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนดีเอ็นเอบริเวณ <i>luxI</i>	44
รูปที่ 4.10	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	45
รูปที่ 4.11	พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม	46
รูปที่ 4.12	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	47
รูปที่ 4.13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ <i>luxI</i> จาก พลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa โดยใช้ไพรเมอร์ T7	48

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

การสื่อสารเป็นคุณลักษณะอย่างหนึ่งที่พบในสิ่งมีชีวิต โดยอาจจะใช้การส่งเสียง การแสดงลักษณะท่าทางต่างๆ และอื่นๆ ในการทำให้เกิดความเข้าใจระหว่างกันและกัน ซึ่งวิธีการที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น มนุษย์สามารถสื่อสารกันได้โดยใช้ภาษาและท่าทาง สัตว์ก็อาจสื่อสารกันได้โดยใช้สัญญาณที่อยู่ในรูปของเสียง ท่าทาง หรือสารเคมีต่างๆ และแม้กระทั่งสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก เช่นแบคทีเรียที่ยังไม่มีการพัฒนาเซลล์เป็นอวัยวะได้เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ก็ยังสามารถติดต่อสื่อสารระหว่างกันและอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มชุมชนได้ โดยแบคทีเรียจำนวนมากจะใช้สารเคมีเป็นสัญญาณในการติดต่อระหว่างกันและกัน และร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง (Parsek and Greenberg, 2000) ดังนั้น การสื่อสารระหว่างเซลล์จึงเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งในระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ และยังพบว่าแบคทีเรียมีการตอบสนองต่อสัญญาณภายนอกที่มาจากเซลล์ข้างเคียง ซึ่งเซลล์นั้นอาจเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ก็ได้ แบคทีเรียแกรมบวกจะสร้างเปปไทด์ขนาดเล็กเป็นตัวส่งสัญญาณ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีการใช้สารเคมีโมเลกุลเล็กเป็นสัญญาณ โดยระบบสัญญาณและการสื่อสารที่มีการศึกษากันมากที่สุด ในแบคทีเรียแกรมลบ คือการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง (Quorum sensing)

ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) เป็นการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งของแบคทีเรียแกรมลบ โดยการส่งสัญญาณประเภทนี้มีกลไกการตอบสนองต่อเซลล์เฉพาะเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง (Fuqua et al., 1994; 1996; Salmond et al., 1995) นั่นคือ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ถึงระดับความหนาแน่นหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นการสร้างและส่งสัญญาณโมเลกุลซึ่งก็คือ สารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตน หรือ acyl-HSL ออกมา ทำให้แบคทีเรียสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนบางชนิด และส่งผลให้สามารถควบคุมความหนาแน่นประชากรของตัวเองได้ เพื่อให้สามารถลดประชากรลงในสภาวะอาหารที่จำกัด เราอาจเรียก acyl-HSL ว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer) ได้ ในกรณีที่สารนี้ถูกสร้างมาเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งตัวของแบคทีเรียเอง นอกจากนี้สัญญาณดังกล่าวอาจแพร่ผ่านผนัง

เซลล์ออกไปยังเซลล์อื่นๆ โดยทำหน้าที่เทียบเท่ากับฮอร์โมน (hormone) หรือฟีโรโมน (pheromone) ได้ สัญญาณ acyl-HSL ถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอ-รีนแลคโตซินเทส (acy-HSL synthase) โดยใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน และ acyl-acyl carrier protein ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น (Schaefer et al., 1996; Parsek et al., 1999; Morè et al., 1996; Hanzelka et al., 1999; Hoang et al., 1999)

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอ-รีนแลคโตซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ทำให้ acyl-HSL ที่ผลิตออกมามีความแตกต่างกัน โดยมีความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl-side chain) ที่ไม่เท่ากัน (จำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน) หรือมีการแทนที่ของสายโซ่ข้าง (side chain) ที่แตกต่างกันทำให้ได้สัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะขึ้น สายโซ่เอซิลของสัญญาณสามารถอยู่ในรูปอิมิตัว และสามารถมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และสายโซ่เอซิลสามารถมีความยาวได้ 4-16 คาร์บอนอะตอม (Faqua et al., 1996) สัญญาณที่มีขนาดเล็ก เช่น C<sub>4</sub>-HSL สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ ในขณะที่ 3OC<sub>12</sub>-HSL สามารถแพร่ผ่านได้เช่นเดียวกันแต่ในอัตราที่ช้ากว่า (Kaplan and Greenberg, 1985; Pearson et al., 1999)

เมื่อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งมีการสร้างสัญญาณ acyl-HSL ขึ้น หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ (receptor) จำเพาะของสัญญาณ acyl-HSL ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มของ LuxR จะจับกับสารนั้นและทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) โปรตีนในกลุ่ม LuxR ประกอบด้วย 2 โดเมน (domain) ได้แก่ ด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (C-terminal DNA-binding domain) สำหรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย และด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับ acyl-HSL (N-terminal acyl-HSL-binding domain) (Stevens and Greenberg, 1998) เมื่อ LuxR จับกับสารสัญญาณแล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายทำให้มองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้

การศึกษากลไกการสื่อสารและการส่งสัญญาณออกมาเพื่อควบคุมประชากรของตัวเองหรือที่เรียกว่าควอรัมเซนซิง มีประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านเกษตรกรรมและอื่นๆ เนื่องจากควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมความรุนแรงและการเจริญของเชื้อโรคในคนหรือพาโทเจนในพืช โดยพบว่า acyl-HSL มักพบในแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ร่วมกับผู้ให้อาศัย (host) ที่เป็นพืชและสัตว์ หรืออาจกล่าวได้ว่า ควอรัมเซนซิงนั้นเกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) มีรายงานว่าสัญญาณ acyl-HSL มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคพืชที่เกิดจาก *Erwinia carotovora* (Pirhonen et al., 1993) และความรุนแรงของโรคที่เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาก *Pseudomonas aeruginosa* ในตัวอย่างหนูที่มีการติดเชื้อที่ปอด (Tang et al., 1996) ในแผลอักเสบ (Rumbaugh et al., 1999) ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Tan et al., 1999a; 1999b; Mahajan-Miklos et al., 1999) และในพืช (Rahme et al., 1995) จะเห็นได้ว่า สัญญาณควอรัมเซนซิงพบโดยทั่วไปในความสัมพันธ์ของแบคทีเรียหลายชนิดที่แตกต่างกันขึ้นกับผู้ให้อาศัยที่เป็นยูคาริโอต (eukaryote) ยกตัวอย่างเช่น เมื่อแบคทีเรีย เช่น *P. aeruginosa* เข้าไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายแบคทีเรียจะเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อนั้น แต่ละเซลล์เดี่ยวที่ติดกับผิวสัมผัสจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) (Costerton et al., 1995; Costerton et al., 1999) เมื่อมีการเจริญสะสมมากขึ้น ทำให้ยาปฏิชีวนะต่างๆ ไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง มีรายงานวิจัยพบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สาร acyl-HSL นั้น เซลล์ของแบคทีเรียจะไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ (Davies et al., 1998) นั่นคือในสายพันธุ์กลายจะมีการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่จะไม่มีการพัฒนาต่อไปเป็นไบโอฟิล์มที่มีลักษณะสมบูรณ์ได้ ทำให้ไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นมีลักษณะแบน และเชื้อโรคสามารถถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL สามารถควบคุมลักษณะความรุนแรงของโรคได้ และสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลนี้จะแสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง (Pirhonen et al., 1993) ดังนั้น การเข้าใจถึงกลไกดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรควิธีใหม่ และการผลิตยาต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งไม่ฆ่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยตรง แต่เพียงรบกวนความสามารถในการก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL หรือยีนที่เกี่ยวข้องอาจนำไปสู่การควบคุมประชากร และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

สำหรับการศึกษเกี่ยวกับควอรัมเซนซิงในประเทศไทยนั้น ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยในโครงการพิเศษนี้ต้องการที่จะคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า *Vibrio fischeri* และ *Vibrio harveyi* ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลนั้น เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างและตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ จากน้ำทะเลที่มีการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง เพื่อนำมาศึกษาระบบและกลไกการผลิตควอรัมเซนซิง และนำมาศึกษาให้เข้าใจถึงคุณลักษณะต่างๆ ของเชื้อ เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และด้านอื่นๆ ต่อไปได้อีกในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. คัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง
2. ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. ศึกษาขึ้นและการผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียที่แยกได้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วทดสอบการมีสัญญาณควอรัมเซนซิงกับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 จากนั้นนำมาศึกษาคุณลักษณะของเชื้อจากการทดสอบทางชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อนำมาศึกษากลไกการผลิตควอรัมเซนซิงต่อไป

## 1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1. ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณที่ต้องการศึกษา
2. นำตัวอย่างน้ำทะเลที่ได้มา spread plate เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง Marine agar
3. ทดสอบการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิง โดยทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* A136 เป็น reporter strain ซึ่งผลที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบกับ ONPG แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถมีการสื่อสารชนิดควอรัมเซนซิงนั้น จะผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสออกมาอย่าง ONPG ทำให้สังเกตเห็นเป็นสีเหลืองเกิดขึ้น
4. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ
  - 4.1 ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ เช่น ความสามารถในการทนเค็มของเชื้อ และการติดสีแกรม
  - 4.2 ศึกษาชนิดของเชื้อจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยการสกัดจีโนมดีเอ็นเอ แล้วมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณยีน 16S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทำการศึกษาการสร้างสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถสร้างและตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณของเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ซึ่งเซลล์สร้างขึ้นเพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer)
6. ศึกษา ยีน *luxI* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณยีน *luxI*

### 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตควอรัมเซนซิงได้ เพื่อนำมาศึกษากลไกการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

เมื่อก้าวถึงการสื่อสาร (communication) เราทุกคนคงจะนึกถึงการพูดการเขียน โดยอาศัยภาษาเป็นสื่อ อันจะนำไปสู่ความเข้าใจระหว่างกันและกัน มนุษย์สามารถสื่อสารระหว่างกันได้โดยอาศัยภาษาและท่าทางเป็นสื่อ ผ่านระบบกลไกจากสมองทำให้สามารถพัฒนาการสื่อสารออกมาในรูปแบบของเสียง สัตว์ก็เช่นเดียวกันสามารถติดต่อสื่อสารและเข้าใจระหว่างกันได้โดยอาศัยสัญญาณเสียง ท่าทางหรืออาจเป็นฟีโรโมน (Pheromone) แต่เมื่อก้าวถึงแบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ยังไม่มีการพัฒนาเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะเหมือนสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเราอาจไม่คิดว่าเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้สามารถติดต่อสื่อสารระหว่างกันและกันได้ อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มชุมชน (Community) โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีเป็นตัวสัญญาณติดต่อระหว่างกันและกันและร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียสามารถตอบสนองต่อสัญญาณภายนอก (external signal) จากเซลล์ข้างเคียงไม่ว่าเซลล์นั้นจะเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ก็ได้

#### 2.1 การสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียสามารถสื่อสารกันระหว่างเซลล์โดยใช้สารเคมีเป็นตัวสัญญาณติดต่อระหว่างกัน ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบจะใช้สารเคมีโมเลกุลเล็กเป็นตัวสัญญาณ เช่น สารประเภทเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน (N-acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) (Bassler, 1999; Greenberg, 2000; Fuqua et al., 1996) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะสร้างเปปไทด์ขนาดเล็กเป็นตัวส่งสัญญาณ (Kleerebezem et al., 1997; Lazazzera and Grossman, 1998; Shapiro, 1998)

