

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลนยีน *attM* ของ  
เชื้อ *Mycobacterium smegmatis*



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....67289.....  
วัน,เดือน,ปี..2..2..พ.ศ..2548

b.....11k6206.....  
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Cloning of the putative *attM* of *Mycobacterium smegmatis***

**Mr. Rattanachai Pahtaradiloak**



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

**the Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

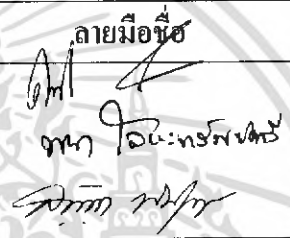
**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**


**Academic Year 2005**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงการพิเศษ**                      การโคลนยีน *attM* ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*  
**ชื่อนักศึกษา**                        นาย รัตนชัย ภัทรดิลก  
**ภาควิชา**                                ชีววิทยาประยุกต์  
**สาขาวิชา**                            เทคโนโลยีชีวภาพ  
**อาจารย์ที่ปรึกษา**                    ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์  
**ปีการศึกษา**                         2548

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	

  
 (รศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง)  
 หัวหน้าภาควิชา

สិขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การโคลนยีน <i>attM</i> ของเชื้อ <i>Mycobacterium smegmatis</i>	
นักศึกษา	นาย รัตนชัย ภัทรพิติก	รหัสประจำตัว 45050230
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย	

### บทคัดย่อ

ควอรัมเซนซิงเป็นระบบการสื่อสารของเซลล์ประเภทหนึ่งในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์ โดยเมื่อมีความหนาแน่นของประชากรสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง เซลล์จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โมเลกุลสัญญาณนี้จะเข้าจับกับรีเซพเตอร์ และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะถูกทำลายได้โดยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* การลดโมเลกุลสัญญาณจะนำไปสู่การลดความรุนแรงในการก่อโรค โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีน *attM* ของเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium smegmatis* เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของโปรตีนที่สร้างจากยีน *attM* ต่อไป การทดลองเริ่มจากการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จากเชื้อ *M. smegmatis* เข้าสู่พลาสมิด pDrive จากการทดลองพบว่าพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างพลาสมิด pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่มีขนาด 967 คู่เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องและมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ตรงกับไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้น นำชิ้นส่วนยีน *attM* และพลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มาเชื่อมต่อกันแล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 $\alpha$  จากการทดลองไม่สามารถโคลนยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET30a ได้ จึงได้ทำการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO จากการทดลองพบว่า พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1, 1.2 และ 1.3 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมระหว่างพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* แต่เฉพาะพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 เท่านั้นที่มีการเข้าจับของผลิตภัณฑ์ PCR ในทิศทางที่ต้องการ เมื่อนำพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเบสผิด 3 ที่ จึงไม่สามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Special Project Title</b>	<b>Cloning of the putative <i>attM</i> of <i>Mycobacterium smegmatis</i></b>
<b>Name</b>	Mr. Rattanachai Pahtaradiloak
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Academic year</b>	2004
<b>Spacial Project Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

### ABSTRACT

Quorum sensing is one of the cell communication systems in Gram-negative bacteria responding to the cell density. When the cell density increases, cells produce signal molecule acyl homoserine lactone. This signal molecule binds to the receptor and then activates the target gene expressions resulting in the different physiological expressions. It is destroyed by enzyme acyl homoserine lactonase encoded by *attM*. The decrease of this signal molecule leads to the decrease of disease virulence. This special project aims to clone *attM* of *Mycobacterium smegmatis* in order to study function and expression of protein encoded by *attM*. Firstly, the PCR product of *attM* from *M. smegmatis* was cloned into plasmid pDrive. It was found that pDrive-*attM* 1.1 was a recombinant plasmid of pDrive and PCR product of *attM*, which contained 967 bp, correct nucleotide sequences and had restriction recognition sites of *Bam*HI and *Hind*III as primers designed. Secondly, the *attM* fragment was cloned into the expression plasmid pET30a digested with restriction enzymes *Bam*HI and *Hind*III and the recombinant plasmid was transformed to competent cell *E. coli* DH5 $\alpha$ . From the result, *attM* fragment was not able to clone into expression plasmid pET30a. Finally, the PCR product of *attM* was cloned into the expression plasmid pCR T7/NT-TOPO. It was found that pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1, 1.2 and 1.3 were recombinant plasmids of pCR T7/NT-TOPO and the PCR product of *attM* but only pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 contained the PCR product in the right direction. The nucleotide of plasmid pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 was sequenced and three wrong bases were found, therefore this plasmid can not be used for studying the recombinant enzyme expression.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายหน้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้อนุเคราะห์ crude DNA ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล. ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและคอยเอื้อเพื่อให้คำปรึกษาต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างดำเนินงาน

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ โดยเฉพาะพี่ๆ ในห้องแลปทุกท่านที่ช่วยเหลือ แนะนำ จนทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ เป็นกำลังใจสำคัญ และให้การสนับสนุนส่งเสริมทางการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

นาย รัตนชัย ภัทรดิลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	IX
สารบัญรูป	X
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	4
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	6
2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย	6
2.2 ระบบควอรัมเซนซิง	7
2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก	9
2.4 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ	10
2.5 สารยับยั้งระบบ quorum sensing	14
2.6 เชื้อไมโคแบคทีเรีย ( <i>Mycobacterium</i> )	16
2.6.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.6.2 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	17
2.7 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย	18
2.7.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	18
2.7.2 การเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับเวกเตอร์ (Ligation)	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.3 ตัวพาหะในการพาติเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	22
2.7.4 การทรานฟอร์มเมชัน	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	25
3.2 สารเคมี	25
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	25
3.2.2 ยาปฏิชีวนะ	25
3.2.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน	25
3.2.4 เอนไซม์	26
3.2.5 พลาสมิด	26
3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)	26
3.2.7 เคมิภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ	26
3.3 อุปกรณ์	27
3.4 สถานที่ทำการวิจัย	28
3.5 วิธีการทดลอง	28
3.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	28
3.5.2 การสกัด crude DNA	29
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	29
3.5.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน <i>attM</i>	29
3.5.5 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน <i>attM</i> โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	29
3.5.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> กับพลาสมิด pDrive (ligation)	31
3.5.8 การเตรียม competent cell และการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)	31
3.5.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis	32
3.5.10 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	33
3.5.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i>	33
3.5.12 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและพลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	33
3.5.13 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> กับพลาสมิด pET30a	34
3.5.14 การทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) โดยใช้พลาสมิด pET30a- <i>attM</i>	35
3.5.15 เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> กับพลาสมิด pCRT7/NT-TOPO	35
3.5.16 การทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิด pCR-T7/NT-TOPO- <i>attM</i>	35
3.5.17 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCR-T7/NT-TOPO- <i>attM</i> ด้วยวิธี Alkali lysis	36
3.5.18 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCR-T7/NT-TOPO- <i>attM</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i>	36

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.19 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ใน pCR T7/NT-TOPO- <i>attM</i>	36
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	<b>37</b>
4.1 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> เข้าสู่พลาสมิด pDrive	37
4.1.1 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน <i>attM</i>	37
4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน <i>attM</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)	39
4.1.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ให้บริสุทธิ์	41
4.1.4 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเมชัน	42
4.1.5 ผลสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis	42
4.1.6 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.1.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pDrive- <i>attM</i>	45
4.2 การโคลนยีน <i>attM</i> จาก pDrive- <i>attM</i> เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET30a	49
4.2.1 ผลการโคลนยีน <i>attM</i> จากพลาสมิดลูกผสม pDrive- <i>attM</i> เข้าสู่เวกเตอร์แสดงออก pET30a	49
4.2.2 ผลการตัดพลาสมิด pDrive- <i>attM</i> และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	50
4.2.3 ผลการทำให้บริสุทธิ์ของพลาสมิด pET30a และ ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ใน pDrive- <i>attM</i> ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	51
4.2.4 ผลการเชื่อมต่อพลาสมิดแสดงออก pET30a กับ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> และ การทรานสฟอร์มเมชัน	52

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การโคลนยีน <i>attM</i> เข้าสู่พลาสมิด pCR-T7/NT-TOPO	53
4.3.1 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน <i>attM</i> ด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	53
4.3.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pCR-T7/NT TOPO และการ ทราายสฟอร์มเมชัน	54
4.3.3 การสกัดพลาสมิดลูกผสม pCR-T7/NT-TOPO- <i>attM</i>	55
4.3.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- <i>attM</i> 1.1-1.3 โดยวิธีการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	56
4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCR-T7/NT-TOPO- <i>attM</i>	58
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก 1	63
ภาคผนวก 2	65
ภาคผนวก 3	66

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>attM</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส	30
3.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pDrive และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i>	31
3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>	33
3.4 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	34
3.5 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pET30a และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> และ <i>HindIII</i>	34
3.6 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pCR T7/NT-TOPO และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i>	35
3.7 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- <i>attM</i> ด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i>	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างพื้นฐานของ N-acyl homoserine lactone (acyl-HSL)	10
2.2 กลไกพื้นฐานของระบบ quorum sensing ในแบคทีเรียแกรมลบ	12
2.3 โครงสร้างของสัญญาณ (signal molecule) ในระบบ quorum sensing ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ	13
2.4 การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของ เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนเนส	15
2.5 เชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.6 เชื้อ <i>Mycobacterium smegmatis</i>	17
2.7 หลักการของ PCR	19
2.8 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอและการโคลนยีน	22
4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>attM</i> และการออกแบบไพรเมอร์ทั้งด้าน forward และ reverse	38
4.2 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน <i>attM</i> ที่สภาวะการจับตัว 45, 50, 55, 60 องศาเซลเซียส	40
4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว	41
4.4 พลาสมิดลูกผสม pDrive- <i>attM</i> 1.1-1.4	43
4.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.6 โครมาโตแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive- <i>attM</i> เมื่อใช้ T7 เป็นไพรเมอร์	46
4.7 โครมาโตแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive- <i>attM</i> เมื่อใช้ SP6 เป็นไพรเมอร์	47
4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive- <i>attM</i>	48

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1 และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยวิธี alkali lysis	49
4.10 ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-attM และพลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII	51
4.11 ผลการทำให้บริสุทธิ์ของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM ในพลาสมิด pDrive-attM และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII	53
4.12 การสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR-T7/NT-TOPO-attM1.1-1.3	54
4.12 ผลการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน attM ที่สภาวะการจับตัว 60 องศาเซลเซียส	54
4.13 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM 1.1-1.3	55
4.14 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI, BamHI และ HindIII	57
4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน attM ที่ได้จากพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO-attM 1.3 โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7	58
4.16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน attM ของเชื้อ M. smegmatis จากธนาคารยีนกับผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-attM 1.3	59

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell to cell communication) โดยส่งสัญญาณในรูปของสารเคมี ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) เป็นการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์รูปแบบหนึ่งที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและการตอบสนองของระบบนี้ขึ้นกับจำนวนประชากร นั่นคือเมื่อจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจะเกิดกระตุ้นการสร้างและส่งสัญญาณทางเคมี โดยสัญญาณนี้จะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมายและในที่สุดจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาต่างๆ ของแบคทีเรีย (Fugua และคณะ, 1996) (Carlier และคณะ, 2003)

ในการสื่อสารของแบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมลบจะใช้สารพวกเปปไทด์สายสั้นๆ เป็นสัญญาณการสื่อสาร ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะใช้สัญญาณที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL สังเคราะห์จากเอนไซม์ เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (acyl-HSL synthase) โดยใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนและ acylated acyl-carrier protein (acyl-ACP) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น (Greenberg, 2000)

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ในแบคทีเรียต่างชนิดนี้เองทำให้สิ่งมีชีวิตผลิตสาร acyl-HSL ที่แตกต่างกัน โดยมีความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) ที่ไม่เท่ากัน (จำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน) หรือมีการแทนที่ (substitution) ของสายโซ่ข้าง (side chain) ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไป acyl-HSL มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4-16 อะตอม และ side chain ที่ตำแหน่งที่ 3 อาจอยู่ในรูปอิมิดหรือรูปไฮดรอกซิล (OH) หรือรูปคาร์บอนิล (O) โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ  $C_4$ -HSL สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ ในขณะที่  $3OC_{12}$ -HSL สามารถแพร่ผ่านได้เช่นกันแต่ในอัตราที่ช้ากว่า

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แปรเซลล์และมีประชากรหนาแน่นจะเกิดการสร้างโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL จากโปรตีน LuxI หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ (receptor) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxR ที่จำเพาะต่อสัญญาณ acyl-HSL จะไปจับกับสารนั้นและทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ของยีนเป้าหมาย LuxR ประกอบด้วยสองโดเมน (domain) คือ ด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (C-terminal DNA-binding domain) สำหรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมายและด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับสารสัญญาณ acyl-HSL (N-terminal acyl-HSL binding domain) เมื่อ LuxR จับกับสารสัญญาณแล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้

ตัวอย่างของงานวิจัยควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสงที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (bioluminescence) โดยขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ในแบคทีเรีย *Vibrio fischeri* และ *Vibrio harveyi* แบคทีเรียทั้งสองสปีชีส์นี้สามารถสร้างและตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL โดยเมื่อ acyl-HSL สะสมในอาหารถึงระดับหนึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade และก่อให้เกิดการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) โดย LuxI สร้างโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL มาจับกับโปรตีนรีเซพเตอร์ LuxR แล้วจึงกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้างของเอนไซม์ luciferase (*luxCDABE*)

การศึกษากลไกการสื่อสารและควบคุมประชากรประเภทควอรัมเซนซิงนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมความรุนแรงและการเจริญของเชื้อโรคในคนหรือพาโทเจนในพืช โดยปัจจุบันพบว่าระบบควอรัมเซนซิงที่ผลิต acyl-HSL นี้พบในแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ยกตัวอย่าง เช่น ปลาหมึกกับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และระบบควอรัมเซนซิงยังอาจพบในแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์แบบพาโทเจน (pathogenesis) ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เข้าไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย แบคทีเรียจะเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อนั้น แต่ละเซลล์เดี่ยวที่ติดกับผิวสัมผัสจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) และขยายขนาดและหนาขึ้น กลายเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) และเมื่อมีการเจริญสะสมมากขึ้นทำให้ยาปฏิชีวนะต่างๆ ไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง มีรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สาร acyl-HSL นั้น เซลล์ของแบคทีเรียจะไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ นั่นคือในสายพันธุ์กลายจะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัสแต่จะไม่มีการพัฒนาต่อไป ทำให้ไบโอฟิล์มที่ได้มีลักษณะแบนและเชื้อโรคสามารถถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL สามารถควบคุมเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนของ virulence determinant ได้และสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลนี้จะแสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง ดังนั้นการเข้าใจกลไกดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรควิธีใหม่และการผลิตยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งไม่ฆ่าแบคทีเรียที่เป็นพาหุเจินโดยตรงหากแต่รบกวนความสามารถในการก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL หรือยีนที่เกี่ยวข้องอาจนำไปสู่การควบคุมประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถบ่งบอกถึงภาวะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเริ่มกลไกควบคุมประชากรของตัวเอง เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการกำหนดการเจริญและการตายของเชื้อแบคทีเรีย เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สามารถย่อยเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ โดยจะเข้าไปย่อยเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่บริเวณวงแหวนแลคโตน เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการค้นพบเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang และคณะ, 2002) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนนี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* หรือยีน *aiiA* และเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่ทำหน้าที่ย่อยวงแหวนแลคโตนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีกด้วย

ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *attM* จาก *Agrobacterium tumefaciens* กับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย พบว่ายีน *MS3930* ของ *Mycobacterium smegmatis* สามารถถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับ *AttM* แต่ใน *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อวัณโรคกลับไม่พบยีนดังกล่าว จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน *AttM* นี้มีหน้าที่ที่สัมพันธ์กับการลดความรุนแรงของการก่อโรค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการโคลนยีน *MS3930* หรือ *attM* ของ *M. smegmatis* เพื่อศึกษาในด้านต่างๆต่อไป

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาการโคลนยีน *attM* ของ *M. smegmatis* เพื่อนำโคลนที่ได้ไปใช้ในการศึกษาด้านการแสดงออกของโปรตีนที่สร้างจากยีน *attM* ต่อไปในอนาคต

### 1.3 ขอบเขตของการศึกษา

เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์และสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จากเชื้อ *M. smegmatis* นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherchia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากนั้นจึงนำพลาสมิดลูกผสมไปตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จากเชื้อ *M. smegmatis* มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET30a และ pCR-T7-NT-TOPO นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherchia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

### 1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *M. smegmatis*
2. สกัด crude DNA จากเชื้อ *M. smegmatis*
3. ออกแบบไพรเมอร์
4. เพิ่มปริมาณยีน *attM* โดยเทคนิค ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
5. เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pDrive แล้วถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 $\alpha$
6. คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ
7. ทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมออกมาจาก โคโลนีที่คัดเลือก และทดสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR
9. นำพลาสมิดลูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII*
10. เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* กับพลาสมิดแสดงออก pET30a
11. นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR-T7-NT-TOPO และคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

## 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *attM* เพื่อนำไปใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET30a หรือ pCR-T7-NT-TOPO ทรานสฟอร์มเข้าเซลล์จุลินทรีย์ *E. coli* แล้วชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์เอสตีเอสโมเซอรินแลคโคเนสในปริมาณสูง เพื่อจุดประสงค์ในการทราบหน้าที่ของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย (Cell-cell communication in bacteria) (กัลยา, 2548)

เมื่อก่อนเข้าใจว่าแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ถ้ามีอาหาร ก็สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเองได้ด้วยตัวเองอย่างอิสระ ต่อมาเมื่อมีการค้นพบว่าในความเป็นจริงแล้วแบคทีเรียไม่ได้อยู่แบบตัวใครตัวมันแต่กลับมีความสัมพันธ์ หรือมีการทำงานร่วมกันกับเซลล์อื่นๆ เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ตัวอย่างเช่น พฤติกรรมที่มีการเคลื่อนที่ไปในที่ๆ เอื้อต่อการเจริญ หรือ ลักษณะของการเปลี่ยนรูปแบบในการเจริญ เช่น การสร้างสปอร์หรือ Biofilm ซึ่งจะช่วยป้องกันจากสภาพแวดล้อม ที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้เนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ จะต้องเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่มรการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา บางครั้งการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนตั้งตัวไม่ทันแบคทีเรียจึงมีความจำเป็นต้องปรับตัวทั้งในเรื่องโครงสร้าง สรีรวิทยา ตลอดจนพฤติกรรมต่างๆ ในการตอบสนองอย่างทันที่ว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้น เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

สิ่งที่แบคทีเรียใช้ในการสื่อสาร หรือภาษาที่แบคทีเรียใช้ในการติดต่อระหว่างกันคือ chemical signal molecule สารสัญญาณที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา จะถูกปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์มักเรียกกันโดยทั่วไปว่า “autoinducer” (AI) หรือ pheromone พบว่าแบคทีเรียจะใช้สารเคมีในการควบคุมพฤติกรรมต่างๆ ของประชากรที่เจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน โดยที่การควบคุมดังกล่าวขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์ของประชากรแบคทีเรีย (population density) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) โดยอาศัยกลไกที่ว่า เมื่อเซลล์สร้างสารเคมีแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ โดยที่ในช่วงแรกๆ ปริมาณของสารเคมีจะยังไม่มากพอที่จะทำให้เซลล์แต่ละเซลล์สามารถรับรู้ (detect) ได้ ต่อมาเมื่อการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับ threshold จะมีการส่งสัญญาณให้แต่ละเซลล์รับรู้ถึงความหนาแน่นของเซลล์ ณ ขณะนั้น แล้วจะมีผลในการกระตุ้นหรือกดการทำงานของยีนเป้าหมาย (target gene) ต่อไป นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ระบบ ควอรัมเซนซิง ไม่ทางใดก็ทางหนึ่งในการอยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ไม่ว่าจะเป็นพืช คน สัตว์ หรือแบคทีเรียด้วยกันเอง ความสัมพันธ์อาจเป็นแบบ symbiosis หรือ pathogenic ก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการเชื่อกันว่าแบคทีเรียใช้ระบบการสื่อสารภายในเซลล์ Intracellular signaling systems เพื่อส่งสัญญาณและข้อมูลจากสิ่งแวดล้อมให้แก่กันและกัน แบคทีเรียแต่ละชนิดมีการสื่อสารระหว่างเซลล์เพื่อควบคุม (transcription) ของ ยีนเป้าหมาย หลายชนิด แบคทีเรียที่เจริญในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ โดยมีกลไกที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย พบว่าแบคทีเรียสามารถพัฒนากลไกที่มีความซับซ้อนมาก ๆ ในการปรับตัวดังกล่าว ขณะนี้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าแบคทีเรียเกือบทุกชนิดจะมีพฤติกรรมเหมือนพวกสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (multicellular organism)

การศึกษาเกี่ยวกับการปฏิสัมพันธ์ระหว่างผู้ให้อาศัย(host) กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างผู้ให้อาศัยกับแบคทีเรียก่อโรคนั้นกับความหนาแน่นของเซลล์กล่าวคือเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้เชื้อสร้าง virulence factor ช่วยให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนอยู่ในผู้ให้อาศัยได้ซึ่งผู้ให้อาศัยจะมีเวลาเพียงช่วงสั้นๆ ที่จะสร้างกลไกต่อต้านเชื้อโรคได้ทันเวลาที่ จากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการสร้าง virulence factor หลายชนิด เช่น surface proteins และ extracellular enzyme ที่พบในแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่มักถูกควบคุมด้วยยีนในระบบ ควอรัมเซนซิง แทบทั้งสิ้น

## 2.2 ระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing system) (กัลยา, 2548)

ระบบควอรัมเซนซิงเป็นปรากฏการณ์หรือกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน ที่ขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์แล้วไปมีผลต่อการแสดงออกหรือลักษณะทาง phenotype ของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียชนิดหนึ่งผลิต โมเลกุลสัญญาณ ออกมาจะมีการส่งสัญญาณให้เซลล์ข้างเคียงได้รับรู้ ซึ่งมีการตอบสนองโดยอาศัยกลไกของระบบ ควอรัมเซนซิง จึงเป็นคำที่ใช้อธิบาย การสะสมของโมเลกุลสัญญาณ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก และสามารถส่งสัญญาณให้เซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์สามารถรับรู้ถึงความหนาแน่นของเซลล์ได้ในระดับ “minimum unit” หรือ “quorum” แล้วทำให้เกิดการตอบสนองขึ้นพร้อมๆ กันในทุกๆ เซลล์ คำว่า ควอรัมเซนซิง เริ่มมีการนำมาใช้ครั้งแรกเพื่ออธิบายกลไกการเรืองแสงของแบคทีเรียชนิดหนึ่ง คือ *Vibrio fischeri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในทะเลชอบอาศัยอยู่ในอวัยวะของปลาทะเลและปลาหมึกหลายชนิด โดยปลาและปลาหมึกจะอาศัยการเรืองแสงที่อวัยวะดังกล่าว ซึ่งเกิดจากการกระทำของแบคทีเรีย เพื่อล่อเหยื่อเข้ามาติดกับหรือใช้ในการพรางตัวเพื่อหนีศัตรูในยามข้ามคืน รวมไปถึงการหาคู่ผสมพันธุ์ ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียก็จะได้รับ

สารอาหารที่มีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ในตัวปลา หรือปลาหมึกเป็นการตอบแทน พบว่าการเรืองแสงจะเกิดขึ้นในกรณีที่เซลล์แบคทีเรียมีเป็นจำนวนมาก แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนอยู่ในอวัยวะของปลาและปลาหมึก เมื่อมีปริมาณมากพอจะกระตุ้นกลไกของระบบ ควอรัมเซนซิง ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ซึ่งจะมีผลทำให้มีการเรืองแสงเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียจะเรืองแสงได้เฉพาะเมื่อเข้ามาอาศัยอยู่ในอวัยวะของปลาและปลาหมึกเท่านั้น เพราะการเข้ามาอยู่ในบริเวณที่มีพื้นที่จำกัดจะทำให้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียถึงระดับที่จะกระตุ้นระบบควอรัมเซนซิง ได้ การเรืองแสงจะไม่เกิดขึ้นในแบคทีเรียที่อยู่เป็นอิสระในธรรมชาติเนื่องจากความหนาแน่นของแบคทีเรียในน้ำทะเลยังมีไม่มากพอ การค้นพบกลไกการเรืองแสงของเชื้อ *V. fischeri* ในปลาทะเล และปลาหมึกบางชนิด จึงนับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาระบบ ควอรัมเซนซิง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่แบคทีเรียใช้ในการสื่อสารระหว่างกัน และต่อมาได้ถูกนำมาใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาระบบ ควอรัมเซนซิง ในแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ จวบจนถึงปัจจุบัน

ในราวปี พ.ศ. 2526 ได้ค้นพบวงจรการควบคุมระบบ quorum sensing ใน *V. fischeri* และพบว่า เป็นกลไกที่ถูกควบคุมโดยโปรตีนสองชนิดคือโปรตีน LuxI และ LuxR โดยที่ LuxI เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารสัญญาณหรือ autoinducer ที่มีชื่อเรียกกันว่าสารไฮโมเซอรินแลคโตน (acyl-HSL) ส่วน LuxR เป็นโปรตีนที่จับได้อย่างจำเพาะกับโมเลกุลของสาร acyl-HSL autoinducer ในสภาวะที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียอยู่ในระดับสูง acyl-HSL จะจับกับ LuxR เกิดเป็นสารประกอบ acyl-HSL /LuxR complex ซึ่งจะไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนโครงสร้างของลูซิเฟอเรสมีผลกระตุ้นให้เกิดทรานสคริปชันของยีนที่ถอดและแปลรหัสสำหรับเอนไซม์ ลูซิเฟอเรส ทำให้มีการเรืองแสงเกิดขึ้น และกลไกนี้จะถูกกระตุ้นทุกครั้งที่มีความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้นจนถึงระดับควอรัมเซนซิง นักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาเรื่องนี้ต้องใช้เวลานานนับสิบปี จึงสามารถเข้าใจถึงกลไกของระบบควอรัมเซนซิงใน *V. fischeri* ว่าเกิดจากการส่งสัญญาณของแบคทีเรียผ่านระบบ LuxI/LuxR แล้วไปกระตุ้นยีนเป้าหมายให้มีการแสดงออกพร้อมๆ กันในเซลล์ทุกเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการตอบสนองที่ขึ้นกับความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรีย ณ ขณะนั้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเป็นที่เข้าใจกันแล้วว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสื่อสารกันในทิศทางเดียวกัน สารสัญญาณที่แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตขึ้นมาจะมีความหลากหลายเพื่อให้การตอบสนองของประชากรเป็นไปอย่างเหมาะสมในสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ ทั้งนี้เพื่อความอยู่รอดของแบคทีเรียเอง โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่วิกฤติต่างๆ เช่น เชื้อที่เจริญอยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารบางอย่าง เป็นต้น การค้นพบความจริงของธรรมชาติดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียอาศัยกลไกของระบบ ควอรัมเซนซิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสื่อสารซึ่งกันและกันและในหลายกรณี ทำให้เชื่อว่าแบคทีเรียสามารถสื่อสารกันได้หลายภาษา หรืออาจเป็นการสื่อสารระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกันได้อีกด้วย โดยใช้ภาษาหรือสัญญาณที่เป็นสากล (universal signal) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจะใช้สารสัญญาณที่แตกต่างกัน

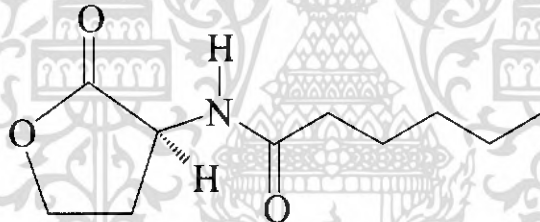
### 2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก (Quorum sensing in Gram positive bacteria) (กัลยา, 2548)

แบคทีเรียแกรมบวกมีภาษาที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างกันและสามารถตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์สูงได้ เมื่อสัญญาณถูกสร้างขึ้นจะไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาต่างๆ ของเซลล์ เช่น ความสามารถในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (uptake DNA) ในแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus pneumoniae* ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Staphylococcus aureus* การสืบพันธุ์แบบคอนจูเกชัน (conjugation) ของ *Enterococcus faecalis* และการผลิตไมโครซิน (microcin) ของ *Lactobacillus sake* และ *Carnobacterium piscicola* (Kleerebezem *et al.*, 1997)

แบคทีเรียแกรมบวกส่งสัญญาณโมเลกุลสัญญาณจำพวกโอลิโกเปปไทด์ ซึ่งไม่สามารถแพร่ ออกนอกเซลล์ได้โดยตรง แต่จะส่งออกนอกเซลล์โดยจับโปรตีนขนส่งประเภท ABC (ATP-binding cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโอลิโกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กและจึงถูกส่งผ่านออกนอกเซลล์ เปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติหรือฟีโรโมน โดยมีโปรตีนเซนเซอร์สำหรับโคเนสที่เซลล์เมมเบรนเป็นตัวจดจำ เซนเซอร์ที่ได้รับสัญญาณเปปไทด์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตด้วยตัวเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทีดีน และเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุม (regulator) ที่อยู่ข้างเคียง เมื่อกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น ดังนั้นขบวนการขนส่งสัญญาณหรือการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวกจึงจัดเป็นแบบ phosphorylase cascade โดยเรียกการควบคุมประชากรเซลล์ด้วยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้ว่า “เปปไทด์ควอร์มเซนซิง”

