สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การโคลนยีนทอกซิน-แอนติทอกซินของเชื้อวัณโรค

นางสาว ฐิติพร ภัทรถานต์กุล
นางสาว พิชัญญา ชาญชัย
นางสาว ศริตา ญาณพินิต

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67292
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Cloning of Toxin-antitoxin Genes of *Mycobacterium tuberculosis*


**Miss Thitiporn Pattarakankul**

**Miss Pichanya Charnchai**

**Miss Sarita Yanpinit**


**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement**

**for the Degree of Bachelor of Science**


**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**


**Academic Year 2005**


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การโคลนยีนทอกซิน-แอนติทอกซินของเชื้อวัณโรค | | | |
| **นักศึกษา** | นางสาวฐิติพร | ภัทรกานต์กุล | รหัสประจำตัว | 45050193 |
| | นางสาวพิชัญญา | ชาญชัย | รหัสประจำตัว | 45050222 |
| | นางสาวศริตา | ญาณพินิต | รหัสประจำตัว | 45050243 |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยาประยุกต์ | | | |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีชีวภาพ | | | |
| **ปีการศึกษา** | 2548 | | | |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร. สรัญญา | พันธุ์พฤกษ์ | | |

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|
| ประธานกรรมการ | รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ | |
| กรรมการ | ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ | |
| กรรมการ | รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต | |

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงงานพิเศษเรื่อง** การโคลนยีนทอกซิน-แอนติทอกซินของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

**นักศึกษา** นางสาว ฐิติพร ภัทรกานต์กุล
นางสาว พิชัญญา ชาญชัย
นางสาว ศริตา ญาณพินิต

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

**ปีการศึกษา** 2548

**อาจารย์ที่ปรึกษา** *ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์*

## บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โรคนี้คร่าชีวิตประชากรทั่วโลกกว่า 1.9 ล้านคนและยังมีผู้ติดเชื้อแอบแฝงอยู่อีกประมาณ 1.9 พันล้านคนทั่วโลก ปัญหาวัณโรคมีความรุนแรงมากขึ้นจากการระบาดของเชื้อเอชไอวีและการเกิดวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) มีความพยายามหลากหลายที่จะต่อสู้กับวัณโรค รวมทั้งการพัฒนายาต้านวัณโรคตัวใหม่ที่ออกฤทธิ์ได้ทั้งกับเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานและเชื้อวัณโรคในระยะแอบแฝง และสามารถลดระยะเวลาในการรักษาให้สั้นลง วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการพัฒนายาใหม่ คือการค้นหาเป้าหมายของยาที่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดและการก่อโรคของเชื้อ มีรายงานการพบระบบการควบคุมยีนที่เรียกว่าทอกซิน-แอนติทอกซินในแบคทีเรียหลายชนิดและพบว่ามีความสำคัญกับแบคทีเรียโดยเฉพาะการตอบสนองต่อสภาวะเครียด การรบกวนหรือยับยั้งการทำหน้าที่ของระบบนี้น่าจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ ในเชื้อวัณโรค พบยีนในกลุ่มนี้หลายชนิดแต่ยังไม่ทราบหน้าที่ หนึ่งในยีนเหล่านี้ ได้แก่ กลุ่มยีน *relBE* ที่ประกอบด้วยยีนสร้างทอกซิน *relE* และยีนที่สร้างแอนติทอกซิน *relB* โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะโคลนยีนกลุ่ม *relBE* โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน *relE* และ *relBE* ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37RV ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) จากนั้นเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pDrive (Qiagen) จากการทดลองพบว่าพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างพลาสมิด pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ตามลำดับ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องและมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะตรงกับที่ออกแบบไว้ จากนั้นนำยีน *relE* และ *relBE* จากพลาสมิดลูกผสมมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pMV261 ซึ่งสามารถแสดงออกได้ในเชื้อวัณโรค จากการทดลองยังไม่สามารถสร้างพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **Special Project Title** | Cloning of Toxin-antitoxin Genes of *Mycobacterium tuberculosis* | |
| **Name** | Miss Thitiporn | Pattarakankul |
| | Miss Pichanya | Charnchai |
| | Miss Sarita | Yanpimit |
| **Department** | Applied Biology | |
| **Academic year** | 2005 | |
| **Speacial Project Adviser** | Assistant Professor Saranya | Phanpruch |


## Abstract


Tuberculosis is a mycobacterial infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. This disease kills approximately 1.9 million people around the globe and another 1.9 billion are latently infected with this bacterium. Tuberculosis has been exacerbated by HIV epidemic and the emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Many efforts have been taken for fighting against this disease, including the development of new antituberculous drugs that could be effective against both MDR-TB and latent TB, and also shorten the time of treatment. One strategy for developing new drugs is searching for the potential targets, which are essential for cell survival and pathogenesis. The regulatory system, like toxin-antitoxin (TA) module, has been investigated in many organisms, and shown to be important for bacteria, especially in the presence of stresses. Interfere the function of this system should impair the bacterial growth. In *M. tuberculosis*, several TA modules have been identified with unknown function. The *relBE* genes, one of the TA modules, comprised the *relE* coded for a toxin and *relB* coded for anti-toxin. This special project aims to clone the *relBE* genes by amplifying the *M. tuberculosis* H37RV *relE* and *relBE* by polymerase chain reaction (PCR). The amplified products were then subcloned into the plasmid pDrive (Qiagen). It was found that pDrive-*relE* and pDrive-*relBE* were the recombinant plasmids of pDrive and the PCR products of *relE* and *relBE*, respectively. Their sequences were correct and contained the designed recognition sites of restriction enzymes. Subsequently, the *relE* and *relBE* were isolated and subcloned to plasmid pMV261 for expression in *M. tuberculosis*. However, this step was unsuccessful; the recombinant plasmid pMV261-*relE* and pMV261-*relBE* could not be constructed.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ คำแนะนำต่างๆ และประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายภาคหน้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบปัญหาพิเศษ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการสอบปัญหาพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษและให้คำแนะนำเสมอมา รวมทั้งตรวจสอบและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์ ห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุ-วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อ crudeDNA ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* การให้คำแนะนำและความช่วยเหลือทุกๆ ด้านในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ และกำลังใจ โดยเฉพาะคุณชุดิมา ภาพสิงห์ คุณศรินยา ใจตรง และคุณวิชาณี แบนคีรี ที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจตลอดมาจนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจที่สำคัญ รวมทั้งให้การสนับสนุนและส่งเสริมด้านการศึกษาอย่างเต็มที่แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

นางสาวฐิติพร ภัทรกานต์กุล
นางสาวพิชัญญา ชาญชัย
นางสาวศริตา ญาณพินิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฌ |
| สารบัญรูป | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1ความสำคัญและที่มา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตงานวิจัย | 3 |
| 1.4 ขั้นตอนงานวิจัยและวิธีการดำเนินงาน | 3 |
| 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | 4 |
| 2.1 เชื้อวัณโรค | 4 |
| 2.1.1 ลักษณะของเชื้อ | 4 |
| 2.1.2 การจำแนกชนิดของมัยโคแบคทีเรีย | 4 |
| 2.1.3 การระบาด | 5 |
| 2.1.4 การตรวจวินิจฉัย | 5 |
| 2.2 ระบบทอกซิน-แอนติทอกซิน | 6 |
| 2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย | 6 |
| 2.3.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ | 6 |
| 2.3.1.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว | 7 |
| 2.3.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายหู่ | 7 |
| 2.3.1.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สม | 8 |
| 2.3.2 DNA Cloning | 8 |
| 2.3.3 การทรานฟอร์มเมชัน (transformation) | 9 |
| 2.3.4 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) | 10 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


2.3.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) 11

2.3.6 DNA sequencing 13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 15

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 15

3.2 พลาสมิด 15

3.3 สารเคมี 15

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ 15

3.3.2 ยาปฏิชีวนะ 15

3.3.3 เอนไซม์ 15

3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 15

3.3.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ 16

3.3.6 ชุดทดสอบ (kit ) 17

3.3.7 อุปกรณ์ 17

3.4 วิธีการทดลอง 18

3.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* 18

3.4.2 การสกัด crude DNA จากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* 18

3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *relE* และ ยีน *relBE* 18

3.4.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *relE* และยีน *relBE* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 18

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส 19

3.4.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ 20

3.4.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* กับพลาสมิด pDrive 20


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.4.8 การเตรียม competent cell 21

3.4.9 การทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) 21

3.4.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis 22

3.4.11 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ 22

3.4.12 การตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 22

3.4.13 การตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 23

3.4.14 การตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 24

3.4.15 ตรวจสอบผลของการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิสและการทำให้บริสุทธิ์ 26

3.4.16 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* กับพลาสมิด pMV261 26

3.4.17 การตรวจสอบคลอนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* 27

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 29

4.1 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด pDrive 29

4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *relE* และยีน *relBE* 29

4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *relE* และยีน *relBE* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 30

4.1.3 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของยีน *relE* และยีน *relBE* ให้ บริสุทธิ์ 30

4.1.4 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive 31

4.1.5 ผลการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α 32

4.1.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ 32


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


4.1.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 33

4.1.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* 35

4.2 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด pMV261 40

4.2.1 การสกัดพลาสมิด pMV261 40

4.2.2 ผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิสและการทำให้บริสุทธิ์ 41

4.2.3 ผลการสกัดพลาสมิด pDrive-*relE* และpDrive-*relBE* 42

4.2.4 ผลการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และpDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 43

4.2.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์ 44

4.2.6 ผลการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เข้าสู่พลาสมิด pMV 261 45

4.2.7 ผลการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5$\alpha$ 45

4.2.8 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* 45

4.2.9 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* โดย การ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 47


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 50 |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง | 50 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 51 |
| เอกสารอ้างอิง | 52 |
| ภาคผนวก 1 | 54 |
| ภาคผนวก 2 | 55 |
| ภาคผนวก 3 | 56 |
| ภาคผนวก 4 | 57 |
| ภาคผนวก 5 | 58 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

3.1 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* 19

3.2 ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา ligation ของ พลาสมิด pDrive 21
กับยีน *relE* และยีน *relBE*

3.3 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* 23
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

3.4 แสดงส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 24
*Bam*HI และ *Cla*I

3.5 แสดงส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 24
*Xba*I และ *Cla*I

3.6 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I 25
และ*Bam*HI

3.7 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ClaI 25
และ XbaI

3.8 ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา ligation ของ พลาสมิด pMV261 26
และยีน *relE*

3.9 ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา ligation ของ พลาสมิด pMV261 27
และยีน *relBE*

3.10 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261-*relE* ด้วยเอนไซม์ 27
ตัดจำเพาะ*Eco*RI

3.11 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261-*relbE* ด้วยเอนไซม์ 28
ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

**รูปที่** **หน้า**

2.1 หลักการการcloning 9
2.2 อุปกรณ์ในการทำเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 11
2.3 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) 12
2.4 เทคนิคของ Sanger ในการตรวจลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 13
2.5 หลักการของการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (Automated sequencing) 14
4.1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ *Mycobacrterium tuberculosis* 31
4.2 ผลของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* และตรวจสอบปริมาณด้วยเทคนิคอะการโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส 33
4.3 ผลของการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 34
4.4 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-*relE* จาก BigDye Terminator reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 36
4.5 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-*relBE* จาก BigDye Terminator reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 37
4.6 การตรวจสอบความถูกต้องของโครมาโตแกรมของพลาสมิด pDrive-*relE* จากโครมาโตแกรมในรูป 4.4 38
4.7 การตรวจสอบความถูกต้องของโครมาโตแกรมของพลาสมิด pDrive-*relBE* จากโครมาโตแกรมในรูป 4.5 39
4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 40
4.9 ผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 42
4.10 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* 43
4.11 พลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 44
4.12 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE* 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.13 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relBE* 47
4.14 ผลการตัดพลาสมิด pMV261-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 48
4.15 ผลการตัดพลาสมิด pMV261-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 48



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

**1.1 ความสำคัญ/ที่มา**

วัณโรค เป็นโรคติดเชื้อดึกดำบรรพ์ที่ทำลายชีวิตมนุษย์มากที่สุดโรคหนึ่งและได้ระบาดไปทั่วโลก จากสถิติที่รวบรวมโดยองค์การอนามัยโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 และทบทวนใหม่เมื่อ พ.ศ. 2541 พบว่าประชากรโลกถึงหนึ่งในสามหรือประมาณ 1,900 ล้านคนติดเชื้อวัณโรค มีผู้ป่วยวัณโรคใหม่อุบัติขึ้น 7-8 ล้านคนและเสียชีวิตกว่า 2-3 ล้านคนต่อปี เนื่องจากการระบาดของโรคเอดส์มีผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคได้ง่ายขึ้นและวัณโรคยังคงเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรมากกว่าโรคติดเชื้ออื่นๆ ร้อยละ 95 ของประชากรที่เสียชีวิตนี้อยู่ในประเทศกำลังพัฒนาและสองในสามของผู้ป่วยอยู่ในทวีปเอเชีย ในปี พ.ศ. 2535 มีรายงานการระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนานในสหรัฐอเมริกา องค์การอนามัยโลกจึงประกาศให้เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ.2536 ว่าวัณโรคเป็นปัญหาฉุกเฉินระดับโลก

ในประเทศไทยวัณโรคยังคงติดอยู่ในสาเหตุการตาย 10 อันดับแรกของประชากร การตรวจหาผู้ป่วยและการรักษาครอบคลุมผู้ป่วยได้ประมาณ 75,000-100,000 รายต่อปี แต่ยังมีปัญหาว่าในจำนวนผู้ที่เข้ารักษาจนครบถ้วนมีผู้ที่รักษาหายเพียงร้อยละ 50-60 เท่านั้น นอกจากนี้ยังเริ่มมีปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ซึ่งจากการสำรวจเฉลี่ยทั่วประเทศพบร้อยละ 2.53 ระหว่างปี พ.ศ.2531-2541 และการพบเชื้อวัณโรคดื้อยายังสูงขึ้นในท้องที่ที่มีการระบาดของการติดเชื้อเอดส์ เช่น จังหวัดเชียงรายและกรุงเทพฯ เนื่องจากประเทศไทยยังคงมีการระบาดของเอดส์สูงมาก จำนวนผู้ป่วยวัณโรคจึงมีแนวโน้มสูงขึ้นตามไปด้วย โดยพบผู้ป่วยมากที่สุดในภาคเหนือตอนบนตามด้วยภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความสำคัญต่อวัณโรค โดยเน้นหนักด้านการปรับปรุงการวินิจฉัยและการรักษาวัณโรค การป้องกันวัณโรคสามารถทำได้โดยฉีดวัคซีนบีซีจี แต่วัคซีนบีซีจีนั้นมีผลเพียงป้องกันวัณโรคชนิดร้ายแรงได้ในเด็ก ไม่ป้องกันโรคในผู้ใหญ่และเกือบไม่มีผลในการลดแหล่งแพร่เชื้อวัณโรคซึ่งอยู่ในผู้ใหญ่เป็นส่วนใหญ่ (www.clib-online.com/doctors45/ped_tb001.html)