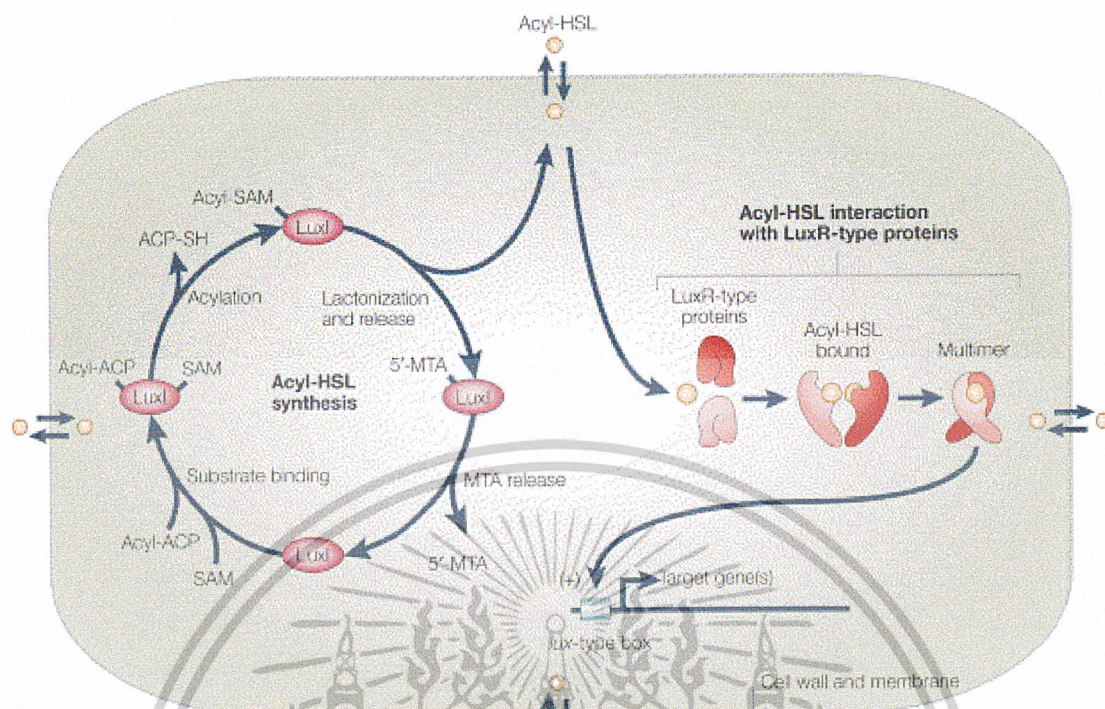
#### 2.2 การสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง

การสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) เป็นการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งของแบคทีเรียแกรมลบ โดยการส่งสัญญาณประเภทนี้มีกลไกการตอบสนองต่อเซลล์เฉพาะเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง (Fuqua et al., 1994; 1996; Salmond et al., 1995)

นั่นคือ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ถึงระดับความหนาแน่นหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นการสร้างและส่งสัญญาณ โมเลกุลซึ่งก็คือ สารเอซิลโฮโมเซอริน-แลคโตน หรือ acyl-HSL ออกมา ทำให้แบคทีเรียสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนบางชนิดและส่งผลให้สามารถควบคุมความหนาแน่นประชากรของตัวเองได้ เพื่อให้สามารถลดประชากรลง ในสถานะอาหารที่จำกัด เราอาจเรียก acyl-HSL ว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer) ได้ ในกรณีที่สารนี้ถูกสร้างมาเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งตัวของแบคทีเรียเอง นอกจากนี้สัญญาณดังกล่าว อาจแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปยังเซลล์อื่นๆ โดยทำหน้าที่เทียบเท่ากับฮอร์โมน (hormone) หรือฟีโรโมน (pheromone) ได้ สัญญาณ acyl-HSL ถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (acy-HSL synthase) โดยใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน และ acyl-acyl carrier protein ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น (รูปที่ 2.1) (Schaefer et al., 1996; Parsek et al., 1999; Morè et al., 1996; Hanzelka et al., 1999; Hoang et al., 1999)

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ซึ่งความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ในแบคทีเรียต่างชนิดนี้เองทำให้ acyl-HSL ที่ผลิตออกมามีโครงสร้างที่แตกต่างกัน acyl-HSL ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ C<sub>4</sub>-HSL สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ ในขณะที่ 3OC<sub>12</sub>-HSL สามารถแพร่ผ่านได้เช่นเดียวกันแต่ในอัตราที่ช้ากว่า (Kaplan and Greenberg, 1985; Pearson et al., 1999)

เมื่อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งมีการสร้างสัญญาณ acyl-HSL ขึ้นมา หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ (receptor) จำเพาะของสัญญาณ acyl-HSL ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มของ LuxR จะจับกับสารนั้นและทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ของยีนเป้าหมาย (รูปที่ 2.1) ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้



รูปที่ 2.1 รูปแบบทั่วไปของระบบการสื่อสารแบบควอรัมเซนซิง

(ACP, acyl carrier protein; MTA, methylthioadenosine; SAM, S-adenosylmethionine; HSL, homoserine lactone; AHL, N-acyl-homoserine lactone)

ที่มา: Fuqua and Greenberg, 2002.

## 2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง

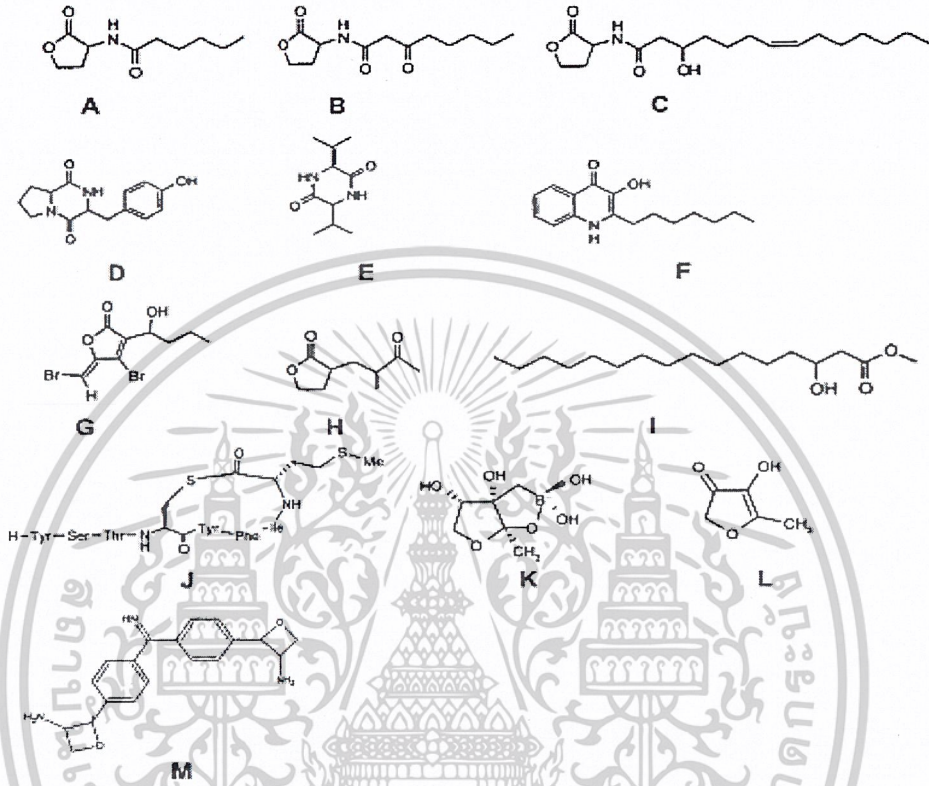
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบนั้นประกอบด้วยยีน 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ ยีนในกลุ่ม *luxI* และยีนในกลุ่ม *luxR*

### 2.3.1 ยีนในกลุ่ม *luxI*

*luxI* เป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตซินเทส โดยยีน *luxI* ที่แตกต่างกันจะทำให้มีการสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตซินที่แตกต่างกัน และมีความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl-side chain) ที่ไม่เท่ากัน (จำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน) หรือมีการแทนที่ของสายโซ่ข้าง (side chain) ที่แตกต่างกันทำให้ได้สัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะขึ้น สายโซ่เอซิลของสัญญาณสามารถอยู่ในรูปอิมิตัว และสามารถมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และสายโซ่เอซิลสามารถมีความยาวได้ 4-16 คาร์บอนอะตอม (รูปที่ 2.2) (Faqua et al., 1996)



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างของสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน

(A-C) ตัวอย่าง AHL ของจุลินทรีย์ซึ่งไม่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (A) *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone หรือ  $C_6$ -HSL (B) *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone หรือ  $3O_8$ -HSL (C) *N*-(3R-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl)-L-homoserine lactone หรือ  $3OH_{C_{14:1}}$ -HSL (D, E) Microbial diketopiperazines: (D) cyclo(L-Pro-L-Tyr) (E) cyclo( $\Delta$ Ala-L-Val) (F) 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolone หรือ PQS ผลิตโดย *P. aeruginosa* (G) 4-Bromo-5-(bromomethylene)-3-(1'-hydroxybutyl)-2(5H)-furanone ของ *D. pulchra* (H)  $\gamma$ -butyrolactone ผลิตโดย *X. campestris* (I) 3-Hydroxypalmitic acid methyl ester ของ *R. solanacearum* (J) Group IV cyclic thiolactone จาก *S. aureus* (K) โครงสร้างสมมติสำหรับ *Vibrio harveyi* AI-2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารประกอบนี้ และ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)furanone หรือ MHF (L) สามารถเปลี่ยนแปลงซึ่งกันและกันได้ (M) bradyoxetin, a four-membered oxetane ring จาก *B. japonicum*

ที่มา: Daniel et al., 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.2 ยีนในกลุ่ม *luxR*

*luxR* เป็นยีนของตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม *LuxR* ประกอบด้วย 2 โดเมน (domain) ได้แก่ ด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับ ดีเอ็นเอ (C-terminal DNA-binding domain) สำหรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย และด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับ acyl-HSL (N-terminal acyl-HSL-binding domain) (Stevens and Greenberg, 1998) เมื่อ *LuxR* จับกับสารสัญญาณแล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายทำให้มองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้

### 2.4 สังคมในทะเล (marine community) (นิตยา, 2456)

การศึกษาระบบนิเวศในทะเลมีขอบเขตกว้างมาก เนื่องจากส่วนที่เป็นทะเลมีอาณาเขตกว้างขวางถึงประมาณร้อยละ 71 ของพื้นที่ผิวโลกหรือประมาณ 361 ล้านตารางกิโลเมตร และยังมีควมลึกมากเมื่อเทียบกับแหล่งน้ำจืดทั่วไป คือ มีความลึกถึง 3,750 เมตร ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเฉพาะสมุทรศาสตร์ (Oceanography) และนิเวศวิทยาทางทะเล (Marine Ecology)

แม้จะไม่ใช่เป็นที่ทราบแน่นอนว่า น้ำทะเลเริ่มแรกสุดมาจากไหน แต่เชื่อกันว่าคงเกิดจากการควบแน่นของไอน้ำที่เกิดจากการระเบิดของภูเขาไฟในโลกยุคแรกๆ และความเค็มของน้ำทะเลเกิดจากการละลายของแร่ธาตุต่างๆ บนเปลือกโลก ไม่มีใครทราบว่า ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในทะเลได้มีการเปลี่ยนแปลงไปมากน้อยเท่าใดตั้งแต่เริ่มเกิดทะเลมา แต่เชื่อกันว่าคงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักตั้งแต่เริ่มมีสิ่งมีชีวิตขึ้นในโลก สำหรับปัจจุบันปริมาณแร่ธาตุและสารประกอบต่างๆ ในน้ำทะเล ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.1 ซึ่งแยกเป็นไอออนบวกและไอออนลบ ไอออนบวกที่สำคัญที่สุดคือ โซเดียม และรองลงมา คือ แมกนีเซียม ส่วนไอออนลบที่สำคัญมากที่สุดคือ คลอไรด์ และรองลงมา คือ ซัลเฟต

ความเค็มของน้ำทะเลในมหาสมุทรส่วนใหญ่มีค่าระหว่าง 34-36 ส่วนในพันส่วน และมีความผันแปรตามฤดูกาลบ้าง เนื่องจากการระเหยของน้ำ การจับแข็ง การเพิ่มปริมาณน้ำจืด และเกลือแร่จากแผ่นดิน

