สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลนยีน *aiiA* ที่สร้างเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสจาก *Bacillus thuringiensis*

T 061821

นางสาวรัชธิดา เดชอุดม
นางสาววิชาณี แบนคีรี
นางสาวศรัญญา มงคลสิทธิ์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61821
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549
b 11603537
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cloning of *aiiA* Gene Encoding Acyl-Homoserine Lactonase from *Bacillus thuringiensis*

Miss Rachatida Dajudom

Miss Wichanee Bankeeree

Miss Saranya Mongkolsit

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษเรื่อง	การโคลนยีน *aiiA* ที่สร้างเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสจาก *Bacillus thuringiensis*	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวรัชธิดา เดชอุดม	รหัสประจำตัว 44050199
	นางสาววิชาณี แบนคีรี	รหัสประจำตัว 44050205
	นางสาวศรัญญา มงคลสิทธิ์	รหัสประจำตัว 44050210
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
รศ.มาลินี	ต้นเตียาภรณ์	
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การโคลนยีน *aiiA* ที่สร้างเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสจาก *Bacillus thuringiensis*	
นักศึกษา	นางสาวรัชธิดา เดชอุดม	รหัสประจำตัว 44050199
	นางสาววิชาณี แบนคีรี	รหัสประจำตัว 44050205
	นางสาวศรัญญา มงคลสิทธิ์	รหัสประจำตัว 44050210
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

บทคัดย่อ

ควอรัมเซนซิงเป็นระบบการสื่อสารของเซลล์ประเภทหนึ่งในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์ โดยเมื่อมีความหนาแน่นของประชากรสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง เซลล์จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน โมเลกุลสัญญาณนี้จะเข้าจับกับรีเซพเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiA* เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยวงแหวนแลคโตนของเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน และสามารถนำมาใช้ควบคุมจำนวนประชากรและความรุนแรงของการก่อโรคได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* ใส่ในพลาสมิด pDrive และศึกษาชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มียีน *aiiA* การทดลองเริ่มจากเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. 3 ตัวอย่างและสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน *aiiA* และมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่าปรากฏแถบ 1 แถบ ขนาดประมาณ 800 คู่เบสของผลิตภัณฑ์ PCR จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp.1 เพียงตัวอย่างเดียว จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDirve แล้วทรานส-ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีสีขาว 4 โคโลนี บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-gal และ IPTG จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 จากการทดลองพบว่าพลาสมิด pAiiA1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR ของยีน *aiiA* จากการนำพลาสมิด pAiiA1.1 ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus* มากกว่าร้อยละ 98 จากนั้นทำการศึกษาสปีชีส์ของสายพันธุ์ *Bacillus* sp.1 โดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค PCR ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า *Bacillus* sp.1 จัดจำแนกเป็น *Bacillus thuringiensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Cloning of *aiiA* Gene Encoding Acyl-Homoserine Lactonase from *Bacillus thuringiensis*
Name	Miss Rachtida Dajudom Miss Wichanee Bankeeree Miss Sarunya Mongkolsit
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic year	2003
Spacial Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

Quorum sensing is one of the cell communication system in Gram-negative bacteria responding to the cell density. When the cell density increases, cells produce signal molecule acyl homoserine lactone. This signal molecule binds to the receptor and then activates the target gene expressions resulting in the different physiological expressions. Acyl homoserine lactonase encoded from *aiiA* is an enzyme capable of lactone ring degradation of acyl homoserine lactone and is utilized for controlling the cell population and the disease virulence. This project aims to clone PCR product of *aiiA* to plasmid pDrive and study of the specie of *Bacillus* harboring *aiiA* gene. Three samples of *Bacillus* sp. were cultivated. Genomic DNA from each sample was isolated. The *aiiA* specific primers containing recognition sites of restriction enzymes *Bam*HI and *Hin*dIII were designed. The DNA-amplification by polymerase chain reaction was performed. The PCR product was detected by agarose gel electrophoresis. It was shown that one band with approximately 800 bp. of PCR product was found only using genomic DNA of *Bacillus* sp.1. The PCR product was purified and ligated to plasmid pDrive. The recombinant plasmid was transformed into the competent *E.coli* DH5α. Four white colonies were selected on kanamycin, X-gal and IPTG containing LB agar. Plasmid DNA was isolated and cut by restriction enzyme *Bam*HI and *Hin*dIII. The result showed that plasmid pAiiA1.1 was the recombinant plasmid containing the *aiiA* gene. The nucleotide of pAiiA1.1 was sequenced and thair amino acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sequences were compared to amino acids reported in GenBank. The sequences showed higher than 98 percent similarity to acyl homoserine lactonase of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. In addition, the specie of *Bacillus* sp.1 was identified by amplifying 16S rDNA gene by PCR. One band of PCR product with approximately 600 bp. was shown. By sequence analysis, *Bacillus* sp.1 was identified as *Bacillus thuringiensis*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คำแนะนำต่างๆ และประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายหน้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบปัญหาพิเศษ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการสอบปัญหาพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.มงคล อุตมโท ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในปัญหาพิเศษนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวก และคอยเอื้อเฟื้อให้คำปรึกษาต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างดำเนินงาน

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ โดยเฉพาะคุณวิภาวี แบบประเสริฐ ที่ช่วยเหลือ แนะนำ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ เป็นกำลังใจสำคัญ และให้การสนับสนุนส่งเสริมทางด้านการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

นางสาวรัชธิดา เดชอุดม
นางสาววิชาณี แบนคีรี
นางสาวศรัญญา มงคลสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	XI
สารบัญรูป	XII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 การสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย	5
2.1.1 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ	5
2.1.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก	8
2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง	8
2.2.1 ยีนในกลุ่ม *aiiA*	9
2.2.2 ยีนในกลุ่ม *luxI*	9
2.2.3 ยีนในกลุ่ม *luxR*	9
2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย	11
2.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	11
2.3.2 การเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับเวกเตอร์ (Vector)	11
2.3.3 ตัวพาหะในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.4 การทรานฟอร์มเมชัน (transformation) 15

2.3.5 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) 16

2.3.6 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) 18

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20

3.1 เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด 20

3.2 สารเคมี 20

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ 20

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ 20

3.2.3 เอนไซม์ 20

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 21

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ 21

3.2.6 ชุดทดสอบ (kit) 22

3.2.7 อุปกรณ์ 22

3.3 วิธีการทดลอง 23

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 23

3.3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย 23

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 24

3.3.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *aiiA* 25

3.3.5 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *aiiA* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 25

3.3.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* กับพลาสมิด (Ligation) 26

3.3.8 การเตรียม competent cell และการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) 27

3.3.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis 28

3.3.10 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 28

3.3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR 29

3.3.12 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA 29

3.3.12.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR 29

3.3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA 30

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 31

4.1 การศึกษาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ใน *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 31

4.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย 31

4.1.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *aiiA* 33

4.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR) 35

4.2 การศึกษาการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด pDrive 35

4.2.1 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส ของบริเวณยีน *aiiA* ให้บริสุทธิ์	36
4.2.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive	37
4.2.3 การทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α	37
4.2.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	38
4.2.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII	38
4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1	40
4.3 การศึกษาสปีชีส์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส	45
4.3.1 การศึกษาสปีชีส์ของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	45
4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	45
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	51
5.1 สรุปผลการทดลอง	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก 1	56
ภาคผนวก 2	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก 3	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน *aiiA*	25
3.2	ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation	27
3.3	ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Bam*HI	29
3.4	ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA	30
4.1	ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน	44
4.2	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน ของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส	2
2.1	รูปแบบทั่วไปของระบบการสื่อสารแบบควอรัมเซนซิง	6
2.2	ตัวอย่างของสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน	10
2.3	รูปแบบการตัดของ restriction endonuclease	11
2.4	คุณสมบัติของ เวกเตอร์ พลาสมิดในการโคลนยีน (gene cloning)	12
2.5	การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ	14
2.6	เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส	17
2.7	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่งมีปริมาณน้อย ในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นเป็นทวีคูณ	19
4.1	จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์	32
4.2	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *aiiA* ของ *Bacillus thuringiensis* (AY460124), *Bacillus* sp. (AF350927), *Bacillus* sp. (AF397400), *Bacillus cereus* (AF350935), *Bacillus thuringiensis* (AF350928) และ *Bacillus* sp. (AF350927)	34
4.3	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอแบคทีเรียจาก *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์	36
4.4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ *aiiA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	37
4.5	พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม	39
4.6	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII	40
4.7	โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pAiiA1.1 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7	41
4.8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1	46
4.10	โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ FDNA	47
4.11	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1	48
4.12	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus cereus* (BCE288157), *Bacillus thuringiensis* (AF160221), *Bacillus* sp.1 (BS000001)	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

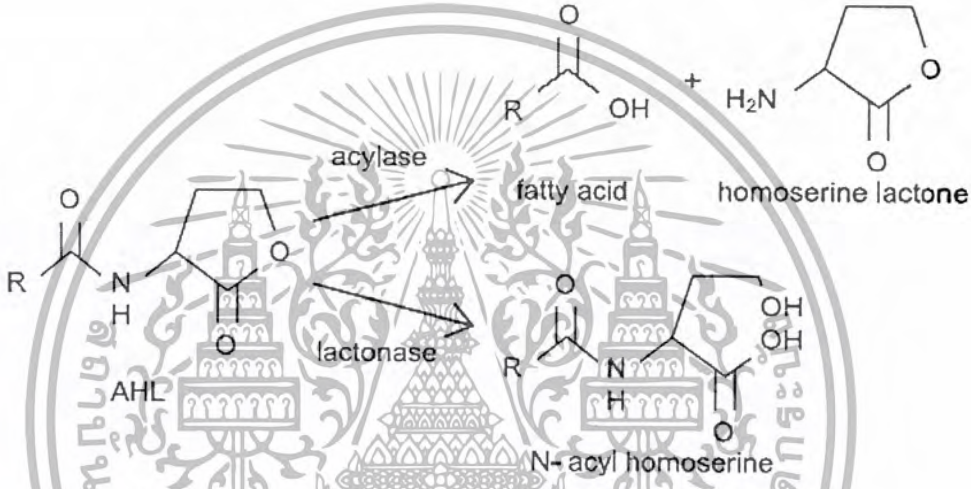
เมื่อไม่นานมานี้ มีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติเหมือนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นั่นคือ มีความสามารถในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-to-cell communication) โดยแบคทีเรียจะผลิตและปล่อยสารเคมีออกมาเพื่อส่งสัญญาณ (signal) ถึงกันและกันและร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง แบคทีเรียแกรมบวกผลิตโมเลกุลสัญญาณประเภทเปปไทด์ขนาดเล็ก (small peptide) และแบคทีเรียแกรมลบผลิตสัญญาณโมเลกุลประเภทเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (acyl-homoserine lactone, acyl-HSL) การค้นพบการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียประเภทหลังนี้ในสมัยแรกนั้นมีประโยชน์ในการศึกษาด้านนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ต่อมาภายหลังมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า การส่งสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนมีความสำคัญทั้งในด้านการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากสัญญาณดังกล่าวนี้จะมีผลในการลดระดับความรุนแรงของจุลินทรีย์ก่อโรคในคน สัตว์ หรือพาโทเจนในพืชได้

ระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) เป็นการสื่อสารระบบหนึ่งที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ และเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรีย (Fuqua *et al.*, 1994) เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของประชากรเพิ่มขึ้นจะมีการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน ซึ่งในแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) ตั้งแต่ 4 ถึง 16 คาร์บอนอะตอม และบริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่เอซิลอาจอยู่ในรูปอิ่มตัว รูปคาร์บอนิล (O) หรือรูปไฮดรอกซิล (OH) สารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนนี้อาจอยู่ในเซลล์หรือถูกขับออกนอกเซลล์ เมื่อเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ที่มีความจำเพาะ จะไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาของเชื้อที่แตกต่างกันออกไป และในที่สุดสามารถลดจำนวนประชากรของแบคทีเรียลงได้