วัณโรคสามารถรักษาให้หายได้โดยใช้ยาหลายขนานร่วมกัน การกินยารักษาต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6 เดือน ยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นยาหลักที่เรียกว่า First-line drug อันได้แก่ Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, Pyrazinamide และ Streptomycin หรือยาสำรองที่เรียกว่า Second-line drug ได้แก่ PAS, Ethionamide, ยากลุ่ม Quinolones และ ยากลุ่ม Aminoglycosides ที่จะใช้ต่อเมื่อเชื้อนั้นดื้อต่อยาหลักแล้ว อย่างไรก็ตาม ยาเหล่านี้โดยเฉพาะยาหลักเป็นยาที่นำมาใช้รักษาวัณโรคตั้งแต่ 40-50 ปีมาแล้ว และในขณะนี้ก็ยังไม่มียาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อวัณโรคเท่ากับยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าว หรือถ้ามียานั้นก็จะมีราคาแพงไม่สามารถนำมาใช้ได้เหมือนยาหลัก ทำให้มีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องพัฒนาศึกษายารักษาโรคใหม่ที่มีประสิทธิภาพทำลายทั้งเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และเชื้อวัณโรคแฝง (Latent tuberculosis) ที่อยู่ในร่างกายของผู้ติดเชื้อ และจะดียิ่งขึ้น หากยาที่พัฒนามาใหม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ และสามารถลดระยะเวลาในการรักษาให้เหลือน้อยกว่า 6 เดือน

วิธีการหนึ่งในการพัฒนาให้ได้ยาชนิดใหม่ คือ การศึกษากลไกที่จำเป็นของเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตในร่างกายมนุษย์ การเกิดพยาธิกำเนิดของโรค หรือการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ความรู้ที่ได้จากการศึกษาและวิจัยในหัวข้อเหล่านี้สามารถนำมาใช้ ประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนายา โดยให้ยาออกฤทธิ์กับเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของเชื้อ Toxin-antitoxin module เป็นกลุ่มของยีนที่ประกอบด้วยยีน 2 ชนิด ยีนชนิดแรกจะสร้าง antitoxin ในขณะที่ยีนที่อยู่ถัดมาจะสร้าง toxin ในสภาวะปกติ antitoxin จะถูกสร้างขึ้นในระดับที่สามารถทำลายฤทธิ์ของ toxin ได้ ยีนกลุ่มนี้พบครั้งแรกบนพลาสมิดดีเอ็นเอ และมีหน้าที่ในการรักษาพลาสมิดให้คงอยู่ได้ในเซลล์เจ้าบ้านภายหลังจากที่เซลล์มีการแบ่งตัว ถ้าเซลล์ลูกเซลล์ใดไม่มีพลาสมิดที่มียีนกลุ่มนี้จะไม่สามารถดำรงชีวิตได้ เนื่องจากฤทธิ์ของ toxin ที่สร้างจาก toxin gene หรือที่เรียกว่า Postsegregational killing system (Gerdes *et al.*, 1986) และจะตายในที่สุด ต่อมาพบว่ายีนกลุ่มนี้สามารถอยู่บนโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่อยู่ตามธรรมชาติและที่ก่อโรคในคน (Gerdes *et al.*, 2005) และยังพบว่ายีนกลุ่มนี้สามารถทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดบางประการ เช่น สภาวะการขาดแคลนสารอาหาร (Gerdes *et al.*, 2000) หรือสภาวะการเข้าสู่ระยะ persistence ของเซลล์ (Keren *et al.*, 2003) นอกจากนี้ toxin ที่สร้างขึ้นจะออกฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น toxin ที่สร้างจากยีน *relE* ใน *relBE* system ออกฤทธิ์โดยการย่อย mRNA ที่จับอยู่กับ ribosome ที่ตำแหน่ง A-site (Pedersen *et al.*, 2003) ส่วน toxin ที่สร้างโดยยีน *mazF* ใน *mazEF* system ออกฤทธิ์โดยจะย่อย mRNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ ACA (Christensen *et al.*, 2003) โครงการพิเศษนี้ได้สนใจศึกษายีน *relBE* ที่มีเกี่ยวข้องกับการสร้าง toxin-antitoxin ในเชื้อวัณโรค โดยได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จากการทำ Homology search กับลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (www.tigr.org หรือ www.sanger.ac.uk) เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาการตอบสนองของเชื้อต่อการผลิต toxin และ antitoxinในสภาวะเครียดแบบต่างๆ และนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ในการพัฒนายารักษาเชื้อวัณโรคต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อโคลนยีน *relE* และ *relBE* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เข้าสู่พลาสมิด pDrive และ pMV261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.3 ขอบเขตงานวิจัย**

1. โคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เข้าสู่พลาสมิด pDrive
2. ตัดชิ้นส่วนยีน *relE* และ *relBE* จากพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ตามลำดับ แล้วทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pMV261

**1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน**

1. ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *relE* และ *relBE* โดยให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ข้าง
2. เพิ่มปริมาณยีน *relE* และ *relBE* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR:Polymerase Chain Reaction)
3. เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิด pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัย *E. coli* DH5α
4. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีโคโลนีที่ต้องการโดยใช้อาหาร LB + X-gal + IPTG + Km
5. สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE*
6. นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
7. นำพลาสมิดลูกผสม pDrive-*RelE*, pDrive-*RelBE* และ pMV261 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้
8. เชื่อมต่อชิ้นยีน *relE* และยีน *relBE* เข้ากับพลาสมิด pMV261 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัย *E. coli* DH5α

**1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้เซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมของ pDrive-*RelE* และ pDrive-*RelBE* และพลาสมิดลูกผสมของ pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักการ

## 2.1 เชื้อวัณโรค

### 2.1.1 ลักษณะของเชื้อ

โรควัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Mycobacterium tuberculosis* บางครั้งเรียกว่าเชื้อเอเอฟบี (AFB/Acid Fast Bacilli) จัดอยู่ในวงศ์ Mycobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปท่อน โค้งเล็กน้อย ขนาดยาวประมาณ 2-4 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการอากาศ มักพบได้ในที่แห้งและที่มีน้ำมันมาก จากการศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์พบว่าประกอบด้วยเพปติโดไกลแคน และมีลิพิดเป็นส่วนประกอบถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แบ่งลิพิดที่เป็นส่วนประกอบที่ผนังเซลล์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กรดไมโคลิก พบว่ามีอยู่ในบริเวณ envelope ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่เป็นสารเลือกผ่านที่ผนังเซลล์ ปกป้องเซลล์จากการทำลายของ cation protein ไลโซไซม์ และ อนุมูลออกซิเจน (oxygen radical) สามารถใช้กรดไมโคลิกในการจัดลำดับความรุนแรงของเชื้อได้
2. cord factor มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถยับยั้ง PMN migration มักพบการสร้าง cord factor ในสายพันธุ์ที่ก่อโรค
3. Wax-D พบใน cell envelope เป็นส่วนประกอบหลักของ Freund's complete adjuvant (CFA)

เชื้อ *M. tuberculosis* ใช้ระยะเวลาในการแบ่งตัวนาน 18-24 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลานาน 4-6 สัปดาห์จึงจะเจริญเป็นโคโลนี ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งมีสีขาว ครีม นูน ขอบไม่ชัดเจน มีลักษณะเป็นไข ในอาหารเหลวพบการเรียงตัวมีลักษณะเป็นเส้น เรียกว่า serpentine cord ซึ่งสังเกตพบได้เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 2.1.2 การจำแนกชนิดของมัยโคแบคทีเรีย

สามารถจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. typical mycobacteria หรือ "tubercle bacilli" ได้แก่ มัยโคแบคทีเรียที่ก่อวัณโรคในคนและสัตว์ ได้แก่ *M. tuberculosis* , *Mycobacterium bovis* , *Mycobacterium.africanum*
2. atypical หรือ non tuberculosus mycobacteria คือมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ไม่ก่อโรควัณโรค ได้แก่ *Mycobacterium.avium* complex (MAC), *Mycobacterium.kansasii*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Mycobacterium fortuitum* เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

Runyon ได้จำแนกชนิดของมัยโคแบคทีเรียโดยอาศัยความเร็วในการเจริญเติบโต การสร้าง carotenoid pigment และลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 4 ชนิด คือ

1. Runyon Group I photochromogen สร้างเม็ดสีเมื่อถูกแสง เจริญเติบโตช้า
2. Runyon Group II scotochromogen สร้างเม็ดสีโดยไม่ขึ้นกับแสง เจริญเติบโตช้า
3. Runyon Group III nonchromogen ไม่สามารถสร้างเม็ดสีได้
4. Runyon Group IV rapid grower เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

**2.1.3 การระบาด**

เชื้อสามารถแพร่ไปยังผู้อื่นโดยการไอ จาม พูดเสียงดัง ซึ่งจะทำให้เชื้อที่อยู่ในทางเดินหายใจของผู้ป่วย กระจายออกสู่ภายนอกเป็นละอองเสมหะ การไอครั้งหนึ่งๆ ก่อให้เกิดละอองเสมหะในบรรยากาศถึง 3000 droplet nuclei ละอองเสมหะที่มีขนาดใหญ่จะตกลงพื้น เมื่อเสมหะแห้งแล้วจะเกิดละอองของเชื้อขนาดเล็กและมีโอกาสฟุ้งกระจายจากพื้นได้อีก ละอองเสมหะที่มีขนาดเล็กกว่า 4 ไมโครเมตร สามารถลงสู่ถุงลมปอดได้ นอกเหนือจากการหายใจแล้ว วัณโรคยังสามารถติดต่อทางอื่นได้อีก เช่น ทางผิวหนังจากแผลที่ติดเชื้อวัณโรค การสัมผัสสิ่งของเครื่องใช้ของผู้ป่วย หรืออาจติดต่อได้ทางอาหารเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำเหลือง ซึ่งบางครั้งอาจลุกลามเข้ากระแสเลือดไปยังปอด สมอง กระดูก ไต หรืออวัยวะอื่นๆ ได้ ผู้ป่วยมักจะได้รับเชื้อวัณโรคเข้าไปในร่างกายครั้งแรกในระยะที่เป็นเด็ก โดยไม่มีอาการแสดงแต่อย่างไร ยกเว้นบางคนอาจมีอาการของปอดอักเสบเล็กน้อยอยู่สักระยะหนึ่งแล้วจึงหายไปเอง เนื่องจากร่างกายสร้างภูมิต้านทานขึ้นกำจัดเชื้อวัณโรค คนส่วนมากที่ได้รับเชื้อวัณโรคครั้งแรกจึงมักจะแข็งแรงเป็นปกติดี แต่อย่างไรก็ตามเชื้อวัณโรคที่ยังอาจหลงเหลืออยู่ในปอดและอวัยวะอื่นๆ เมื่อร่างกายอ่อนแอด้วยสาเหตุใดก็ตาม เชื้อที่หลบซ่อนอยู่ก็จะแบ่งตัวจนทำให้เกิดเป็นวัณโรคขึ้นได้โดยไม่ต้องรับเชื้อมาจากภายนอก ส่วนมากจะเกิดเป็นวัณโรคปอด บางคนที่รับเชื้อวัณโรคเข้าร่างกายครั้งแรก เชื้ออาจจะลุกลามจนกลายเป็นวัณโรคในทันทีได้ (http://www.thailabonline.com/respirat-tb.htm)

**2.1.4 การตรวจวินิจฉัย**

มักทำการตรวจวินิจฉัยวัณโรคมักทำโดย positive tuberculin skin test ซึ่งเป็นวิธีทดสอบปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อ tuberculosis antigens ในปริมาณน้อยๆ จากนั้นทำการยืนยันผลขั้นต้นโดยการเอ็กซเรย์ปอดและทำการย้อมสีโดยวิธี Ziehl-Neelsen stain เพื่อตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทนกรดในเสมหะและเนื้อเยื่อตัวอย่างของผู้ป่วย การยืนยันผลขั้นสุดท้ายทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคซึ่งใช้ระยะเวลานานประมาณ 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2 ระบบทอกซิน-แอนติทอกซิน**

โครโมโซมของโปรคาริโอตมีตำแหน่งของยีนทอกซิน-แอนติทอกซินที่อยู่ติดกัน ซึ่งทั้งสองยีนนี้มีการจัดเรียงตัวกันเป็นโอเปรอน ยีนแรกควบคุมการสร้างแอนติทอกซิน อีกยีนหนึ่งควบคุมการสร้างทอกซิน (Gerdes, 2000) ในสภาวะเสถียร แอนติทอกซินมีผลในการยับยั้งทอกซินโดยการเข้าจับกันของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ (Galvani *et al.*, 2001) แอนติทอกซินและสารประกอบเชิงซ้อนของทอกซิน-แอนติทอกซินเข้าจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ภายในบริเวณโอเปอรอนของตัวเองและควบคุมการถอดรหัส (Gotfredson *et al.*, 1998) การเหนี่ยวนำจากสภาพแวดล้อมที่กดดัน เช่น กรดอะมิโน และการขาดแคลนแหล่งคาร์บอน ทำให้แอนติทอกซินที่ไม่คงตัวเกิดการย่อยสลายโดยเอนไซม์ลอนโปรตีเอส หรือระบบการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่ภาวะการยับยั้งการเจริญอย่างรวดเร็วและเซลล์ตายโดยเป็นผลจากทอกซิน (Christensen *et al.*, 2001) ระบบ RelBE เป็นระบบหนึ่งในกลุ่มทอกซิน-แอนติทอกซินซึ่งพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดรวมถึงเชื้อมัยโคแบคทีเรีย RelE เป็นโปรตีนทอกซินในขณะที่ RelB เป็นโปรตีนแอนติทอกซินซึ่งเมื่อจับกับโปรตีนทอกซิน ยังผลให้โปรตีนทอกซินหมดความรุนแรง มีการรายงานเมื่อไม่นานมานี้ว่า RelE ทำหน้าที่เป็น ribosome-dependent ribonuclease (RNase) และตัดสาย mRNA ที่บริเวณรหัสหยุด (stop codon) (Pedersen, 2003) ดังนั้น RelE จึงเป็นตัวยับยั้งการแปลรหัสและได้รับการกระตุ้นเมื่ออยู่ในภาวะกดดันจากสารอาหาร การกระตุ้นการลอกรหัสของ RelBE ไม่ขึ้นอยู่กับ ppGpp แต่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ลอนโปรติเอส (Christensen *et al.*, 2001) จากการศึกษาเบื้องต้นคาดว่ามี relBE อย่างน้อย 3 ตำแหน่งบนจีโนมของ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv (Gerdes *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม หน้าที่ของยีนหรือความสำคัญของยีนเหล่านี้ในเชื้อมัยโคแบคทีเรียยังไม่ทราบแน่ชัด

**2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย**

**2.3.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ (vector) (สุรินทร์, 2545)**

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์มี 3 วิธี คือ (1) เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (cohesive end ligation) (2) เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end ligation) และ (3) การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สมที่เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (homopolymer tailing) ทั้งนี้การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเออาจจะไม่ได้ใช้วิธีหนึ่งวิธีใดเพียงวิธีเดียว แต่ใช้หลายวิธีหรือต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.1.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว**