## 2.4 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ (Quorum sensing in Gram negative bacteria) (กัลยา, 2548)

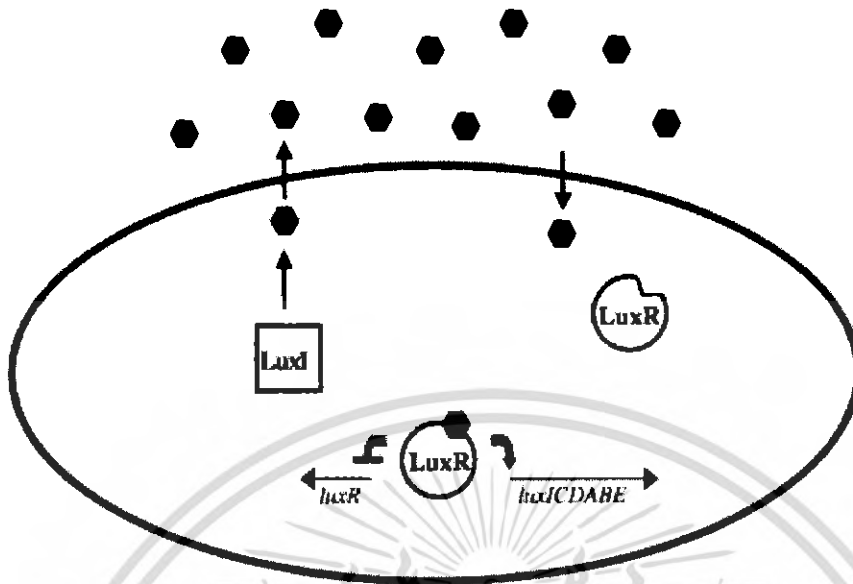
แบคทีเรียแกรมลบมีการสื่อสารโดยใช้สาร N-acyl homoserine lactone (acyl HSL) เป็น autoinducer หรือ สัญญาณโมเลกุล แบคทีเรียแต่ละชนิดจะสังเคราะห์ acyl-HSL ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วยหมู่เอซิล(acyl group) เชื่อมต่อกับวงแหวนโฮโมเซอิลินแลคโตน (homoserine lactone) ที่เชื่อมกันด้วยไนโคเจนอะตอม จะต่างกันที่ความยาวของ acyl side chain ที่มักประกอบด้วยจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4-16 อะตอม และจำนวนคาร์บอนมักพบเป็นจำนวนคู่ คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อาจมี substituent ได้แก่หมู่ oxo และ hydroxyl มาจับ พบว่า acyl HSL บางชนิดอาจไม่มี substituent ใดๆ มาจับเลยก็เป็นได้ นอกจากนี้อาจพบ double bond ในโมเลกุลของ acyl chain ได้บ้าง ได้แก่ 7,8-cis-N-(3-hydroxytetradecenyl) homoserine lactone ผลิตจากเชื้อ *Rhizobium leguminosarum* และ 7,8-cis-N-(tetradecenyl) homoserine lactone จากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของ N-acyl homoserine lactone (acyl-HSL)

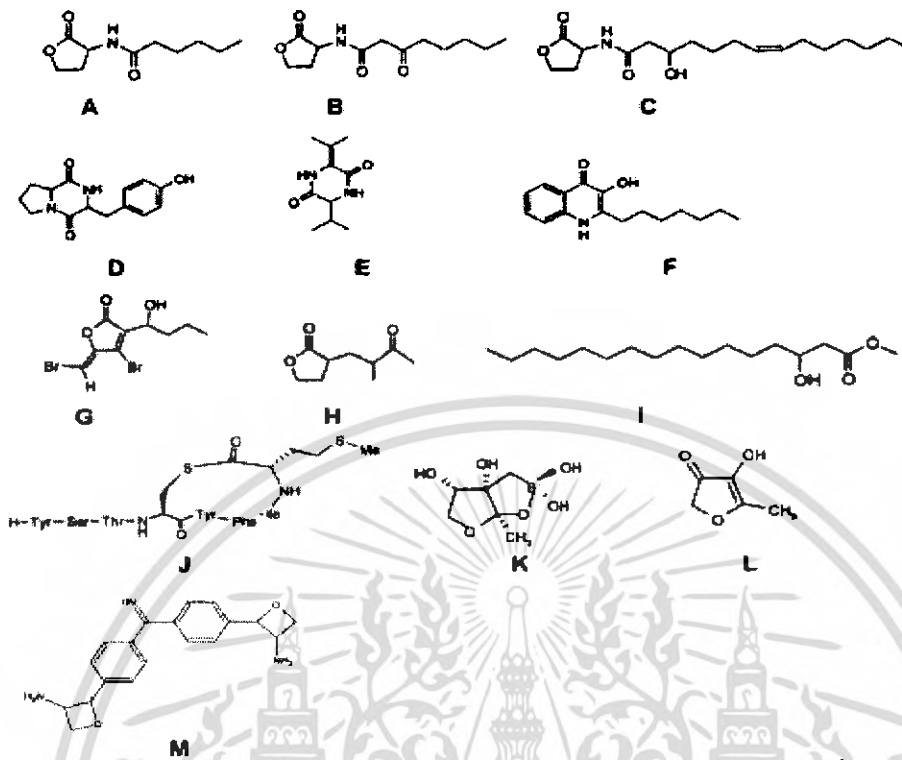
สาร acyl-HSL เป็นสารสัญญาณชนิดแรกที่พบในแบคทีเรียแกรมลบสามารถสกัดได้จาก supernatant ของ bacterial culture ของแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดด้วยสารอะซิโตไนไตรต์ (acetonitrite) หรือ ไดคลอโรมีเทน(dichloromethane) แล้วทำให้บริสุทธิ์โดย วิธี preparative HPLC ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานว่าสาร acyl-HSL มีบทบาทในเรื่องอื่นๆ นอกไปจากการทำหน้าที่เป็นสารสัญญาณ แบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดสังเคราะห์สาร acyl-HSL ได้มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดสามารถผลิตสารสัญญาณ ที่ไม่ใช่สาร acyl-HSL ได้ด้วย เช่น เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคน้ำหนึบสามารถผลิตสาร 3-hydroxy palmitic acid methyl ester

กว่าสิบปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบระบบ ควอรัมเซนซิง ในแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า 25 ชนิด และพบว่าระบบ ควอรัมเซนซิง ในเชื้อเกือบทุกชนิดยกเว้น *V. harveyi* และ *Myxococcus xanthus* ล้วนมีความคล้ายคลึงกับกลไกที่พบใน *V. fischeri* แทบทั้งสิ้น กล่าวคือทุก สปีชีส์ มี โพรตีนควบคุม ที่คล้ายคลึงกัน(homologous) กับโพรตีน LuxI และ LuxR ซึ่งเป็นโพรตีนที่ ถูก วิเคราะห์ได้ครั้งแรกในเชื้อ *V. fischeri* ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่ากลไกของระบบ ควอรัมเซนซิง ในเชื้อ แกรมลบส่วนใหญ่ประกอบด้วย โพรตีนควบคุม 2 ชนิดที่ ถอดและแปลรหัส มาจากยีน *luxI* และ *luxR* (รูปที่ 2.2) โดยที่ LuxI-like protein จะมีคุณสมบัติเป็น autoinducer synthase หรือ acyl-HSL synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์ autoinducer ซึ่งเป็นสารสัญญาณแล้วส่งออกมาออกเซลล์จนกระทั่งความเข้มข้น เพิ่มขึ้นถึงระดับ threshold หรือ critical concentration ก็จะไปจับกับ โพรตีนควบคุม LuxR เกิด สารประกอบเชิงซ้อนซึ่งจะไปจับกับ โพรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายทำให้มี การถอดรหัสที่ยีนเป้าหมาย เกิดขึ้น LuxR จึงทำหน้าที่เป็น transcriptional activator protein นั่นเอง ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นว่า โมเลกุลของ LuxR ประกอบด้วย 2 domain คือ N-terminal ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลของสารสัญญาณ acyl-HSL ส่วน C-terminal เป็น DNA binding domain ทำหน้าที่จับกับโพรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย นั่นเองโดยที่ LuxR จะสามารถจับกับ โพรโมเตอร์ ที่มีลักษณะคล้ายกันได้หลายชนิด ส่วน LuxI จะ กระตุ้นให้มีการจับกันระหว่าง S-adenosylmethionine (SAM) กับ acyl-acyl carrier protein (acyl ACP) อย่างจำเพาะ แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสังเคราะห์สาร acyl-HSL ได้มากกว่า 1 ชนิด จึงเชื่อกันว่า การทำงานของเอนไซม์ acyl-HSL synthase ในการสังเคราะห์สารสัญญาณ ย่อมต้องมีความจำเพาะต่อ สารตั้งต้น โดยเฉพาะส่วนของ acyl carrier protein (ACP) เป็นอย่างมาก



รูปที่ 2.2 กลไกพื้นฐานของระบบ quorum sensing ในแบคทีเรียแกรมลบ  
ที่มา: Schauder & Bassler., 2001

โมเลกุลของ acyl-HSL ยังไม่ค่อยมีความชัดเจนนักว่า สารสัญญาณ acyl-HSL ทั้งหมดที่สังเคราะห์มาจากการกระตุ้นของเอนไซม์ LuxI homologue จะมีบทบาทต่อพฤติกรรมทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิตสารนั้นขึ้นมา การที่เชื้อแต่ละชนิดผลิตสารสัญญาณที่ต่างกัน หรือเชื้อชนิดเดียวกันผลิตสารสัญญาณได้มากกว่า 1 ชนิด (รูปที่ 2.3) เป็นการสะท้อนให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า เชื้อแต่ละชนิดอาจจะผลิตสารสัญญาณคนละชนิดเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีคำตอบที่แน่ชัด ในเรื่องของความจำเพาะระหว่างสารสัญญาณแต่ละชนิดกับโปรตีน LuxR จากเดิมที่เชื่อกันว่าโมเลกุลของ acyl-HSL สามารถแพร่ผ่านเยื่อเซลล์ได้อย่างอิสระ ในปัจจุบันแนวคิดลักษณะเช่นนี้ได้เริ่มเปลี่ยนไปบ้างแล้ว จากการศึกษาในเชื้อ *Erwinia carotovora subsp. carotovora* มีข้อบ่งชี้ว่าการกระตุ้นโปรตีน CarR ซึ่งเป็น LuxR homologue ด้วย acyl-HSL หลายชนิด จะขึ้นกับความสามารถของโมเลกุลของสัญญาณเหล่านี้ในการหลีกเลี่ยงการรวมกลุ่มกันเองในบริเวณเยื่อเซลล์ของเชื้อและพบว่าการแพร่ออกนอกเซลล์ของ acyl-HSL ที่มีสายโซ่เอซิลยาวๆ เช่น โมเลกุลที่มี 12 คาร์บอนอะตอม ใน *P. aeruginosa* จำเป็นต้องอาศัย efflux pumping system จึงมีความเป็นไปได้ว่าเฉพาะในกรณีที่สายโซ่เอซิลมีขนาดสั้นเท่านั้นที่จะสามารถผ่านออกนอกเยื่อเซลล์มาได้อย่างอิสระ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาเพื่อหาข้อมูลในเชื้ออื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสัญญาณ (signal molecule) ในระบบ quorum sensing ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ

(A-C) ตัวอย่างเอสเทอร์ไฮโดรอกซีลิแกนด์ของโฮโมซีรีนซึ่งไม่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือคาร์บอนิล (O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (A) *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone หรือ  $C_6$ -HSL (B) *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone หรือ  $3O,C_8$ -HSL (C) *N*-(3R-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)-L-homoserine lactone หรือ  $3OH,C_{14:1}$ -HSL (D, E) Microbial diketopiperazines: (D) cyclo(L-Pro-L-Tyr) (E) cyclo( $\Delta$ Ala-L-Val) (F) 2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolone หรือ PQS ผลิตโดย *P. aeruginosa* (G) 4-Bromo-5-(bromomethylene)-3-(1-hydroxybutyl)-2(5H)-furanone ของ *D. pulchra* (H)  $\gamma$ -butyrolactone ผลิตโดย *X. campestris* (I) 3-Hydroxypalmitic acid methyl ester ของ *R. solanacearum* (J) Group IV cyclic thiolactone จาก *S. aureus* (K) โครงสร้างสมมติสำหรับ *Vibrio harveyi* AI-2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารประกอบนี้ และ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)furanone หรือ MHF (L) สามารถเปลี่ยนแปลงซึ่งกันและกันได้ (M) bradyoxetin, a four-membered oxetane ring จาก *B. japonicum*

ที่มา: Daniel *et al.*, 2003

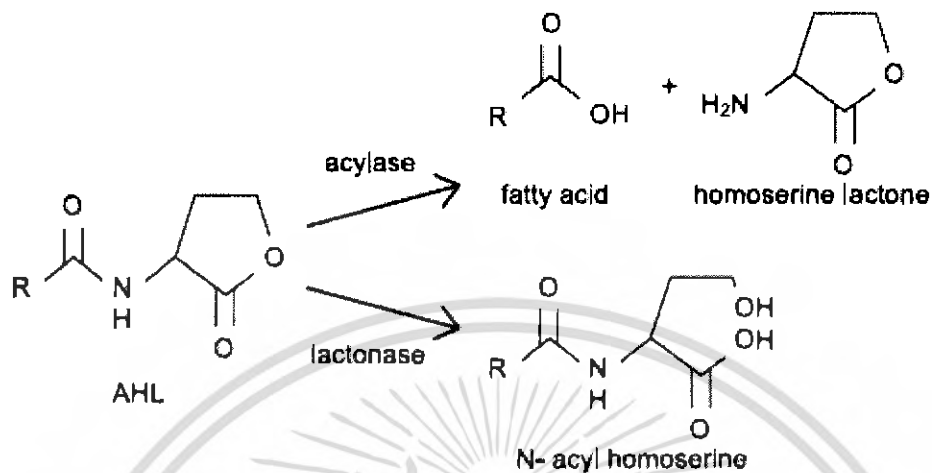
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 สารยับยั้งระบบ ควอรัมเซนซิง (Quorum-quenching reagent) (กัลยา, 2548)