จากความรู้จากข้างต้น ทำให้เกิดความสนใจที่จะลดปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน โดยในปี ค.ศ. 2000 Dong และคณะได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถลดสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน พบว่าแบคทีเรีย 24 สายพันธุ์มีกิจกรรมของการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนได้ในระดับต่างๆ กัน ปฏิกิริยาการย่อยสลายเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. แสดงดังรูปที่ 1.1 จากการศึกษาต่อมาพบว่าเอนไซม์นี้มีชื่อว่าเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน *aiiA* แล้วย่อยสลายวงแหวนแลคโตนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine ยีน *aiiA* นี้สามารถพบใน *Bacillus* หลายสายพันธุ์ (Dong *et al.*,2002; Lee *et al.*,2002; Dong *et al.*, 2004) โดยลำดับของกรดอะมิโนของยีน *aiiA* ใน *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ นั้นมีความคล้ายคลึงกันถึง 90 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 1.1 การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส
ที่มา: Dong *et al.*, 2000

หลักฐานที่ชี้ว่าสามารถใช้เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสในการควบคุมโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนคือ เมื่อถ่ายโอนยีน *aiiA* เข้าไปใน *Erwinia corotovora* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช และชักนำให้เกิดการแสดงออกจะสามารถลดการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชจนเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์และยับยั้งโรคเน่าในพืชได้เกือบสมบูรณ์ (Dong *et al.*, 2000)

สำหรับการศึกษาในประเทศไทยที่เกี่ยวกับการควบคุมจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์และการลดความรุนแรงของการก่อโรคในคนหรือในพืชที่เกิดจากควอรัมเซนซิงนั้น ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยในโครงงานพิเศษนี้ต้องการที่จะสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส และศึกษาสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มียีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aiiA เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสสามารถย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนได้ แต่แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้นพลาสมิดลูกผสมที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ *E.coli* เพื่อชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสในปริมาณที่สูงขึ้น และนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* ใส่ในพลาสมิด pDrive
2. ศึกษาชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มียีน *aiiA* โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับบริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน *aiiA* และมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณยีน *aiiA* ด้วยเทคนิค PCR แล้วทำการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pDrive ทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ รวมทั้งศึกษาชนิดของสายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. ที่มียีน *aiiA* โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp.
2. สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ *Bacillus* sp.
3. ออกแบบไพรเมอร์
4. เพิ่มปริมาณยีน *aiiA* โดยเทคนิค PCR
5. เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pDrive แล้วถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*
6. คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ X-gal และ IPTG
7. ทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมออกมาจากโคโลนีที่คัดเลือก และทดสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Bam*HI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR
9. ศึกษาชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
10. นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *aiiA* เพื่อนำไปใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET ทรานสฟอร์มเข้าเซลล์จุลินทรีย์ *E. coli* แล้วชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสในปริมาณสูง และสามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัย ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งทางการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และด้านอื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย

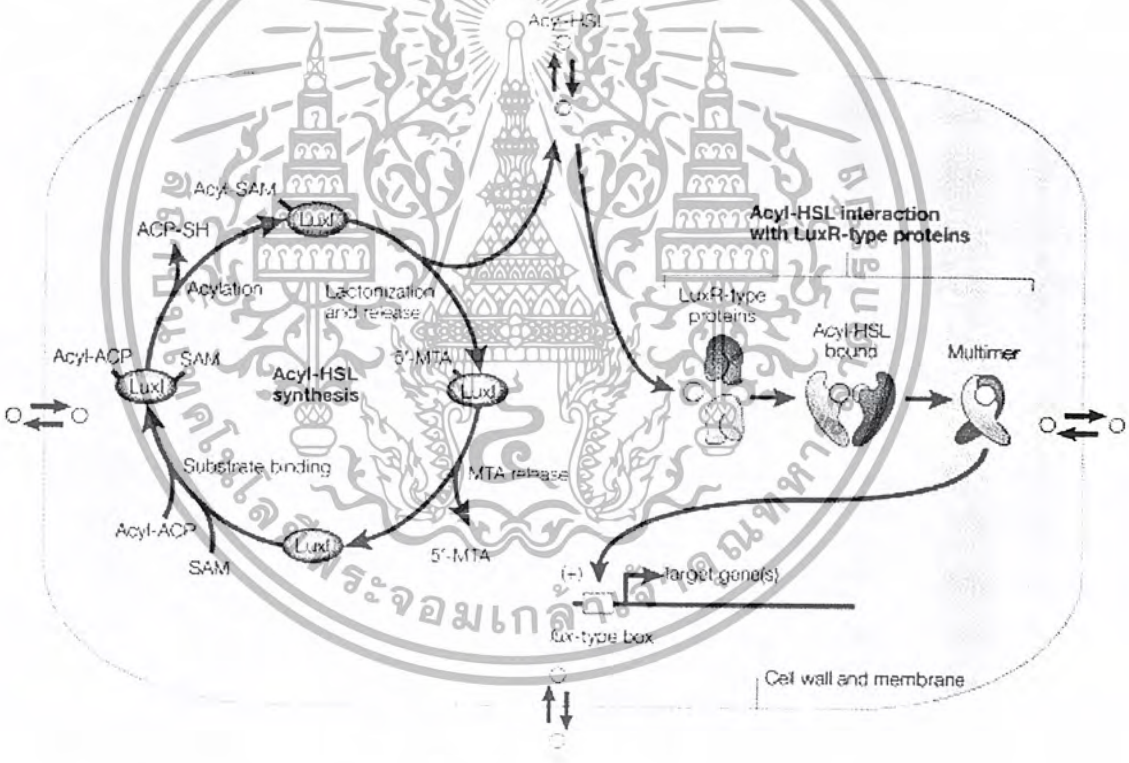
2.1.1 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

การสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งของแบคทีเรียแกรมลบที่ทราบกลไก คือ การสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) การส่งสัญญาณประเภทนี้มีกลไกการตอบสนองต่อเซลล์เฉพาะเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง (Fuqua *et al.*, 1994, Fuqua *et al.*, 1996, Salmond *et al.*, 1995, Swift *et al.*, 1996) นั่นคือเมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ถึงระดับความหนาแน่นหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นการสร้างและส่งสัญญาณโมเลกุลซึ่งก็คือสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนออกมาควบคุมประชากรของตัวเอง เพื่อให้สามารถลดประชากรลงในสภาวะอาหารจำกัด เราอาจเรียกสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer) ได้ในกรณีที่สารนี้ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งตัวเอง นอกจากนี้สัญญาณดังกล่าวอาจแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปยังเซลล์อื่นๆ โดยจะทำหน้าที่เทียบเท่ากับฮอร์โมนหรือฟีโรโมนได้ (Swift *et al.*, 1996) สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนถูกสร้างจากเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทส (acyl-HSL synthase) โดยใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน acylated acyl-carrier protein (acyl-ACP) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ในแบคทีเรียต่างชนิดนี้เองทำให้สิ่งมีชีวิตผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่แตกต่างกันโดยมีความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) ที่ไม่เท่ากัน (จำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน) หรือมีการแทนที่ (substitution) ของสายโซ่ข้าง (side chain) ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4 – 16 อะตอม และสายโซ่เอซิลที่ตำแหน่งที่ 3 อาจอยู่ในรูปอิ่มตัว รูปไฮดรอกซิล (OH) หรือรูปคาร์บอนิล (O) เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ C_4-HSL สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ ในขณะที่ $3OC_{12}$-HSL สามารถแพร่ผ่านได้เช่นกันแต่ในอัตราที่ช้ากว่า (Kaplan and Greenberg, 1985, Pearson *et al.*, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แบ่งเซลล์ และมีประชากรหนาแน่น จะเกิดการสร้างสัญญาณของเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจากโปรตีน LuxI ขึ้นมา หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ (receptor) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxR ที่จำเพาะต่อสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจะจับกับสารนั้นและทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ของยีนเป้าหมาย LuxR ประกอบด้วยสองโดเมน (domain) คือ ด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (C-terminal DNA-binding domain) สำหรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมายและด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (N-terminal acyl HSL binding domain) เมื่อ LuxR จับกับโมเลกุลสัญญาณแล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้ (รูป 2.1)



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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของงานวิจัยควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสงที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (bioluminescense) โดยขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ในแบคทีเรีย *Vibrio fischeri* และ *Vibrio harveyi* ทั้งสองสปีชีส์นี้สามารถสร้างและตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน โดยเมื่อเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนสะสมในอาหารถึงระดับหนึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade และก่อให้เกิดการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) โดย LuxI สร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนมาจับกับโปรตีนรีเซฟเตอร์ LuxR แล้วจึงกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้างของเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (*luxCDABE*) (Engebrecht *et al.*, 1983, Engebrecht and Silverman, 1984, Engebrecht and Silverman, 1987)

การศึกษากลไกการสื่อสารและการควบคุมประชากรของตัวมันเองหรือควอรัมเซนซิงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมความรุนแรงและการเจริญของเชื้อโรคในคนหรือพาโทเจนในพืช โดยปัจจุบันพบว่าระบบควอรัมเซนซิงที่ผลิตเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนนี้พบในแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ร่วมกับ host ที่เป็นพืชและสัตว์บางชนิดหรืออาจกล่าวได้ว่าเกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยทั่วไปเมื่อแบคทีเรียเข้าไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย แบคทีเรียจะเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อนั้น แต่ละเซลล์เดี่ยวที่ติดกับผิวสัมผัสจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) และขยายขนาดและหนาขึ้นกลายเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) (Costerton *et al.*, 1995, Costerton *et al.*, 1999) และเมื่อมีการเจริญสะสมมากขึ้น ทำให้ยาปฏิชีวนะต่างๆไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง มีรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนนั้น เซลล์ของแบคทีเรียจะไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ (Davies *et al.*, 1998) นั่นคือในสายพันธุ์กลายจะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัสแต่จะไม่มีการพัฒนาต่อไป ทำให้ไบโอฟิล์มที่ได้มีลักษณะแบน และเชื้อโรคสามารถถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบอีกว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนสามารถควบคุมจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้และสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลนี้จะแสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง (Pirhonen *et al.*, 1993) ดังนั้นความเข้าใจในกลไกดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรควิธีใหม่และการผลิตยาต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งไม่ฆ่าแบคทีเรียที่เป็นพาโทเจนโดยตรง หากแต่รบกวนความสามารถในการก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคโตนหรือยีนที่เกี่ยวข้องอาจนำไปสู่การควบคุมประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆในการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

2.1.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก

ระบบข้างต้นกล่าวถึงการสื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบเพื่อใช้ในการควบคุมประชากร แบคทีเรียแกรมบวกก็มีภาษาหรือการสื่อสารของตัวเองที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกสามารถตอบสนองต่อความหนาแน่นสูงของเซลล์โดยแสดงออกถึงความสามารถในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (uptake DNA) ใน *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus aureus* ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Streptococcus aureus* การสืบพันธุ์แบบคอนจูเกชันของ *Enterococcus faecalis* และการผลิตไมโครซิน (microcin) ของ *Lactobacillus sake* และ *Carnobacterium piscicola* (Novick and Muir, 1999) แบคทีเรียแกรมบวกไม่ใช้เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนเป็นสัญญาณเหมือนแบคทีเรียแกรมลบแต่จะหลั่งโมเลกุลสัญญาณประเภทโอลิโกเปปไทด์ออกมา โมเลกุลสัญญาณนี้จะไม่ถูกส่งไปยังภายนอกเซลล์โดยตรง แต่จะจับกับโปรตีนขนส่งประเภท ABC (ATP-binding cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโอลิโกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กลงและจึงถูกส่งผ่านออกนอกเซลล์ เปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติหรือฟีโรโมน โดยจะถูกจดจำจากโปรตีนเซนเซอร์สำหรับไคเนสที่เซลล์เมมเบรนเซนเซอร์ที่ได้รับเปปไทด์สัญญาณนี้จะเร่งปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตด้วยตัวเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทีดีนและเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุมบริเวณกรดอะมิโนแอสปาร์เทต โปรตีนนี้อาจจะกระตุ้นหรืออาจยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น ดังนั้นขบวนการขนส่งสัญญาณหรือการสื่อสารที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียแกรมบวกจึงจัดเป็นแบบ phosphorylase cascade โดยเรียกการควบคุมประชากรของเซลล์ด้วยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้ว่าเปปไทด์ควอรัมเซนซิง (peptide quorum sensing) (Novickand Muir, 1999, Kleerebezem *et al.*, 1997)