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้เมื่อดีเอ็นเอนั้นมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในบริเวณที่เหมาะสม และเวกเตอร์ที่ใช้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เดียวกันนั้นด้วยในบริเวณที่ใช้โคลนยีน เช่น ใช้เอนไซม์ *Eco*RI ตัดทั้งชิ้นดีเอ็นเอและเวกเตอร์จะได้ปลายที่เป็นปลายเหนียวที่มีเบสคู่สมกัน นำมาเชื่อมต่อกันได้ทันที แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เวคเตอร์อาจเชื่อมต่อกันเองเป็นไดเมอร์ (dimer) หรือเชื่อมปลายของโมเลกุลเดียวกัน (self ligation) จึงนิยมดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของเวคเตอร์ออกโดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายของเวกเตอร์กลับมาเชื่อมกันเองได้ เนื่องจากเอนไซม์ ligase จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้เมื่อปลาย 5' มีหมู่ฟอสเฟตและปลาย 3' เป็นหมู่ไฮดรอกซีเท่านั้น

**2.3.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่**

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ทำได้ยากกว่า ต้องใช้เอนไซม์ ligase ที่มีความเข้มข้นมากกว่าการเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวหลายเท่า นอกจากนี้ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอและสภาวะที่แตกต่างออกไปจากการเชื่อมดีเอ็นเอปลายเหนียว การเชื่อมดีเอ็นเอปลายทู่นี้ใช้ในกรณีที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาต่อมีตำแหน่งของเอนไซม์ไม่เหมาะสม เพื่อให้การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงนิยมนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่นั้นมาต่อกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ มีความยาวประมาณ 8-10 คู่เบส โดยมีลำดับเบสบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่ง เรียกว่า ลิงค์เกอร์ (linker) การนำชิ้นดีเอ็นเอมาต่อกับลิงค์เกอร์นี้จะใส่ลิงค์เกอร์มากเกินพอเพื่อให้มีโอกาสต่อลิงค์เกอร์เข้าที่ปลายดีเอ็นเอมากกว่า 1 โมเลกุล แล้วจึงนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น และนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ โดยการเชื่อมดีเอ็นเอปลายเหนียวอีกทีหนึ่ง ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดได้ปลายทู่ตัดเวกเตอร์ แล้วนำมาต่อกับชิ้นดีเอ็นเอปลายทู่โดยตรง ประสิทธิภาพจะต่ำและต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอมาก จึงนิยมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับลิงค์-เกอร์ก่อน นอกจากนั้นอาจจะนำมาต่อกับอะแดพเตอร์ (adaptor) ในกรณีที่ชิ้นดีเอ็นเอมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะใช้อยู่ภายใน เมื่อต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วยลิงค์เกอร์แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์นั้นจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอขาดตรงกลาง วิธีใช้อะแดพเตอร์จะช่วยได้ในกรณีนี้ เพราะอะแดพเตอร์มีปลายข้างหนึ่งเป็นปลายทู่สำหรับเชื่อมต่อกับปลายดีเอ็นเอ อีกปลายหนึ่งเป็นปลายที่ยาวไม่เท่ากัน โดยมีลำดับเบสที่ปลายสายที่ยาวกว่าเหมือนกับเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่ง หลังจากต่ออะแดพเตอร์เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว สามารถนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์นั้นได้ทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.1.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สม**

การเชื่อมต่อดีเอ็นเออีกวิธีหนึ่งทำได้โดยสร้างดีเอ็นเอให้มีปลายเป็นเบสคู่สม โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) เติมเบสเข้าที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอ โดยเติมเบสชนิดหนึ่งเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอ และเติมเบสอีกชนิดหนึ่งเป็นคู่สมกับชนิดแรกเข้าที่ปลายของเวกเตอร์ แล้วจึงนำชิ้นดีเอ็นเอและเวกเตอร์มารวมกัน จะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างปลาย 3' ที่มีเบสที่ต่อไว้ แต่อาจมีช่องว่างอยู่ซึ่งช่องว่างนี้จะถูกเติมจนเต็มเมื่อถ่ายฝากลงไปในเซลล์ผู้รับแล้ว วิธีนี้ยังช่วยป้องกันไม่ให้โมเลกุลของเวกเตอร์วกกลับมาต่อกันเองเนื่องจากมีเบสที่ปลายทั้งสองด้านเหมือนกัน (homopolymer tail) ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ตามวิธีที่กล่าวมานั้นใช้ได้กับเวกเตอร์ทุกชนิด แต่จะเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสม อาจจะต้องมีการดัดแปลงบางขั้นตอนเพื่อให้เหมาะกับเวกเตอร์ที่ใช้ด้วย

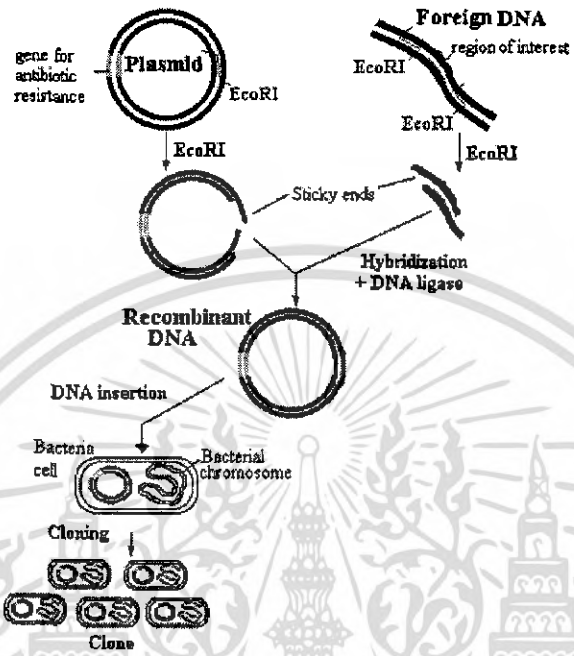
**2.3.2 DNA Cloning (อมรา, 2546)**

DNA Cloning (การเพิ่มปริมาณโคลนดีเอ็นเอโมเลกุล) (รูปที่ 2.1) เป็นการอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณยีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีพลาสมิดเป็นพาหะหรือตัวพายีน (vector) และให้มีการเพิ่มปริมาณยีนในเซลล์ของแบคทีเรีย พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอชนิดวงกลม (circular DNA) ขนาดเล็กๆ อยู่ในไซโทพลาสซึมของแบคทีเรียบางชนิด มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้มากมายและเป็นอิสระต่อการแบ่งตัวของดีเอ็นเอของเจ้าบ้าน และดีเอ็นเอของพลาสมิดมียีนบางตัวที่สามารถผลิตโปรตีนได้เองด้วย ได้มีการคัดเลือกชนิดของพลาสมิดที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสายพันธุ์เพื่อทำ DNA cloning (เรียกว่า cloning vector) ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการถอดแบบจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้มากมายภายในตัวแบคทีเรียเจ้าบ้าน การนำยีนที่ต้องการสอดใส่ในพลาสมิดกระทำได้โดยการตัดดีเอ็นเอวงแหวนของพลาสมิดให้ขาดออกที่ตำแหน่งหนึ่ง การตัดจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นเชื่อมช่วงการขาดด้วยชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน (ที่ต้องการจะโคลนซึ่งถูกตัดออกจากจีโนมด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน) การเชื่อมต่อกันใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase enzyme) จึงได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรืออาจเรียกว่า foreign DNA ติดอยู่กับพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอวงแหวนวงเดียวกัน ใส่พลาสมิดที่มี foreign DNA นี้สู่แบคทีเรียเพื่อปล่อยให้มีการเพิ่มปริมาณพลาสมิดในตัวแบคทีเรียเจ้าบ้าน เมื่อพลาสมิดมีการแบ่งตัวจะทำให้ foreign DNA แบ่งตัวตามไปด้วย ซึ่งถ้า foreign DNA มีส่วนของยีนที่ทำงานก็อาจมีผลทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติที่จะถูกทดสอบยีนดังกล่าวได้

การเพาะเลี้ยงประชากรของแบคทีเรียชนิดที่มีพลาสมิดและ foreign DNA เรียกว่าการทำ genomic library แต่ละชิ้นส่วนของ foreign DNA จะถูกเลี้ยงในแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน โดยการแยกเชื้อแบคทีเรียในระดับเซลล์เดี่ยว (single cell) แล้วเลี้ยงให้เจริญจนเป็นโคโลนี (colony) แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละโคโลนีที่เริ่มต้นมาจากเซลล์เดี่ยวนี้เรียกว่าโคลน (clone) ซึ่งโคลนที่มียีนที่ต้องการอยู่ในพลาสมิดของโคลนนั้น เรียกโคลนชนิดนี้ว่า positive clone จึงเลี้ยงขยาย positive clone ออกไปอีกมากมายให้เพียงพอกับความต้องการผลิตยีนดังกล่าว




**รูปที่ 2.1 หลักการการcloning**

ที่มา : http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/plasmid.gif

### 2.3.3 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) (อมร1, 2546)

การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรองรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้งานด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ เป็นต้น การเตรียม competent cell อาจมีวิธีการแตกต่างกันได้ แต่สำหรับการทรานสฟอร์ม competent cell ด้วยพลาสมิดนั้นจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือใช้แคทไอออนมาทำให้เซลล์แบคทีเรียมีช่องว่าง และใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ และยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์

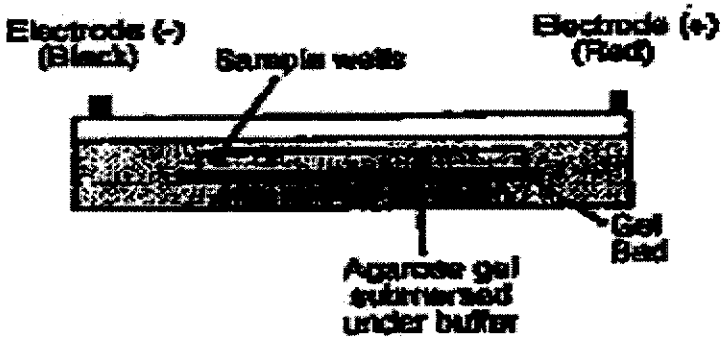
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.4 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) (พรงาม, 2541)**

การตรวจหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ทำได้โดยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ขั้นตอนแรกคือการตัดดีเอ็นเอให้เป็นเส้นตรงแล้วทำการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้วบนเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส โดยทั่วไปเวกเตอร์ที่ใช้จะทราบขนาดแล้วดังนั้นขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่จึงทราบได้จากขนาดที่ได้ของเวกเตอร์ลูกผสม(recombinant vector) ลบด้วยขนาดของเวกเตอร์ที่ใช้ หรือทำการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ในเวกเตอร์ลูกผสมออกก่อนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจึงหาขนาดของดีเอ็นเอจากเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสแล้วเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ซึ่งทราบขนาดมาก่อนแล้ว

หลักการของอิเล็คโตรโฟเรซิส คือ การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่างโดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตทำให้มีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกแรงเคลื่อนไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไปควรใช้อะกาโรสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ใช้แยกกรดนิวคลีอิกที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโลดาลตัน สำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ (horizontal gel electrophoresis) ในขณะที่โพลีอะคริลาไมด์เจลจะต้องทำในแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ คือ ขนาดรูปร่างของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของเจลที่ใช้ กล่าวคือ ถ้าชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่จะผ่านตัวกลางหรือเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก เป็นผลให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกล ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงเกลียว (supercoiled DNA) มักจะเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ดีกว่าดีเอ็นเอรูปร่างอื่นๆ รองลงมาคือ ดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นเส้น และดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นวง เจลที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีช่องว่างภายในเนื้อเจลน้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หลังจากที่แยกดีเอ็นเอออกมาเป็นแถบบนอะกาโรสโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสแล้ว ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โครงสร้างของเอทิเดียมโบรไมด์เป็นอะโรมาติกแคทไอออนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกัน แล้วจะให้ฟลูออเรสเซนส์ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต การย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้ สำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามารถให้ฟลูออเรสเซนส์เมื่อย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เช่นกัน แต่จะมีความไวน้อยกว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ นอกจากนี้ยังมีสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เช่น อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) หรือ โพรฟลาวิน (proflavin) ในปัจจุบันได้มีการใช้สีย้อมที่มีความเป็นอันตรายน้อยกว่าสีย้อมในอดีต เช่น เจลสตาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่2.2 อุปกรณ์ในการทำเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส**

ที่มา : http://faculty.uca.edu/~march/bio1/DNA_GMO/gelelectro1.htm

### 2.3.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction) (http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm)

Polymerase chain reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน รูปที่ 2.3

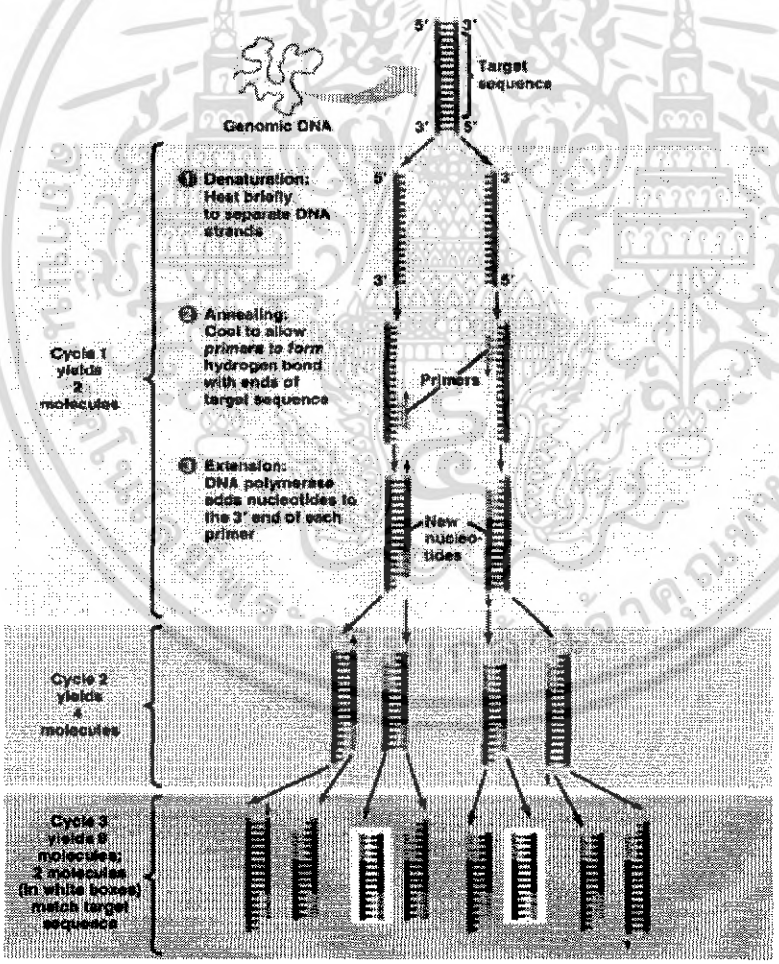
ขั้นแรก เรียกว่า denatuation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็น-เอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-20 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า