สิ่งมีชีวิตทั้งคน พืช และสัตว์ ล้วนมีกลไกในการป้องกันตนเองจากการทำลายของเชื้อโรค เช่น การสร้าง แอนติบอดี ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังจากเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายของ ผู้ให้อาศัย เป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว แสดงว่าในระยะแรกที่ร่างกายยังไม่มีภูมิคุ้มกันที่มากพอ เชื้ออาจจะฉวยโอกาสในช่วงนี้ สร้างกลไกขึ้นมาเพื่อเอาชนะการต่อต้านของ ผู้ให้อาศัย โดยเฉพาะการใช้กลไกของระบบ ควอรัมเซนซิง ในการกระตุ้น virulence gene นั้นเอง ด้วยเหตุผลนี้จึงมีความพยายามที่จะหาสาร หรือ เอนไซม์ที่สามารถไปยับยั้งการทำงานของระบบ ควอรัมเซนซิง ในเชื้อก่อโรคเหล่านี้ เพื่อตัดวงจรการสื่อสารของเซลล์แบคทีเรียไม่ให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อเราจึงเรียก สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งระบบ ควอรัมเซนซิง ของแบคทีเรียว่า “ quorum-quenching reagent” ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ เพื่อหวังผลในการควบคุมเชื้อก่อโรสดังกล่าว และเมื่อไม่กี่ปีมานี้ได้มีการศึกษาถึงชนิดและโครงสร้างของสารเคมี หรือ เอนไซม์ที่สามารถตัดวงจรการสื่อสาร หรือ การทำงานของระบบ ควอรัมเซนซิง ในแบคทีเรียได้ โดยมีเป้าหมายสำคัญ คือ เพื่อต้องการหยุดยั้งความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคให้ได้นั่นเอง

acyl-HSL lactonase เป็นเอนไซม์ตัวแรก ที่พบว่ามียุทธียับยั้งการสังเคราะห์สาร acyl-HSL ซึ่ง ถอดและแปลรหัส มาจากยีน *aiiA* ของเชื้อ *Bacillus* sp 240B1 จาก การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้วพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มของ zinc-binding metallohydrolase การวิเคราะห์ทางเคมีและชีวเคมีแสดงว่า AiiA เป็น acyl-HSL lactonase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อย homoserine lactone ring ของ acyl-HSL (รูปที่ 2.4) นอกจากนี้ยังพบ AiiA homologue ในเชื้อ *Bacillus thuringiensis* หลาย subspecies รวมทั้ง *Bacillus cereus* และ *B.mycoides* เช่นกัน ที่น่าสนใจก็คือการพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบก็มีการสังเคราะห์ acyl-HSL lactonase เช่นกัน เช่น AiiA homologue ที่ ถอดและแปลรหัส มาจากยีน *attM* ในเชื้อ *Agrobacterium.tumefaciens* นับได้ว่า acyl-HSL lactonase เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการทำลายสารสัญญาณชนิด acyl-HSL ที่ผลิตมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด การแสดงออกของยีน *aiiA* ในเชื้อ *E. carotovora* จะระงับการปลดปล่อยสาร acyl-HSL ออกนอกเซลล์ และลดการสังเคราะห์เอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่ extracellular pectate lyase, pectin lyase และ polygalacturonase เป็นต้น ซึ่งมีผลลดความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคในพืชอีกด้วย ในกรณีของเชื้อ *Ps. Aeruginosa* PA01 ซึ่งเป็น สายพันธุ์ ที่ก่อโรคในคน และมียีน *aiiA* จะไม่สามารถสะสม acyl-HSL รวมทั้งไม่มีการสังเคราะห์ virulence factor ต่างๆ อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส

ที่มา: Dong *et al.*, 2000

acyl-HSL acylase เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีผลยับยั้งสาร acyl-HSL จากการศึกษาคือเชื้อ *Variovorax paradoxus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบแยกได้จากดินพบว่าเชื้อสามารถใช้สาร acyl-HSL เป็นแหล่งคาร์บอนได้เนื่องจากเชื้อผลิตเอนไซม์ acyl-HSL acylase มาย่อยสาร acyl-HSL ที่ amide link ที่เชื่อมระหว่าง สายโวลีเอซิล กับ โฮโมเซอริน ได้เป็น โฮโมเซอรินแลคโตน ซึ่งจะถูกล่อยออกมาออกเซลล์ กับ กรดไขมัน ให้เชื้อได้ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป acyl-HSL acylase จัดเป็น เอนไซม์ที่ลดสัญญาณควอรัมเซนซิงที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiD* ซึ่งเป็นยีนใหม่ที่เพิ่งโคลนได้จากเชื้อ *Ralstonia* sp. เมื่อไม่นานมานี้เอง AiiD เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 794 ตัว จากการทำให้เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่า acyl-HSL acylase เป็นโปรตีนที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด โดยมีบริเวณอนุรักษ์ เช่นเดียวกับที่พบใน N-terminal-hydrolase family การวิเคราะห์เอนไซม์ AiiD โดยใช้ HPLC และ mass spectrometry พบว่าเป็นเอนไซม์ที่ย่อย acyl-HSL amide แล้วได้โฮโมเซอรินแลคโตน และ กรดไขมันซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้พบว่าไม่มีคุณสมบัติของการเป็นสารสัญญาณหลงเหลืออยู่เลย นอกจากนี้ยังพบว่า AHL acylase ยังเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการขัดขวางระบบการสื่อสาร และการสร้าง ไบโอฟิล์ม ในเชื้อ *P. aeruginosa* และมีผลทำให้ความรุนแรงของเชื้อ *Caenorhabditis elegans* ลดลงอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 เชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Mycobacterium)

จีโนส *Mycobacterium* ประกอบด้วยเชื้อรูปท่อนที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 0.2-0.6 x 1-10 ไมโครเมตร บางครั้งเชื้อเรียงตัวเป็นเส้นสายที่แตกกิ่งก้าน ผนังเซลล์มีไขมันจำนวนมากจึงทำให้ผิวเซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำและทำให้เชื้อทนทานต่อสารทำลายเชื้อ (disinfectant) รวมทั้งทนต่อการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) และจิมซ่า (Giemsa stain) แต่ถ้าย้อมติดสีแล้วก็ทนต่อการล้างด้วยกรดได้ จึงเรียกเชื้อนี้ว่าแบคทีเรียทนกรด เนื่องจากผนังเซลล์มีความซับซ้อนและเชือกกลุ่มนี้เลี้ยงยาก ส่วนใหญ่เจริญได้ช้า คือ แบ่งตัวทุกๆ 12-24 ชั่วโมง การแยกเชื้อพวกที่เจริญเร็ว ต้องใช้เวลามากกว่า 3 วัน ในขณะที่เชื้อพวกที่เจริญช้า (เช่น *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare*) ต้องใช้เวลา 3-8 สัปดาห์ *Mycobacterium leprae* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

มัยโคแบคทีเรีย ที่พบแล้วมีอย่างน้อย 41 สปีชีส์ และที่แยกได้จากคนมีมากกว่า 27 สปีชีส์ แต่ส่วนใหญ่ที่เกิดการติดเชื้อในคน มี 6 สปีชีส์ คือ *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* และ *M. leprae* เชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญในคนคือ *M. tuberculosis* ที่ทำให้เกิดวัณโรค และ *M. leprae* ทำให้เกิดโรคเรื้อน

### 2.6.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Phylum Actinobacteria *M. tuberculosis* เป็นพวกที่เจริญได้ในที่มีอากาศ obligate aerobe เป็นพวกที่ไม่สามารถตรวจว่าเป็นแกรมบวกหรือลบ (not gram positive/negative) มีลักษณะ (ดังรูปที่ 2.5) การเจริญของเชื้อจะแบ่งตัวทุกๆ 16-20 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีการแบ่งเซลล์ช้ากว่ามาก เช่น เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* ที่แบ่งตัวทุก 20 นาที ลักษณะของเชื้อเป็นรูปท่อนขนาดเล็ก สามารถทนต่อกรดอ่อนได้ และสามารถทนอยู่ในที่แห้งแล้งได้เป็นเวลาหลายอาทิตย์แต่เชื้อจะสามารถเจริญได้ภายใน ผู้ให้อาศัย

การที่ *M. tuberculosis* มีความสามารถทนกรดได้เป็นเพราะมีปริมาณไขมันมากที่ผนังเซลล์ สีย้อมจะทำปฏิกิริยากับกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่ผนังเซลล์ จึงจับสีไว้ การย้อมสีด้วยวิธีนี้ ถ้าเป็นเชื้อจากเนื้อเยื่อและเสมหะ จะติดสีไม่สม่ำเสมอและเป็นแถบๆ เพราะมีแวคิวโอลและสารพอลิฟอสเฟต นอกจากนี้ยังอาจย้อมด้วยสีคาร์บอน-ออรามิน (carbon-aureamine) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะเกิดการเรืองแสงเป็นสีเหลืองสว่าง

นอกจากนี้ เชื้อ *M. tuberculosis* ยังมีกรดไมโคลิกที่เรียกว่า คอร์ดแฟกเตอร์ (cord factor) ซึ่งเป็นสารประกอบ trehalose 6,6' dimycolate อยู่ที่ผนังเซลล์ ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการ

หายใจของไมโทคอนเดรียในเซลล์ฟาโกไซต์และเนื้อเยื่อ นอกจากนี้เชื้อจะมีปริมาณไขมันมากซึ่งรวมทั้งกรดไขมันและคอสมเพลิกซ์ลิพิดแล้ว ยังประกอบด้วยโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเกี่ยวกับการเป็นแอนติเจน ([http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium\\_tuberculosis](http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis))



รูปที่ 2.5 เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

ที่มา [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:TB\\_Culture.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:TB_Culture.jpg)

#### 2.6.2 *Mycobacterium smegmatis*

*M. smegmatis* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Phylum Actinobacteria มีลักษณะคล้ายกับ *M. tuberculosis* (ดังรูปที่ 2.6) แต่เชื้อ *M. smegmatis* ไม่เป็นเชื้อก่อโรคและการที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *M. tuberculosis* ทำให้มีการนำเชื้อ *M. smegmatis* มาทำการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นโมเดลของเชื้อ *M. tuberculosis*



รูปที่ 2.6 เชื้อ *Mycobacterium smegmatis*

ที่มา <http://www.bsip.com/fond> ,

<http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/Img/graphics/hatfull/hatfull02.jpigs/lr/0804703.j>

pg

67289

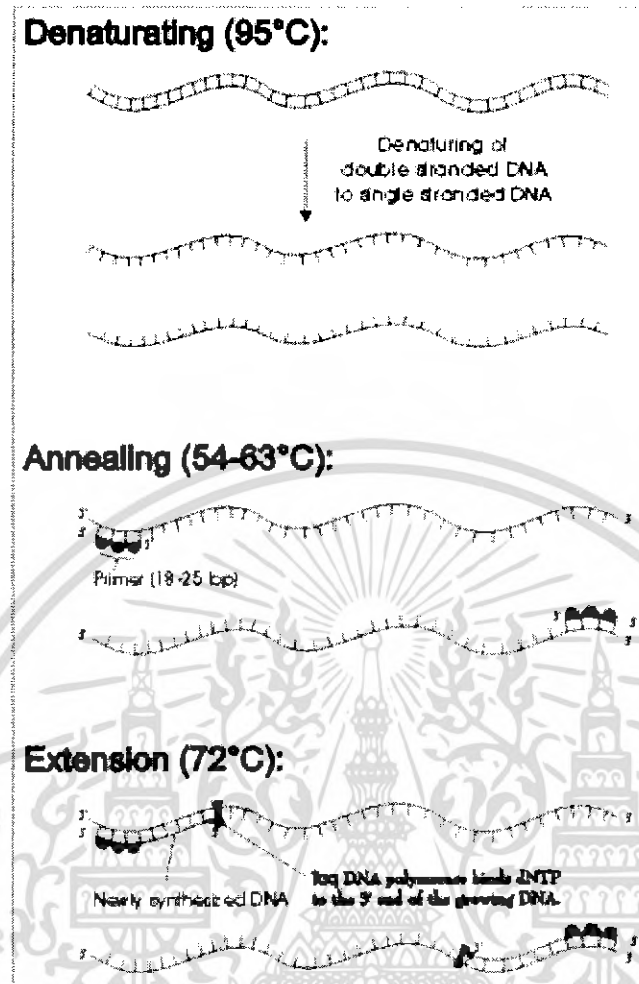
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

### 2.7.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส Polymerase chain reaction (PCR) อาศัยหลักการของการเกิด DNA replication โดยทำให้เกิดในหลอดทดลองแบบซ้ำๆ กันหลายรอบ (repeated cycles) และ ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ร่วมเร่งปฏิกิริยาในแต่ละรอบของ PCR มี 3 ขั้นตอน(รูป 2.7) ได้แก่

1. Denaturation ทำให้ DNA สายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
  2. Primer annealing primer 2 สาย เข้าไปจับคู่สมบน DNA สายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ (template) เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส
  3. Primer extension การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส
- เมื่อทำซ้ำจำนวนกันหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากเดิมได้อย่าง exponential โดยมีจำนวนผลิตภัณฑ์ (PCR product) จำนวนได้เท่ากับ  $2^n$  ( $n$  = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ (<http://home.nvg.org/~forthun/cdr-lenker.html>)



รูปที่ 2.7 หลักการของ PCR

ที่มา. <http://home.nvg.org/~forthun/cdr-linker.html>

### 2.7.2 การเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับเวกเตอร์ (Ligation) (วัฒนาลัย และสรวง, 2536)

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

1. Origin of replication คือ มีบริเวณของดีเอ็นเอที่สามารถเริ่มต้นเพิ่มจำนวนสร้างดีเอ็นเอใหม่ของเวกเตอร์ได้ในเซลล์เจ้าบ้าน
2. Multiple restriction site (polylinker site) คือ มีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5' กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3' ปฏิกริยาการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ไลเกส (ligase) เป็นตัวเร่งปฏิกริยา และพบว่ามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ i และ j

i คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอทั้งหมด โดยหมายความถึงทั้งปลาย 5' และปลาย 3' ของ ดีเอ็นเอทุกโมเลกุลในปฏิกริยา

j คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอปลายหนึ่งๆ (5' หรือ 3') เฉพาะที่อยู่ใกล้กับปลายตรงข้าม (3' หรือ 5') ของโมเลกุลเดียวกัน ค่า i จึงเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอ ยิ่งโมเลกุลดีเอ็นเอยาวมากขึ้นเท่าใดก็ทำให้ปลายทั้งสองมีโอกาสเข้าใกล้กันน้อยลงเท่านั้น นอกจากนี้ ค่า j ยังเป็นค่าคงที่เฉพาะสำหรับโมเลกุลหนึ่งๆ และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกริยานั้น