2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิง

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารประเภทควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบนั้นประกอบด้วยยีน 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ ยีนในกลุ่ม *aiiA*, *luxI* และ *luxR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ยีนในกลุ่ม *aiiA*

ยีนในกลุ่ม *aiiA* ประกอบด้วยจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 750-800 ตัว สามารถถอดรหัสออกมาได้เป็นกรดอะมิโน 250-270 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 28 กิโลดาลตัน โปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *aiiA* นี้คือเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส ซึ่งจะไม่หลั่งออกมานอกเซลล์ เนื่องจากสายโปรตีนด้านปลาย N ไม่มีคุณสมบัติ hydrophobic และจัดได้ว่าเป็น metalloenzyme เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสสามารถย่อยสลายวงแหวนแลคโตนของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนได้ ทำให้เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนมีปริมาณลดลง

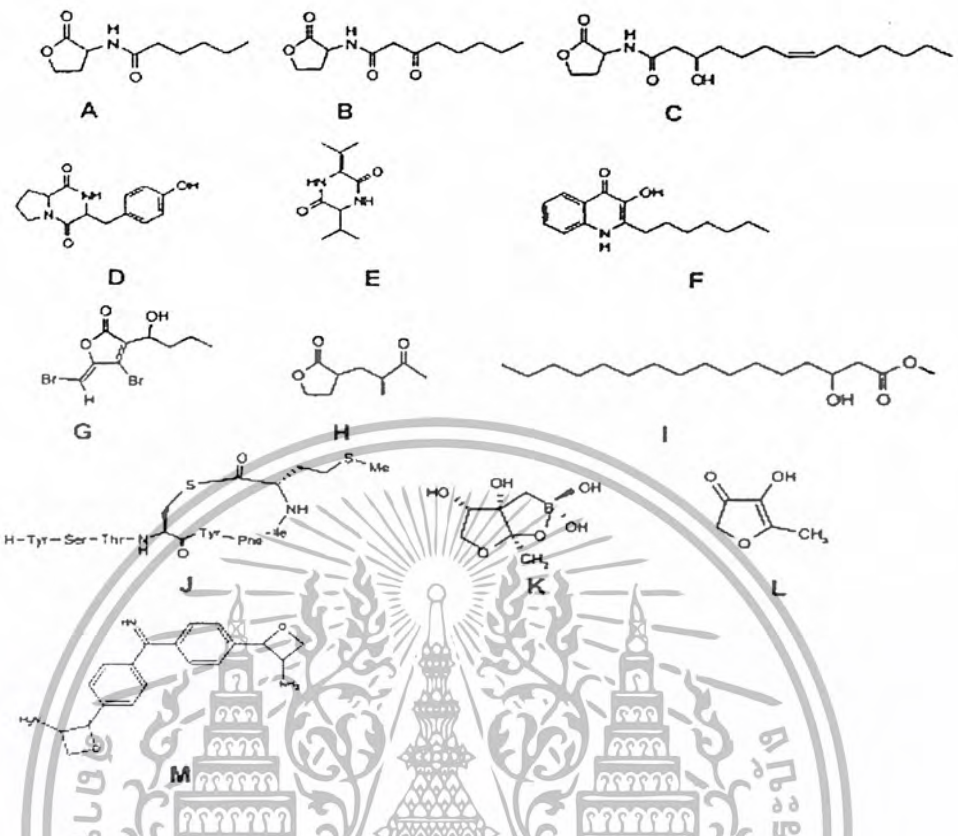
2.2.2 ยีนในกลุ่ม *luxI*

luxI เป็นยีนที่ถอดและแปรรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทส โดยยีน *luxI* ที่แตกต่างกันจะทำให้มีการสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่แตกต่างกัน และมีความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl-side chain) ที่ไม่เท่ากัน (จำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน) หรือมีการแทนที่ของสายโซ่ข้าง (side chain) ที่แตกต่างกันทำให้ได้สัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะขึ้น สายโซ่เอซิลของสัญญาณสามารถอยู่ในรูปอิ่มตัว และสามารถมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และสายโซ่เอซิลสามารถมีความยาวได้ 4-16 คาร์บอนอะตอม (รูปที่ 2.2) (Fuqua et al., 1996)

2.2.3 ยีนในกลุ่ม *luxR*

luxR เป็นยีนของตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างของสารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน

(A–C) ตัวอย่างเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของจุลินทรีย์ซึ่งไม่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (A) *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone หรือ C_6-HSL (B) *N*-(3-oxooctanoyl)-L- homoserine lactone หรือ 3O,C_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(ΔAla-L-Val) (F) 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolone หรือ PQS ผลิตโดย *P. aeruginosa* (G) 4-Bromo-5-(bromomethylene)-3-(1'-hydroxybutyl)-2(5*H*)-furanone ของ *D. pulchra* (H) γ-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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

2.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (www.school.net.th/library/snet4/cell/cloning.html)

การเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ขนาดตามที่ต้องการจำเป็นต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัด-จำเพาะ (restriction endonuclease) ซึ่งสามารถตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะเพื่อให้ได้ปลายที่เหมาะสมตามต้องการ

เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้สามารถแยกตามลักษณะการตัดได้เป็น 2 ประเภทคือ เอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอได้ปลายเหนียวหรือปลายที่มีดีเอ็นเอ 1 สายยื่นออกมา (cohesive ends หรือ sticky ends) เช่น *Hind* III (รูปที่ 2.3) และเอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอตรงกลางตำแหน่งที่จำเพาะได้ปลายทู่หรือปลายตัดตรง (blunt ends) เช่น *Hpa* I (รูปที่ 2.3)

รูปที่ 2.3 รูปแบบการตัดของ restriction endonuclease

ที่มา : http://bio.kaist.ac.kr

2.3.2 การเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับเวกเตอร์ (vector) (วัฒนาลัย และสรวง, 2536)

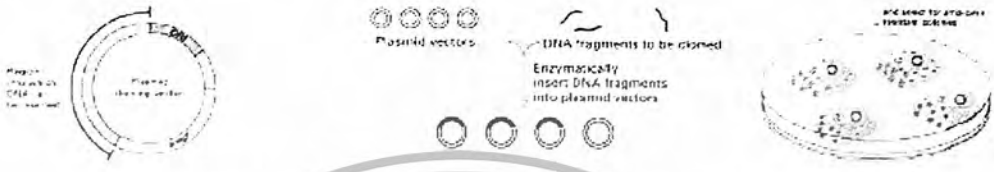
เวกเตอร์ คือดีเอ็นเอซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เพื่อเพิ่มจำนวน คุณสมบัติที่สำคัญของเวกเตอร์ (รูปที่ 2.4) คือมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

1. Origin of replication คือ มีบริเวณของดีเอ็นเอที่สามารถเริ่มต้นเพิ่มจำนวนสร้างดีเอ็นเอใหม่ของเวกเตอร์ ได้ในเซลล์เจ้าบ้าน

2. Multiple restriction site (polylinker site) คือ มีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Antibiotic resistance marker (selectable marker) คือ ยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ใช้เป็น marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านหรือแบคทีเรียที่มีหรือไม่มีดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) อยู่



รูปที่ 2.4 คุณสมบัติของ เวกเตอร์ พลาสมิดในการโคลนยีน (gene cloning)

ที่มา : http://bio.kaist.ac.kr

เวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) มีหลายชนิด เช่น พลาสมิด (plasmid) แบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) คอสมิด (cosmid) หรือลูกผสมของพลาสมิดและแบคเทอริโอฟาจ เวกเตอร์ที่นิยมใช้เป็นเวกเตอร์ซึ่งสามารถรับชิ้น ส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็กน้อยกว่า 10 กิโลเบส (kb) โดยพลาสมิดจะเป็น circular extrachromosomal DNA ที่มีการแบ่งตัวอย่างอิสระไม่ขึ้นกับ chromosomal DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน มีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตนเองในแบคทีเรีย มีตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) หลายชนิดที่มีตำแหน่งตัดเพียงอย่างละ 1 ตำแหน่ง มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ซึ่งช่วยในการนำเข้าสู่เซลล์และสามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้พลาสมิดมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น ampicillin tetracycline หรือ chloramphenicol ซึ่งเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5′ กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3′ ปฏิกิริยาการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ไลเกส (ligase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และพบว่ามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ i และ j

i คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอทั้งหมด โดยหมายความถึงทั้งปลาย 5′ และปลาย 3′ ของ ดีเอ็นเอทุกโมเลกุลในปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

j คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอปลายหนึ่งๆ (5′ หรือ 3′) เฉพาะที่อยู่ใกล้กับปลายตรงข้าม (3′ หรือ 5′) ของโมเลกุลเดียวกัน ค่า i จึงเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอ ยิ่งโมเลกุลดีเอ็นเอยาวมากขึ้นเท่าใดก็ทำให้ปลายทั้งสองมีโอกาสเข้าใกล้กันน้อยลงเท่านั้น นอกจากนี้ค่า j ยังเป็นค่าคงที่เฉพาะสำหรับโมเลกุลหนึ่งๆ และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยานั้น

โดยทฤษฎีแล้ว สามารถใช้ค่า i และ j เข้าช่วยในการคาดคะเนถึงผลที่ควรจะได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกิริยา กล่าวคือ

เมื่อ i = j (j/i = 1) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองเป็นโมเลกุลวงกลมมีสูงเท่าๆกับโอกาสที่มีโมเลกุลดีเอ็นเอทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมกันเป็นสายตรง

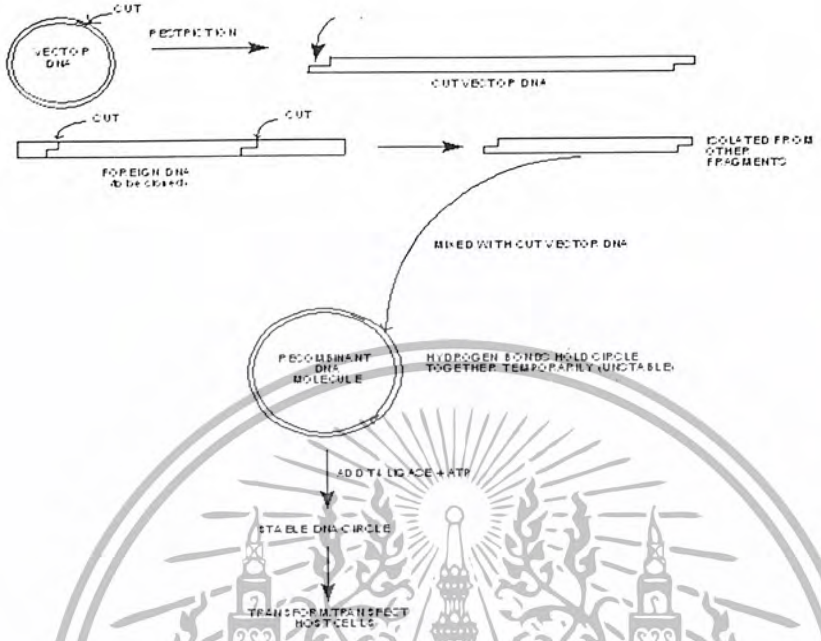
เมื่อ i > j (j/i > 1) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองมีมากกว่า

เมื่อi < j (j/i < 1) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมต่อเป็นเส้นตรงมีมากกว่า