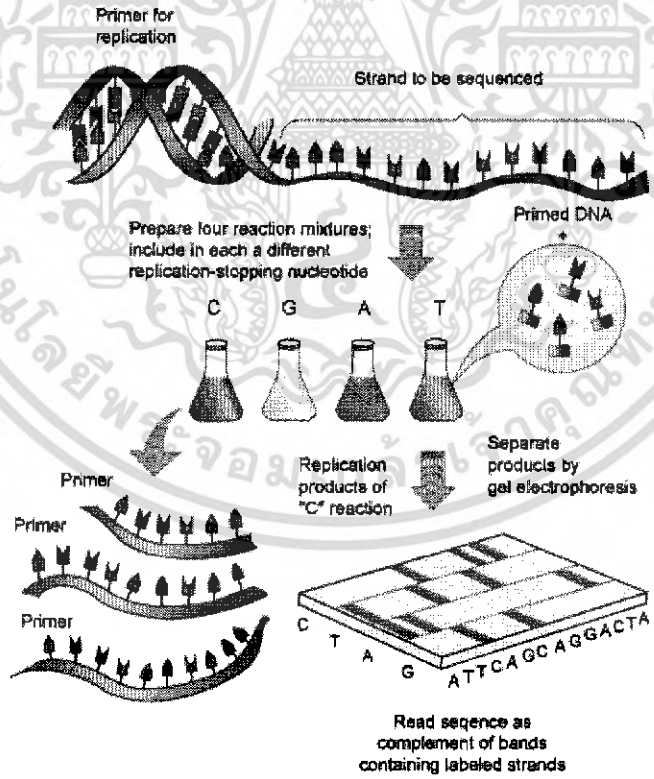

**รูปที่ 2.3 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)**

ที่มา : http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.6 DNA sequencing**

การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เป็นการตรวจหาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา เป็นเทคนิคพัฒนาขึ้นโดย Walter Gilbert และ Fred Sanger (รูปที่ 2.4) และได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1980 วิธีการคือ นำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับเบสซึ่งอาจนำมาจากการ cloning หรือจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่สังเคราะห์เพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ใช้เทคนิคคล้ายการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายให้เป็นสายเดี่ยว ใส่สารเคมียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในขณะที่มีการสังเคราะห์สายใหม่ที่เป็นเบสคู่สมกับสายต้นแบบ ถ้าต้องการหาตำแหน่งของ G (เบส guanine) ต้องใส่สารยับยั้ง G เข้าไปในปฏิกิริยา เมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไปเรื่อยๆ จะเกิดการหยุดสังเคราะห์ที่ตำแหน่ง G ของทุกๆ แห่งในสายดีเอ็นเอ ในแต่ละปฏิกิริยาการสังเคราะห์บางสายหยุดที่ G ตำแหน่งแรกคือ G ตำแหน่งที่ 2 หรือตำแหน่งอื่นๆ เช่นนี้จะทำให้ได้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นยาวผิดกันแล้วแต่ว่าจะหยุดที่ตำแหน่งใดของ G จึงตรวจดูตำแหน่งของ G จากเทคนิคการทำเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส และทำการยับยั้งปฏิกิริยากับเบสตัวอื่นๆ (A, T และ C) ด้วย อ่านผลของปฏิกิริยา 4 ชนิด (ของ A, T, G และ C) โดยวิธีการอ่านแบบลำดับขั้นบันไดเป็นการบอกลำดับของเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย

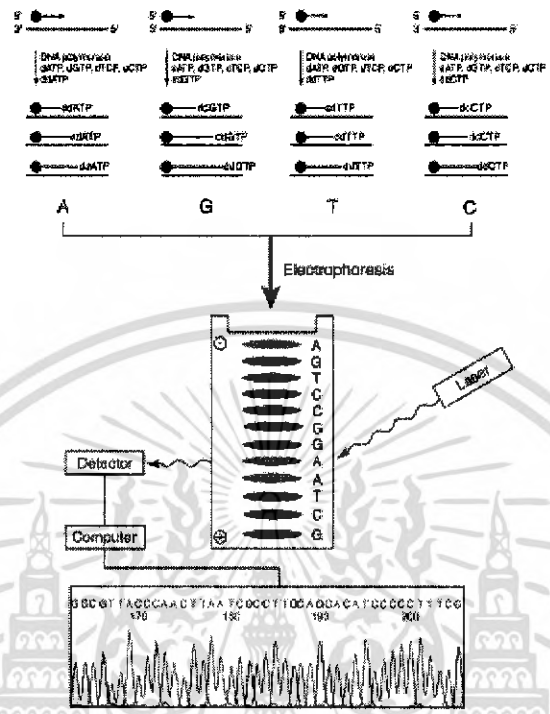



**รูปที่ 2.4 เทคนิคของ Sanger ในการตรวจลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ**

ที่มา : http://www.bioteach.ubc.ca/Bioinformatics/GenomeProjects

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีเครื่องมืออัตโนมัติ (รูปที่ 2.5) ตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอซึ่งเป็นประโยชน์มาก เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าแบบเดิม มีความถูกต้องมากกว่า และสามารถอ่านลำดับเบสได้ครบถ้วนทั้งหมด




**รูปที่ 2.5 หลักการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (Automated sequencing)**

ที่มา : http://genome4.cpmc.columbia.edu/dna_chem.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

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

## 3.2 พลาสมิด

3.2.1 pDrive Cloning Vector (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก 1)

3.2.2 pMV261(ภาคผนวก 2)

## 3.3 สารเคมี

### 3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 Middlebrook medium (ภาคผนวก 3)

3.3.1.2 Luria-Bertani medium (LB) (ภาคผนวก 4)

3.3.1.3 SOB medium (Tryptone , yeast extract, NaCl)

### 3.3.2 ยาปฏิชีวนะ

3.3.2.1 กานามัยซิน (kanamycin)

### 3.3.3 เอนไซม์

3.3.3.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Promega, USA)

3.3.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Promega, USA)

3.3.3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I (Promega, USA)

3.3.3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I (Promega, USA)

3.3.3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Promega, USA)

### 3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.4.1 ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ขนาด 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416, 23,130 คู่เบส) (Promega, USA)

3.3.4.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700 ,800, 900, 1000, 1200, 1517 คู่เบส) (Promega, USA)

**3.3.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอนเอ**

3.3.5.1 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

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

3.3.5.3 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

3.3.5.4 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.3.5.5 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.3.5.6 อะกาโรส (Agarose)

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

3.3.5.8 กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ (86% glycerol)

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

3.3.5.10 สีย้อม ดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ภาคผนวก 5)

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

3.3.5.12 สารละลายที่ 2 (NaOH 0.2 มิลลิโมลาร์, SDS 1 เปอร์เซนต์)

3.3.5.13 สารละลายที่ 3 ($CH_3COOK$ 5 มิลลิโมลาร์, glacial acetic acid)

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

3.3.5.15 บัฟเฟอร์ RF1 (KCl 10 มิลลิโมลาร์, $MnCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์, KOAc 30 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์)

3.3.5.16 บัฟเฟอร์ RF2 (MOPs 10 มิลลิโมลาร์, KCl 10 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 75มิลลิโมลาร์)

3.3.5.17 X-gal (5-Bromo-4-chloro-IndoLyl-$\beta$-D-Galactopyranoside) (Promega, USA)

3.3.5.18 IPTG (Isopropyl-$\beta$-D-Thiogalactopyranoside) (Promega,USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.19 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์

3.3.5.20 ไลโซไซม์ (lysozyme)

**3.3.6 ชุดทดสอบ (kit )**

3.3.6.1 ชุด QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany)

3.3.6.2 ชุด Qiaprep® spin miniprep (Qiagen, Germany)

**3.3.7 อุปกรณ์**

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

3.3.7.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Hermle-Labortech รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี

3.3.7.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี

3.3.7.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Lammina flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

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

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

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

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

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

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

3.3.7.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (Thermoblock) บริษัท Biosan รุ่น TDB-120 Thermostat ประเทศเยอรมนี

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

3.3.7.13 เครื่องแก้ว (Glasswares)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67292

## 3.4 วิธีการทดลอง

### 3.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* บนอาหารแข็ง Middlebrook จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

### 3.4.2 การสกัด crude DNA จากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* 1 ลูป ในบัฟเฟอร์ TE 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง ทำให้ได้สารละลาย crude DNA ดีเอ็นเอของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

### 3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *relE* และ ยีน *relBE*

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculsis* โดยอาศัยข้อมูลจากธนาคารยีน (Gen Bank) ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้สร้างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE* โดยออกแบบให้ครอบคลุมบริเวณจุดเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon) และจุดสิ้นสุดการแปลรหัส (stop codon) อีกทั้งออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5′ มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ด้านปลาย 3′ มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า FB2866 และ RC2866 สำหรับยีน *relBE* ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5′ มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I ให้ชื่อไพร์เมอร์ว่า FX2865 ส่วนด้านปลาย 3′ ใช้ไพรเมอร์ตัวเดียวกับที่ออกแบบไว้เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *relE*

### 3.4.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *relE* และ ยีน *relBE* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

PCR (Polymerase chain reaction) คือเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ โดยในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ FB2866 ไพรเมอร์ FX2865 และไพรเมอร์ RC2866 ซึ่งได้ทำการออกแบบมาตามวิธีข้างต้นแล้ว และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE***

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | |
|---|---|---|
| | ยีน *relE* | ยีน *relBE* |
| บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า | 5 | 5 |
| มิลลิโมลาร์ dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) | 1 | 1 |
| ไพรเมอร์ FB2866 (5 มิลลิโมลาร์) | 2.5 | - |
| ไพรเมอร์ FX2865 (5 มิลลิโมลาร์) | - | 2.5 |
| ไพรเมอร์ RC2866 (5 มิลลิโมลาร์) | 2.5 | 2.5 |
| แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) | 3 | 3 |
| เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ( 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 0.5 | 0.5 |
| จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 5 | 5 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 30.5 | 30.5 |
| ปริมาตรสุทธิ | 50 | 50 |

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 94 องศาเซลเซียส | 5 นาที | |
| Denaturation | 94 องศาเซลเซียส | 1 นาที | 40 รอบ |
| Annealing | 50 องศาเซลเซียส | 1 นาที | |
| Extension | 72 องศาเซลเซียส | 2 นาที | |
| Final extension | 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที | |

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเทคนิคอะการโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสดังวิธีการตามหัวข้อ 3.4.5

### 3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส

เตรียมเจลอะกาโรส 0.8, 1.0, 1.5 หรือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยชั่งอะกาโรส 0.16, 0.2, 0.3 และ0.4 ตามลำดับ ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE buffer) 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ (microwave) แล้วปล่อยให้อะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมเจลสตาร์ 1 ส่วนต่ออะกาโรส 100 ส่วน และเทใส่แม่พิมพ์ทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ใส่ในอ่าง (chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) หลังจากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแผ่นเจลที่เตรียมไว้โดยทำการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปส่องกายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ถ่ายรูปแผ่นเจลและคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.4.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

เมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสแล้ว ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด โดยกลับหลอดทุก 2 นาที หลังจากที่เจลละลายหมด ปิเปตสารละลายเจลครั้งละ 700 ไมโครลิตร ลงใน QIA quick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง แล้วปิเปตสารละลายเจลลงไป ทำซ้ำจนสารละลายเจลหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ก้นหลอด แล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตบัฟเฟอร์ EB ลงไป 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส จากนั้นนำสารละลายเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* กับพลาสมิด pDrive

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany) ที่ได้จากหัวข้อ 3.4.6 โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ของพลาสมิด pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE***

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | |
|---|---|---|
| | *relE* | *relBE* |
| พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 1 | 1 |
| ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* (16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 6 | - |
| ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE* (19 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | - | 6 |
| 2 เท่าของบัฟเฟอร์ ligation | 10 | 10 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 3 | 3 |
| ปริมาตรสุทธิ | 20 | 20 |

**3.4.8 การเตรียม competent cell**

การเตรียม competent cell ทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* DH5α มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนเซลล์ปริมาณโดยการนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลว SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ควรมีค่าระหว่าง 0.6-0.8 เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม ทำการแช่ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นกระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ RF1 ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตร SOB บ่มบนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งส่วนใส หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RF2 ปริมาตร 1ใน 25 ของปริมาตร SOB ทำการกระจายเซลล์ได้เป็น competent cell เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

**3.4.9 การทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)**

การทรานสฟอร์มเมชันทำได้โดยการนำพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแล้วมาทรานสฟอร์มใน competent cell โดยใช้พลาสมิด pDrive ที่มีชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เป็น positive control และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็น Negative control ปิเปต competent cell 100 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และพลาสมิด 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่เย็น แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้น นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำมาเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการพลิกหลอดๆไปมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตออกมา 100 ไมโครลิตร มาทำเทคนิค spread plate ลงบนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 3 ซ้ำ นับจำนวนโคโลนีที่ได้เทียบกับตัวควบคุม

### 3.4.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคโลนีที่ได้จากหัวข้อ 3.4.9 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปิเปตเชื้อทั้งหมด ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนใส เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 100ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ออกจากกัน เติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ใหม่ เติมเอทานอล 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 ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส ตากหลอดจนกระทั่งแห้ง ละลายพลาสมิดดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.4.11 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE* ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6

### 3.4.12 การตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ที่ได้จากข้อ 3.4.10 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการตัดแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส แล้วเก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

| *ส่วนประกอบ* | *ปริมาตร (ไมโครลิตร)* | |
|---|---|---|
| | *pDrive-relE* | *pDrive-relBE* |
| พลาสมิด *pDrive-relE* (67.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 8 | - |
| พลาสมิด pDrive-*relBE* (67.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | - | 8 |
| เอนไซม์ *Eco*RI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 2 | 2 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ H | 2 | 2 |
| BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | 2 | 2 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 6 | 6 |
| ปริมาตรสุทธิ | 20 | 20 |

**3.4.13 การตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

หลังจากการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นนำโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* มาทำการเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด Qiaprep® spin miniprep (Qiagen, USA) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยพลาสมิด pDrive-*relE* จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I และ *Cla*I สำหรับ พลาสมิด pDrive-*relBE* จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงดังตาราง 3.4 และ3.5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิด pDrive-*relE* (51.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 30 |
| เอนไซม์ *Cla*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 4 |
| เอนไซม์ *Bam*HI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 4 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ | 6 |
| BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | 6 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 10 |
| ปริมาตรสุทธิ | 60 |

**ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิด pDrive-*relBE* (51.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 30 |
| เอนไซม์ *Cla*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 4 |
| เอนไซม์ *Xba*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 4 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ | 6 |
| BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | 6 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 10 |
| ปริมาตรสุทธิ | 60 |

**3.4.14 การตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

พลาสมิด pMV261 ที่นำไปเชื่อมต่อกับยีน *relE* จะต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I และ *Bam*HI โดยครั้งแรกจะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I จากนั้นจึงตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ส่วนพลาสมิด pMV261 ที่จะนำไปเชื่อมต่อกับยีน *relBE* จะต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I และ *Xba*I โดยครั้งแรกจะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I จากนั้นจึงตัดด้วยเอนไซม์ตัด-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะ *Xba*I ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงดังตาราง 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

**ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I และ*Bam*HI**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | |
|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 |
| พลาสมิด pMV261 (48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 40 | - |
| พลาสมิด pMV 261ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I (33.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | - | 18 |
| เอนไซม์ *Cla*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 8 | - |
| เอนไซม์ *Bam*HI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | - | 3 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ | 6 | 3 |
| BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | 6 | 3 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | - | 3 |
| ปริมาตรสุทธิ | 60 | 30 |

**ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I และ *Xba*I**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | |
|---|---|---|
| | ครั้งที่1 | ครั้งที่2 |
| พลาสมิด pMV261 (48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 40 | - |
| พลาสมิด pMV 261ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I (30.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | - | 20 |
| เอนไซม์ *Cla*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 8 | - |
| เอนไซม์ *Xba*I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | - | 4 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ Tango | 6 | 3 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 6 | 3 |
| ปริมาตรสุทธิ | 60 | 30 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.15 การตรวจสอบผลของการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสและการทำให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ของพลาสมิด pMV261 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I และผลิตภัณฑ์ของพลาสมิด pMV261 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสเทียบกับพลาสมิด pMV261 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของพลาสมิดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ต่อไป

### 3.4.16 การเชื่อมต่อยีน *relE* และยีน *relBE* กับพลาสมิด pMV261

นำชิ้นส่วนของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามหัวข้อ 3.3.13 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pMV261 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันตามหัวข้อ 3.3.14 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.8 และตารางที่ 3.9

**ตารางที่ 3.8 ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา ligation ของ พลาสมิด pMV261 และยีน *relE***

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์-ตัดจำเพาะ *Cla*I และ *Bam*HI ( 20.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 3 |
| ยีน *relE* (16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 10 |
| 10 เท่าบัฟเฟอร์ T4 ligase | 3 |
| เอนไซม์ T4 ligase | 2 |
| 30 เปอร์เซ็นต์ PEG | 2 |
| ปริมาตรสุทธิ | 20 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.9 ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา ligation ของ พลาสมิด pMV261 และยีน *relBE***

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I และ *Xba*HI (15.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 4 |
| ยีน *relBE* (15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 10 |
| 10 เท่าบัฟเฟอร์ T4 ligase | 2 |
| เอนไซม์ T4 ligase | 2 |
| 30 เปอร์เซ็นต์ PEG | 2 |
| ปริมาตรสุทธิ | 20 |

จากนั้นทำการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิด pMV261-*relE* และ pMV216-*reBE* เข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α โดยวิธีการตามหัวข้อ 3.4.8 และ 3.4.9

### 3.4.17 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMv261-*relBE*

คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkali lysis ตามหัวข้อ 3.4.10 จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์การเชื่อมต่อของ พลาสมิด ลูกผสม pMV261-*relE* และพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relBE* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงดังตารางที่ 3.10 และ 3.11 ตามลำดับ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

**ตารางที่ 3.10 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิด pMV261-*relE* (45 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 2 |
| เอนไซม์ *Eco*RI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 1 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ H | 1 |
| บัฟเฟอร์ BSA | 1 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 5 |
| ปริมาตรสุทธิ | 10 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.11 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิด pMV261-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| พลาสมิด pMV261-*relBE* (20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 2 |
| เอนไซม์ *Eco*RI (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 1 |
| 10 เท่าของบัฟเฟอร์ H | 1 |
| บัฟเฟอร์ BSA | 1 |
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 5 |
| ปริมาตรสุทธิ | 10 |

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและอภิปรายผล

## 4.1 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด pDrive

### 4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *relE* และยีน *relBE*

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน relE และยีน relBE ทำได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *relE* และ ยีน *relBE* จากแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* มาทำการออกแบบ forward primer ของยีน *relE* ด้านปลาย 5′ ให้ครอบคลุมบริเวณจุดเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon) โดยออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และออกแบบ reverse primer ของยีน *relE* ด้านปลาย 3′ ให้ครอบคลุมบริเวณจุดสิ้นสุดการแปลรหัส (stop codon) โดยออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I โดยให้ชื่อไพรเมอร์ว่า FB2866 และ RC2866 ตามลำดับดังนี้

5′-GC**GGATTC**GTGCCTTACACCGTGCG-3′ 2866FB forward primer
(*Bam*III)

5′-CG**ATCGAT**CTGAGACGCCGCGCACAA-3′ 2866RC reverse primer
(*Cla*I)

สำหรับยีน *relBE* จะทำการออกแบบ forward primer ด้านปลาย 5′ ให้ครอบคลุมบริเวณจุดเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon) ของยีน *relB* โดยออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า FB2865 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

5′-GC**TCTAGA**GGTGAGTTGCTATCGGCG-3′ 2865FX forward primer
(*Xba*I)

ส่วน reverse primer 2866RC ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกับที่ออกแบบไว้สำหรับยีน *relE* โดยมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I หลังจากนั้นจะนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *relE* และยีน *relBE* ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

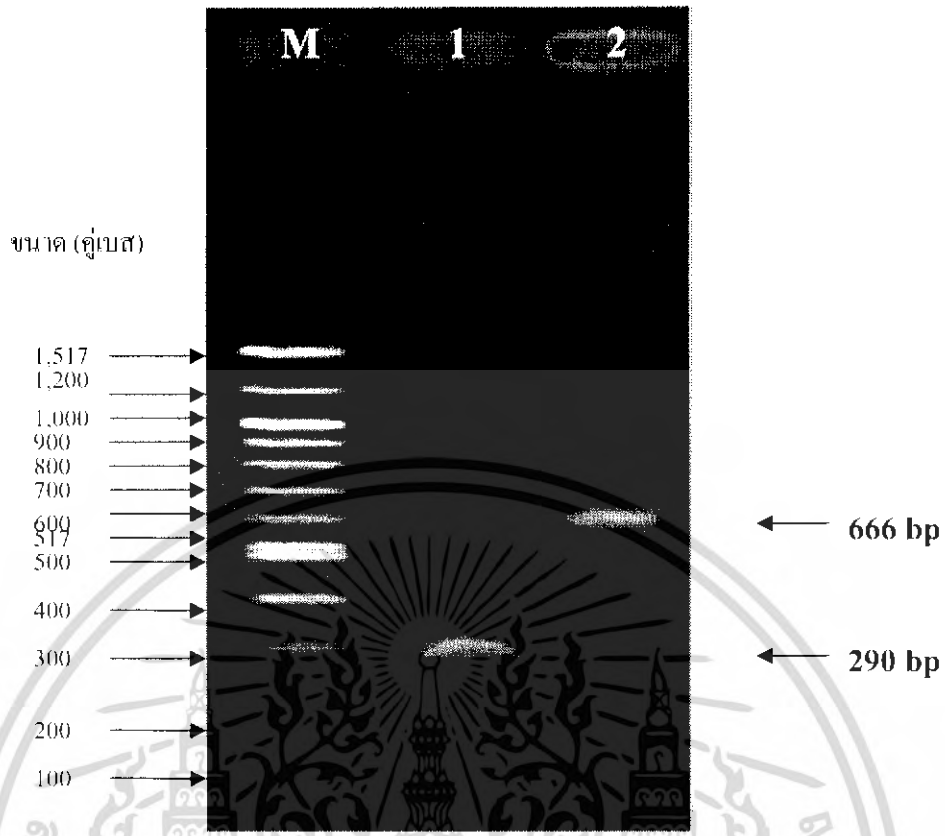
### 4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *relE* และยีน *relBE* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *relE* และยีน *relBE* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังแสดงในตารางที่ 3.1 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal cycle) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* 1 แถบเมื่อนำขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR มาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 300 คู่เบสซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือ 290 คู่เบส และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE* มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบสซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือ 666 คู่เบส (รูปที่ 4.1) ภายหลังจากการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR แล้วจะทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) จากผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงให้เห็นว่าสภาวะและปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้มีความเหมาะสม อีกทั้งไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความจำเพาะเจาะจง มีขนาดโดยประมาณใกล้เคียงกับความต้องการและมีความน่าเชื่อถือสูง

### 4.1.3 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ให้บริสุทธิ์

ภายหลังทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *relE* และยีน *relBE* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ก่อนจะนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปใช้ในการโคลนยีนต่อไป จะต้องมีการกำจัดสารเคมีปนเปื้อนจากการทำปฏิกิริยา PCR และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์โดยการใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นปรากฏแถบ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 290 คู่เบส และ 666 คู่เบสตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีปริมาณดีเอ็นเอ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 19 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะนำไปทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis***

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE*

2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE*

**4.1.4 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive**

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่งมีขนาดประมาณ 290 คู่เบส ปริมาณ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 666 คู่เบส ปริมาณ 19 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ปริมาณ 50 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พลาสมิดลูกผสมที่ได้คือพลาสมิดลูกผสมของ pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และพลาสมิดลูกผสมของ pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE* หลังจากนั้นจะทำการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

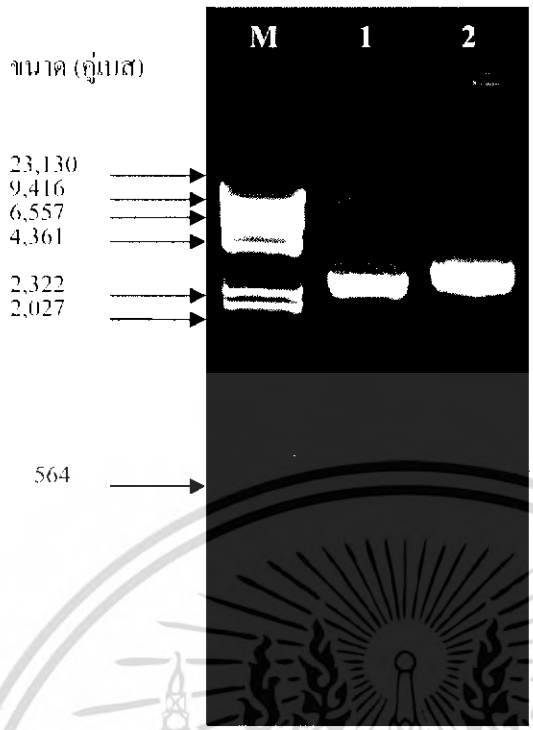
**4.1.5 ผลการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α**

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และยีน *relBE* กับพลาสมิด pDrive มาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 80 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว เนื่องจากเวคเตอร์ pDrive มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งมีบริเวณ multiple cloning site อยู่บนยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ (α-peptide) ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site ยีนดังกล่าวจะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินได้ จากการทรานสฟอร์ม-เมชันได้คัดเลือกโคโลนีสีขาว 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชันมีค่าประมาณ $1.01 \times 10^6$ CFU ต่อไมโครกรัม แสดงว่าสภาวะที่ใช้มีความเหมาะสมและเซลล์ผู้ให้อาศัย *E.coli* DH5α มีคุณภาพดี

**4.1.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ**

ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* มาอย่างละ 4 โคโลนี เพื่อทำการสกัดพลาสมิด โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB นำไปบ่มสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkali lysis จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ได้ผลดังรูป 4.2 เมื่อคำนวณปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอของ pDrive-*relE* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานเฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 67.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับ pDrive-*relBE* พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 67.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเช่นกัน ทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.2 ผลของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* และตรวจสอบปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส**

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE*

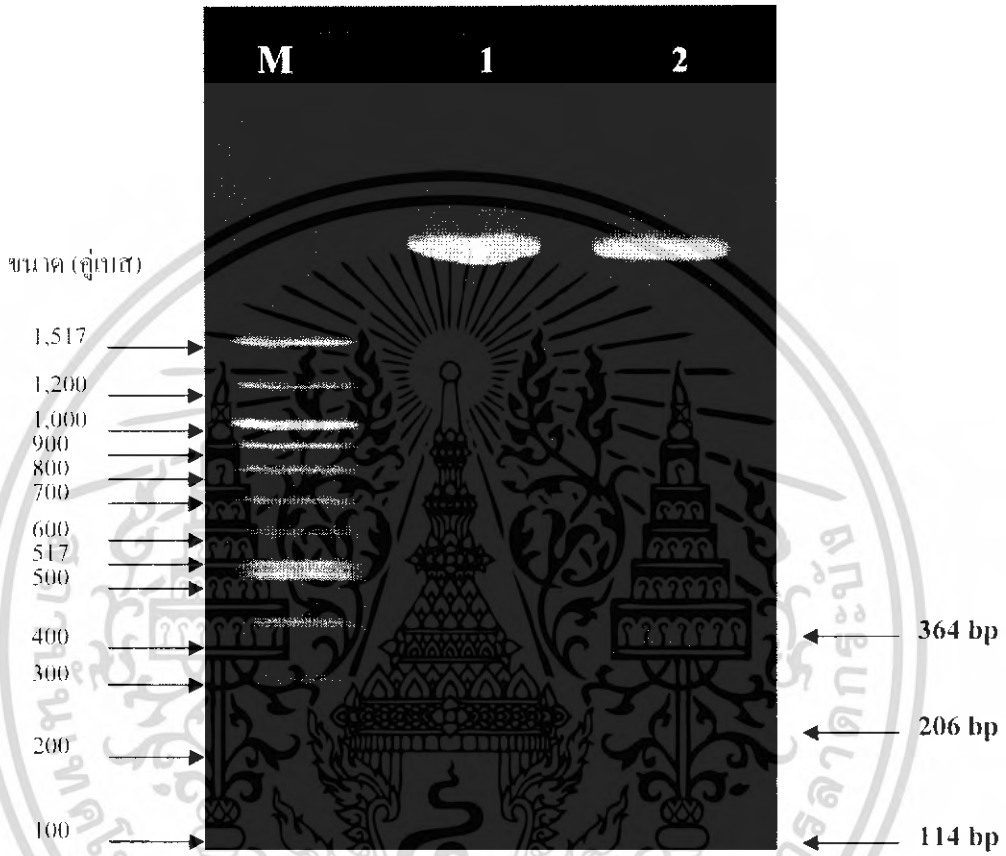
2 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE*

**4.1.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

นำพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อทำการทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ปรากฏแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 3 แถบ มีขนาดดังนี้ 3,845, 206 และ 94 คู่เบส โดยชิ้นส่วนขนาด 3829 คู่เบส คือชิ้นส่วนของพลาสมิด pDrive ที่เหลือจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ชิ้นส่วนขนาด 206 และ 94 คู่เบส คือชิ้นส่วนของยีน *relE* ที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริเวณพลาสมิด pDrive (ภาคผนวก 1) จำนวน 2 ตำแหน่ง และบริเวณภายในยีน *relE* จำนวน 1 ตำแหน่ง สำหรับพลาสมิด pDrive-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ปรากฏแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 4 แถบ มีขนาด 3,839, 364, 206 และ 114 คู่เบส โดยชิ้นส่วนขนาด 3839 คู่เบส คือชิ้นส่วนของพลาสมิด pDrive ที่เหลือจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนชิ้นส่วนขนาด 364, 206 และ 94 คู่เบส คือชิ้นส่วนของยีน *relBE* ที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมิด pDrive จำนวน 2 ตำแหน่ง และบริเวณภายในยีน *relBE* จำนวน 2 ตำแหน่ง ดังรูปที่ 4.3 จากผลความแตกต่างของขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จึงสามารถนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากกระบวนการเชื่อมต่อ (ligation)