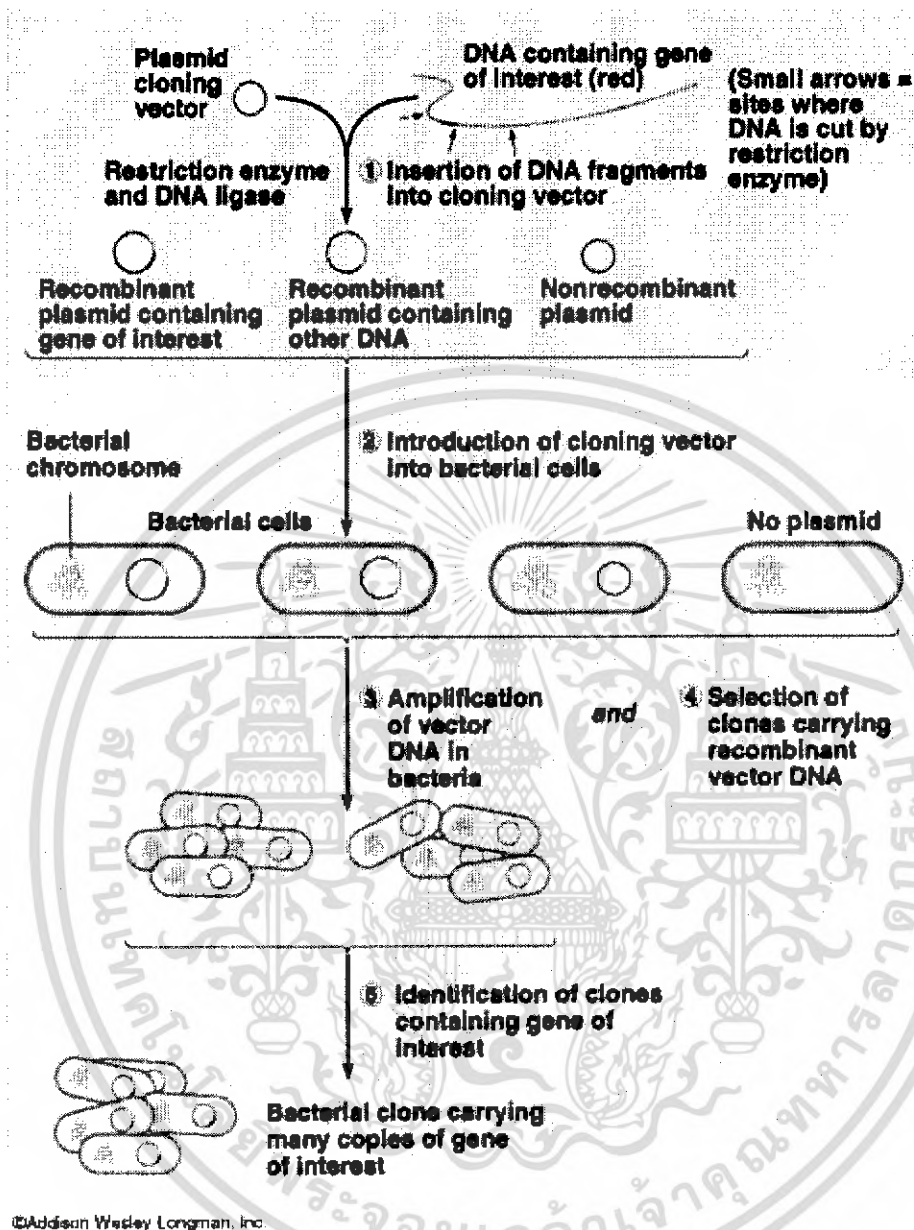
โดยทฤษฎีแล้ว สามารถใช้ค่า i และ j เข้าช่วยในการคาดคะเนถึงผลที่ควรจะได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกริยา กล่าวคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ $i = j$ ( $j/i = 1$ )	เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองเป็น โมเลกุลวงกลมมีสูงเท่ากับโอกาสที่มีโมเลกุลดีเอ็นเอทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมกันเป็นสายตรง
เมื่อ $i > j$ ( $j/i > 1$ )	เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองมีมากกว่า
เมื่อ $i < j$ ( $j/i < 1$ )	เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมต่อเป็นเส้นตรงมีมากกว่า

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

ฉะนั้นสำหรับการเชื่อมต่อโดยทั่วไป จึงมักกะเนให้ความเข้มข้นของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมีอัตราส่วนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 หรืออีกนัยหนึ่งก็คือใช้เวกเตอร์ในปริมาณเท่ากับหรือน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย(รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอและการโคลนนิ่ง

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/1827.JPG>

### 2.7.3 ตัวพาหะในการพาดีนเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (สุรินทร์, 2545)

ดีเอ็นเอพาหะ (vector) ที่ใช้ในงานพันธุวิศวกรรมต้องมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนได้เองในเซลล์เจ้าบ้าน ตัวพาหะเหล่านี้ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และ คอสมิด (cosmid) การเลือกใช้พาหะชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอที่สนใจ กล่าวคือดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สนใจมีขนาดประมาณ 5, 22 และ 40 กิโลเบส จะนิยมใช้พลาสมิด ฟาจ และคอสมิดเป็นตัวพาดีเอ็นเอชนิดนั้นๆ ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอที่สนใจเมื่อทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจกับพาหะที่ใช้

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่พันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoil) มีขนาดตั้งแต่หนึ่งพันเบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส หรือประมาณร้อยละ 0.2-4 ของโครโมโซม พลาสมิดจะมียีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ อย่างไรก็ตาม พลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์แบคทีเรีย ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียหนึ่งๆ โดยธรรมชาติการถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาสมิดนั้นจะเกิดขึ้นโดยกระบวนการคล้ายการคอนจูเกชัน (conjugation) นั่นเอง พลาสมิดบางชนิดมีความสามารถในการส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้เรียกว่า conjugative หรือ self transmissible plasmid เนื่องจากในพลาสมิดมียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายซึ่งพลาสมิดนั้น คือ ยีน *tra* (transfer) อยู่ พลาสมิดบางชนิดไม่มียีน *tra* อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่ง ทำให้ไม่สามารถส่งพลาสมิดจากเซลล์เดิมไปสู่เซลล์ใหม่ได้ จัดเป็น non conjugative plasmid คือ ขาดคุณสมบัติการเป็น self transmissible พลาสมิดกลุ่มหลังนี้จะส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่โดยการที่ทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอาดีเอ็นเอที่ภายนอกเข้าไปโดยการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) การเลือกพลาสมิดให้เหมาะสมกับดีเอ็นเอที่สนใจ ควรจะคำนึงถึงหลัก 2 ประการดังนี้

1. พลาสมิดถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอที่สนใจจึงสามารถสร้างเป็นดีเอ็นเอลูกผสมได้
2. พิจารณาคูสมบัติในการตัดของพลาสมิด โดยเฉพาะยีนที่แสดงคุณสมบัตินี้สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดดีเอ็นเอที่สนใจ

#### การทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) (สุรินทร์, 2545)

การทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรองรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้งานด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ เป็นต้น การเตรียม

competent cell อาจมีวิธีการแตกต่างกันได้ แต่สำหรับการทรานฟอร์ม competent cell ด้วยพลาสมิดนั้น จะมีลักษณะที่เหมือนกันคือใช้แคลเซียมคลอไรด์มาทำให้เซลล์แบคทีเรียมีช่องว่าง และใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีน ส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ และยีนที่สร้างแอลฟาแลกโตซิมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 *Mycobacterium smegmatis* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 3.1.2 *E.coli* DH5 $\alpha$  (F',  $\alpha$  80 $\Delta$ lacZ  $\alpha$  M15,  $\alpha$  (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\alpha$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*)
- 3.1.3 *E.coli* BL21 DE3 (F', *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*(DE3))

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.1 อาหาร Middlebrook 7H9 Broth, Middlebrook 7H10 agar
- 3.2.1.2 อาหาร LB

#### 3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

- 3.2.2.1 แอมพิซิลลิน (ampicillin)
- 3.2.2.2 กานามัยซิน (kanamycin)

#### 3.2.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.3.1 แลมบ์ดา( $\lambda$ ) คัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Promaga, USA)
- 3.2.3.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600,700, 800, 900, 1000,1200, 1,517 คู่เบส) (Promaga, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.3 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600,700, 800, 900, 1000,1200, 1,300, 1,400, 1,500, และ 2,072 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

### 3.2.4 เอนไซม์

3.2.4.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3.2.4.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)

3.2.4.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (Promega, USA)

3.2.4.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Promega, USA)

### 3.2.5 พลาสมิด

3.2.5.1 pDrive Cloning Vector (ขนาด3,850 คู่เบส) (Qiagen, Germany)

3.2.5.2 pET-30a (ขนาด5,422 คู่เบส) (Novagen, USA)

3.2.5.3 pCR T7/NT-TOPO (ขนาด 2,900 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

### 3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.6.1 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany)

3.2.6.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Qiagen, Germany)

### 3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.2.7.1 อะกาโรส (agarose) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)

3.2.7.2 เจลสตาร์ (gelstar) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)

3.2.7.3 ดีนอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.7.4 สีข้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) (ภาคผนวก ข)

3.2.7.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)

3.2.7.6 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.7.7 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.2.7.8 ไลโซไซม์ (lysozyme)
- 3.2.7.9 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.2.7.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- 3.2.7.11 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- 3.2.7.12 กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ (86% glycerol)
- 3.2.7.13 บัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub> buffer) (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 50 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.7.14 สารละลายที่ 1 solution I (สารละลายกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.7.15 สารละลายที่ 2 solution II (NaOH 0.2 มิลลิโมลาร์, SDS 1 เปอร์เซ็นต์)
- 3.2.7.16 สารละลายที่ 3 solution III (CH<sub>3</sub>COOK 5 มิลลิโมลาร์, glacial acetic acid)

### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น autoclave-325 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortechnik รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี
- 3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี
- 3.3.4 ตู้เป่าเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย
- 3.3.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipments) บริษัท Amersham PharmaciaBiotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน
- 3.3.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายภาพโปรตีน (Documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น Bts-20.M ประเทศเยอรมนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น  
EPS 301 ประเทศสวีเดน
- 3.3.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (thermoblock) บริษัท Biosan รุ่น  
TDB-120 Thermostat ประเทศเยอรมนี
- 3.3.12 เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา
- 3.3.13 เครื่องแก้ว (Glasswares)
- 3.3.14 ไมโครปิเปต

### 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร  
ลาดกระบัง

### 3.5 วิธีการศึกษา

#### 3.5.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

##### 3.5.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium smegmatis*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. smegmatis* ในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 หรือ อาหารแข็ง,  
Middlebrook 7H10 , (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน

##### 3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* DH5 $\alpha$

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5 $\alpha$  1 โคโลนี ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ  
37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เซลล์จะเจริญสูงสุดภายในเวลา 16 ชั่วโมง  
หลังเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารแข็งทำได้โดยเติมวุ้น Difco bacto 15 กรัมต่ออาหาร 1  
ลิตร ในกรณีที่มีการคัดเลือกเชื้อด้วยอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินกับยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ยา  
ปฏิชีวนะจะถูกเติมไปในชั้นตอนสุดท้ายเท่ากับ 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร  
ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.2 การสกัด crude DNA

นำโคลนของเชื้อ *M. smegmatis* มา 1 ลูบ มากระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสหรือ crude DNA ออกมาใส่หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม เดิมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่น เดิมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทใส่แม่พิมพ์เจลใสหวี เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เดิมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร

### 3.5.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *attM*

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *M53930* หรือ *attM* ของแบคทีเรีย *Mycobacterium smegmatis* ที่ได้จากธนาคารยีน นำมาทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ให้มีบริเวณที่สามารถจดจำได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 3' ให้มีบริเวณที่สามารถจดจำได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III โดยให้ชื่อไพรเมอร์ว่า *attMF* และ *attMR*

### 3.5.5 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *attM* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอคั้นแบบ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	5	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl <sub>2</sub> ) 25 มิลลิโมลาร์	4	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	2	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	29	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังในข้อที่ 3.5.3 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94	1 นาที } 35 รอบ 1 นาที } 1 นาที }
	60	
	72	
3	72	10 นาที
4	20	∞

### 3.5.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์เดิม บัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด โดยกลับหลอดทุก 2 นาที หลังจากทีเจลละลายหมด ปิดฝอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเจลครั้งละ 700 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง แล้วเปิดสารละลายเจลลงไปใหม่ ทำซ้ำจนสารละลายเจลหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ก้นหลอด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เปิดบัฟเฟอร์ EB ลงไป 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 3.5.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pDrive (ligation)

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.2 ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> (27 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	13
5 เท่าของบัฟเฟอร์ ligation	4
เอนไซม์ T4 DNA ligase	2
ปริมาตรสุทธิ	20

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

### 3.5.8 การเตรียม competent cell และการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)

การเตรียม competent cell ทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* DH5 $\alpha$  มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาขยายปริมาณโดยการนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม ทำการบ่มเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์บนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์โดยนำเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตรและ กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์ได้เป็น competent cell

การทรานสฟอร์มเมชันทำได้โดยการนำพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมคอดีเอ็นเอแล้วมาทรานสฟอร์มใน competent cell โดยใช้พลาสมิด pDrive ที่มีชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เป็น Positive control และ competent cell ที่ไม่มีพลาสมิดดีเอ็นเอเป็น Negative control ปิเปิด competent cell 100 ไมโครลิตร และ ligation 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เย็น แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้น นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำมาเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการพลิกหลอดทดลองไปมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปิเปิดออกมา 100 ไมโครลิตรมาทำเทคนิค spread plate ลงบนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำโดยเทียบกับตัวควบคุม บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

### 3.5.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคลนที่ได้จากหัวข้อ 3.5.8 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปิเปิดเชื้อ 1500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนใส เติมน้ำสะอาดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปิดขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ เติมน้ำสะอาดที่ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำสะอาดที่ 3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ เติมน้ำสะอาด 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 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างหลอดจนกระทั่งแห้ง ละลายพลาสมิดดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.10 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.9 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยมี ส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการตัดแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ	2
เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
10 เท่าของบัฟเฟอร์ <i>EcoRI</i>	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6
ปริมาตรสุทธิ	10

### 3.5.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

### 3.5.12 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมและพลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.9 และพลาสมิด pET30a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* เพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET30a โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำชิ้นส่วนยีน *attM* ที่ผ่านการตัดแล้วมาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	pET30a	ผลิตภัณฑ์ PCR
ผลิตภัณฑ์ PCR		2
พลาสมิดดีเอ็นเอ	2	
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	0.5
เอนไซม์ <i>Hind</i> III (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	0.5
10 เท่าของบัฟเฟอร์ K	1	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6	6
ปริมาตรสุทธิ	10	10

### 3.5.13 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิด pET30a

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III จากข้อ 3.5.12 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันโดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.5 บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pET30a และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pET30a / <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (21 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>attM</i> / <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	6
5 เท่าของบัฟเฟอร์ ligation	2
เอนไซม์ T4 DNA ligase	1
ปริมาตรสุทธิ	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.14 การทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) ของพลาสมิด pET30a-attM

ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิด pET30a-attM ได้จากข้อ 3.5.13 เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5 $\alpha$  ตามวิธีในข้อ 3.5.8 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานฟอร์มเมชันโดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.5.15 การผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM กับพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.6 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation ระหว่าง pCR T7/NT-TOPO และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pCR T7/NT-TOPO (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM (16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
10 เท่าของบัฟเฟอร์ น้ำกลั่น	1 2
เอนไซม์ T4 DNA ligase	2
ปริมาตรสุทธิ	10

### 3.5.16 การทรานสฟอร์มเมชันของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-attm

ทำการทรานสฟอร์มเมชันพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-attm ที่ได้จาก 3.5.15 เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5 $\alpha$  ตามวิธีในข้อ 3.5.8 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานฟอร์มเมชันโดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.5.17 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM ด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคลนที่ได้จาก 3.5.16 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.5.9

### 3.5.18 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.5.17 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.7 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการตัดแล้วมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI

ส่วนประกอบ	ปริมาณ(ไมโครลิตร)		
พลาสมิดดีเอ็นเอ	2	2	2
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1		
เอนไซม์ <i>Hind</i> III (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)		1	
เอนไซม์ <i>Eco</i> RI (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)			1
10 เท่าของบัฟเฟอร์ K	1	1	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6	6	6
ปริมาตรสุทธิ	10	10	10

### 3.5.19 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ใน pCR T7/NT-TOPO-attM

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีในข้อ 3.5.11

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* เข้าสู่พลาสมิด pDrive

##### 4.1.1 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *attM*

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *attM* เริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MS3930 จากเชื้อ *M. Smegmatis* ที่ได้จากธนาคารยีนมาหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดการแปลรหัสของยีน จากนั้นทำการ ออกแบบไพรเมอร์

4.1.1.1 ออกแบบไพรเมอร์ 2 บริเวณ ไพรเมอร์ด้วย forward ออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI เพิ่มขึ้นที่ต้นหน้าตำแหน่ง ATG หรือ start codon (รูปที่ 4.1) และไพรเมอร์ด้าน reverse ออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ stop codon จาก TGA เป็น CGA และเพิ่มบริเวณจดจำเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII ด้านหลัง (รูปที่ 4.1)