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เป็นการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย จะต้องคำนึงถึงค่า i และ j ของทั้งเวกเตอร์และดีเอ็นเอนั้นๆ โดยทั่วไปค่า i ต้องสูงกว่าค่า j ราว 2 หรือ 3 เท่า และความเข้มข้นของเวกเตอร์ประมาณ 2 เท่า จึงจะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมที่คาดหวังไว้ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติ การคำนวณค่า i และ j ไม่ใช่เรื่องง่ายเสมอไป เพราะบ่อยครั้งที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีอยู่น้อยเกินกว่าจะวัดปริมาณได้แน่นอน นอกจากนั้นเป็นไปได้ว่าในการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อมาเชื่อมต่ออาจทำให้ปลายดีเอ็นเอนั้นชำรุด ไม่สมบรูณ์พอที่จะเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอได้ถูกต้อง

ฉะนั้นสำหรับการเชื่อมต่อโดยทั่วไป จึงมักคะเนให้ความเข้มข้นของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมีอัตราส่วนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 หรืออีกนัยหนึ่งก็คือใช้เวกเตอร์ในปริมาณเท่ากับหรือน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูป 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

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

2.3.3 ตัวพาหะในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (สุรินทร์, 2545)

ดีเอ็นเอพาหะ (vecter) ที่ใช้ในงานพันธุวิศวกรรมต้องมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนได้เองในเซลล์เจ้าบ้าน ตัวพาหะเหล่านี้ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และ คอสมิด (cosmid) การเลือกใช้พาหะชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอที่สนใจ กล่าวคือถ้าดีเอ็นเอที่สนใจมีขนาดประมาณ 5, 22 และ 40 กิโลเบส จะนิยมใช้พลาสมิด ฟาจ และคอสมิดเป็นตัวพาดีเอ็นเอชนิดนั้นๆ ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอที่สนใจเมื่อทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจกับพาหะที่ใช้

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่พันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoil) มีขนาดตั้งแต่หนึ่งพันคู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส หรือประมาณร้อยละ 0.2-4 ของโครโมโซม พลาสมิดจะมียีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ อย่างไรก็ตาม พลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์แบคทีเรีย ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียหนึ่งๆ โดยธรรมชาติการถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาสมิดนั้นจะเกิดขึ้นโดยกระบวนการคล้ายการคอนจูเกชัน (conjugation) นั่นเอง พลาสมิดบางชนิดมีความสามารถในการส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้เรียกว่า conjugative หรือ self transmissible plasmid เนื่องจากในพลาสมิดมียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายชิ้นพลาสมิดนั้น คือ ยีน *tra* (transfer) อยู่ พลาสมิดบางชนิดไม่มียีน *tra* อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่ง ทำให้ไม่สามารถส่งพลาสมิดจากเซลล์เดิมไปสู่เซลล์ใหม่ได้ จัดเป็น non conjugative plasmid คือ ขาดคุณสมบัติการเป็น self transmissible พลาสมิดกลุ่มหลังนี้จะส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่โดยการที่ทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอาดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปโดยการทรานฟอร์มเมชัน (transformation) การเลือกพลาสมิดให้เหมาะสมกับดีเอ็นเอที่สนใจ ควรจะคำนึงถึงหลัก 2 ประการดังนี้

1. พลาสมิดถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอที่สนใจจึงสามารถสร้างเป็นดีเอ็นเอลูกผสมได้

2. พิจารณาคุณสมบัติในการดื้อยาของพลาสมิด โดยเฉพาะยีนที่แสดงคุณสมบัตินี้สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดดีเอ็นเอที่สนใจ

2.3.4 การทรานฟอร์มเมชัน (transformation)

การทรานฟอร์มเมชัน (transformation) เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรองรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้งานด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ เป็นต้น การเตรียม competent cell อาจมีวิธีการแตกต่างกันได้ แต่สำหรับการทรานฟอร์ม competent cell ด้วยพลาสมิดนั้นจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือใช้แคทไอออนมาทำให้เซลล์แบคทีเรียมีช่องว่าง และใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ และยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) (พรงาม, 2541)

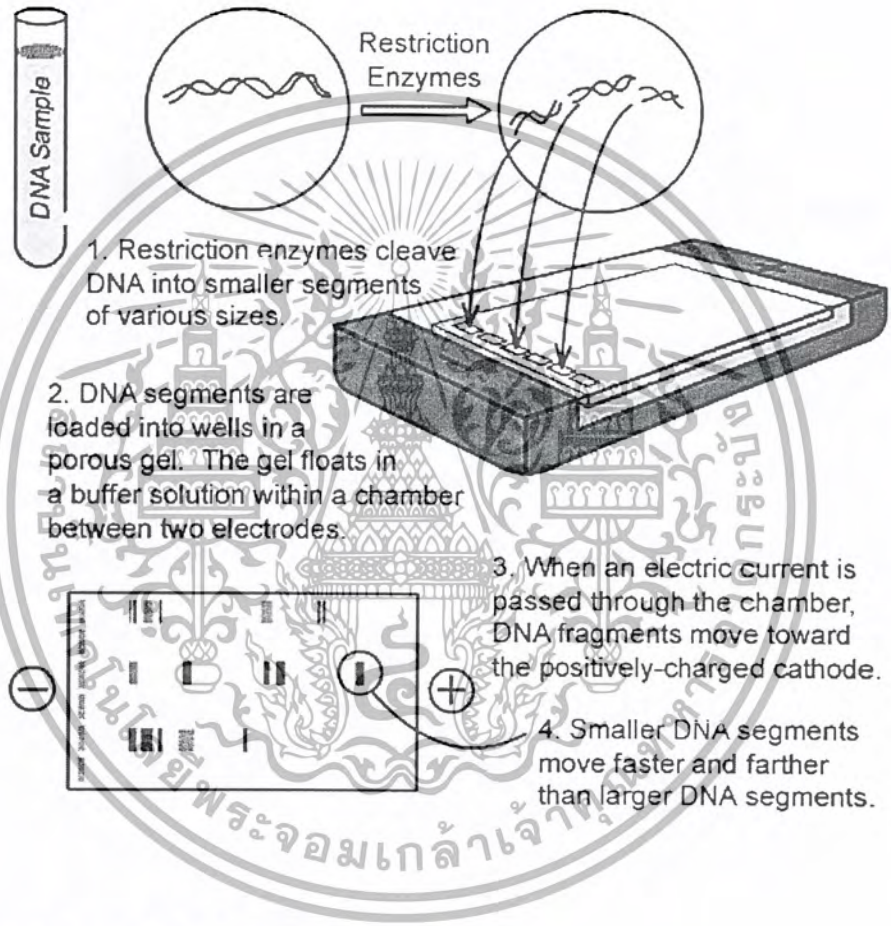
การตรวจหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ทำได้โดยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ขั้นตอนแรกคือการตัดดีเอ็นเอให้เป็นเส้นตรง แล้วทำการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้วบนเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส โดยทั่วไปเวกเตอร์ที่ใช้จะทราบขนาดแล้ว ดังนั้นขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่จึงทราบได้จากขนาดที่ได้ของเวกเตอร์ลูกผสม (recombinant vector) ลบด้วยขนาดของเวกเตอร์ที่ใช้ หรือทำการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ในเวกเตอร์ลูกผสมออกมาก่อนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจึงหาขนาดของดีเอ็นเอจากเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสแล้วเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ซึ่งทราบขนาดมาก่อน

หลักการของอิเล็คโตรโฟเรซิส (รูปที่ 2.6) คือ การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่างโดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าก็จะถูกแรงเคลื่อนไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไปควรใช้อะกาโรสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เช่น อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ใช้แยกกรดนิวคลีอิกที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโลดาลตัน สำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ (horizontal gel electrophoresis) ในขณะที่โพลีอะคริลาไมด์เจลจะต้องทำในแนวตั้ง (vertial gel electrophoresis) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ คือ ขนาด รูปร่างของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของเจลที่ใช้ กล่าวคือ ถ้าชิ้นดีเอ็นเอใหญ่จะผ่านตัวกลางหรือเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก เป็นผลให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกล ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงเกลียว (supercoiled DNA) มักจะเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ดีกว่าดีเอ็นเอรูปร่างอื่นๆ รองลงมาคือดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นเส้น และดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นวง เจลที่มีความเข้มข้นสูงๆจะมีช่องว่างภายในเนื้อเจลน้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หลังจากที่แยกดีเอ็นเอออกมาเป็นแถบบนอะกาโรสเจลโดยใช้เทคนิคของอิเล็คโตรโฟเรซิสแล้วดีเอ็นเอสายคู่จะถูกย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โครงสร้างของเอทิเดียมโบรไมด์เป็นอะโรมาติกแคทไอออนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกัน แล้วจะให้ฟลูออเรสเซนส์ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต การย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์สามารถตรวจสอบดีเอ็น-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้ สำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามารถให้ฟลูออเรสเซนส์เมื่อย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เช่นกัน แต่จะมีความไวน้อยกว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ นอกจากนี้ยังมีสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เช่น อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) หรือ โพรฟลาวิน (proflavin) และในปัจจุบันได้มีการใช้สีย้อมที่มีความเป็นอันตรายน้อยกว่าสีย้อมในอดีต ได้แก่ เจลสตาร์



รูปที่ 2.6 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

ที่มา : http://accessexcellence.org/AB/GC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61821

2.3.6 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

(www.school.net.th/library/snet4/genetic/pcr.html)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสคือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน การสร้างดีเอ็นเอติดตาม และการวิจัยประยุกต์ต่างๆ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน เป็นต้น

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้นสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมี 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

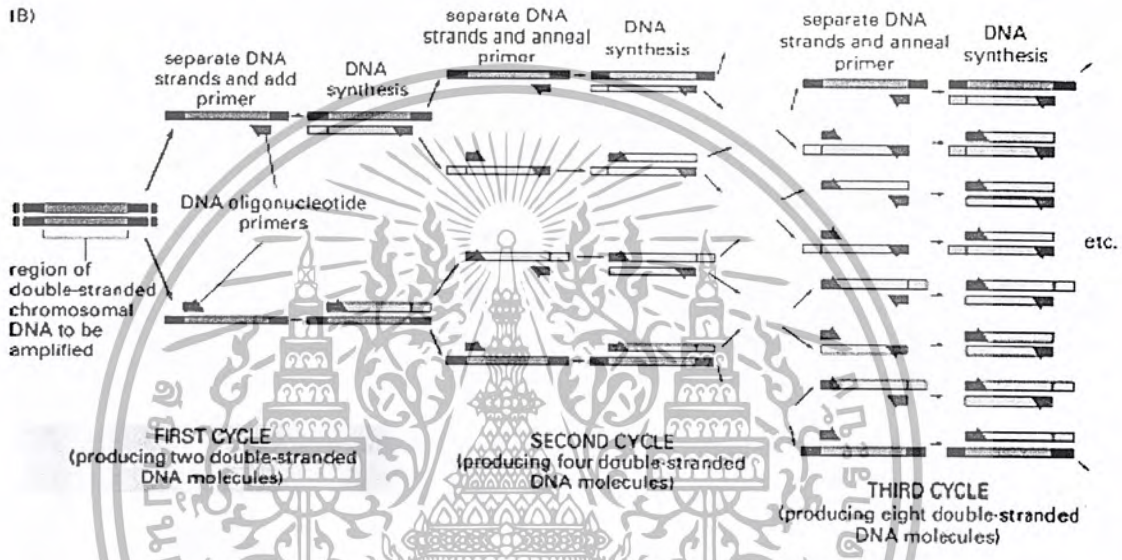
ขั้นแรก เรียกว่า denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า ตัวอย่างแสดงปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่เกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่งมีปริมาณน้อยในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นเป็นทวีคูณ

ที่มา : http://accessexcellence.org/AB/GC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

3.1.1 *Bacillus* sp. 1, 2 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.มงคล อุดมโท ศูนย์พันธุ-วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.1.2 *Bacillus* sp. 3 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.3 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (*supE*44 Δ*lac*U169 (ϕ80*lacZ*ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1)

3.1.4 pDrive Cloning Vector (Qiagen, Germany)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 Luria-Bertani medium (LB) (ภาคผนวก 1)

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

3.2.2.1 กานามัยซิน (kanamycin)