**รูปที่ 4.3 ผลของการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

1 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

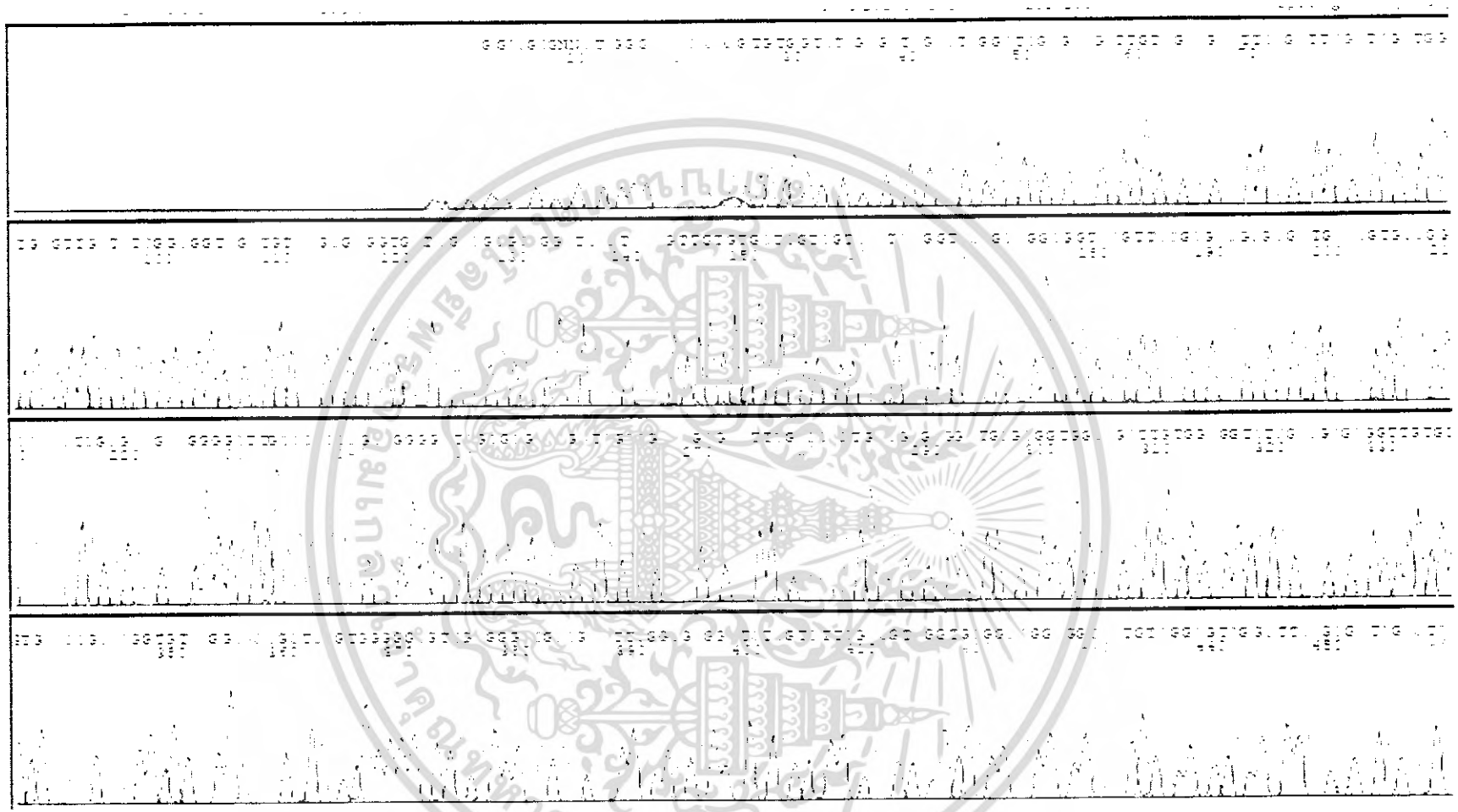
2 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relBE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

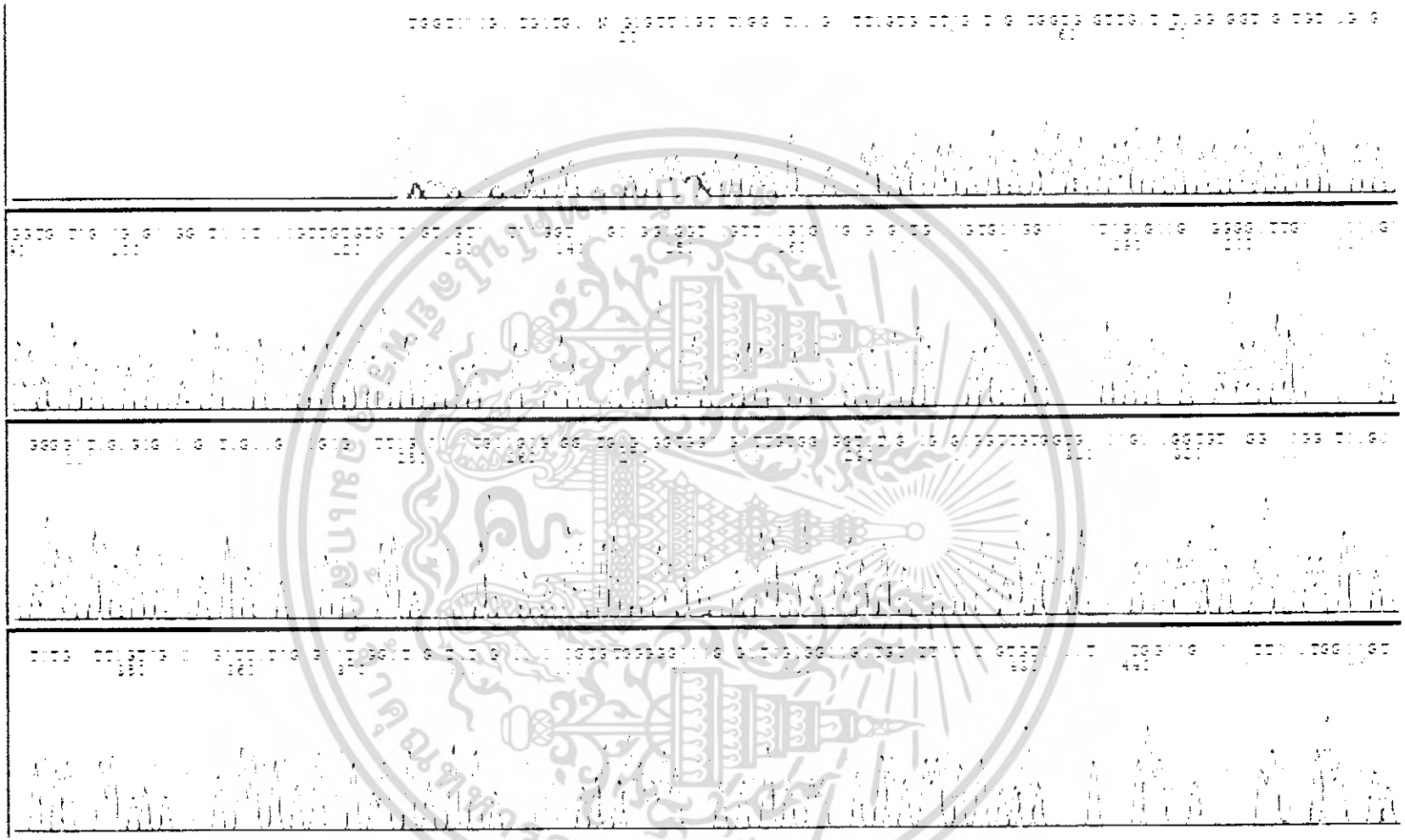
**4.1.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE***

จากการนำพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ที่ได้จากการเชื่อมพลาสมิด pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* ซึ่งมีขนาด 290 คู่เบส และพลาสมิด pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE* ซึ่งมีขนาด 666 คู่เบส ตามลำดับ มาตัดด้วยเอไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ามีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จากนั้นจึงนำพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM$^{R}$ 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6 เป็นไพรเมอร์ ได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 4.4 (สำหรับ pDrive-relE) และ รูปที่ 4.5 (สำหรับ pDrive-*relBE*) เมื่อนำโครมาโตแกรมมาเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ จะพบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* มีขนาด 290 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกประการกับยีน *relE* จาก *M. tuberculosis* โดยมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I ในไพรเมอร์ด้าน forward และ reverse ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relBE* มีขนาด 666 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกประการกับยีน *relBE* จาก *M. tuberculosis* โดยมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I ในไพรเมอร์ด้าน forward และ reverse ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.4** โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-*relE* จาก BigDye Terminator reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7



**รูปที่ 4.5** โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-*relBE* จาก BigDye Terminator reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM$^{R}$ 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7

TGGTCCCGCATGCTGCANAGCGTTCGTATCGGATCCAGAATTCGTGATT[illegible]GTAGATGTCCGCGCGGTGAT

CGACGCGCAGGATCACTACCGTTGTGTGCTCGTCGTCAATCCGGTACAGCAGGCGGTACGTTCCGCGACGCGCGCTGAACGTGCCGGCCAACTCGC

GCCGAAGGGGCTTGCCCACCCGCAGGGGCTCGCGCGACAGATCGCCGAACGCGAATTCGACCACTGCCGCGAGGATGCGCGGTGGCAGCTTGTGG

AGGTCTCGACGCGCGGTTGTGGTGAAC AATCTGAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCT

AGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTCGCGGCCGCTGTATTCTATAGTGTCACCTAAATGGCCGCACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT

GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC

CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATT

TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAATCAAAAAATAGACNGAGATAGGNTGANTGTTGTTCCAGTTTGGAAAAGAGTCACTAT

TAAAAACGTGGACTCAACGTCAAAGGNCGAAAANCGTCTATCAGGCGATGNCCATACGTGAACATCNCCTATCAGTTTTTGGGGCGAGGGCNTAA

ANANTAATCGAACCTAAGGANCCCCAATTNAANTNANGGAAAACNCCAANTGNCAAAANAAGNAAAANNAAGANCGGCCTAGGCTTGAAATNAA

GTACCTTCGNAACCACCCCCNNTTANGCCCTANGGGNNG

5′-GC**GGATCC**GTGCCTTACACCGTGCG-3′ 2866FB forward primer

(*Bam*HI) (สีเขียว)

5′-CG**ATCGAT**GGTGAGTTGCTATCGGCG-3′ 2866RC reverse primer

(*Cla*I) (สีน้ำเงิน)

**รูปที่ 4.6 การตรวจสอบความถูกต้องของโครมาโตแกรมของพลาสมิด pDrive-*relE* จากโครมาโตแกรมในรูป 4.4**

TGGTCCCGCATGCTGCANAGCGTTNGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTCGTAGTAGACTGAGACGCCGCGCACAAAGTGCGAAACCACTGGAA

GGTGAGCCCTAATTTAGGGCTGAGCAGGACCTGTATAACGGCCTAGTATGGCGGTATGCGGATACTGCCGATTTCGACGATCAAGGGCAAGCTCAA

TGAGTTCGTCGACGCGGTCTCGTCGACACAGGACCAGATCACCATCACCAAGAACGGTGCACCCGCAGCCGTTCTGGTCGGCGCCGACGAGTGGGA

ATCGTTGCAGGAGACGCTGTACTGGCTGGCGCAACCCGGAATCAGGGAGTCGATCGCTGAAGCCGACGCCGACATTGCCTCCGGCCGCACCTACGG

CGAAGACGAGATCCGCGCCGAATTCGGCGTCCCGCGACGCCCCCACTGAGCGGTGCCTTACACCGTGCGGTTCACCACAACCGCGCGTCGAGACCT

CCACAAGCTGCCACCGCGCATCCTCGCGGCAGTGGTCGAATTCGCGTTCGGCGATCTGTCGCGCGAGCCCCTGCGGGTGGGCAAGCCCCTTCGGCG

CGAGTTGGCCGGCACGTTCAGCGCGCGTCGCGGAACGTACCGCCTGCTGTACCGGATTGACGACGAGCACACAACGGTAGTGATCCTGCGCGTCGA

TCACCGCGCGGACATCTAC[illegible]AATCTGAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGNCTAGCTNTAAACCAC

ACGTGTGGGGGCCNANCTCGNGNCGCTGTNTNTATNTGTCACTAATGGCGCCAATTCATGGCCGTCGTTTNNACGTCNTGATGGGAAAACCTGGGG

TNCCAATTTATCGCTTGAAANATCCCTTTNCCAGTTGGTTATACAAANGCCNNCNATNCCNTCCANATTNNCACCTNANGNANGNAATNTANNNTA

NTTTNTAATNCGGTNANTTNTAANCC

5′-GC**TCTAGA**CTGAGACGCCGCGCACAA-3′ 2865FX forward primer

(*Xba*I) (สีแดง)

5′-CG**ATCGAT**GGTGAGTTGCTATCGGCG-3′ 2866RC reverse primer

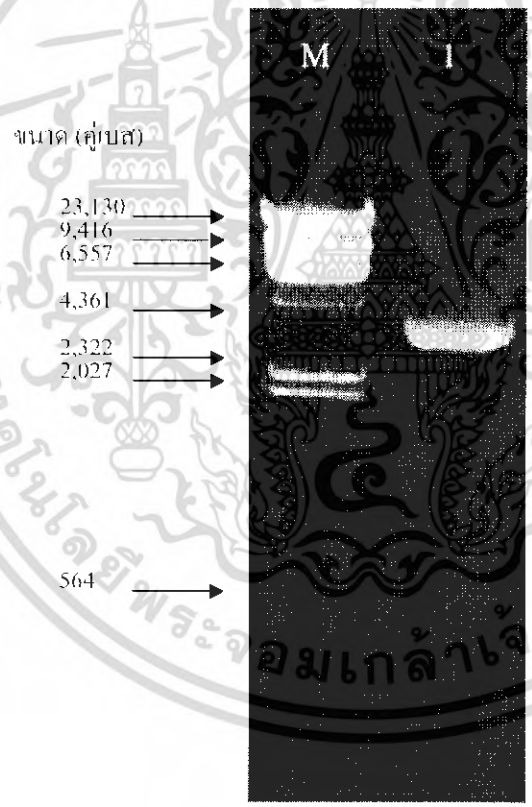
(*Cla*I) (สีน้ำเงิน)

**รูปที่ 4.7 การตรวจสอบความถูกต้องของโครมาโตแกรมของพลาสมิด Drive-*relBE* จากโครมาโตแกรมในรูป 4.5**

**4.2 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE* เข้าสู่พลาสมิด pMV261**

**4.2.1 การสกัดพลาสมิด pMV261**

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pMV261 ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย ชุดสกัดพลาสมิด Qiaprep® spin miniprep kit (Qiagen, Germany) และนำมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าปรากฏมีแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่ามีขนาดประมาณ 4500 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอพบว่ามีประมาณ 48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.8