4.1.1.2 ในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะมีวัตถุประสงค์ในการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET30a

4.1.1.3 พลาสมิด pET30a มีบริเวณจำขของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII อย่างละ 1 บริเวณ

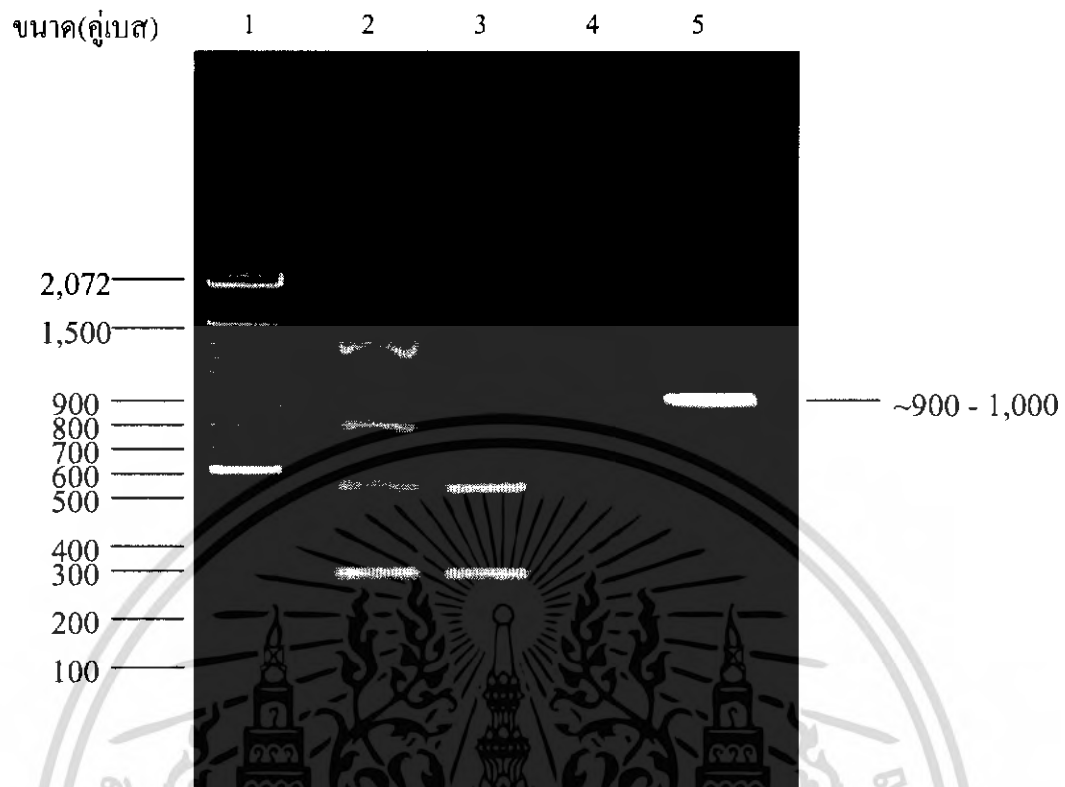
4.1.1.4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer ดังนี้  
5'-GGATCCATGACCTCGGCACACCC-3' (มีขนาด 23 คู่เบส) ให้ชื่อว่า attMF และได้ไพรเมอร์สาย reverse มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-AGCCCCGCATGCGATCGAGCGAGCAAGCTT-3' (มีขนาด 30 คู่เบส) ให้ชื่อว่า attMR หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยคาดว่าจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 967 คู่เบส



รูปที่ 4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *attM* และการออกแบบไพรเมอร์ทั้งด้าน forward และ reverse

#### 4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ดังข้อที่ 3.5.5 และ ใช้ไพรเมอร์ attMF และ attMR ที่ได้ออกแบบไว้จากหัวข้อ 4.1.1 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแปรผันอุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 45, 50, 55, และ 60 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ที่อุณหภูมิของการจับตัว 45 องศาเซลเซียส พบผลิตภัณฑ์ PCR 4 แถบที่มีขนาด 300, 500, 800, และ 1,300 คู่เบส ที่อุณหภูมิของการจับตัว 50 องศาเซลเซียส พบผลิตภัณฑ์ PCR 2 แถบที่มีขนาด 300, และ 500 คู่เบส ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR และที่อุณหภูมิของการจับตัว 60 องศาเซลเซียส พบผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาด ~900 - 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.2) จากผลการทดลองจะพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการเมื่อใช้อุณหภูมิของการจับตัว 60 องศาเซลเซียส เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากในจีโนมของ *M. Smegmatis* มีปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส G และ C สูงจึงทำให้ต้องใช้อุณหภูมิของการจับตัวค่อนข้างสูงถึงจะเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน จาก *M. Smegmatis* หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* จาก *M. Smegmatis* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 60 องศาเซลเซียสมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.2 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน *attM* ที่สภาวะการจับตัว 45, 50, 55, 60 องศาเซลเซียส

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 45 องศาเซลเซียส

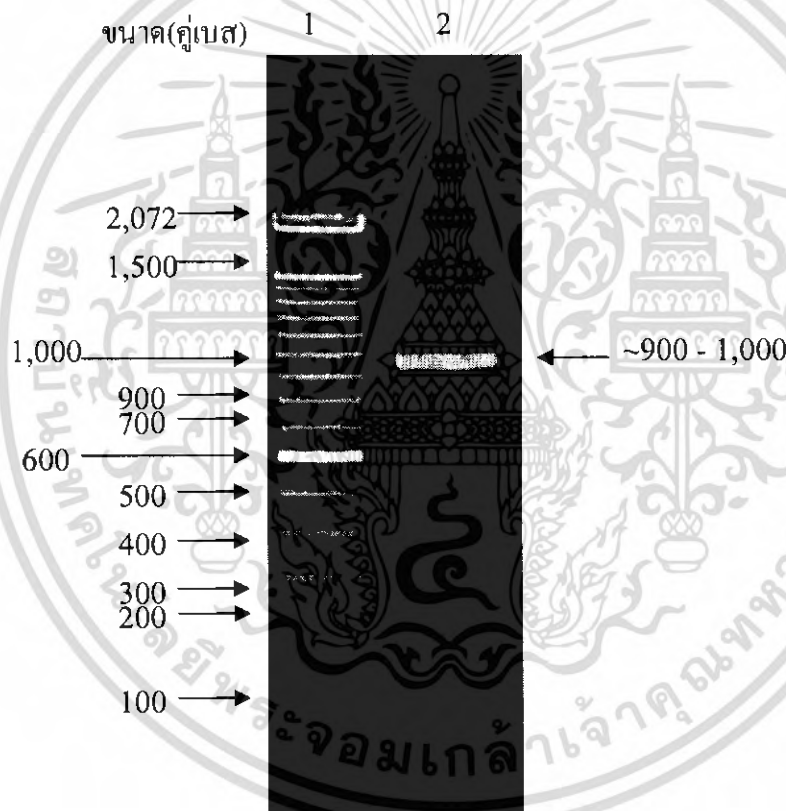
เลน 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 50 องศาเซลเซียส

เลน 4 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 55 องศาเซลเซียส

เลน 5 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 60 องศาเซลเซียส

#### 4.1.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ให้บริสุทธิ์

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่อุณหภูมิการจับตัวที่ 60 องศาเซลเซียส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) เพื่อขจัดสารเคมีหรือสิ่งปนเปื้อนที่อาจรบกวนปฏิกิริยาการเชื่อมต่อไป นำ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ซึ่งตรงกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ขนาด 976 คู่เบส และมีปริมาณดีเอ็นเอ 27 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.3) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

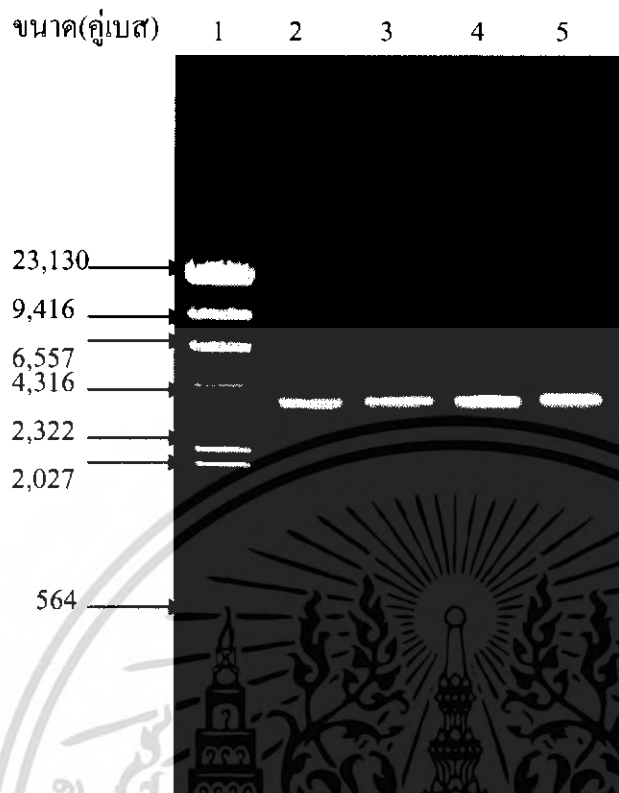
เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

#### 4.1.4 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเมชัน

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ดังตารางที่ 3.2 หลังจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีที่ขึ้นมา 4 โคโลนีมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

#### 4.1.5 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคโลนีที่ได้จากการคัดเลือกตามหัวข้อ 4.1.4 มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยวิธี Alkali lysis เรียกชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมว่า pDrive-*attM* 1.1, 1.2, 1.3 และ 1.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่า พลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1-1.4 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากัน (รูปที่ 4.4) จึงคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1 มาทำการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป



รูปที่ 4.4 พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1-1.4

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 2 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1

เลน 3 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.2

เลน 4 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.3

เลน 5 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.4

#### 4.1.6 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการนำพลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.10 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อย่างสมบูรณ์ โดยพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบเมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าแถบแรกมีขนาด 3,850 คู่เบส (รูปที่ 4.5) ซึ่งเป็นแถบของพลาสมิด pDrive และ แถบที่ 2 มีขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ดังนั้นสามารถวางได้ว่าพลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างพลาสมิด pDrive และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิด pDrive-attM 1.1 มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

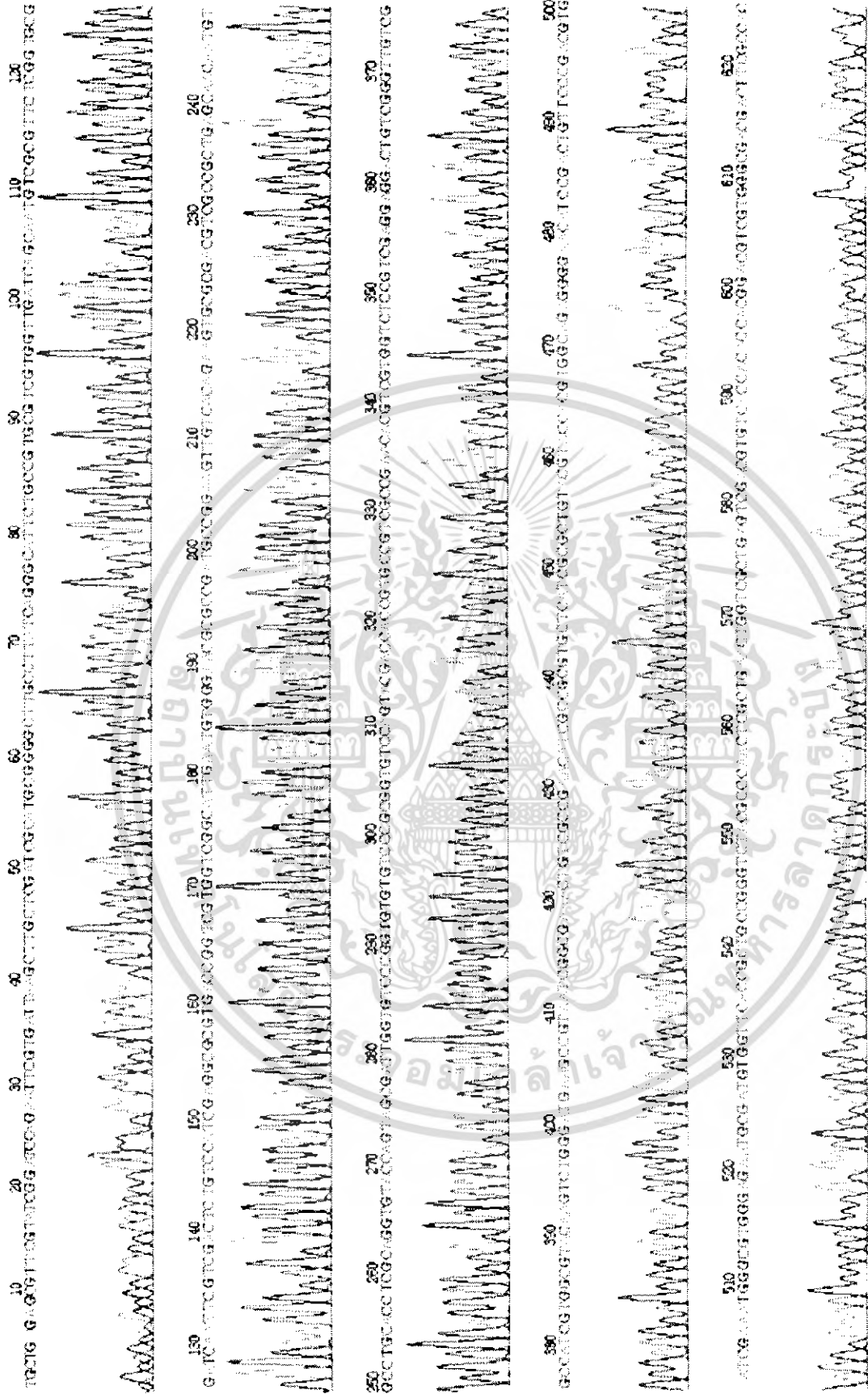
เลน 2 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1

เลน 3 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pDrive-attM

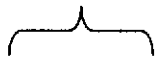
จากการนำพลาสมิด pDrive-attM 1.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6 เป็นไพรเมอร์ พบว่า ได้โครมาโตแกรมดัง (รูป 4.6 และ 4.7) ตามลำดับนำโครมาโตแกรมที่ได้มาจัดเรียงเป็นลำดับจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ทั้งสิ้น 967 เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดัง (รูปที่ 4.8) และพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน attM ของเชื้อ *M. smegmatis* ทุกประการ แสดงว่าการเพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM โดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีความถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ก่อนจุดเริ่มต้นการแปลรหัส และ HindIII หลังสิ้นสุดจุดการแปลรหัส ตามไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้



รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-attM เมื่อใช้ T7 เป็นไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**BamHI**