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน

องค์ประกอบสารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำทะเล)
โซเดียม	10.770
แมกนีเซียม	1.300
แคลเซียม	0.412
โพแทสเซียม	0.399
สตรอนเตียม	0.008
คลอไรด์	19.340
ซัลเฟต	2.710
โบรไมด์	0.067
คาร์บอน (ในสภาพของไบคาร์บอเนต)	0.023 ที่ pH 8.4
คาร์บอเนต และคาร์บอนไดออกไซด์	0.027 ที่ pH 7.8

สัตว์ที่พบอาศัยในทะเลเปิดมักไม่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มมาก ๆ จึงจัดได้ว่าเป็นสแตโนฮาลีน (Stenohaline) ในขณะที่สัตว์บางชนิดที่พบตามปากแม่น้ำหรือชายฝั่งสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ช่วงกว้างกว่า เรียกว่า ยูริฮาลีน (Euryhaline) สัตว์ที่สามารถรักษาความดันออสโมซิสให้อยู่ในสมดุลกับน้ำทะเลในขณะที่ความเค็มเปลี่ยนไปนี้ เรียกว่า Poikilosmotic เช่น ไข่เดือนทะเล หรือโพลีคิทพวก *Arenicola marina* และแม่เพรียง ซึ่งมีความดันออสโมซิสของของเหลวในตัวเปลี่ยนแปลงเป็นอัตราส่วนกับน้ำทะเลภายนอก แต่มีสัตว์ทะเลบางพวกที่สามารถรักษาความดันออสโมซิสของของเหลวในร่างกายให้ค่อนข้างคงที่ในขณะที่ความเค็มของน้ำทะเลภายนอกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ปูใบ (*Carcinus maenas*) จัดเป็นพวกที่มีความดันออสโมซิสคงที่ (Homoiosmotic) ส่วนพวกปลาทะเลจะมีการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของของเหลวในร่างกายต่ำกว่าน้ำทะเลภายนอก การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำทะเลนอกจากมีอิทธิพลในทางสรีรวิทยาต่อสัตว์ดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มมีผลต่อความถ่วงจำเพาะของน้ำทะเล และการลอยตัวของสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วย

## 2.5 เทคนิคที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

### 2.5.1 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (พรงาม, 2541)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่กำลังวิเคราะห์ หลักการของอิเล็กโตรโฟรีซิส คือการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่างโดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าก็就会被แรงคลื่นไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และพอลิอะคริลามิด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายของดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไป ควรใช้อะกาโรสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้แยกกรดนิวคลีอิกที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโลดาลตัน สำหรับพอลิอะคริลามิด์เจลจะใช้สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ (horizontal gel electrophoresis) ในขณะที่พอลิอะคริลามิด์เจลจะต้องทำในแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะเวลาการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ คือ ขนาด รูปร่างดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของเจลที่ใช้ กล่าวคือ ถ้าชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านตัวกลางหรือเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก เป็นผลทำให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกล ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงเกลียว (supercoiled DNA) มักจะเคลื่อนผ่านเจลได้ดีกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอื่นๆ รองลงมาคือ ดีเอ็นเอคลายเป็นเส้น และดีเอ็นเอคลายเป็นวง เจลที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีช่องว่างภายในเนื้อเจลดน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หลังจากที่แยกดีเอ็นเอออกมาเป็นแถบบนอะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิคของอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โครงสร้างของเอทิลเดียมโบรไมด์เป็นอะโรมาติกแคทไอออน ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกันแล้วจะให้ฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต การย้อมเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ สำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามารถให้ฟลูออเรสเซนต์เมื่อย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์เช่นกัน แต่จะมีความไวน้อยกว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ นอกจากนี้ยังมีสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เช่น อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) หรือ โพรฟลาวิน (proflavin) และในปัจจุบันได้มีการใช้สีย้อมที่มีความเป็นอันตรายน้อยกว่าสีย้อมในอดีต ได้แก่ เจลสตาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (วัตินาลัย และสรวง, 2536)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5' กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3' ปฏิบัติการการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไลเกส (ligase) เป็นตัวเร่ง และพบว่ามียาจัยสำคัญ 2 ประการ ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ  $i$  และ  $j$

$i$  คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอทั้งหมด โดยหมายความถึงทั้งปลาย 5' และปลาย 3' ของดีเอ็นเอทุกโมเลกุลในปฏิกิริยา

$j$  คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอปลายหนึ่งๆ (5' หรือ 3') เฉพาะที่อยู่ใกล้กับปลายตรงข้าม (3' หรือ 5') ของโมเลกุลเดียวกัน ค่า  $j$  จึงเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอ โมเลกุลดีเอ็นเอยาวมากขึ้นเท่าใด ก็ทำให้ปลายทั้งสองมีโอกาสเข้าใกล้กันน้อยลงเท่านั้น นอกจากนี้ค่า  $j$  ยังเป็นค่าคงที่เฉพาะสำหรับโมเลกุลหนึ่งๆ และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยานั้น

โดยทฤษฎีแล้ว สามารถใช้ค่า  $i$  และ  $j$  เข้าช่วยในการคาดคะเนถึงผลที่ควรจะได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกิริยา กล่าวคือ

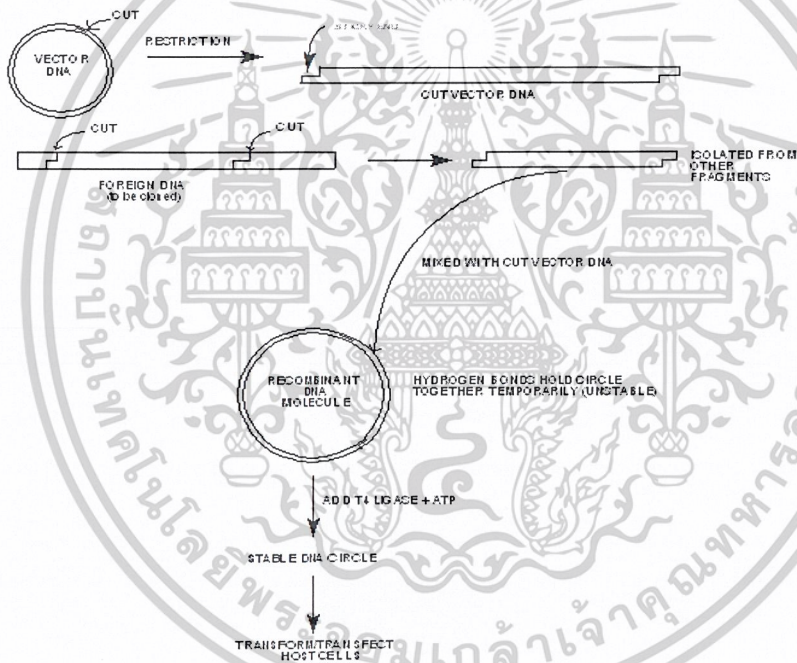
เมื่อ  $i=j$  ( $j/i=1$ ) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองเป็นโมเลกุลวงกลมมีสูงเท่าๆ กับโอกาสที่จะมีโมเลกุลดีเอ็นเอทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมกันเป็นสายตรง

เมื่อ  $i>j$  ( $j/i<1$ ) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองมีมากกว่า

เมื่อ  $i<j$  ( $j/i>1$ ) เป็นภาวะซึ่งโอกาสที่ปลายของโมเลกุลทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมต่อเป็นเส้นตรงมีมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย จะต้องคำนึงถึงค่า  $i$  และ  $j$  ของทั้งเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทั่วไปค่า  $i$  ต้องสูงกว่าค่า  $j$  ราว 2 หรือ 3 เท่า และความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายต้องมากกว่าความเข้มข้นของเวกเตอร์ประมาณ 2 เท่า จึงจะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมที่คาดหวังไว้ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติ การคำนวณค่า  $i$  และ  $j$  ไม่ใช่เรื่องง่ายเสมอไป เพราะบ่อยครั้งที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีอยู่น้อยเกินกว่าจะวัดปริมาณได้แน่นอน นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่า ในการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อมาเชื่อมต่อ อาจทำให้ปลายบางปลายของดีเอ็นเอนั้นชำรุดไม่สมบูรณ์พอที่จะเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 2.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

ที่มา: <http://bio.kaist.ac.kr/~mbtlab/ligation.gif>

ฉะนั้นสำหรับการเชื่อมต่อต่างๆ ไป จึงมักจะเนให้ความเข้มข้นของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมีอัตราส่วนน้อยกว่า หรือเท่ากับ 1 หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ ใช้เวกเตอร์ในปริมาณเท่ากับหรือน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.3 ตัวพาหะในการพาดิเอ็นเอทีสนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (สุรินทร์, 2545)

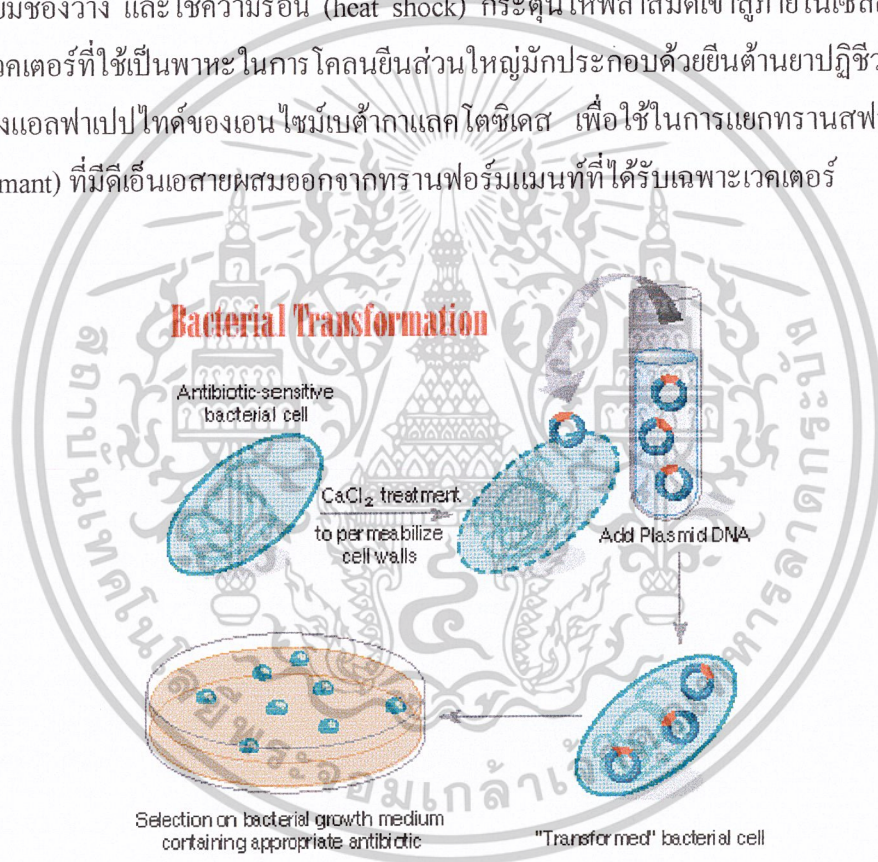
ดิเอ็นเอพาหะ (vector) ที่ใช้ในงานพันธุวิศวกรรมต้องมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนได้เองในเซลล์เจ้าบ้านโดยไม่ขึ้นกับเซลล์เจ้าบ้าน ตัวพาหะเหล่านี้ ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และคอสมิด (cosmid) การเลือกใช้ตัวพาหะชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของนิวคลีโอไทด์ในดิเอ็นเอทีสนใจ กล่าวคือถ้าดิเอ็นเอทีสนใจมีขนาดประมาณ 5, 22 และ 40 กิโลเบส จะนิยมใช้พลาสมิด ฟาจ และคอสมิดเป็นตัวพาหะดิเอ็นเอทีสนใจตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของดิเอ็นเอทีสนใจเมื่อทำการเชื่อมต่อดิเอ็นเอทีสนใจกับตัวพาหะที่ใช้