**รูปที่ 4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261**

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

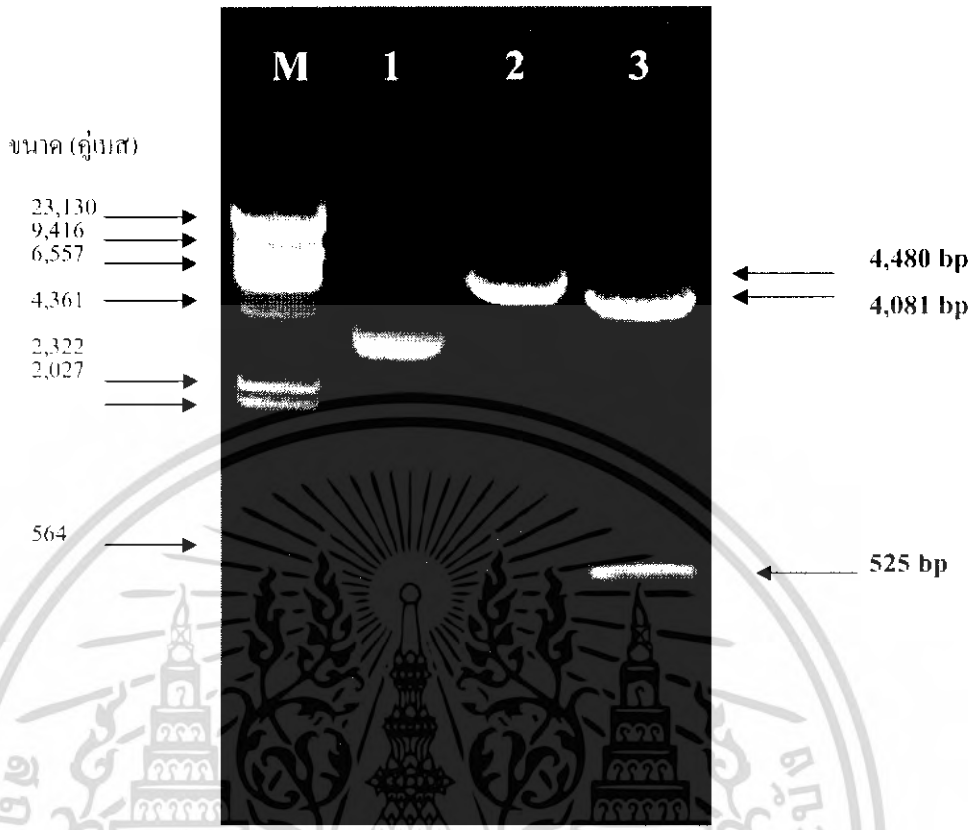
1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.2.2 ผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสและการทำให้บริสุทธิ์**

นำพลาสมิด pMV261 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I ดังวิธีในตารางที่ 3.6 และ 3.7 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับพลาสมิด pMV261 พบว่าพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I มีแถบเกิดขึ้น 1 แถบซึ่งมีขนาด 4,480 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 20.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I มีแถบเกิดขึ้น 2 แถบ คือแถบของพลาสมิด pMV261 จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีขนาด 3,081 คู่เบส และอีกแถบหนึ่งคือส่วนของยีนที่ถูกตัดออกมีขนาด 525 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 15.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในขณะที่พลาสมิด pMV261 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีแถบเกิดขึ้น 1 แถบดังรูปที่ 4.9 จากนั้นนำพลาสมิด pMV261 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIA quick gel extraction (Qiagen, Germany) ต่อไป จากผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I พบว่ามีการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดขึ้น เนื่องจากพลาสมิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทำให้ขนาดมีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองในพลาสมิด pMV261 เมื่อผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วควรได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 4480 และ 26 คู่เบส ซึ่งชิ้นส่วนขนาด 26 คู่เบส ไม่สามารถสังเกตได้จากเจล ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงมีโอกาสผิดพลาดได้สูง ส่วนผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I สามารถสังเกตความสมบูรณ์ในการตัดได้ง่าย เนื่องจากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดในพลาสมิด pMV261 มีระยะห่างถึง 525 คู่เบส ซึ่งสามารถสังเกตได้ในแผ่นเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.9 ผลการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

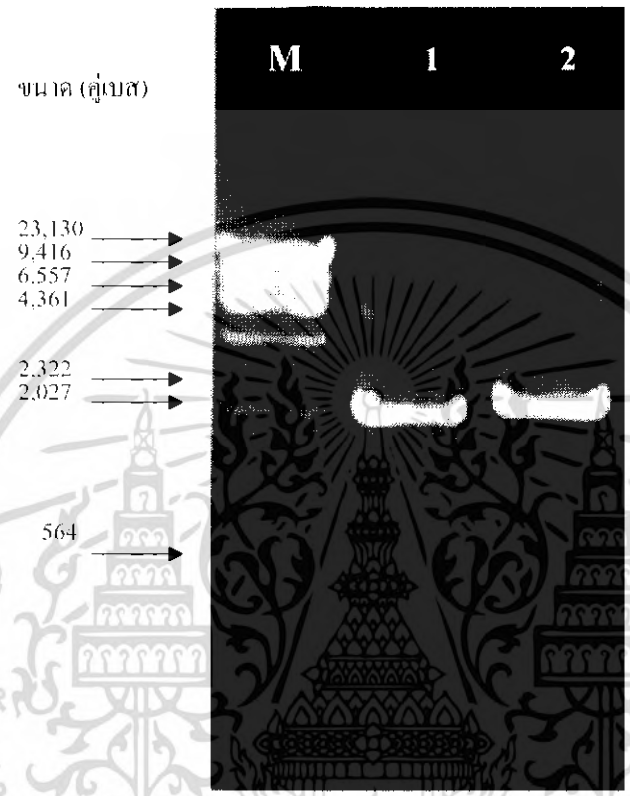
| | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII |
| 1 | พลาสมิด pMV261 |
| 2 | พลาสมิด pMV 261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I |
| 3 | พลาสมิด pMV 261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I |

**4.2.3 ผลการสกัดพลาสมิด pDrive-*relE* และpDrive-*relBE***

นำโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* มาทำการสกัดพลาส-มิดดีเอ็นเอ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB นำไปบ่มสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด Qiaprep® spin miniprep (Qiagen, Germany) และนำพลาสมิดที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมแต่ละชนิดได้แถบดีเอ็นเอชนิดละ 1 แถบ ซึ่งพลาสมิด pDrive-*relE* มีขนาด 4,140 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

51.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และพลาสมิด pDrive-*relBE* มีขนาด 4,516 คู่เบส เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 51.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.10




**รูปที่ 4.10 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE***

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE*

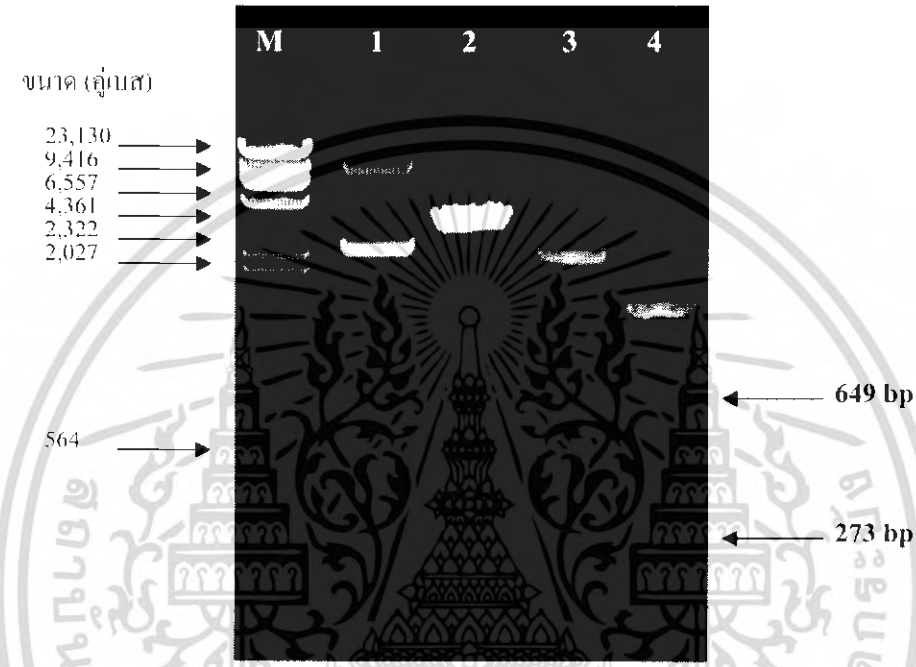
2 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE*

### 4.2.4 ผลการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และpDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการนำพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยพลาสมิด pDrive-*relE* ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ ขนาด 273 คู่เบส เป็นชิ้นส่วนยีน *relE* ที่สอดแทรกเข้าไป และแถบดีเอ็นเอขนาด 3867 คู่เบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนพลาสมิด pDrive สำหรับ พลาสมิด pDrive-*relBE* จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I พบว่ามีแถบเกิดขึ้น 3 แถบ ขนาด 649 คู่เบส เป็นชิ้นส่วนยีน *relBE*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สอดแทรกเข้าไปและแถบดีเอ็นเอขนาด 1,947 รวมกับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,547 คู่เบส ซึ่งเกิดจากชิ้นส่วนของพลาสมิด pDrive ที่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I อยู่ภายใน ดังรูปที่ 4.11




**รูปที่ 4.11 พลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE*

2 พลาสมิด pDrive-*relE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I

3 พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE*

4 พลาสมิด pDrive-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I

### 4.2.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์

หลังจากการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrve-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ทำการตัดชิ้นส่วนของยีน *relE* และยีน *relBE* และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIA quick gel extraction จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตภัณฑ์ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ นั้นปรากฏแถบ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 273 คู่เบส และ 649 คู่เบสตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ของยีน *relE* และยีน *relBE* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีปริมาณดีเอ็นเอ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *relE* และยีน *relBE* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันต่อไป

**4.2.6 ผลการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เข้าสู่พลาสมิด pMV 261**

นำผลิตภัณฑ์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *relE* และ *relBE* จากการตัดพลาสมิด pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่งมีขนาดประมาณ 273 คู่เบส ปริมาณ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และขนาด 649 คู่เบส ปริมาณ 15 นาโนกรัมต่อไมโครกรัมตามลำดับ มาเชื่อมกับพลาสมิด pMV261 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *relE* และ *relBE* ปริมาณ 20.6 และ 15.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการทรานส-ฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α ต่อไป

**4.2.7 ผลการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5α**

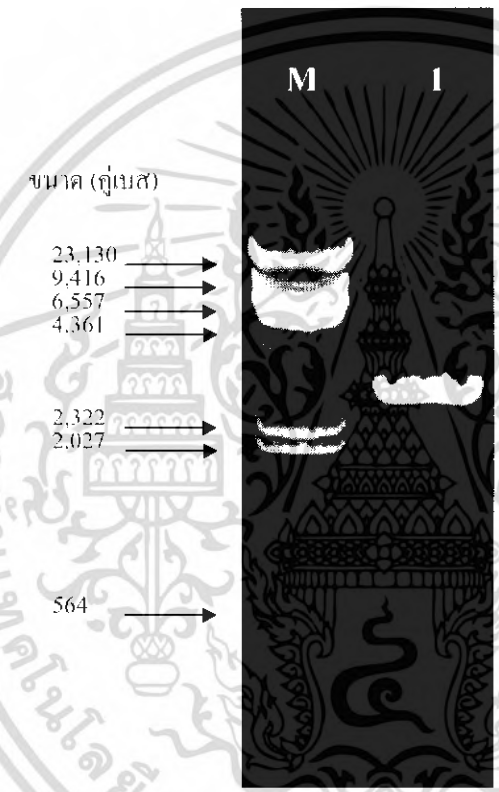
นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อในข้อ 4.2.6 มาทำการทรานสฟอร์มเมชันเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli*DH5α และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีโคโลนีที่ได้จากการทรานส-ฟอร์มพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* ทั้งสิ้น 1 โคโลนี และพบโคโลนีจากการทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relBE* ทั้งสิ้น 5 โคโลนี นำโคโลนีที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

**4.2.8 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE***

นำโคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkali lysis และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ปรากฏแถบแถบดีเอ็นเอชนิดละ 1 แถบ เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าพลาสมิด pMV261-*relE* มีปริมาณดีเอ็นเอ 45 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร(รูปที่ 4.12) และพลาสมิด pMV261-*relBE* มีปริมาณดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.13)

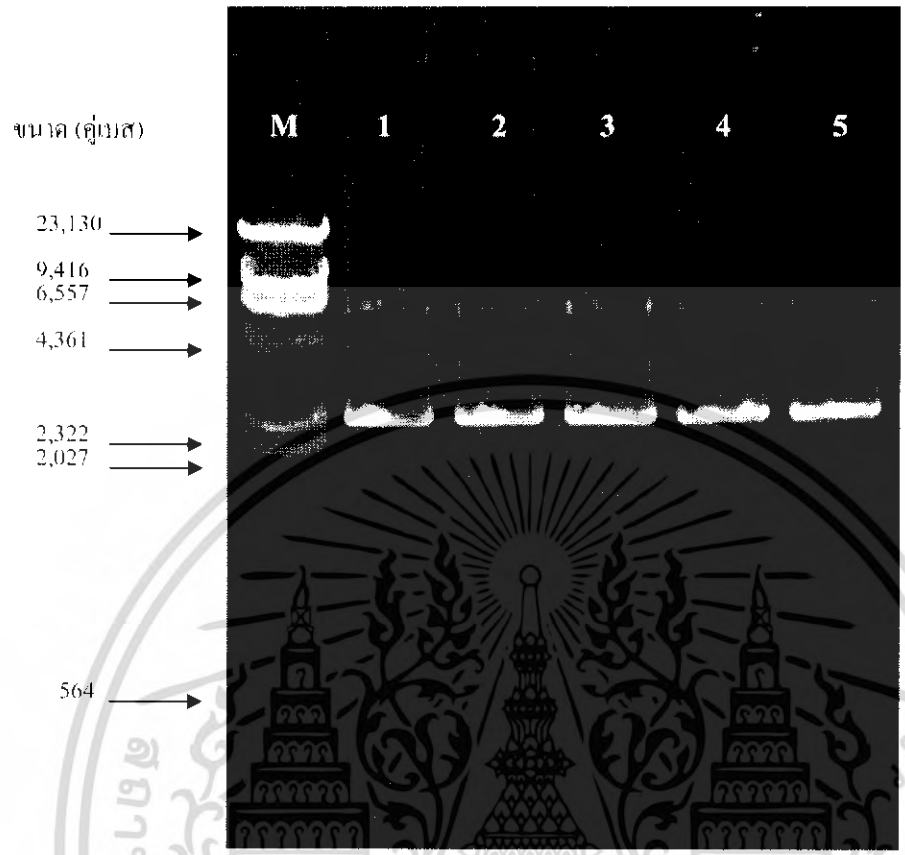



**รูปที่ 4.12 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE***

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

I พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.13 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relBE***