**GGA TCC ATG ACC TCG GCA CAC CCT** TTT CGG CGA AAC ACA CCT GAA CTT  
 TCC CGA CGC GAT GCG ATA CGC CGA GCG GGT CTG CTG GGA ATC GGT GCA TCG  
 GGA CTC GCC GCG CTA CTG GCG GCG TGC GGG CTG GGG CGC GAC GAC ACG  
 GAC CCG CCC GCG ACA ACC GCG CCG GCC GGC GGG CAC ACG CGA CAA ATT TTC  
 GCC GAC CGG ATG TAT GTG CTC GAC GGC GGA ACC GCT CAC GTC ACC GAT ATC  
 TCC CAA TGG TCC CCA GGC GTC AAC GAG GGT CAG AGC GCA ACA TTC AGC AAC  
 AAC GTC TAC CTC ATC GAG CAC GGC GAT GAA TGG ATG GTG TGG GAC ACC GGC  
 CTC GAC GAG AAT CTG ATC GAT GTT CCC GGT GGC GAA GTC GTC GCC CAC GAC  
 GTC CGT GGT GTG GTG ACA CGT CGA CTC AGC GAC CAG TTC AGC GAG TTG GGC  
 GTA GAC CCG GCA GCG GTG AAC CAC ATC GCA TTC TCC CAC GCC CAT TTC GAT  
 CAC GTC GGG AAC AGT CGG ATG TTC CCC TCT GCC ACG TGG TAC GTA CAG CGC  
 GAT GAG CAC GCG GCG ATG TTC GGC GAC AGT TTC GCC GAT TAC GGC TTC ATC  
 CCA GAC TTG TAC GCC ACG ATG GCC GAC AAC CCG ACA GTC CTC CTC GAC GGA  
 GAC CAC GAC GTG TTC GGC GAC GGC ACG GTG GTC GTA CTG GAC ACC GCG GGA  
 CAC ACA CCG GGA CAC CAA TCG CTA CTG GTA CAC CTG CGA GGT GCA GGC ACA  
 TTG TTG CTC AGC GGC GAC GTC GCG CAC TTC TGT GAC AAC TTC CGG CAT CGG  
 CGC GTT CCC ACA TTC AAT GCC GAC CAC GAC CGG TCA CGC GCC TCG ATG GAC  
 AGA GTC GAC GAA TTG ATC CGC ACC GAG AAC GCG ACA TTG CTG ATC AAC CAC  
 GAC GCA CGG CAG AAT GCC CTG ATA AGG CAA **GCC CCG CAT GCG ATC GAG**  
**CGA GC AAG CTT**

**HindIII**

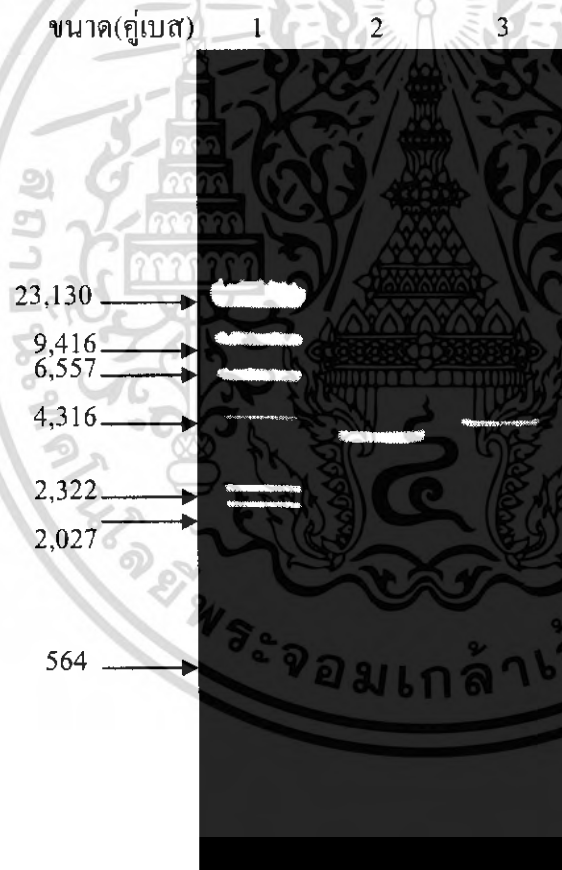
รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pDrive-attM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ผลการโคลนยีน *attM* จาก pDrive-*attM* เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pET30a

### 4.2.1 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* และพลาสมิดแสดงออก pET30a

จากการนำโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1 และพลาสมิดแสดงออก pET30a มาสกัดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินจากนั้นนำเซลล์มาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkali lysis ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.9 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ โดยแถบของพลาสมิด pET30a จะอยู่สูงกว่าแถบของพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1 เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.9) จากนั้น นำพลาสมิดทั้งสองมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ต่อไป



รูปที่ 4.9 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1 และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยวิธี alkali lysis

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 2 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-*attM* 1.1

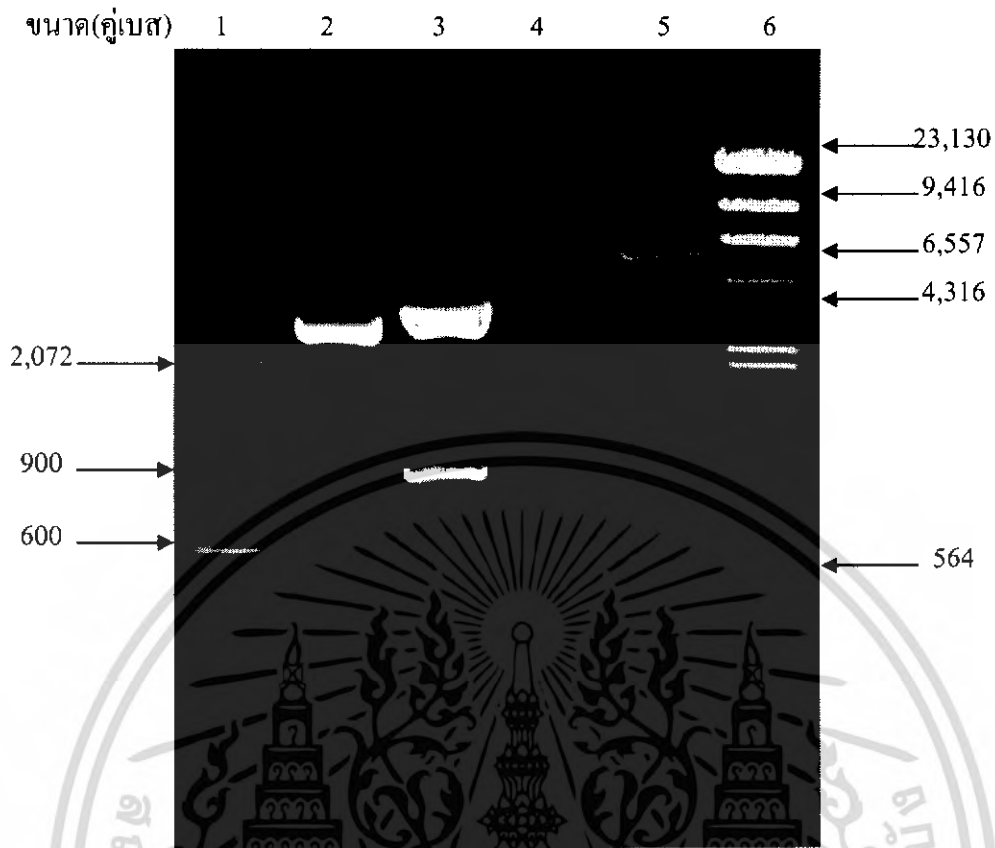
เลน 3 คือ พลาสมิดแสดงออก pET30a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 ผลการตัดพลาสมิด pDrive-attM และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัด

##### จำเพาะ BamHI และ HindIII

จากการนำพลาสมิดที่ได้จากการสกัดในข้อที่ 4.2.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อตัดพลาสมิด pDrive-attM ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder และ แลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบว่าแถบขนาดใหญ่มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส (รูปที่ 4.10) เป็นแบนของพลาสมิด pDrive แถบขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.10) เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM ของ *M. Smegmatis* จากนั้นนำแถบที่มีขนาดเล็กมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เมื่อตัดพลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,400 คู่เบส (รูปที่ 4.10) ซึ่งตรงกับแถบของพลาสมิด pET30a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

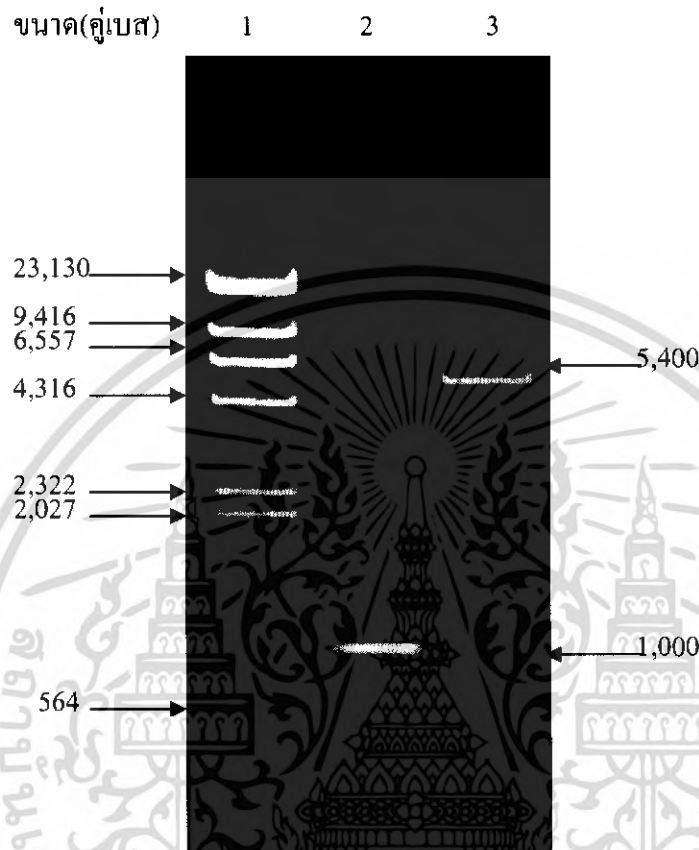


รูปที่ 4.10 ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pDrive-attM และพลาสมิดแสดงออก pET30a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III  
 เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder  
 เลน 2 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM1.1  
 เลน 3 คือ พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III  
 เลน 4 คือ พลาสมิดแสดงออก pET30a  
 เลน 5 คือ พลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III  
 เลน 6 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

#### 4.2.3 ผลการทำให้บริสุทธิ์ของพลาสมิด pET30a และ ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ใน pDrive-attM ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

จากการนำพลาสมิดแสดงออก pET30a และชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ใน pDrive-attM ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Qiagen gel extraction kit และนำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่ผ่านการทำ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้บริสุทธีมี 1 แแถบ ที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.11) ในขณะที่พลาสมิด pET30a ที่ผ่านการทำให้บริสุทธีมี 1 แแถบ ที่มีขนาด 5,400 คู่เบส (รูปที่ 4.11) หลังจากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธีทั้งสองมาเชื่อมต่อกัน



รูปที่ 4.11 ผลการทำให้บริสุทธีของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ในพลาสมิด pDrive-*attM* และ พลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ในพลาสมิด pDrive-*attM*

เลน 3 คือ พลาสมิดแสดงออก pET30a

#### 4.2.4 ผลการเชื่อมต่อพลาสมิดแสดงออก pET30a กับ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* และ การทรานสฟอร์มเมชัน

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* และพลาสมิดแสดงออก pET30a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III และทำให้บริสุทธีมาเชื่อมต่อกันจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม pET30a-*attM* ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญ

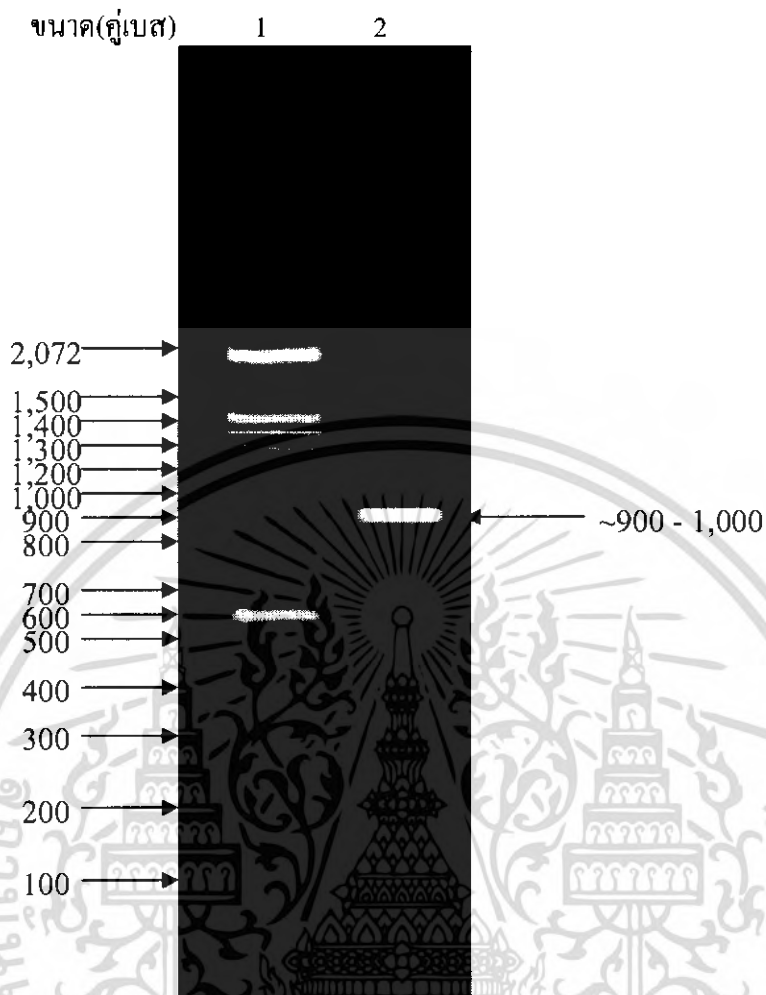
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีโคโลนีขึ้นบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินอาจเนื่องมาจากพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET30a-*attM* มีการจำลองตัวเองต่ำ และ สภาวะการเชื่อมต่อ ไม่ดีพอ ทำให้ไม่พบโคโลนีที่สามารถเจริญบนยาปฏิชีวนะกานามัยซินได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจในการโคลนขึ้น *attM* เข้าสู่พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO เนื่องจาก พลาสมิดนี้เป็นพลาสมิดแสดงออกเช่นเดียวกับ pET30a และ บริเวณปลายมีเบส T ขึ้นออกมา ทำให้เหมาะสมในการ โคลนผลิตภัณฑ์ PCR

### 4.3 ผลการโคลนขึ้น *attM* เข้าสู่พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO

#### 4.3.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนที่ 3.5.5 โดยเติมไพรเมอร์ *attMF* และ *attMR* แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้อุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* 1 แถบที่มีขนาด 900-1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.12) ซึ่งมีขนาดตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ 967 คู่เบส จากนั้น จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์และนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO ต่อไป



รูปที่ 4.12 ผลการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของยีน *attM* ที่สภาวะการจับตัว 60 องศาเซลเซียส

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ที่อุณหภูมิจับตัว 60 องศาเซลเซียส