พลาสมิดเป็นดิเอ็นเอทีอยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ พันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoil) มีขนาดตั้งแต่ 1 พันคู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบสหรือประมาณ 0.2-4 เมกะเบสของโครโมโซม พลาสมิดจะมียีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ อย่างไรก็ตาม พลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่าในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียหนึ่งๆ โดยธรรมชาติ การถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่พลาสมิดนั้น จะเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่คล้ายกับการคอนจูเกชัน (conjugation) นั่นเอง พลาสมิดบางชนิดมีความสามารถในการส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้เรียกว่า conjugative หรือ self transmissible plasmid เนื่องจากในพลาสมิดมียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายขึ้นพลาสมิดนั้น คือ ยีน *tra* (transfer) อยู่ พลาสมิดบางชนิดไม่มียีน *tra* อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่ง ทำให้ไม่สามารถส่งพลาสมิดจากเซลล์เดิมไปสู่เซลล์ใหม่ได้ จัดเป็น non conjugative plasmid คือ ขาดคุณสมบัติการเป็น self transmissible พลาสมิดกลุ่มหลังนี้จะส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่ โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอาดิเอ็นเอทีจากภายนอกเข้าไปได้โดยกระบวนการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) การเลือกพลาสมิดให้เหมาะสมกับดิเอ็นเอทีสนใจ ควรจะคำนึงถึงหลัก 2 ประการดังนี้

- 1) พลาสมิดสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดดิเอ็นเอทีสนใจ จึงสามารถสร้างเป็นดิเอ็นเอทีผสมได้
- 2) พิจารณาคุณสมบัติในการดีออกของพลาสมิด โดยเฉพาะยีนที่แสดงคุณสมบัตินี้ สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดดิเอ็นเอทีสนใจ

## 2.5.4 การทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation)

การทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรองรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ เป็นต้น การเตรียม competent cell อาจมีวิธีการแตกต่างกันได้ แต่สำหรับการทรานส์ฟอร์มเมชัน competent cell ด้วยพลาสมิดนั้น จะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ ใช้แคลเซียมคลอไรด์มาทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียมีช่องว่าง และใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรียสำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ และยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานส์ฟอร์มเมนต์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานส์ฟอร์มเมนต์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์



รูปที่ 2.4 การทรานส์ฟอร์มเมชัน

ที่มา: <http://www.accessexcellence.org/AB/WYW/cohen/transformation.gif>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 *E. coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)

#### 3.2 พลาสมิด

- 3.2.1 pDrive Cloning Vector (Qiagen, Germany)

#### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น autoclave-325 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortechnik รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี
- 3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี
- 3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย
- 3.3.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.7 ตู้ป้อนเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipments) บริษัท Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน

- 3.3.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูพอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น BTS-20.M ประเทศเยอรมนี
- 3.3.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน
- 3.3.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (Thermoblock) บริษัท Biosan รุ่น TDB-120 Thermostat ประเทศเยอรมนี
- 3.3.12 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.13 เครื่องแก้ว (Glasswares)
- 3.4 สารเคมี
- 3.4.1 บัฟเฟอร์ Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06 โมลาร์,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.04 โมลาร์, KCl 0.01 โมลาร์,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 โมลาร์,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.05 โมลาร์)
- 3.4.2 คลอโรฟอร์ม
- 3.4.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.4.4 O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma)
- 3.4.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 1 โมลาร์
- 3.4.6 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 8.0 (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 5 มิลลิโมลาร์)
- 3.4.7 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.4.8 ฟีนอลอิมิตัว
- 3.4.9 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol) 25 ต่อ 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)
- 3.4.10 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol) 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)
- 3.4.11 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด
- 3.4.12 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด
- 3.4.13 อะกาโรส (Agarose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.14 บัฟเฟอร์ TBE 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)
- 3.4.15 เจลสตาร์ (Gel star) บริษัท BMA Biowhittaker Molecular Application ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.4.16 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)
- 3.4.17 สารละลายกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.4.18 บัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub> buffer) (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 50 มิลลิโมลาร์)
- 3.4.19 กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ (86% glycerol)
- 3.4.20 บัฟเฟอร์ STET (ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์)
- 3.4.21 ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.4.22 ยาปฏิชีวนะเตตระซัยคลิน (tetracycline) ความเข้มข้น 4.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.4.23 ยาปฏิชีวนะสเปกทิโนมายซิน (spectinomycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.4.24 คีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 2 มิลลิโมลาร์
- 3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะและเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการพิเศษ
- 3.5.1 *EcoRI* 12 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Promega, USA)
- 3.5.2 *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Promega, USA)
- 3.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker)
- 3.6.1 ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.7 วิธีการทดลอง

#### 3.7.1 การเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเลและคัตแยกแบคทีเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเล ณ เกาะขาม จังหวัดชลบุรี วันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2546 นอกจากนี้ยังใช้ฟองน้ำสังเคราะห์ที่มีอาหาร Marine agar (ภาคผนวก 1) มาจุ่มลงในน้ำทะเลลึก 5 เมตร เป็นเวลา 30 นาที นำสัตว์ทะเลและฟองน้ำสังเคราะห์มาทำการตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วขยี้ในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารมาทำการเจือจางโดยให้มีความเข้มข้น  $10^{-1}$  และ  $10^{-2}$  ต่อจากนั้น ปิเปิดน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเลและฟองน้ำสังเคราะห์ที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำการ spread บนอาหารแข็ง Marine agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน ทำการแยกเชื้อจนได้เป็นเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่ทำการคัตแยกได้

#### 3.7.2 การคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอร์รินแลกโตน

##### 3.7.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิต่ำเพื่อทดสอบสารเอซิลโฮโมเซอร์รินแลกโตน

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา streak ลงบนอาหารแข็ง Marine agar ที่งัวข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจากอาหารแข็งมาลงในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อในแต่ละหลอดให้มีค่าเท่ากับ 0.04 ในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง โดยปิเปิดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 3.7.2.2 การเตรียมเชื้อ Reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136

ทำการลงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ลงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก 2) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินความเข้มข้นสุดท้าย 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาปฏิชีวนะสเปกตินอมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 1 โคโลนี จากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกตินอมัยซิน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ (ขนาด 50 มิลลิลิตร) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วย AT medium (ภาคผนวก 3) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกตินอมัยซิน แล้วทำการเจือจาง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เพื่อปรับปริมาตรของเชื้อในแต่ละหลอดให้อยู่ในช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรมีค่าเป็น 0.45 ในอาหารเหลว AT medium ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกตินอมัยซิน จากนั้นปิเปตเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตัวอย่างข้อ 3.7.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 แต่ละหลอด เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

### 3.7.2.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปิเปตเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 (จาก 3.7.2.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรจากนั้นเติมบัพเฟอร์ Z ปริมาตร 450 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารตั้งต้น ONPG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเกิดสีเหลืองจึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองขนาดเล็กไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แยกส่วนใสและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตร ตามลำดับ หลังจากนั้น นำผลที่ได้ไปทำการคำนวณเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (Sambrook et al., 1987)

### 3.7.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

#### 3.7.3.1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี

##### 3.7.3.1.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม

การย้อมแกรมเป็นการย้อมสีของผนังเซลล์แบคทีเรีย เพื่อแยกความแตกต่างของชนิดแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดสีต่างกัน โดยเริ่มจากหยดน้ำด่างบนสไลด์ 1 หยด จากนั้นใช้ลูป (loop) ตะเข้ นำมาสเมียร์ (smear) บนแผ่นสไลด์ เกลี่ยให้เป็นฟิล์มบางๆ จากนั้นทิ้งไว้จนรอยสเมียร์แห้ง ตรึงสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการล้างด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram iodine) ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาไม่เกิน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำ แล้วหยดสีซาฟรานิน (Safranin) ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

##### 3.7.3.1.2 การทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS (ภาคผนวก 4) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการสังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป

##### 3.7.3.1.3 การทดสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารแข็ง Gelatin salt (ภาคผนวก 5) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 10, 30, 100, 200 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

### 3.7.3.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

#### 3.7.3.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารแข็ง LB ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง นำเซลล์ 1 ลูกปามากระจายในบัฟเฟอร์ Tris EDTA ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ที่มี lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวมาทำการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิมิตัวจนไม่เห็นตะกอนสีขาวระหว่างชั้นของฟีนอลกับชั้นของน้ำ ปิดเปิดส่วนใส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้แห้ง ละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNaseA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอลอิมิตัว ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิดเปิดส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ สกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิดเปิดส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.7.3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA (TBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ (microwave) แล้วปล่อยให้อะกาโรสมีอุณหภูมิลดลง จากนั้นทำการเติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่ออะกาโรส 100 ส่วน และเทใส่แม่พิมพ์ที่วางไว้บนแผ่นเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ใส่ในอ่าง (chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA ทำการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye; ภาควง 6) หลังจากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นเจลที่เตรียมไว้โดยทำการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ถ่ายรูปแผ่นเจลและคำนวณหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.7.3.2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) คือเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจศึกษา โดยในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ Forward DNA (5'-TCCTACGCGAGGCAGCAGT-3') และไพรเมอร์ Reverse DNA (5'-TTGTGCGGGCCCCGTCAGT-3') และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.1

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
Cycle	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	50 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 เท่าของ PCR Buffer	5
10 มิลลิโมลาร์ dNTPs	1
5 มิลลิโมลาร์ Forward DNA primer	2.5
5 มิลลิโมลาร์ Reverse DNA primer	2.5
25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์	3
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	34.5
ปริมาตรสุทธิ	50

#### 3.7.3.2.4 การตกตะกอนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR 35 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 65 ไมโครลิตร และเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เปิดส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ หลังจากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เปิดส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสออก คว่ำหลอดทิ้งตะกอนดีเอ็นเอจนกระทั่งแห้ง

### 3.7.3.2.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการตกตะกอนแล้ว มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง Automated sequencer โดยวิธีของ Sanger et al., 1977

### 3.7.4 การศึกษาการผลิตสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนระหว่างการเจริญ

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมา streak ลงบนอาหารแข็ง Marine agar ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี จากอาหารแข็งมาลงในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น ของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในแต่ละหลอดให้มีค่าเท่ากับ 0.04 ในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่อไป และปิเปตเชื้อแบคทีเรียอีก 1 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

### 3.7.5 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสารเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนและการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมา streak ลงบนอาหารแข็ง Marine agar ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจากอาหารแข็งมาลงในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในแต่ละหลอดให้มีค่าเท่ากับ 0.04 ในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อถึงชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ได้มีการเติมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่อไป และปิเปตเชื้อแบคทีเรียอีก 1 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

### 3.7.6 การศึกษายีน *luxI* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

#### 3.7.6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยเทคนิค PCR

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 3.7.3.2.1 จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> (5'-GAC(A/G)(A/T)C(A/T)GATGAGTA(T/C)GA-3') และไพรเมอร์ QSI<sub>2</sub> (5'-GATGT(T/G)AC(T/C)GTTACATA-3') ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน *luxI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 เท่าของ PCR Buffer	5
10 มิลลิโมลาร์ dNTPs	1
5 มิลลิโมลาร์ QSI <sub>1</sub> primer	5
5 มิลลิโมลาร์ QSI <sub>2</sub> primer	5
25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์	3
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
จีโนมิกดีเอ็นเอ (240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	29
ปริมาตรสุทธิ	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
Cycle	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	40 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	

### 3.7.6.2 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ทำการตัดเจลบริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดที่สะอาด นำชิ้นส่วนของเจลที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) โดยนำหลอดทดลองซึ่งมีเจลส่วนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยผสมให้เข้ากันทุก 2-3 นาที จนครบเวลา 10 นาที จากนั้นทำการย้ายดีเอ็นเอที่อยู่ในบัฟเฟอร์ QG ลงใน QIA quick spin column ที่อยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collection tube แล้วนำ spin column วางบน collection tube เดิม จากนั้นทำการล้าง ดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collection tube แล้วนำ spin column วางบน collection tube เดิม นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาทีซ้ำอีกครั้ง ย้าย spin column ลงในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะดีเอ็นเอให้หลุดจาก spin column โดยเปิดบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน spin column วางทิ้งไว้ 1 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.7.6.3 การเตรียม competent cell ของ *E.coli* DH5 $\alpha$