3.2.3 เอนไซม์

3.2.3.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Promega, USA)

3.2.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Promega, USA)

3.2.3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (Promega, USA)

3.2.3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Promega, USA)

3.2.3.5 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.4.1 ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (ขนาด 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 , 23,130 คู่เบส) (Promega, USA)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.2.5.1 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.2.5.2 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 8.0 (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 5 มิลลิโมลาร์)

3.2.5.3 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

3.2.5.4 ฟีนอลอิ่มตัว

3.2.5.5 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamylalcohol) 25 ต่อ 24 ต่อ1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

3.2.5.6 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.2.5.7 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.2.5.8 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.2.5.9 อะกาโรส (Agarose)

3.2.5.10 บัฟเฟอร์ TBE 10เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

3.2.5.11 กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ (86% glycerol)

3.2.5.12 เจลสตาร์ (Gel star) (Cambrix Bio Science Rockland, USA)

3.2.5.13 สีย้อม DNA (Tracking dye)

3.2.5.14 บัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ buffer) (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์)

3.2.5.15 สารละลายที่ 1 (สารละลายกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์)

3.2.5.16 สารละลายที่ 2 (NaOH 0.2 มิลลิโมลาร์, SDS 1 เปอร์เซ็นต์)

3.2.5.17 สารละลายที่ 3 (CH_3COOK 5 มิลลิโมลาร์, glacial acetic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.18 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galactosidase) (Promega, USA)

3.2.5.19 IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) (Promega, USA)

3.2.5.20 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 2 มิลลิโมลาร์

3.2.5.21 ไลโซไซม์ (lysozyme)

3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.6.1 ชุด QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany)

3.2.7 อุปกรณ์

3.2.7.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น autoclave-325 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.7.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortech รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี

3.2.7.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี

3.2.7.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

3.2.7.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น

3.2.7.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipments) บริษัท Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน

3.2.7.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น Bts-20.M ประเทศเยอรมนี

3.2.7.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (thermoblock) บริษัท Biosan รุ่น TDB-120 Thermostat ประเทศเยอรมนี

3.2.7.12 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7.13 เครื่องแก้ว (Glasswares)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 ตัวอย่างมา streak ลงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจากอาหารแข็งมาลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้มาแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 500 ไมโครลิตรและทำการเติมกลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ ลงไปหลอดละ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังวิธีการในข้อ 3.3.1 แล้วนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์มาเทลงในหลอดทดลอง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง เทสารละลายเซลล์ลงไปใหม่ ปั่นเหวี่ยงซ้ำ กระจายเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 450 ไมโครลิตรที่มี lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวมาทำการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัวจนมองไม่เห็นตะกอนสีขาวระหว่างชั้นของฟีนอลกับชั้นของน้ำ ปิเปตส่วนใสปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองใหม่ แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

500 ไมโครลิตร และนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดทดลองแล้วตากตะกอนให้แห้ง ปิเปตบัฟเฟอร์ Tris- EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์ RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย ฟีนอลอิ่มตัว ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ สกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอล 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 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE buffer) 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ (microwave) แล้วปล่อยให้อะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมเจลสตาร์ 1 ส่วนต่อ อะกาโรส 100 ส่วน และเทใส่แม่พิมพ์ทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ใส่ในอ่าง (chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) หลังจากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นเจลที่เตรียมไว้โดยทำการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ถ่ายรูปแผ่นเจลและคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *aiiA*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส (*aiiA*) จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ชนิดต่างๆ ทำการ multiple alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์จาก anticodon ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ก่อนบริเวณของยีน *aiiA* ด้านปลาย 5′ ให้มีบริเวณที่สามารถจดจำได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่หลังบริเวณยีน *aiiA* ด้านปลาย 3′ ให้มีบริเวณที่สามารถจดจำได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII โดยให้ชื่อไพรเมอร์ว่า AiiA1 และ AiiA2 ตามลำดับ

3.3.5 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *aiiA* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

PCR (Polymerase Chain Reaction) คือเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจศึกษา โดยในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ AiiA1 และไพรเมอร์ AiiA2 ซึ่งได้ทำการออกแบบมาตามวิธีการข้างต้นแล้ว และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน *aiiA*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10 เท่าของ PCR Buffer	5
10 มิลลิโมลาร์ dNTPs	1
5 มิลลิโมลาร์ AiiA1 primer	2.5
5 มิลลิโมลาร์ AiiA2 primer	2.5
25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์	3
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	33.5
ปริมาตรสุทธิ	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	7 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30รอบ
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสดังวิธีการตามหัวข้อ 3.3.3

3.3.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

เมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิสแล้ว ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด โดยกลับหลอดทุก 2 นาที หลังจากที่เจลละลายหมด ปิเปตสารละลายเจลครั้งละ 700 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง แล้วปิเปตสารละลายเจลลงไปใหม่ ทำซ้ำจนสารละลายเจลหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ก้นหลอดทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ปิเปตบัฟเฟอร์ EB ลงไป 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส และนำสารละลายเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* กับพลาสมิด (Ligation)

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* (16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	6
2 เท่าของบัฟเฟอร์ ligation	7
ปริมาตรสุทธิ	14

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.3.8 การเตรียม competent cell และการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)

การเตรียม competent cell ทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* DH5α มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาขยายปริมาณโดยการนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความขุ่นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม ทำการบ่มเซลล์บนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์โดยนำเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตรและ กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์ได้เป็น competent cell

การทรานสฟอร์มเมชันทำได้โดยการนำพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแล้วมาทรานสฟอร์มใน competent cell โดยใช้พลาสมิด pDrive ที่มีชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เป็น Positive control และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็น Negative control ปิเปต competent cell 100 ไมโครลิตร และพลาสมิด 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เย็น แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำมาเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการพลิกหลอดทดลองไปมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตออกมา 100 ไมโครลิตร มาทำเทคนิค spread plate ลงบนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 3 ซ้ำโดยเทียบกับตัวควบคุม

3.3.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคโลนีที่ได้จากหัวข้อ 3.3.8 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปิเปตเชื้อ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนใส เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ออกจากกัน เติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ เติมเอทธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใส บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ตากหลอดจนกระทั่งแห้ง ละลายพลาสมิดดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.3.10 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.3.9 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Bam*HI โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการตัดแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส แล้วเก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Bam*HI

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ	2
เอนไซม์ *Hin*dIII (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
เอนไซม์ *Bam*HI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
10 เท่าของบัฟเฟอร์ K	1
ปริมาตรสุทธิ	10

3.3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7

3.3.12 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

3.3.12.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.2 ที่ทราบความเข้มข้นแล้วโดยการทำเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสตามหัวข้อที่ 3.3.3 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.4 และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	7 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30รอบ
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10 เท่าของ PCR Buffer	5
10 มิลลิโมลาร์ dNTPs	1
5 มิลลิโมลาร์ forward primer	2.5
5 มิลลิโมลาร์ reverse primer	2.5
25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์	3
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	33.5
ปริมาตรสุทธิ	50

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสดังวิธีการตามหัวข้อ 3.3.3 แล้วทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ดังวิธีการในข้อ 3.3.6

3.3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ FDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ใน *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสของ *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.2 และ *Bacillus* sp.3 สามารถทำได้โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.2 และ *Bacillus* sp.3 มาเพิ่มปริมาณยีน *aiiA* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีบริเวณที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำโคโลนีมาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทดสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII นำพลาสมิดลูกผสมมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พลาสมิดลูกผสมที่ได้สามารถนำไปตัดต่อเพื่อนำยีน *aiiA* ไปใส่ในพลาสมิดแสดงออก pET สำหรับการผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสในปริมาณสูงต่อไปในอนาคต

4.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเหลว LB เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจึงทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยทำการแตกเซลล์ด้วยเอนไซม์ lysozyme แล้วตกตะกอนโปรตีนเพื่อแยกโปรตีนออกจากจีโนมิกดีเอ็นเอและย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำอะกาโรสไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ปรากฏแถบเพียงแถบเดียวเหนือระดับของแถบชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ที่มีขนาด 23,130 คู่เบส (รูปที่ 4.1) ความเข้มของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.1) จากการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีปริมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่มีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเออื่นๆ จึงปรากฏแถบเดียว นอกจากนั้นจีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ อยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23,130 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณสูง เนื่องจากในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอมีการนำเอนไซม์ lysozyme มาใช้ในการแตกเซลล์เพื่อให้ได้เป็นสารละลายของจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยการใช้สารละลายฟีนอลอิ่มตัว ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ดีในการแยกโปรตีนออกจากสารละลายของจีโนมิกดีเอ็นเอ และทำการกำจัดส่วนของอาร์เอ็นเอออกโดยการใช้เอนไซม์ RNase ทำให้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.1

2 จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.2

3 จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *aiiA*

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *aiiA* เริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *aiiA* ใน *Bacillus* sp., *Bacillus thuringiensis, Bacillus cereus* ที่มีรายงานในข้อมูลของธนาคารยีนมาเปรียบเทียบกัน พบว่าใน *Bacillus* sp. และ *Bacillus thuringiensis* มีบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อน translation start และหลัง translation stop ของยีน *aiiA* (รูปที่ 4.2) จึงคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 บริเวณมาทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์บางตัวให้มีบริเวณที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR สามารถโคลนเข้าสู่พลาสมิดเพื่อการแสดงออกได้ ซึ่งจากการออกแบบไพรเมอร์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer ด้านปลาย 5' ที่มีบริเวณที่สามารถจดจำได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

5'-TCGGATCCATGACAGTAAAGAAACTTTATTTC-3'

(*Bam*HI)

ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า AiiA1 (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่หน้าลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของยีน *aiiA* (start codon) อยู่ 8 คู่เบส

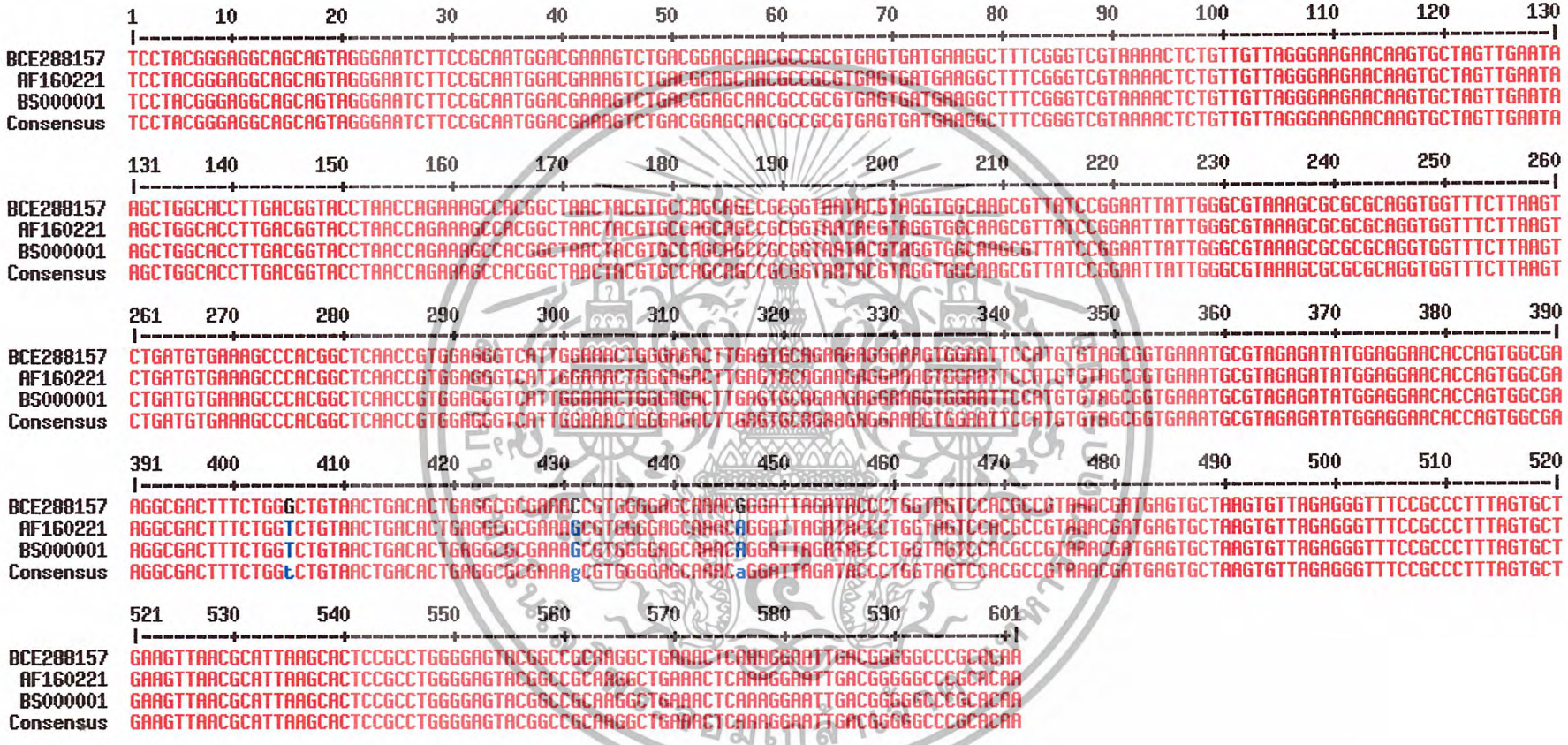
ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reverse primer ด้านปลาย 3' ที่มีบริเวณสามารถจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