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

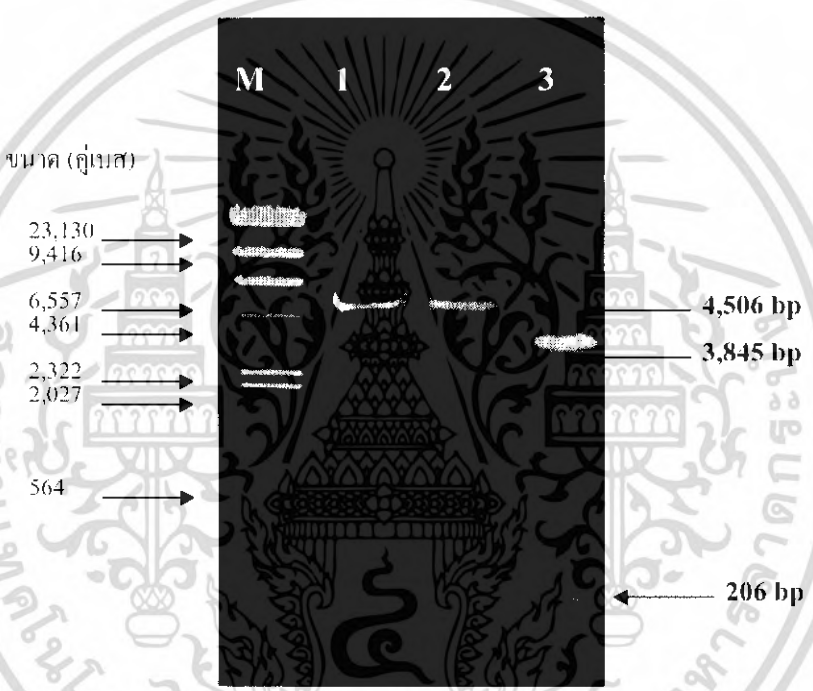
1-5 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relBE*

### 4.2.9 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* โดยการ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิด pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (วิธีการตามตารางที่ 3.12) เพื่อทำการทดสอบการมีชิ้นส่วนของยีน *relE* และยีน *relBE* นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบระหว่างพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และพลาสมิด pMV261ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ที่ไม่มีชิ้นส่วนของยีน *relE* หรือยีน *relBE* และพลาส-มิดลูกผสม pDrive-*relE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า พลาสมิด pMV261-*relE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 1 แถบ ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบของพลาสมิด pMV261 ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

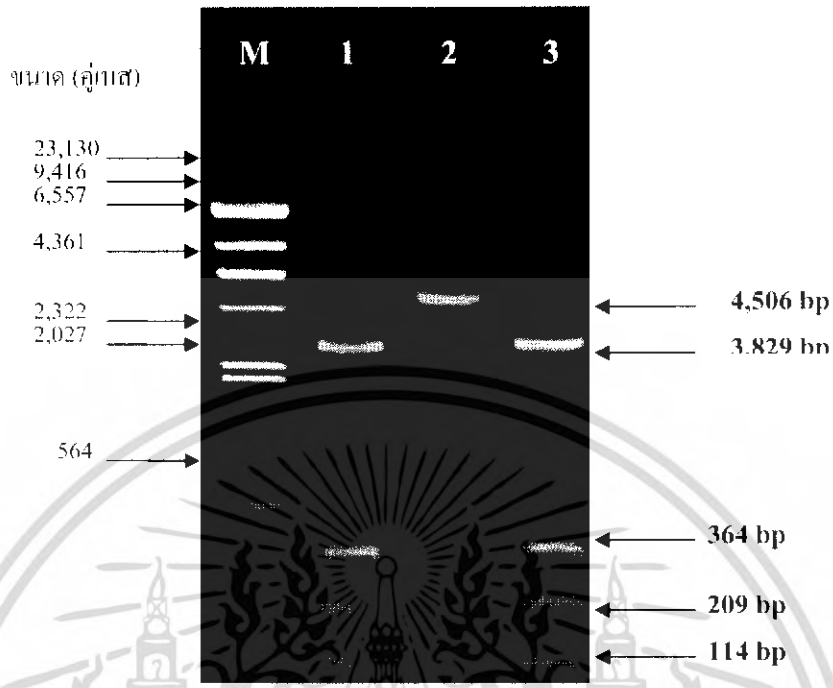
ไม่มีชิ้นส่วนของยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI คือมีขนาด 4,506 คู่เบส ดังรูปที่ 4.14 แสดงว่าพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งคาดว่าจะเป็นพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* นั้นที่จริงแล้วคือพลาสมิด pMV261 ที่เกิดการเชื่อมต่อภายในวงพลาสมิดเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขั้นการตัดพลาสมิด pMV261 เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์แล้วเกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relBE* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แสดงว่าพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งคาดว่าจะเป็นพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relBE* นั้นที่จริงแล้วคือพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE* ดังรูปที่ 4.15




**รูปที่ 4.14 ผลการตัดพลาสมิด pMV261-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

| | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III |
| 1 | พลาสมิด pMV261-*relE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |
| 2 | พลาสมิด pMV 261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |
| 3 | พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.15 ผลการตัดพลาสมิด pMV261-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI**

| | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII |
| 1 | พลาสมิด pMV261-*relBE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |
| 2 | พลาสมิด pMV261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |
| 3 | พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-*relBE* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการเพิ่มปริมาณยีน *relE* ของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ FB2866 กับ RC2866 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* ขนาด 290 คู่เบสที่มีการเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บริเวณส่วนหน้าของยีนและบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I บริเวณส่วนท้ายของยีน

5.1.2 จากการเพิ่มปริมาณยีน *relBE* ของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ FX 2865 กับ RC 2866 ได้ผลิตภัณฑ์ยีน *relE* ที่มีการเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I บริเวณส่วนหน้าของยีนและบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I บริเวณส่วนท้ายของยีน มีขนาดรวมทั้งสิ้น 666 คู่เบส

5.1.3 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดทางการค้า pDrive ได้พลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE* โดยพลาสมิดลูกผสมทั้งสองจะมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *relE* และ *relBE* อยู่ จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดลูกผสมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง เมื่อตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I ตามที่ได้ออกแบบไว้ในไพรเมอร์ ได้ชิ้นส่วนยีน *relE* ขนาด 273 คู่เบส และเมื่อตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I ตามที่ได้ออกแบบไว้ในไพรเมอร์ ได้ชิ้นส่วนยีน *relBE* ขนาด 649 คู่เบส

5.1.4 เมื่อเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *relE* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Cla*I เข้ากับพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัย *E.coli* DH5α พบการเจริญของโคลนจำนวน 1 โคโลนี เมื่อตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าเป็นพลาสมิด pMV261

5.1.5 เมื่อเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *relBE* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relBE* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Cla*I เข้ากับพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัย *E.coli*.DH5α พบการเจริญของโคลนจำนวน 5 โคโลนี เมื่อตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าเป็นพลาสมิด pDrive-*relBE*

**5.2 ข้อเสนอแนะ**

จากโครงงานพิเศษนี้พบปัญหาบางประการในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pMV261-*relE* และ pMV261-*relBE* ข้อเสนอแนะในการแก้ปัญหาอาจทำได้ โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นและปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้ในการตัดให้มีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้น เนื่องจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ หรืออาจปรับเปลี่ยนส่วนประกอบในขั้นตอนการเชื่อมต่อให้มีปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและพลาสมิดมากขึ้นและอาจมีการเติมสารช่วยลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มโอกาสในการเชื่อมต่อให้มากขึ้น นอกจากนี้ควรเพิ่มความระมัดระวังในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของพลาสมิดลูกผสม pDrive-*relE* และ pDrive-*relBE*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

พรงาม ลิ้มตระกูล. 2541. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. เชียงใหม่. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Christensen SK., Mikkelsen M., Pedersen K. and Gerdes K. 2001. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98 : 14328-143333.

Christensen SK, Pedersen K, Hansen GH, Gerdes K. 2003. Toxin-antitoxin loci as stress-responsible-elements. ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. J Mol Biol. 332 : 809-19.

Galvani C., Terry J. and Ishiguro E. 2001. Purification of the RelB Protiens of *Escherichia coli*: RelE binds RelB and to ribosomes. *Bacteriol. J.* 183 : 2700-2703.

Gerdes K. 2000. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *Bacteriol. J.* 182 : 561-572.

Gerdes K., Christensen SK. and Lobner-Olesen A. 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature rev Microbial*. 3 : 371-382.

Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. 1986. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid free cells. Proc Natl Acad Sci USA. 83:3116-20.

Gotfredson, M. and Gerdes, K. 1998. The *Escherichia coli* RelBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol. J.* 29 : 1065-1076.

Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186:8172-80.

Pedersen K, Zavialov AV, Povlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. 2003. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. Cell. 112:131-40.

http://www.elib-online.com/doctors45/ped_tb001.html

http://www.thailabonline.com/respirat-tb.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html

http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/mycotubr.html

http://epid.moph.go.th/dssur/respir/pulmtb.htm

http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/plasmid.gif

http://faculty.uca.edu/~march/bio1/DNA_GMO/gelelectro1.htm

http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg

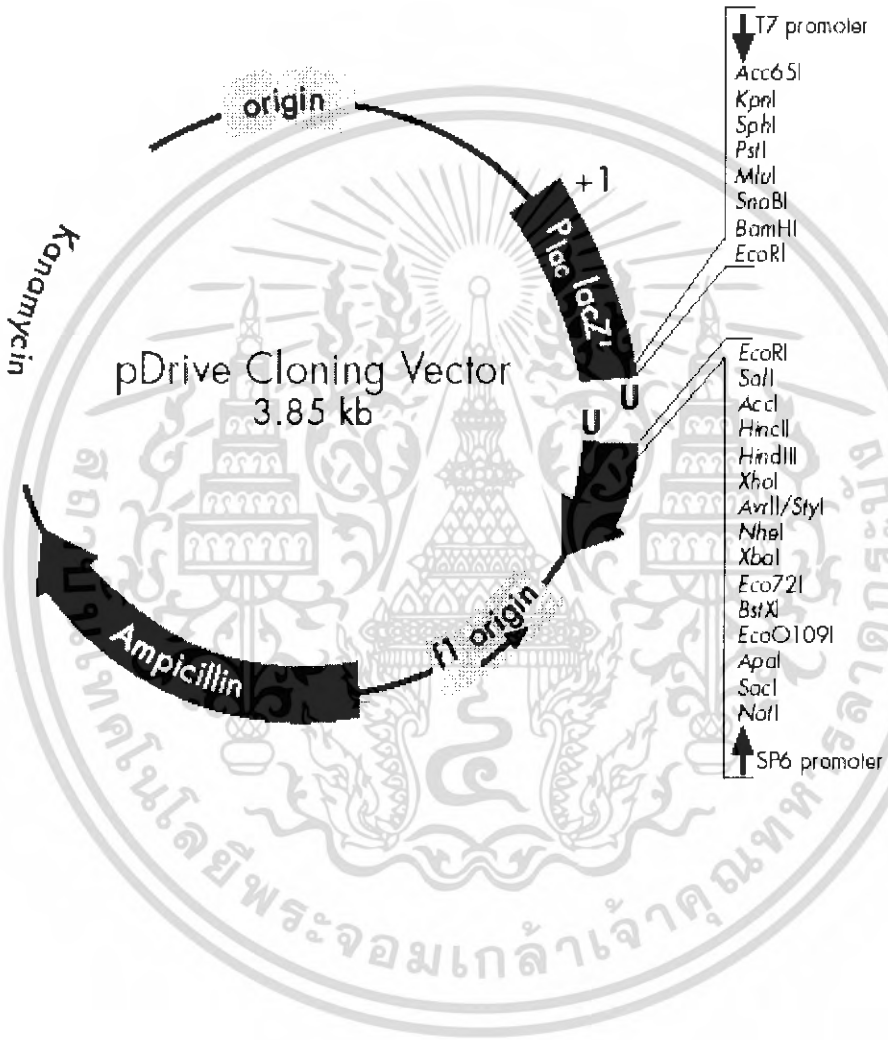
http://www.bioteach.ubc.ca/Bioinformatics/GenomeProjects

http://genome4.cpmc.columbia.edu/dna_chem.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก 1

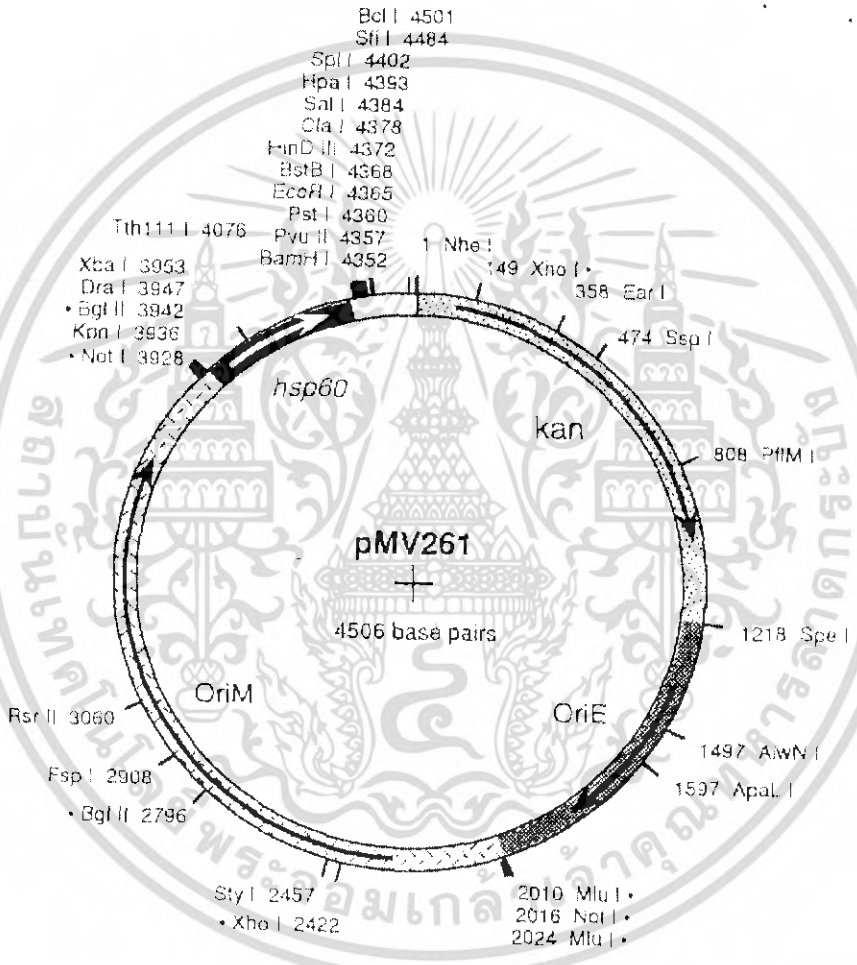
**แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)**




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก 2

**แผนที่ยีนของพลาสมิด pMV261**




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก 3

**ส่วนประกอบอาหารเหลว Middlebrook**

| | | |
|---|---|---|
| Middlebrook 7H9 | | 75 กรัมต่อลิตร |
| OADC | 10 | เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) |
| Tween 80 | 0.05 | เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) |

*ละลายอาหาร Middlebrook 7H9 ในน้ำกลั่น deionized 900 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้มีค่า 6.6 ± 0.2. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เติม AODC ที่ละลายใน Tween 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายอาหารเป็นไปตามที่กำหนดไว้*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก 4

**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 5

**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