เพาะเลี้ยง *E.coli* DH5 $\alpha$  ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ที่ไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที หลังจากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอดทดลองขนาดเล็กหลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -70 องศาเซลเซียส

#### 3.7.6.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *lux I* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive cloning vector โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
2 เท่าของบัฟเฟอร์ ligation	5
ปริมาตรสุทธิ	10

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ที่ 1 ชั่วโมง

#### 3.7.6.5 การทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation)

นำพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแล้ว ทรานส์ฟอร์มใน competent cell โดยใช้พลาสมิด pDrive ที่มีชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เป็น Positive control และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็น Negative control ปิเปิด competent cell 100 ไมโครลิตร และส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (3.7.6.4) 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เย็น แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำมาเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการพลิกหลอดทดลองไปมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิดออกมา 100 ไมโครลิตร มาทำเทคนิค spread ลงบนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 3 ซ้ำ โดยเทียบกับตัวควบคุม

### 3.7.6.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ความร้อน

นำ transformant ที่ได้จากหัวข้อ 3.7.6.5 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการเก็บเซลล์โดยเปิดเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนของของเหลว เดิมบัฟเฟอร์ STET ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เปิดขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ออกจากกัน เดิม lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ เดิมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและไอโซโพรพานอล ปริมาตร 420 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนใส คว่ำหลอด ทั้งพลาสมิดจนกระทั่งแห้ง ละลายพลาสมิดในสารบัฟเฟอร์ Tris EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.7.6.7 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

#### *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.7.6.6 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ	8
เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
10 เท่าของบัฟเฟอร์ H	1
ปริมาตรสุทธิ	10

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมกั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.7.6.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ด้วยเครื่อง Automated sequencer โดยวิธีของ Sanger et al., 1977

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเล และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเล ณ เกาะขาม จังหวัดชลบุรี ในวันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2546 นอกจากนี้ยังใช้ฟองน้ำสังเคราะห์ที่มีอาหาร Marine agar (ภาคผนวก 1) มาจุ่มลงในน้ำทะเลลึก 5 เมตร เป็นเวลา 30 นาที จากการนำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด และฟองน้ำสังเคราะห์ มาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Marine agar จนกระทั่งได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน และเป็นโคโลนีเดี่ยว ตามวิธีในข้อ 3.7.1 พบว่าสามารถคัดแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันทั้งหมด 46 ไอโซเลท และสามารถแบ่งกลุ่มตามแหล่งของการเก็บตัวอย่างได้ 6 กลุ่ม (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างในบริเวณต่างๆ ของเกาะขาม

ชนิดของตัวอย่าง	จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้
ทราบย	7
น้ำทะเลบริเวณน้ำตื้น	6
น้ำทะเลบริเวณน้ำลึก	10
น้ำทะเลบริเวณชายหาด	6
ฟองน้ำสังเคราะห์	9
สิ่งมีชีวิตจากทะเล (ปะการัง ดอกไม้ทะเล)	8

ในการคัดแยกแบคทีเรียจากทะเลได้ใช้อาหารแข็ง Marine agar ในการคัดแยกอาหาร อาหาร Marine agar เป็นอาหารที่นิยมใช้แยกเชื้อ เนื่องจากมีสารอาหาร และแร่ธาตุต่างๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ใกล้เคียงกับน้ำทะเลทำให้แบคทีเรียจำนวนมากที่อาศัยอยู่ในทะเลสามารถเจริญเติบโตได้

ชนิดของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้น จะขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย เช่น ปริมาณของก๊าซออกซิเจน ปริมาณของสารอาหาร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด เป็นต้น

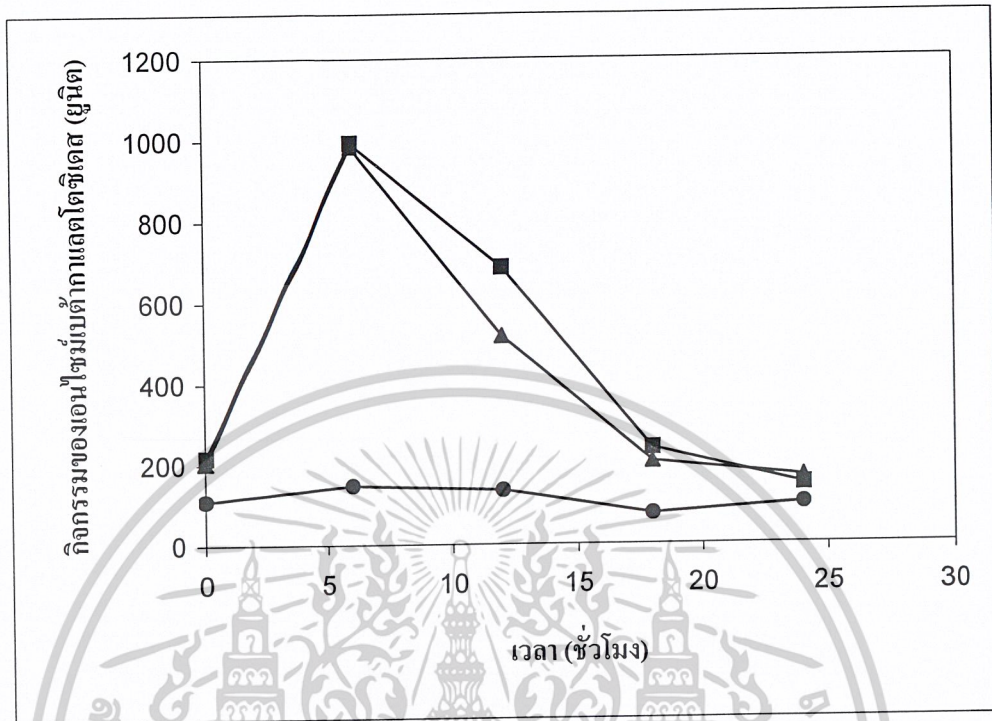
#### 4.2 การคัดเลือกและการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

จากการนำแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนกับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 และ วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ตามวิธีในข้อ 3.7.2.2 พบว่า มีแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในระดับสูง คือ ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 ในขณะที่แบคทีเรียอีก 44 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในระดับต่ำ ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มีรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส หรือการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนใกล้เคียงกัน คือ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 และลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 18 ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะคงที่ (รูปที่ 4.1)

จากการตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท 021 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลบริเวณน้ำลึก และแบคทีเรียไอโซเลท 038 ซึ่งคัดแยกได้จากฟองน้ำสังเคราะห์ พบว่ามีลักษณะโดยทั่วไปที่คล้ายคลึงกัน คือ มีสีครีม โคลนนี้มีลักษณะเยิ้ม เรืองแสงได้ ขอบโคโลนีไม่เรียบ และไม่มีความวุ้นภายใน

จากการคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 2 ชนิดที่สามารถสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ คือ ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 46 ชนิด เนื่องจากในจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด อาจมีทั้งแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวกและแกรมลบ โดยจากรายงานพบว่า แบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ที่สามารถสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Greenberg, 2000) แต่แบคทีเรียแกรมบวกนั้นจะไม่สร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นอกจากนี้ อาจเป็นไปได้ว่าในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ที่ไม่ตรวจพบสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนนั้น เพราะแบคทีเรียบางชนิดไม่ผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน หรืออาจผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ไม่มีความจำเพาะกับรีเซพเตอร์ของ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่ใช้ในการตรวจสอบ ดังนั้นจึงตรวจพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเพียง 2 ชนิดเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของไอโซเลท 021 (■) ไอโซเลท 038 (▲) และไอโซเลทอื่นๆ (●)

#### 4.3 การศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม

นำแบคทีเรียไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มาศึกษาลักษณะรูปร่างโดยนำมาย้อมแกรม ซึ่งเป็นการย้อมสีผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อใช้แยกความแตกต่างของชนิดแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดสีต่างกัน จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถติดสีแดงของซาฟรานิน (Safranin) ได้ และมีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้น แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทจึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

#### 4.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

##### 4.4.1 ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 เพื่อทำการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ห้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลท 021 และ ไอโซเลท 038 มีแถบเดียวขนาดใหญ่ ไม่พบการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอขนาดเล็ก และแถบของจีโนมิกดีเอ็นเออยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าชั้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23,130 คู่เบส (รูปที่ 4.2) โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลททั้ง 2 ชนิด มีปริมาณ 240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.2 ผลจากการสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

- |   |  |
|---|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III |
| 1 | จีโนมิกดีเอ็นเอไอโซเลท 021   |
| 2 | จีโนมิกดีเอ็นเอไอโซเลท 038   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16 S rDNA โดยเทคนิค PCR

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 ปริมาณ 240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA (5'-TCCTACGCGAGGCAGCAGT-3') และไพรเมอร์ Reverse DNA (5'-TTGTGCGGGCCCCGTCAGT-3') พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ได้จากไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มีแถบเดียวและอยู่ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 564 คู่เบส และมีปริมาณ 240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ 16 S rDNA

- |   |  |
|---|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ไอโซเลท 021                                       |
| 2 | ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ไอโซเลท 038                                       |

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 ที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอื่นๆ จึงมีแถบเดียว เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาใช้ คือ ไพรเมอร์ forward DNA และไพรเมอร์ Reverse DNA เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความจำเพาะกับยีนบริเวณ 16S rDNA รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีความเหมาะสม จึงทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้คือ 600 คู่เบส โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16 S rDNA ของไอโซเลททั้ง 2 ชนิด มีปริมาณ 240 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมดีเอ็นเอไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มาตกตะกอน เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆ และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

#### 4.4.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ 16S rDNA จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลนั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เหมือนกัน และมีจำนวน 609 คู่เบส (รูปที่ 4.4)

1	GGCGC	AGCCT	GATGC	AGCCA	TGCCG	CGTGT	ATGAG	AAGGC	CTTCG	GGTTG	50
51	TAAAG	TACTT	TCAGC	AGTGA	GGAAG	GAGGT	ATCGT	TAATA	GCGGT	ATCTT	100
101	TTGAC	GTTAG	CTGCA	GAAAA	AGCAC	CGGCT	AACTC	CGTGC	CAGCA	GCCGC	150
151	GGTAA	TACGG	AGGGT	GCGAG	CGTTA	ATCGG	AATTA	CTGGG	CGTAA	AGCGC	200
201	ATGCA	GGTGG	TTTTGT	TAAGT	CAAA	GTGAA	AGCCC	GGGG	TCAAC	CTCGG	250
251	AATTG	CATTT	GAAAC	TGGCA	GGCTA	GAGTA	CTGTA	GAGGG	GGGTA	AAATT	300
301	TCAGG	TGTAG	CGGTG	AAATG	CGTAA	AGATC	TGAAG	GAATA	CCGGT	GGCGA	350
351	AGGCG	GCCCC	CTGGA	CAGAT	ACTGA	CACTC	AGATG	CGAAA	GCGTG	GGGAG	400
401	CAAAC	AGGAT	TAGAT	ACCCT	GGTAG	TCCAC	GCCGT	AAACG	ATGTC	TACTT	450
451	GGAGG	TTGTG	GCCTT	GAGCC	GTGGC	TTTCG	GAGCT	AACGC	GTTAA	GTAGA	500
501	CCGCC	TGGGG	AGTAC	GGTCG	CAAGA	TAAA	ACTCA	AATGA	ATTGA	CGGGG	550
551	GCCCC	CACAA	GCCGT	GGAGC	ATGTG	GTTTA	ATTCG	ATGCA	ACGCG	AAGAA	600
601	CCTTA	CCTA									650

รูปที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 โดยใช้ไพรเมอร์ Forward DNA

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA จำนวน 609 คู่เบส ของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มาตรวจสอบพบว่า ทั้งสองไอโซเลทมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA ที่เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม Blastn ในธนาคารยีน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. ได้แก่ *Vibrio Fluvialis* (98%), *Vibrio furnissii* (97%), *Vibrio corallilyticus* (97%), *Vibrio tubiashi* (96%) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับ *Allomonas enterica* (97%) และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

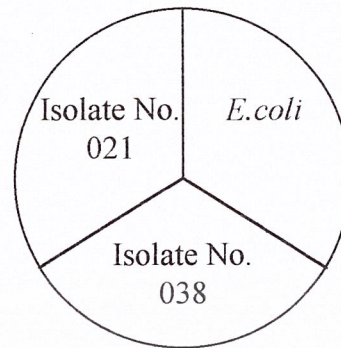
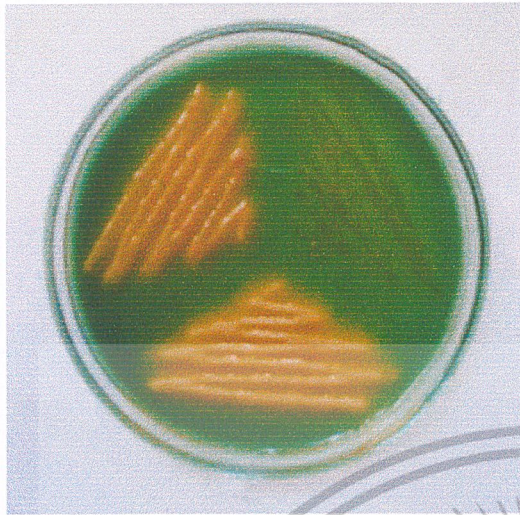
*Listonella pelagia* (96%) อีกด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลนี้จะเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Vibrio* sp.