5'-GCAAGCTTGCTATATATCTTCAGGGAACAC-3'

(*Hin*dIII)

ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า AiiA2 (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่หลังลำดับนิวคลีโอไทด์สุดท้ายของยีน a*iiA* (stop codon) อยู่ 9 คู่เบส หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองด้านไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ของ *Bacillus* sp. ทั้งสามสายพันธุ์ โดยคาดว่าจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus cereus* (BCE288157), *Bacillus thuringiensis* (AF160221) และ *Bacillus* sp.1 (BS000001) ตัวอักษรสีแดง สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ

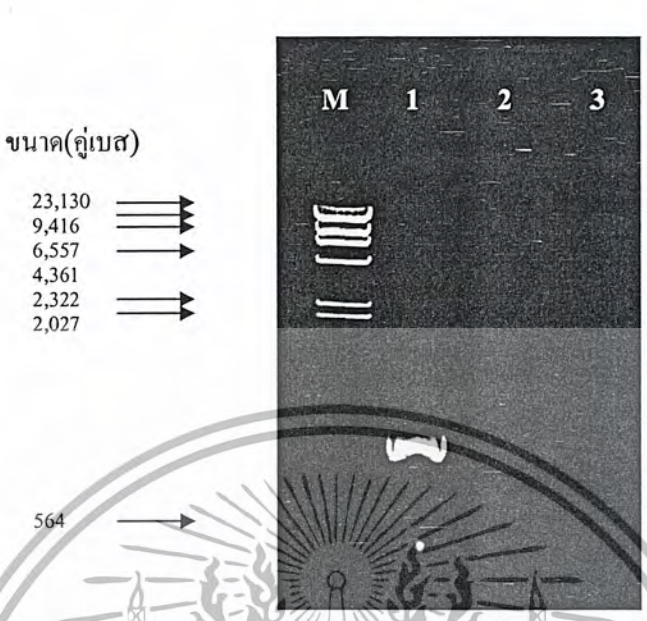
4.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรวมทั้งไพรเมอร์ AiiA1 และ AiiA2 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal cycle) นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับขนาดดีเอ็นเอมาตราฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เฉพาะจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จาก *Bacillus sp.*1 ซึ่งมีแถบเดียวอยู่บริเวณที่ตำแหน่งสูงกว่าแถบของชิ้นดีเอ็นเอมาตราฐานที่มีขนาด 564 คู่เบส (รูปที่ 4.3) ซึ่งตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับ 800 คู่เบส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่มียีน *aiiA* จะพบเพียงไม่กี่สายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เท่านั้นที่มียีน *aiiA* โดยมีรายงานการพบยีน *aiiA* ใน *Bacillus thuringiensis* (Lee *et al.*, 2002) และ *Bacillus cereus* (Leadbetter and Greenberg, 2000) แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จะมีความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมโดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยากต่อการจัดจำแนกออกจากกันโดยดูจากลักษณะภายนอก ภายหลังจากทำการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR แล้วจะทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) ต่อไป

4.2 การศึกษาการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด pDrive

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิด pDrive จากนั้นทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทำการตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.1

2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.2

3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.3

4.2.1 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของยีน *aiiA* ให้บริสุทธิ์

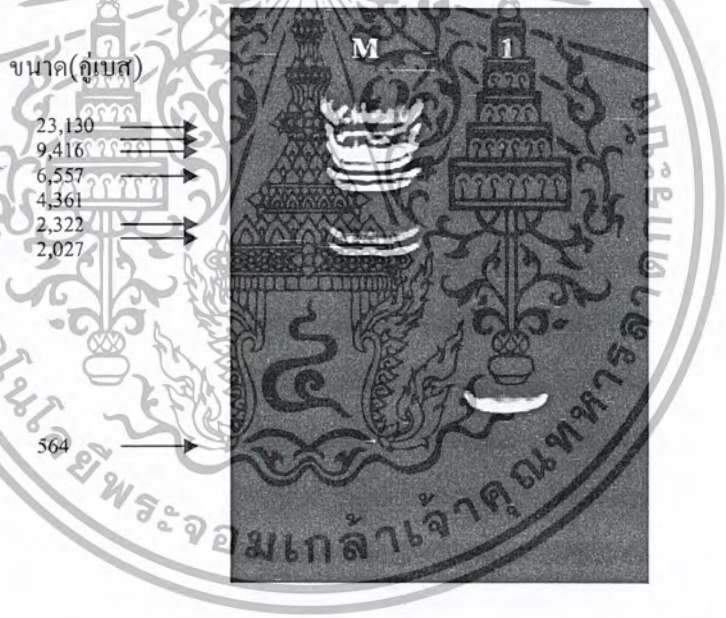
หลังจากทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *aiiA* ของ *Bacillus* sp.1 ก่อนจะนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปใช้ในการโคลนยีนต่อไป จะต้องมีการกำจัดสารเคมีปนเปื้อนจากการทำปฏิกิริยา PCR และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์โดยการใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของดีเอ็นเอจากยีนบริเวณ *aiiA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของยีนบริเวณ *aiiA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นปรากฏแถบ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.4) เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีปริมาณดีเอ็นเอ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณลดลงจากเดิม 68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของดีเอ็นเอจากยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ *aiiA* ให้บริสุทธิ์ เพื่อที่จะนำชิ้นดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *aiiA* นี้ไปทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ต่อไป

4.2.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ AiiA1 และ AiiA2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่งมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ปริมาณ 16 นาโนกรัม มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ปริมาณ 50 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พลาสมิดลูกผสมที่ได้ คือพลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 800 คู่เบส หลังจากนั้นจะทำการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α ต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ *aiiA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบริเวณ *aiiA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.2.3 การทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α

จากการนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ AiiA1 และ AiiA2 กับพลาสมิด pDrive มาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม จากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวเนื่องจากเวกเตอร์ pDrive มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งมีบริเวณ multiple cloning site อยู่บนยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ (α peptide) ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site ยีนดังกล่าวจะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินได้ จากการทรานสฟอร์มเมชันได้คัดเลือกโคโลนีสีขาว 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.2.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

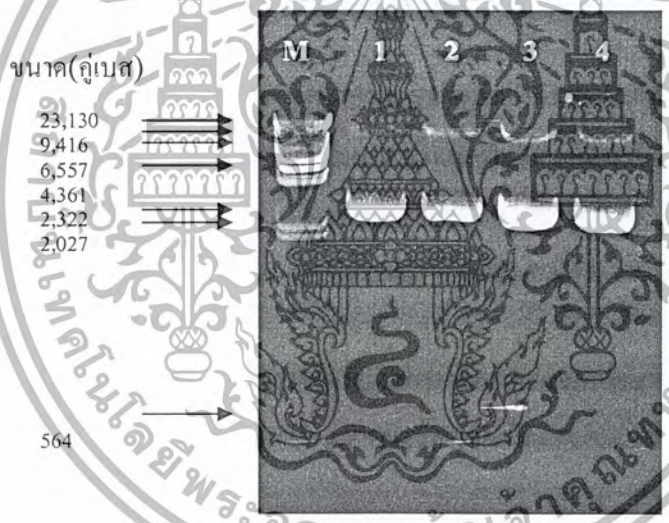
จากการนำโคโลนีจำนวน 4 โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis ตั้งชื่อพลาสมิดว่า pAiiA1.1, pAiiA1.2, pAiiA1.3 และ pAiiA1.4 นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตราฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าพลาสมิด pAiiA1.1, pAiiA1.2, pAiiA1.3 และ pAiiA1.4 มีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส (รูปที่ 4.5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pAiiA1.1, pAiiA1.2, pAiiA1.3 และ pAiiA1.4 มีความเหมือนกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกพลาสมิด pAiiA1.1 เป็นตัวแทนของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เพื่อทำการทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมต่อไป

4.2.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pAiiA1.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เพื่อทำการทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบระหว่างขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hin*dIII กับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เชื่อมเข้าไป พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมิดดีเอ็นเอ pAiiA1.1 ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสมดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เชื่อมอยู่ภายในพลาสมิด ส่วนพลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 3,800 คู่เบส และ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.6) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,800 คู่เบสเป็นแถบของพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 800 คู่เบส ที่ทำการเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด pDrive จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตัดพลาสมิด pAiiA1.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และพลาสมิดดีเอ็นเอ pAiiA1.1 มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการจึงทำการคัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pAiiA1.1 มาวิเคราะห์สำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