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่เหมือนกันของไอโซเลท 021 และ ไอโซเลท 038 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน จึงเลือกไอโซเลท 038 เท่านั้นมาทำการศึกษาค่อยไป

#### 4.5 การทดสอบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีวเคมี

##### 4.5.1 การทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)

อาหารแข็ง TCBS เป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. โดยที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมื่อละลายน้ำจะทำให้อาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เกิดการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ไทมอลบลู-โบรโมไทมอลบลูจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (Muckerjee, 1961; Finkelstein and Muckerjee, 1963; Roy et al., 1965; Bockemuhl, 1974; นันทนา, 2537) เมื่อทำการลงเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *E. coli* (negative control), ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 ลงบนอาหารแข็ง TCBS พบว่า โคโลนีของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 มีลักษณะเป็นสีเหลือง ในขณะที่ *E. coli* ที่ใช้เป็น negative control นั้นสามารถเจริญเติบโตและให้โคโลนีสีเขียวมะกอก (รูปที่ 4.5) การที่โคโลนีของไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 เปลี่ยนเป็นสีเหลือง เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถเจริญเติบโตและย่อยน้ำตาลซูโครสได้ เมื่อละลายน้ำจะทำให้อาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ไทมอลบลู-โบรโมไทมอลบลู จากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ *E. coli* ที่ใช้เป็น negative control นั้น ไม่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ โคโลนีจึงไม่มีการเปลี่ยนสี จึงอาจเป็นไปได้ว่าไอโซเลท 038 อาจอยู่ในกลุ่มของ *Vibrio* sp. ผลที่ได้นี้จึงสนับสนุนผลที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

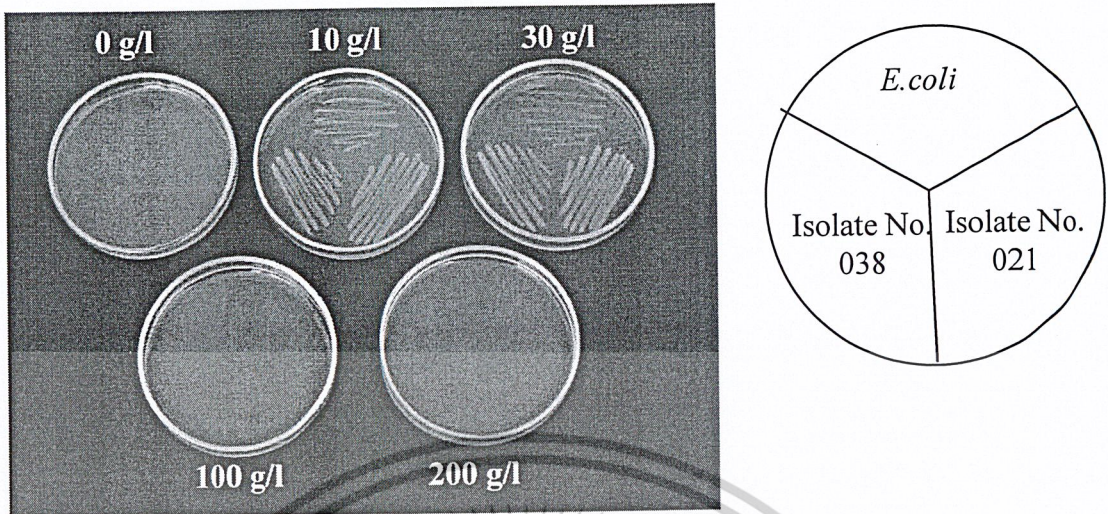


รูปที่ 4.5 การทดสอบแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. บนอาหารแข็ง TCBS

#### 4.5.2 การทดสอบผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างโซเดียมคลอไรด์ และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารแข็ง Gelatin salt agar (GSA) เป็นการทดสอบผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโต เมื่อทำการลงเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *Escherichia coli* (negative control), ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 ลงบนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 10, 30, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดคือ *E. coli*, ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 กรัมต่อลิตร ได้ (รูปที่ 4.6) ส่วนอาหารแข็ง GSA ที่ไม่มีเกลือโซเดียม พบเพียง *E. coli* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ แต่เนื่องจาก *E. coli* เจริญเติบโตซ้ำบนอาหารแข็ง GSA ที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ไม่สามารถมองเห็นได้จากภาพถ่าย จากการที่ไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูง จึงจัดไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 เป็นแบคทีเรีย vibrio ที่ชอบความเค็ม (halophilic vibrio)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

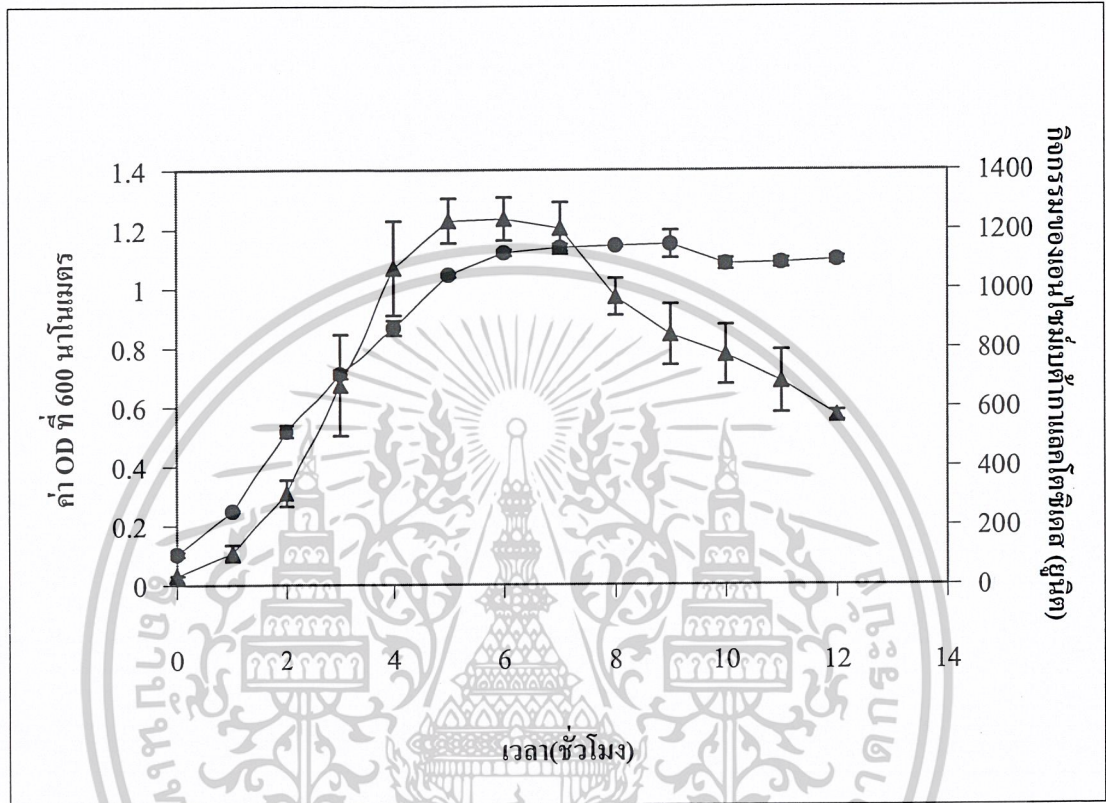


รูปที่ 4.6 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท 021 และไอโซเลท 038 บนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0, 10, 30, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร

#### 4.6 การศึกษาการผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโต

จากการศึกษาการผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียไอโซเลท 038 โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส และวัดเจริญโดยดูจากการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 1 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลท 038 มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงที่ 0 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 5 หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะ stationary phase และการเจริญเติบโตก็จะคงที่ ทางด้านค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสนั้น ในชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 2 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แต่ในชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 4 ซึ่งอยู่ในระยะ log phase ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 5 และคงที่ในชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 7 หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 8 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าลดลง (รูปที่ 4.7) โดยผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่า เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นสูงจนถึงระดับหนึ่ง จะเกิดการผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และจะเกิดการจับกับ receptor ที่จำเพาะต่อสารสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน แล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีน *luxR* ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิ-

kestขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท 038 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับ การผลิตสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

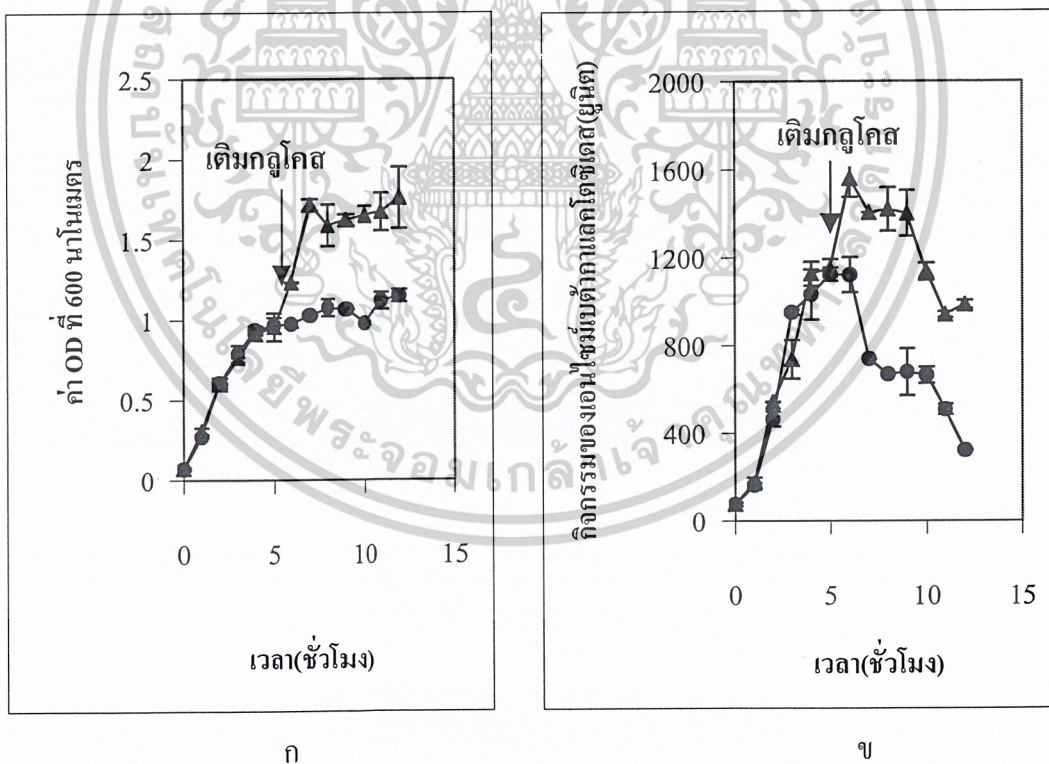


รูปที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (●) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (▲) ของไอโซเลท 038

#### 4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนและการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตกับการผลิตสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียไอโซเลท 038 โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Marine broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเหลว Marine broth โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ชั่วโมงที่ 5 ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส และวัดการเจริญเติบโตจากค่าการดูดกลืนแสงที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 1 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลท 038 มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงที่ 0 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 5 หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะ stationary phase และการเจริญเติบโตก็จะคงที่ แต่ไอโซเลท 038 ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกลูโคสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นจนเกือบเป็น 2 เท่า และจะคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ทางด้านค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสนั้น ในชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 2 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แต่ในชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 4 ซึ่งอยู่ในระยะ log phase ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 5 และคงที่ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 7 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าลดลง แต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจากไอโซเลท 038 ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกลูโคสจะพบว่าหลังจากทำการเติมกลูโคสลงในอาหารแล้ว กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นจนเกือบเป็น 2 เท่า และจะลดลงเมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของไอโซเลท 038 เมื่อมีการเติมกลูโคส (▲) และไม่เติมกลูโคส (●)

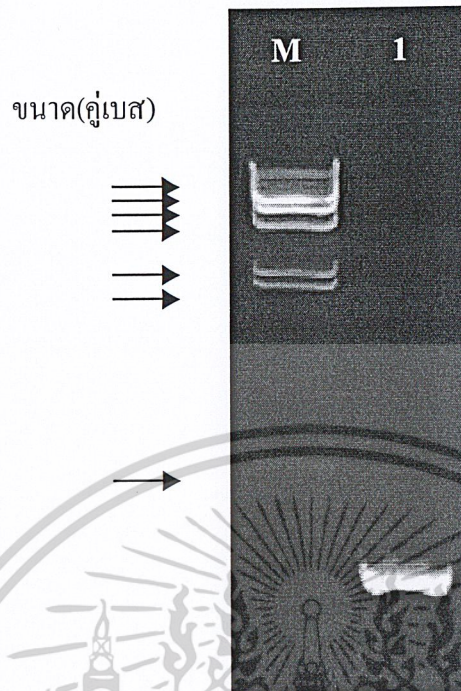
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนนั้นมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต โดยเมื่อไอโซเลท 038 มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากการเติมน้ำตาลกลูโคส จะทำให้การผลิตสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าวิธีการตรวจสอบโดยใช้ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 นั้น สามารถตรวจสอบการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้จริง

#### 4.8 การศึกษายีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส

##### 4.8.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยเทคนิค PCR

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท 038 จากการผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.1 มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *luxI* โดยใช้ไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> (5'-GAC(A/G)(A/T)C(A/T)GATGAGTA(T/C)GA-3') และไพรเมอร์ QSI<sub>2</sub> (5'-GATGT(T/G)AC(T/C)GTTACATA-3') เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มี 1 แถบที่มีขนาด 300 คู่เบส (รูปที่ 4.9) โดยไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ คือ ไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub> มีความจำเพาะกับยีนบริเวณ *luxI* รวมถึงสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ และส่วนประกอบ มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR จึงทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้คือ 300 คู่เบส โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปริมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *luxI* มาตกตะกอน และทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆ ต่อไป

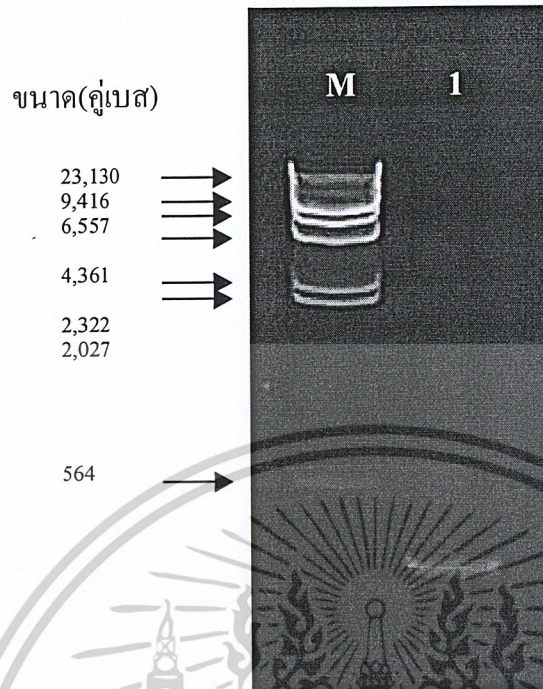


รูปที่ 4.9 ผลผลิต PCR ของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ *luxI*

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
 1 ผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ *luxI*

#### 4.8.2 การทำผลผลิต PCR ของบริเวณยีน *luxI* ให้บริสุทธิ์

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *luxI* ของแบคทีเรียไอโซเลท 038 และนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าผลผลิต PCR ของยีนบริเวณ *luxI* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีแถบ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส มีปริมาณ 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และปราศจากการปนเปื้อน (รูปที่ 4.10) นำผลผลิต PCR ของสิ่งปนเปื้อนที่ตกค้างลดลง เพื่อที่จะนำชิ้นดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *luxI* นี้ไปทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation) ต่อไป



รูปที่ 4.10 ผลลัพธ์ PCR ของยีน *luxI* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
1 ผลลัพธ์ PCR ของบริเวณยีน *luxI* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

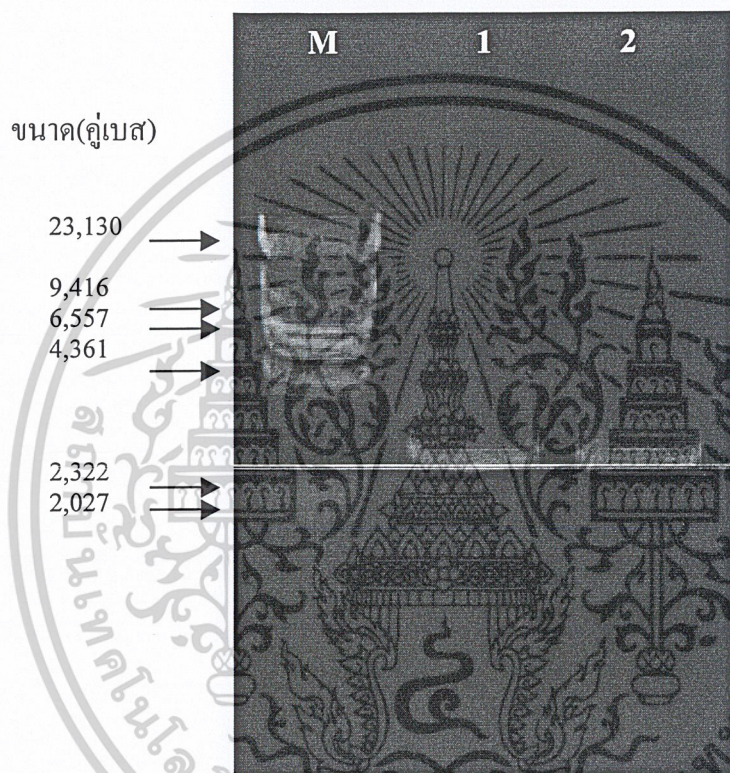
#### 4.8.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

นำผลลัพธ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด pDrive cloning vector และทำการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัยต่อไป

#### 4.8.4 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation)

จากการนำผลลัพธ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ มาทำการทรานสฟอร์มเมชันเข้าไปใน competent cell ของ *E. coli* DH5 $\alpha$  และตรวจสอบ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมโดยทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่าเกิดโคโลนีบนอาหาร 2 โคโลนี จากนั้นนำทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ได้มาทำการเลี้ยงเชื้อ และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ความร้อน (boiling method) โดยเรียกชื่อพลาสมิดที่ได้แต่ละโคโลนีว่า pVAsa และ pVAsb นำ พลาสมิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า พลาสมิด ดีเอ็นเอ pVASa และ pVASb ที่ได้มีแถบเดี่ยว และมีขนาดเท่ากัน (รูปที่ 4.11) โดยเมื่อคำนวณ ปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าพลาสมิด pVASa และ pVASb ทั้ง 2 ชนิด มี ปริมาณดีเอ็นเอ 70 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa มาทำการ ตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*



รูปที่ 4.11 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa  
 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pVASb

#### 4.8.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pVASa โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa ปริมาณ 70 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าในเลนที่ 1 ปรากฏแถบ 1 แถบ ซึ่งเป็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa และในเลนที่ 2 ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าปรากฏแถบ 2 แถบ (รูปที่ 4.13) เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถตัดพลาสมิด pVASa ได้ 2 ตำแหน่ง ที่บริเวณ restriction site ของพลาสมิด pDrive จึงทำให้พบแถบของพลาสมิด pDrive ที่ถูกตัดแล้ว ที่มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส และชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ที่ insert ลงไป ที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส จากนั้นจึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa ไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.12 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa
- 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

#### 4.8.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ *luxI*

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ *luxI* จากพลาสมิด

ดีเอ็นเอ pVASa โดยใช้ไพรเมอร์ T7 พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 309 คู่เบส (รูปที่ 4.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1	GAATC	TGATG	AGTAC	GATAT	CCCGA	GAGCC	CACTA	CCTCT	ATGCC	AAAGG	50
51	CGATG	AAGGG	CACCT	GATTG	GCTGC	TGGCG	CATTC	TGCCG	ACCAC	ACAGA	100
101	GCTAC	ATGCT	CAAAG	ATACC	TTTCC	CGAGC	TTCTG	GGCGA	CGTTC	AGGCA	150
151	CCGCA	AGGTG	AGCGT	ATCTA	CGAAC	TCAGT	CGCTT	TGCGG	TCGAT	AAGGA	200
201	GTTTT	CTGCT	CAGTC	GGGTG	GGGTC	AGCAA	TGTCA	CGATG	AAGAT	GTTTC	250
251	AGTCG	CTGTA	CCACC	ATGCG	CAGAG	TCAGG	GGATT	GAACG	CTATG	TAACG	300
301	GTCAC	ATCA									350

รูปที่ 4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ *luxI* จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa โดยใช้ไพรเมอร์ T7

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ *luxI* จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa จำนวน 309 คู่เบส นำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้มีความใกล้เคียงกับ Autoinducer synthesis protein VanI ของ *Vibrio anguillarum* (74%), Autoinducer synthesis protein LuxI ของ *Vibrio fischeri* (57%), N-acyl-L-homoserine lactone synthetase ของ *Burkholderia fungorum* (47%), MupI ของ *Pseudomonas fluorescens* (48%), Autoinducer synthesis protein LuxI ของ *Pseudomonas aeruginosa* (42%) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ที่อยู่ในพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa นั้น น่าจะเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิตสัตุนิยมควอรัมเซนซิง เริ่มต้นจากการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ทราบย สัตว์ทะเล และฟองน้ำสังเคราะห์ที่มีอาหาร Marine agar ที่จุ่มลงในน้ำทะเลลึก 5 เมตร แล้วนำมาตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดมาคัดแยกแบคทีเรียจากทะเลบนอาหารแข็ง marine agar จนได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว และมีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งหมด 46 ไอโซเลท นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 46 ไอโซเลทนี้ มาคัดเลือกและทดสอบการผลิตสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนกับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถผลิตสารเอสซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ คือ ไอโซเลท 021 และ ไอโซเลท 038 เมื่อมาศึกษาลักษณะรูปร่างโดยการย้อมแกรม พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีลักษณะเป็นท่อนสั้น