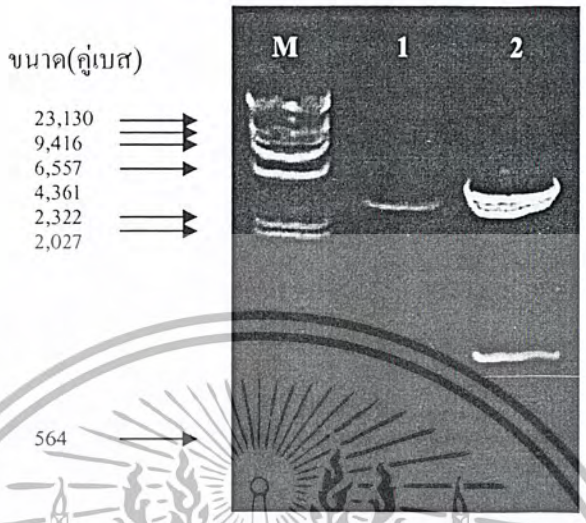
1 พลาสมิด pAiiA1.1

2 พลาสมิด pAiiA1.2

3 พลาสมิด pAiiA1.3

4 พลาสมิด pAiiA1.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

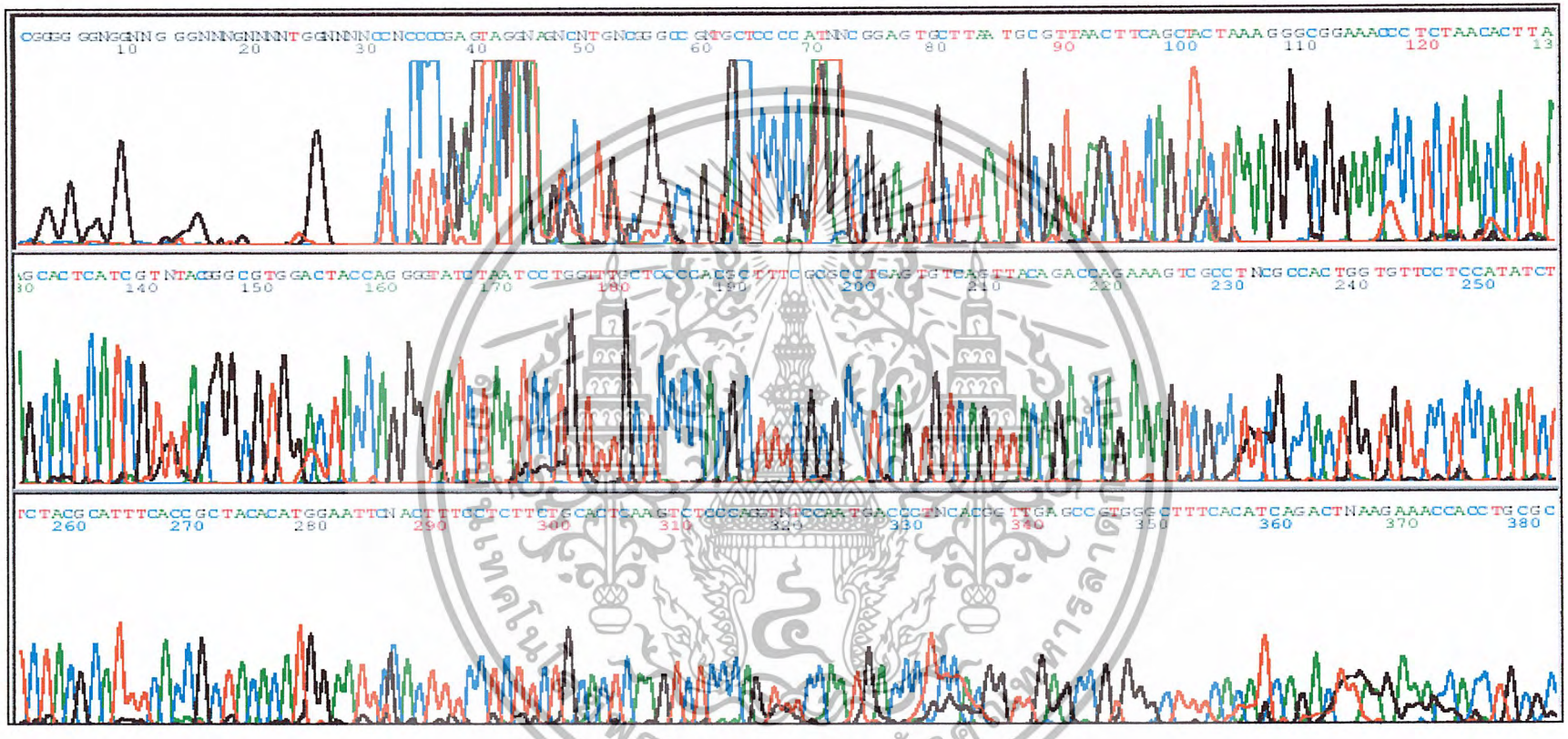


รูปที่ 4.6 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
1 พลาสมิด pAiiA1.1
2 พลาสมิด pAiiA1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1

จากการนำพลาสมิด pAiiA1.1 ที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ AiiA1 และ AiiA2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII พบว่ามีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จากนั้นจึงนำพลาสมิด pAiiA1.1 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 เป็นไพรเมอร์ พบว่ามีโครมาโตแกรมดังรูปที่ 4.7 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 783 เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนแสดงดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ FDNA

1	ATG	ACA	GTA	AAG	AAG	CTT	TAT	TTC	ATC	CCA	30
	M	T	V	K	K	L	Y	F	I	P	
31	GCA	GGT	CGT	TGC	ATG	TTG	GAT	CAT	TCG	TCT	60
	A	G	R	E	M	L	D	H	S	S	
61	GTT	AAC	AGT	GCG	TTA	ACA	CCG	GGG	AAA	CTA	90
	V	N	S	A	L	T	P	G	K	L	
91	TTA	AAC	TTG	CCG	GTG	TGG	TGT	TAT	CTT	TTG	120
	L	N	L	P	V	W	E	Y	L	L	
121	GAG	ACG	GAA	GAA	GGT	CCT	ATT	TTA	GTA	GAC	150
	E	T	E	E	G	P	I	L	V	D	
151	ACA	GGT	ATG	CCA	GAA	AGT	GCA	GTT	AAT	AAT	180
	T	G	M	P	E	S	A	V	N	N	
181	GAA	GGG	CTT	TTT	AAC	GGT	ACA	TTT	GTT	GAA	210
	E	G	L	F	N	G	T	F	V	E	
211	GGA	CAG	ATC	TTA	CCG	AAA	ATG	ACT	GAA	GAA	240
	G	Q	I	L	P	K	M	T	E	E	
241	GAT	AGA	ATC	GTG	AAT	ATA	TTA	AAG	CGT	GTG	270
	D	R	I	V	N	I	L	K	R	Y	
271	GGG	TAT	GAG	CCG	GAC	GAC	CTT	TTA	TAT	ATT	300
	G	Y	E	P	D	D	L	L	Y	I	
301	ATT	AGT	TCT	CAC	TTA	CAT	TTT	GAT	CAT	GCA	330
	I	S	S	H	L	H	F	D	H	A	
331	GGA	GGA	AAC	GGT	GCT	TTT	ACA	AAT	ACA	CCA	360
	G	G	N	G	A	F	T	N	T	P	
361	ATT	ATT	GTG	CAG	CGA	ACG	GAA	TAT	GAG	GCA	390
	I	I	V	Q	R	T	E	Y	E	A	
391	GCA	CTT	CAT	AGA	GAA	GAA	TAT	ATG	AAA	GAA	420
	A	L	H	R	E	E	Y	M	K	E	
421	TGT	ATA	TTA	CCG	CAT	TTG	AAC	TAC	AAA	ATT	450
	C	I	L	P	H	L	N	Y	K	I	
461	ATT	GAA	GGG	GAT	TAT	GAA	GTG	GTA	CCA	GGT	480
	I	E	G	D	Y	E	V	V	P	G	
521	GTT	CAA	TTA	TTG	TAT	ACG	CCA	GGT	CAT	TCT	510
	V	Q	L	L	Y	T	P	G	H	S	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

551	CCA	GGC	CAT	CAG	TCG	CTA	TTC	ATT	GAG	ACG	540
	P	G	H	Q	S	L	F	I	E	T	
581	GAG	CAA	TCC	GGT	TCA	GTT	TTA	TTA	ATG	ATT	570
	E	Q	S	G	S	V	L	L	M	I	
571	GAT	GCA	TCG	TAC	ACG	AAA	GAG	AAT	TTT	GAA	600
	D	A	S	Y	T	K	E	N	F	E	
601	GAT	GAA	GTG	CCG	TTC	GCA	GGA	TTT	GAT	CCA	630
	D	E	V	P	F	A	G	F	D	P	
631	GAA	TTA	GCT	TTA	TCT	TCA	ATT	AAA	CGT	TTA	690
	E	L	A	L	S	S	I	K	R	L	
691	AAA	GAA	GTT	GTG	AAA	AAA	GAG	AAA	CCA	ATT	720
	K	E	V	V	K	K	E	K	P	I	
721	ATT	TTC	TTT	GGT	CAT	GAT	ACA	GAG	CAG	GAA	750
	I	F	F	G	H	D	T	E	Q	E	
751	AAG	AGT	TGT	AGA	GTG	TTC	CCG	GAA	TAT	ATA	780
	K	S	E	R	V	F	P	E	Y	I	
781	TAG										

รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยการใช้โปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซรีนแลคโตเนส โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงดังแสดงในตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ชนิดของแบคทีเรีย	กรดอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
Bacillus thuringiensis	AHL-lactonase (*aiiA*-B22)	99.07
Bacillus thuringiensis	AHL-lactonase (*aiiA*-B20)	98.94
Bacillus thuringiensis serovar *canadensis*	*aiiA*-like protein (*aiiA*)	98.80
Bacillus thuringiensis serovar *tolworthi*	*aiiA*-like protein (*aiiA*)	98.67
Bacillus thuringiensis	AHL-lactonase (*aiiA*-B21)	98.54
Bacillus cereus ATCC 14579	*aiiA*-like protein (*aiiA*)	98.41
Bacillus cereus	*aiiA*-like protein (*aiiA*)	98.41
Bacillus thuringiensis serovar *pakistani*	*aiiA*-like protein (*aiiA*)	98.14
Bacillus thuringiensis serovar *shandongiensis*	AHL-lactonase (*aiiA*)	98.14

จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสจากยีน *aiiA* ของแบคทีเรียแกรมบวกพวก *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus* ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 น่าจะเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสจากการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโน

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 เป็นชิ้นส่วนของยีน *aiiA* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาถึงสปีชีส์ของ *Bacillus* sp.1 ว่าเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ใดที่สามารถผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาสปีชีส์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส

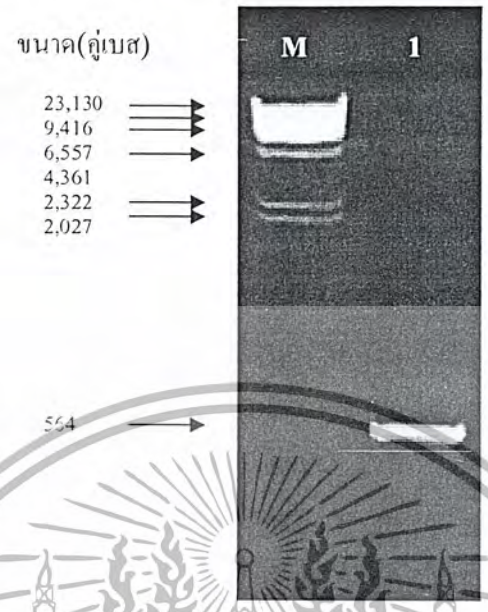
4.3.1 การศึกษาสปีชีส์ของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกสปีชีส์ของตัวอย่างแบคทีเรีย *Bacillus* ทำได้โดยสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1 แล้ววิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 600 คู่เบส ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยโปรแกรม Blast server

4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR รวมทั้งไพรเมอร์ FDNA (forward primer) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3' และ RDNA (reverse primer) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-TTGTGCGGGCCCCCGTCAAT-3' แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycle) โดยใช้อุณหภูมิของการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



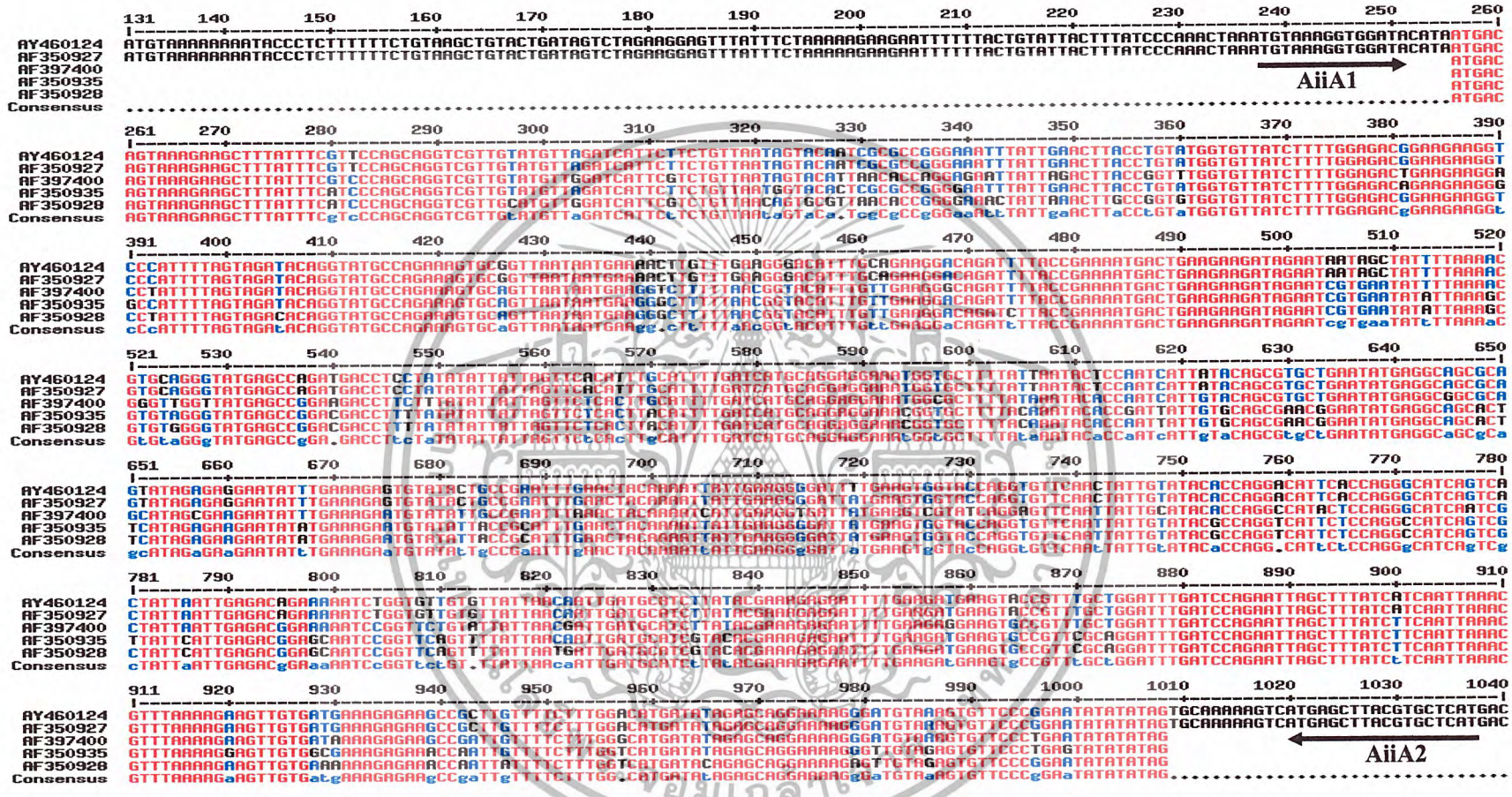
รูปที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.1

M ดีเอ็นเอมาตราฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.1

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตกตะกอนเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆ ต่อไป และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer ได้ผลแสดงดังโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.10 และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า *Bacillus* sp.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังรูป 4.11 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของ *Bacillus* sp.1 มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus* ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp.1 และ *Bacillus thuringiensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เหมือนกันหมด และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจาก *Bacillus cereus* เพียง 3 เบส บริเวณตำแหน่งที่ 405, 431 และ 446 (รูปที่ 4.12) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดอยู่ในสกุลเดียวกัน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 601 คู่เบส ของ *Bacillus* sp.1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *aiiA* ของ *Bacillus thuringiensis* (AY460124), *Bacillus* sp. (AF350927), *Bacillus* sp. (AF397400), *Bacillus cereus* (AF350935), *Bacillus thuringiensis* (AF350928) และ *Bacillus* sp. (AF350927) ตัวอักษรสีแดง, สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน, คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกันตามลำดับ โดยลูกศรจะแสดงถึงทิศทางการเข้าไปจับของไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *aiiA*

1	TCC	TAC	GGG	AGG	CAG	CAG	TAG	GGA	ATC	TTC	30
31	CGC	AAT	GGA	CGA	AAG	TCT	GAC	GGA	GCA	ACG	60
61	CCG	CGT	GAG	TGA	TGA	AGG	CTT	TCG	GGT	CGT	90
91	AAA	ACT	CTG	TTG	TTA	GGG	AAG	AAC	AAG	TGC	120
121	TAG	TTG	AAT	AAG	CTG	GCA	CCT	TGA	CGG	TAC	150
151	CTA	ACC	AGA	AAG	CCA	CGG	CTA	ACT	ACG	TGC	180
181	CAG	CAG	CCG	CGG	TAA	TAC	GTA	GGT	GGC	AAG	210
211	CGT	TAT	CCG	GAA	TTA	TTG	GGC	GTA	AAG	CGC	240
241	GCG	CAG	GTG	GTT	TCT	TAA	GTC	TGA	TGT	GAA	270
271	AGC	CCA	CGG	CTC	AAC	CGT	GGA	GGG	TCA	TTG	300
301	GAA	ACT	GGG	AGA	CTT	GAG	TGC	AGA	AGA	GGA	330
331	AAG	TGG	AAT	TCC	ATG	TGT	AGC	GGT	GAA	ATG	360
361	CGT	AGA	GAT	ATG	GAG	GAA	CAC	CAG	TGG	CGA	390
391	AGG	CGA	CTT	TCT	GGT	CTG	TAA	CTG	ACA	CTG	420
421	AGG	CGC	GAA	AGC	GTG	GGG	AGC	AAA	CAG	GAT	450
451	TAG	ATA	CCC	TGG	TAG	TCC	ACG	CCG	TAA	ACG	480
481	ATG	AGT	GCT	AAG	TGT	TAG	AGG	GTT	TCC	GCC	510
511	CTT	TAG	TGC	TGA	AGT	TAA	CGC	ATT	AAG	CAC	540
541	TCC	GCC	TGG	GGA	GTA	CGG	CCG	CAA	GGC	TGA	570
571	AAC	TCA	AAG	GAA	TTG	ACG	GGG	GCC	CGC	ACA	600
601	A										

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pAiiA1.1 จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7

ตารางที่ 4.2 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
Bacillus thuringiensis	100
Bacillus thuringiensis (4Q281)	99
Bacillus thuringiensis (WS2626)	99
Bacillus thuringiensis (WS2614)	99
Bacillus thuringiensis (WS2617)	99
Bacillus thuringiensis (WS2618)	99
Bacillus cereus (ATCC 14579)	99
Bacillus cereus (ATCC 14893)	99
Bacillus cereus (ATCC 25621)	99

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่า *Bacillus* sp.1 จัดเป็นแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการเพิ่มปริมาณยีน *aiiA* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์คู่ AiiA1 และ AiiA2 พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 800 คู่เบส เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเฉพาะของ *Bacillus* sp.1 เป็นต้นแบบ

5.1.2 พลาสมิด pAiiA1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* อยู่ภายใน เนื่องจากเมื่อนำพลาสมิด pAiiA1.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII แล้วทำการวิเคราะห์ผล พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 3,800 คู่เบสของพลาสมิด pDrive และขนาด 800 คู่เบสของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA*

5.1.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *aiiA* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pAiiA1.1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสของยีน *aiiA* ใน *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus* โดยมีความคล้ายคลึงมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์

5.1.4 *Bacillus* sp.1 สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp.1 มีขนาด 601 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* sp.1 เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus thuringiensis* ในทุกคู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

พลาสมิดลูกผสม pAiiA ที่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จากยีน *aiiA* ที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส ที่ได้จากโครงงานพิเศษนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่สามารถชักนำให้ผลิตเอนไซม์แลคโตเนสปริมาณสูงได้ โดยการนำพลาสมิด pAiiA และพลาสมิด pET มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII แล้วเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดเพื่อการแสดงออก pET จากนั้นทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *E.coli* เพื่อสร้างเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสปริมาณสูง แล้วนำมาทดสอบผลกระทบของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสต่อโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาวิธีการควบคุมประชากรของแบคทีเรียที่มีการสื่อสารระหว่างเซลล์ รวมถึงการลดความรุนแรงของการก่อโรคของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พรงาม ลิ้มตระกูล. 2541. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ: เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมเล่ม 1-2. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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 persistant infections. Science. 284: 1318-1322.

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.

Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., Zhang, L.-H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine-lactonase quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 3526-3531.

Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., Zhang, L.-H. 2002. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1754-1759.

Daniels, R.,Vanderleyden, J., and Michiels, J. 2003. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. FEMS Microbiol. Rev.

Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., Zhang, L.-H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. Appl. Environ. Microbiol. 70: 954-960.

Engebrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of function from *Vibrio fischeri*. Cell 32: 773-781.

Engebrecht, J., and Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4154-4158

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Engebrecht, J., and Silverman, M. (1987) Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. Nucleic Acods Res. 15:10455-10467.

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.

Fuqua, W.C. and Greenberg, E.P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 685-695.

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 Fram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 24: 895-904.

Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. J. Bacteriol. 182: 6921-6926.

Lee, S.J., Park, S.-Y., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T., Lee, J.-K., 2002. Genes encoding the acyl-homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3919-3924.

Novick, R.P., and Muir, T.W. 1999. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other gram positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 2: 40-45.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stevens, A.M. and Greenberg, E.P. 1998. Transcriptional activation by LuxR. In: Cell-Cell Signaling in Bacteria, pp. 231-242.

Swift, S., Thruop, J.P., Williams, P., Salmond, G.P., and Stewart, G.S. 1996. Quorum sensing : a population-density component in the determination of bacterial phenotype. Trends Biochem Sci. 21(6): 214-219.

http://www.school.net.th/library/snet4/cell/cloning.html

http://bio.kaist.ac.kr

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

http://accessexcellence.org/AB/GC

http://www.school.net.th/snet4/genetic/pcr.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

ส่วนประกอบอาหารเหลว LB

แบคโตทริปโตน	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัมต่อลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

ส่วนประกอบสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

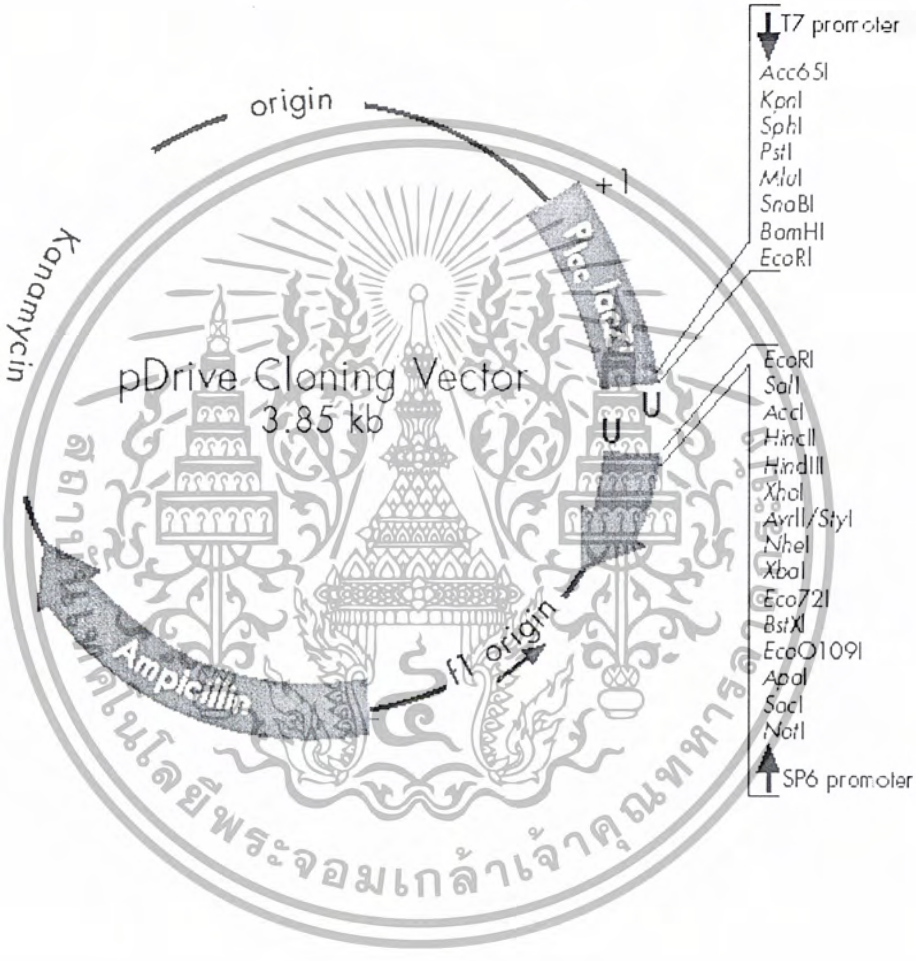
ซูโครสหรือกลีเซอรอล	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-Boric-EDTA	1	เท่า

ชั่งซูโครสหรือกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟีนอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-Boric-EDTA 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 3

แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้