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท 021 และ ไอโซเลท 038 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน เพราะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เหมือนกัน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท จำนวน 609 เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ี้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio fluvialis* ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ และทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการทดสอบบนอาหารแข็ง TCBS ผลที่ได้จากการทดสอบยืนยันว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Vibrio* sp. เมื่อทดสอบความสามารถในการทนเค็มบนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับต่างๆ พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง GSA ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียทั้งสองเป็นแบคทีเรีย vibrio ที่ชอบความเค็ม (halophilic vibrio)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตกับการผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียไอโซเลท 038 พบว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท 038 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนคือ เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุด การผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนก็มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตคงที่ การผลิตสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะลดลงตามไปด้วย

การศึกษายีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท 038 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *lux I* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนบริเวณ *lux I* จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *lux I* มาตกตะกอน และทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ แล้วทำการเชื่อมต่อพลาสมิดดีเอ็นเอกับพลาสมิด pDrive cloning vector และทำการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. Coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นตรวจสอบ *E. Coli* DH5 $\alpha$  ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม พบว่าได้โคลนีนบนอาหารอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินจำนวน 2 โคลโลนี จากนั้นนำทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยความร้อน และให้ชื่อว่า pVASa และ pVASb เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าพลาสมิด pVASa และ pVASb ทั้ง 2 ชนิด มีขนาดเท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa เพียงตัวเดียว มาทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa ที่ได้เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เชื่อมต่ออยู่ จากนั้นจึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 309 เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ *luxI* จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้ นี้มีความใกล้เคียงกับ Autoinducer synthesis protein VanI ของ *Vibrio anguillarum* (74%), Autoinducer synthesis protein LuxI ของ *Vibrio fischeri* (57%), N-acyl-L-homoserine lactone synthetase ของ *Burkholderia fungorum* (47%), MupI ของ *Pseudomonas fluorescens* (48%), Autoinducer synthesis protein LuxI ของ *Pseudomonas aeruginosa* (42%) แสดงให้เห็นว่าขึ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ที่อยู่ในพลาสมิดดีเอ็นเอ pVASa นั้น น่าจะเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสจริง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

แบบที่เรียที่คัดแยกได้จากโครงการพิเศษนี้ สามารถนำไปศึกษาและค้นคว้าวิจัยในด้านต่างๆ เช่น การทำ mutant ยีน *luxI* เพื่อดูลักษณะทางสรีรวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป และสังเกตความรุนแรงของการก่อโรคต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบิก: Classification of Aerobic Bacteria. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- นิตยา เลาหะจินดา. 2546. นิเวศวิทยา: พื้นฐานสิ่งแวดล้อมศึกษา. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรงาม ลิ้มตระกูล. 2541. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ. 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ: เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมเล่ม 1-2. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 582-587.
- Bockemühl, J. 1974. Einfache Laboratoriumsdiagnostik der El Tor-Cholera. *Ärztl. Lab.* 20: 32-41.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P., and Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. 2003. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, 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.
- Finkelstein, R.A. and Muckerjee, S. 1963. Haemagglutination a rapid method for differentiating *V. cholerae* and El Tor vibrios. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 112: 335-359.
- Fuqua, W.C. and Greenberg, E.P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 685-695.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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(2): 269-275.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.
- Greenberg, E.P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria. *The Journal of Microbiology* 38(3): 117-121.
- Hanzelka, B., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Jr., and Greenberg, E.P. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* 181: 5766-5780.
- Hoang, T.T., Yufang, M., Stern, R.J., Mcneil, M.R. and Schweizer, H.P. 1999. Construction and use of low-copy number T7 expression vectors for purification of problem proteins: purification of *Mycobacterium tuberculosis* RmlD and *Pseudomonas aeruginosa* LasI and RhlI proteins, and functional analysis of purified RhlI. *Gene.* 237: 361-371.
- Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163: 1210-1214.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signals-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895-904.
- Lazazzera, B.A. and Grossman, A.D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* 7: 288-294.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G. and Ausubel, F.M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 96: 47-56.
- Moré, M.I., Finger, D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. and Winans, S.C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science.* 272: 1655-1658.
- Muckerjee, S. 1961. Diagnostic use of bacteriophage. *J. Hyg.* 59: 109-115.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr., and Greenberg, E.P. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4360-4365.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., and Iglewski, C., and Iglewski, B.H. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J. Bacteriol. 181: 1203-1210.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikiheimo, R. and Palva, E.T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in *Erwinia carotovora*. EMBO J. 12: 2467-2476.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. and Ausubel, F.M. 1995. Common virulence factors bacterial pathogenicity in plants and animals. Science. 268: 1899-1902.
- Roy, C.; Mridha, K. and Muckerjee, S. 1965. Action of polymyxin on cholera vibrios. Techniques of determinatoin of polymyxin sensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. 119: 893-896.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A. and Hamood, A.N. 1999. Contribution of the regulatory gene *lasR* to the pathogenesis of *Pseudomanas aeruginosa* infection of burned mice. J. Burn Care Rehabil. 20: 42-49.
- Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. Mol. Microbiol. 16: 615-624.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual I-III. Second edition, Clod spring harborlaboratory press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA seguencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr., 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shapiro, J.A. 1998. Thinking about bacterial population as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 81-104.
- Stevens, A.M. and Greenberg, E.P. 1998. Transcriptional activation by LuxR. In: *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, pp. 231-242. Dunny, G. and Winans, S.C., eds. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S. and Ausubel, F.M. 1999a. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *P. aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 715-720.
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G. and Ausubel, F.M. 1999b. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2408-2413.
- Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, G.H., Goldberg, J.B. and Prince, A. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* 64: 37-43.
- <http://bio.kaist.ac.kr/~mbtlab/ligation.gif>
- <http://www.accessexcellence.org/AB/WYW/cohen/transformation.gif>
- <http://www1.qiagen.com/.../QIAGENPCRCloningPlusKit.aspx?ShowInfo=1>

## ภาคผนวก 1

### ส่วนประกอบอาหารเหลว Marine broth (MB)

เปปโตน	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	19.45	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	5.9	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.8	กรัม
โซเดียมซัลเฟต	3.24	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.55	กรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.16	กรัม
โพแทสเซียมโบรไมด์	0.08	กรัม
สตรอนเทียมคลอไรด์	34.0	มิลลิกรัม
กรดบอริก	22.0	มิลลิกรัม
โซเดียมซิติเกต	4	มิลลิกรัม
โซเดียมฟลูออไรด์	2.4	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมไนเตรท	1.6	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	8.0	มิลลิกรัม

ชั่ง 37.4 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร แล้วปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 7.6 สำหรับอาหาร  
แข็ง Marine agar เติมน้ำ 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ  
121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก 2

### ส่วนประกอบอาหารเหลวLB

ทริปโทน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้เป็น 7.4 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็ง เติมน้ำ 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที การเติมยาปฏิชีวนะ จะทำการเติมหลังจากที่อาหารผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เรียบร้อยแล้ว รอให้อาหารมีอุณหภูมิไม่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเสถียรภาพของยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ภาคผนวก 3

ส่วนประกอบอาหาร AT medium (กรัม/ลิตร)

ส่วนที่ 1

โทเทสเซียมซัลเฟต	10.2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	160	มิลลิกรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10	มิลลิกรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	มิลลิกรัม
MnSO <sub>4</sub> ·4-5H <sub>2</sub> O	1.75	มิลลิกรัม
pH 7.0		

ส่วนที่ 2

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	กรัม
---	---	------

ส่วนที่ 3

น้ำตาลกลูโคส	2	กรัม
--------------	---	------

นำส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนไปทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นจึงนำทั้ง 3 ส่วนมารวมให้มีปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร การเติมยาปฏิชีวนะ จะทำการเติมหลังจากที่อาหารผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เรียบร้อยแล้ว รอให้อาหารมีอุณหภูมิไม่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเสียดสภาพของยาปฏิชีวนะ

## ภาคผนวก 4

ส่วนประกอบ TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)

เคซีนเปปโตน	5	กรัม
มีทเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
ซาคคาโรส	20	กรัม
โซเดียมซิเตรด	10	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	10	กรัม
น้ำดี	5	กรัม
โซเดียมคลอเรต	3	กรัม
เฟอริกซิเตรด	1	กรัม
ไทมอลบลู	0.040	กรัม
โบรโมไทมอลบลู	0.040	กรัม
วุ้น	14	กรัม

ละลายอาหาร 85 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ปรับให้พีเอชมีค่าเป็น 8.6 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนจนละลายด้วยเตาไมโครเวฟ (ไม่ต้อง autoclave) แล้วจึงทำการเทลงในจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก 5

ส่วนประกอบของ Gelatin salt agar (GSA)

สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม
เปปโตน	4	กรัม
เจลาติน	15	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 7 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก 6

ส่วนประกอบสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

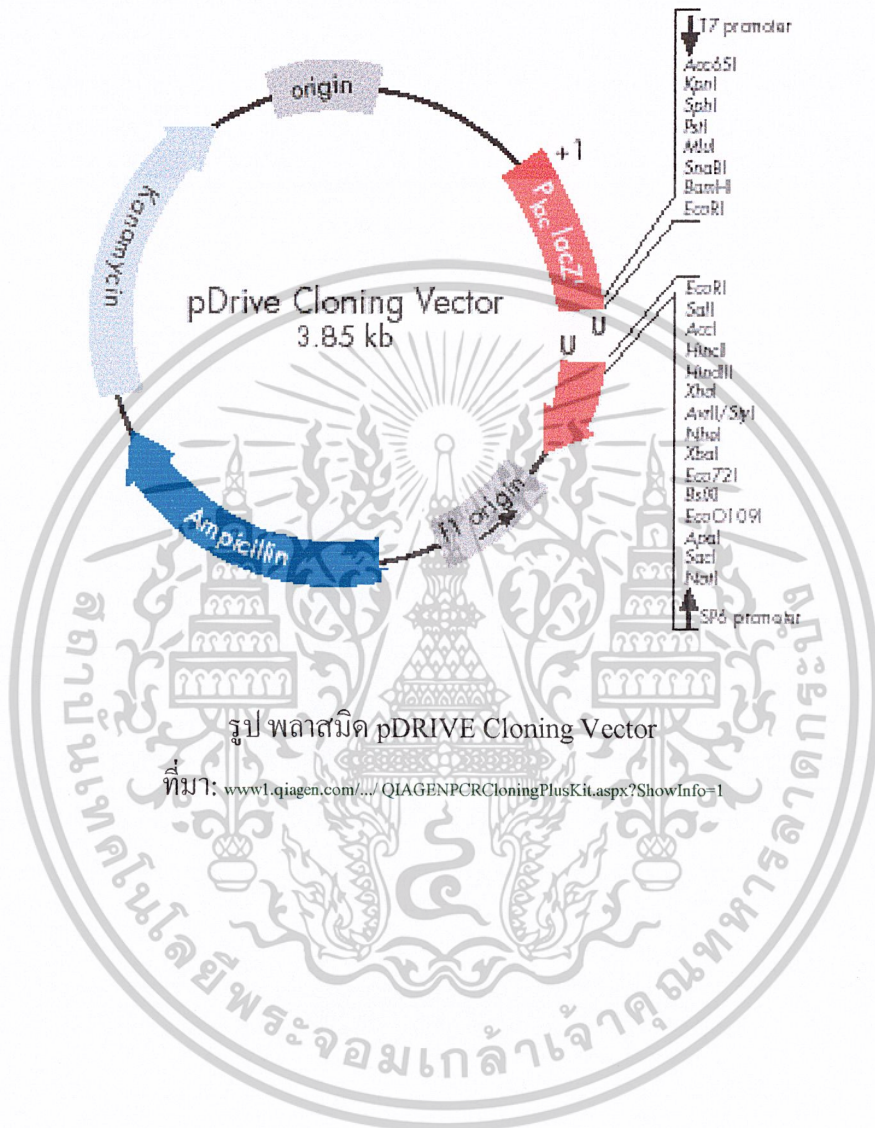
ซูโครสหรือกลีเซอรอล	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟินอลบลู	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-boric-EDTA	1	เท่า

ชั่งซูโครสหรือกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟินอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-boric-EDTA 100 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก 7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้