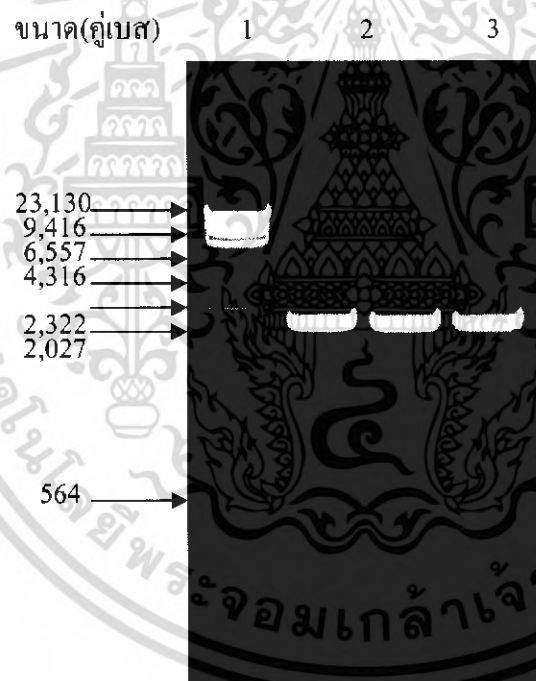
#### 4.3.2 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* เข้าสู่พลาสมิดแสดงออก pCR-T7/NT TOPO และการทรานสฟอร์มเมชัน

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อที่ 4.3.1 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 900-1,000 คู่เบส ที่ได้มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO แล้วนำพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 $\alpha$  ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.3 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *attM*

เพาะเลี้ยงโคโลนีที่ได้จากหัวข้อ 4.3.2 3 โคโลนีในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิ ลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ลูกผสมด้วยวิธี Alkali lysis เรียกพลาสมิดลูกผสมที่ได้ว่า pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1, 1.2 และ 1.3 นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ ทั้งสามมีขนาดเท่ากัน (รูปที่ 4.13) จึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสามมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BamHI*, และ *HindIII* เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมทั้งสามอาจมีการจัดวางผลิตภัณฑ์ PCR ใน วงพลาสมิดในทิศทางที่ไม่เหมือนกัน การตรวจสอบทิศทางของผลิตภัณฑ์ PCR จึงทำได้โดยการม ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสามชนิด



รูปที่ 4.13 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1-1.3

เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 2 คือ พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1

เลน 3 คือ พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.2

เลน 4 คือ พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3

#### 4.3.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1-1.3 โดยวิธีการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BamHI* และ *HindIII*

นำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1-1.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BamHI* และ *HindIII* เพื่อตรวจสอบทิศทางการเข้าไปจับของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO จากจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* ภายในผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิด ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* นั้นจะใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด pDrive ผลการตัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* พบว่า pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1 และ 1.2 พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ(รูปที่ 4.14) ในเลขที่ 4 และ 5, 8 และ 9 เนื่องจากมีการเข้าไปจับของผลิตภัณฑ์ PCR กลับทิศทางกับที่ต้องการ ทำให้เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* จะได้แถบสองแถบ โดยแถบขนาดใหญ่เป็น แถบของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO ที่มีขนาดประมาณ 2,900 คู่เบส และ แถบขนาดเล็กเป็นชิ้นส่วนของ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* มีขนาดประมาณ 900- 1,000 คู่เบส จึงสรุปได้ว่า พลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.1และ1.2 มีการเข้าไปจับของผลิตภัณฑ์ PCR ในทิศทางที่ตรงกันข้ามกับที่ต้องการ จากการตัดพลาสมิดลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1-1.3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสมทั้งสามมีรูปแบบการตัดเหมือนกัน ได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดสูงกว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pCR T7/NT-TOPO (รูปที่ 4.13) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดทั้งสามเป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่าง pCR T7/NT-TOPO กับ ผลิตภัณฑ์ PCRของยีน *attM* อย่างไรก็ตาม การเข้าไปจับของผลิตภัณฑ์ PCR ในทิศทางที่ต้องการ ต้องตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII*

ผลการตัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีขนาด *BamHI* และ *HindIII* พบว่า pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 พบแถบแบนเกิดขึ้น 1 แถบ(รูปที่ 4.14 เลขที่ 12 และ 13) เนื่องมาจากการที่ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ในด้านไพรเมอร์ forward เข้าจับกับพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO ตัดจำเพาะ *BamHI* ที่อยู่ใกล้กันทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ เช่นเดียวกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ใกล้กับบริเวณจดจำในพลาสมิดทำให้ตัดได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 มีการเข้ากันของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกทิศทางจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *BamHI* และ *HindIII*

- เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟางแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
เลน 2 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1  
เลน 3 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *EcoRI*  
เลน 4 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *BamHI*  
เลน 5 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.1 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *HindIII*  
เลน 6 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.2  
เลน 7 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.2 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *EcoRI*  
เลน 8 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.2 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *BamHI*  
เลน 9 คือ พลาสมิด PCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.2 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *HindIII*  
เลน 10 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.3  
เลน 11 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.3 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *EcoRI*  
เลน 12 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.3 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *BamHI*  
เลน 13 คือ พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO- *attM* 1.3 ที่ตัดเอนไซม์จำเพาะ *HindIII*

#### 4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*attM*

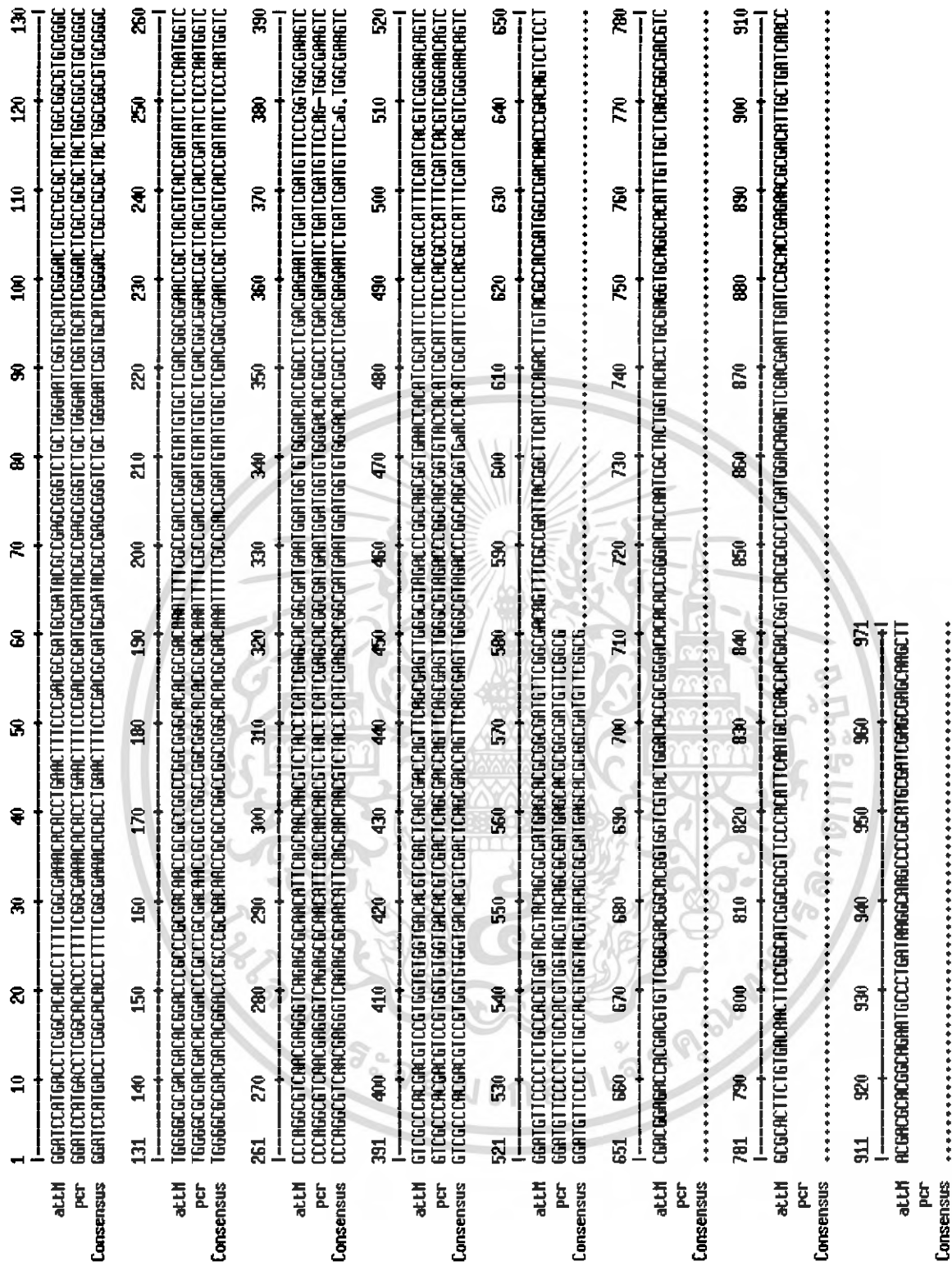
จากการนำพลาสมิด pCRT7/NT-TOPO-*attM* 1.3 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 580 เบส (รูปที่ 4.15) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MS3090 หรือ *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 380 ขาดเบส G และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 472 มีการเปลี่ยนเบส A ไปเป็นเบส T (รูปที่ 4.16) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า พลาสมิดแสดงออก pCRT7/NT-TOPO-*attM* 1.3 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* กับพลาสมิดแสดงออก pCRT7/NT-TOPO แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ถูกต้องทั้งหมด จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกได้

```

GGATCCATGACCTCGGCACACCCTTTTCGGCGAAACACACCTGAACTTCCCCGACGC
GATGCGATACGCCGAGCGGGTCTGCTGGGAATCGGTGCATCGGGACTCGCCGCGCTA
CTGGCGGGCTGCGGGCTGGGGCGCGACGACACGGACCCGCCCGGACAACCGCGCC
GGCCGGCGGGCACACGCGACAAATTTTCGCCGACCGGATGTATGTGCTCGACGGCGG
AACCGCTCACGTCACCGATATCTCCCAATGGTCCCCAGGCGTCAACGAGGGTCAGAG
CGCAACATTCAGCAACAACGTCTACCTCATCGAGCACGGCGATGAATGGATGGTGTG
GGACACCGGCCTCGACGAGAATCTGATCGATGTTCCAGTGGCGAAGTCGTCGCCAC
GACGTCCGTGGTGTGGTGACACGTGACTCAGCGACCAGTTCAGCGAGTTGGGGCGTA
GACCCGGCAGCGGTGTACCACATCGCATTCTCCACGCCCATTTTCGATCACGTCGGG
AACAGTCGGATGTTCCCCTCTGCCACGTGGTACGTACAGCGCGATGAGCACGCGGCG
ATGTTCCGGCG

```

รูปที่ 4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *attM* ที่ได้จากพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3 โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7



รูปที่ 4.16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น *attM* ของเชื้อ *M. smegmatis* จากธนาคารยีน กับ ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*attM* 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

1. พลาสมิดลูกผสม pDrive-attM 1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างพลาสมิด pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน attM ของ *M. smegmatis* ที่มีขนาด 967 คู่เบส เมื่อนำพลาสมิด pDrive-attM 1.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII เหมือนกับไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้
2. ในการใช้พลาสมิดแสดงออก pET30a ไม่สามารถทำการโคลนยีน attM ของเชื้อ *M. smegmatis* ได้เนื่องจากพลาสมิดแสดงออก pET30a มีการจำลองตัวต่ำหรือปฏิกิริยาการเชื่อมต่อไม่ดีพอ
3. พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM 1.1-1.3 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ เชื้อ *M. smegmatis* ที่มีขนาด 967 คู่เบส
4. เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมแสดงออก pCR T7/NT-TOPO-attM 1.1-1.3 มาตรวจสอบการเข้าจับของผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-attM 1.3 มีการเข้าจับของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดในทิศทางที่ต้องการ
5. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pCR T7/NT-TOPO-attM 1.3 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดถึง 3 ตำแหน่ง
  - 5.1 ตำแหน่งที่ 378 เบส C เปลี่ยนเป็น A
  - 5.2 ตำแหน่งที่ 380 ไม่มีการสังเคราะห์ เบส G
  - 5.3 ตำแหน่งที่ 472 เบส A เปลี่ยนเป็น T

## เอกสารอ้างอิง

- พรงาม ลิมตระกูล. 2541. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.  
 วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด  
 สรวง อุดมวรภัณฑ. 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ: เทคนิคทางอนุพันธุ  
 ศาสตร์และพันธุวิศวกรรมเล่ม 1-2. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล.  
 สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร:  
 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
 กัลยา ปรีชานุกูล. 2548. ภาษาของแบคทีเรีย. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์. มหาล  
 นรเศรษฐ.  
 A. Carlier, S. Uroz, B. Smadja, R. Fray, X. Latour, Y. Dessaux, and D. Faure 2003. “The Ti  
 Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Harbors an *attM*-Paralogous Gene, *aiiB*, Also  
 Encoding *N*-Acyl Homoserine Lactonase Activity” *Appl Environ Microbiol.* 4989–4993.  
 Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., Zhang, L.-H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-  
 homoserine-lactonase quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia*  
*carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3526-3531.  
 Danicls, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. 2003. Quorum sensing and swarming migration in  
 bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*  
 Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P.  
 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.  
*Science.* 280: 295-298.  
 Fugua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1996) Census and consensus in bacteria  
 ecosystem: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators  
*Microbiol.* 50: 727-751  
 Greenberg E. Peter. 2000. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in Bacteria. *Microbiology*  
 Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1997. Quorum sensing by  
 peptide pheromones and two-component signals-transduction systems in Gram-positive  
 bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895-904.  
 Schauder S., Bassler B.L. The language of bacteria. *Genes Dev.* 2001. 15:1468-1480  
 Zhang, H., Wang, L., and Zhang, L. 2002. “Genetic control of quorum-sensing signal turnover in  
*Agrobacterium tumefaciens*.” *PNAS.* 99:4638-4643

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium\\_tuberculosis](http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:TB\\_Culture.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:TB_Culture.jpg)

<http://www.bsip.com/fond>

<http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/Img/graphics/hatfull/hatfull02.jpgs/r/0804703.jpg>

<http://home.nvg.org/~forthun/cdrlenker.html>

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/1827.JPG>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### ส่วนประกอบอาหาร MIDDLEBROOK 7H9 BROTH

Ammonium Sulfate	0.5000 g
Monopotassium Phosphate	1.0000 g
Disodium Phosphate	2.5000 g
Sodium citrate	0.1000 g
Magnesium sulfate	0.0500 g
Calcium Chloride	0.0005 g
Zinc Sulfate	0.0010 g
Copper Sulfate	0.0010 g
L-Glutamic Acid	0.5000 g
Ferric Ammonium Citrate	0.0400 g
Pyridoxine	0.0010 g
Biotin	0.0005 g
Solution g/liter (final solution)	4.7 g/l. Final pH at 25°C 6.6 ± 0.2.

### ส่วนประกอบเสริม

Albumin Fraction V, Bovine	5.0000 g
Dextrose	2.0000 g
Catalase (Beef)	0.0003 g
Distilled water	100.000 ml

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกลีเซอรอลปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ส่วนประกอบอาหารเหลว LB

แบคโคทริปโตน	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัมต่อลิตร

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ส่วนประกอบสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

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

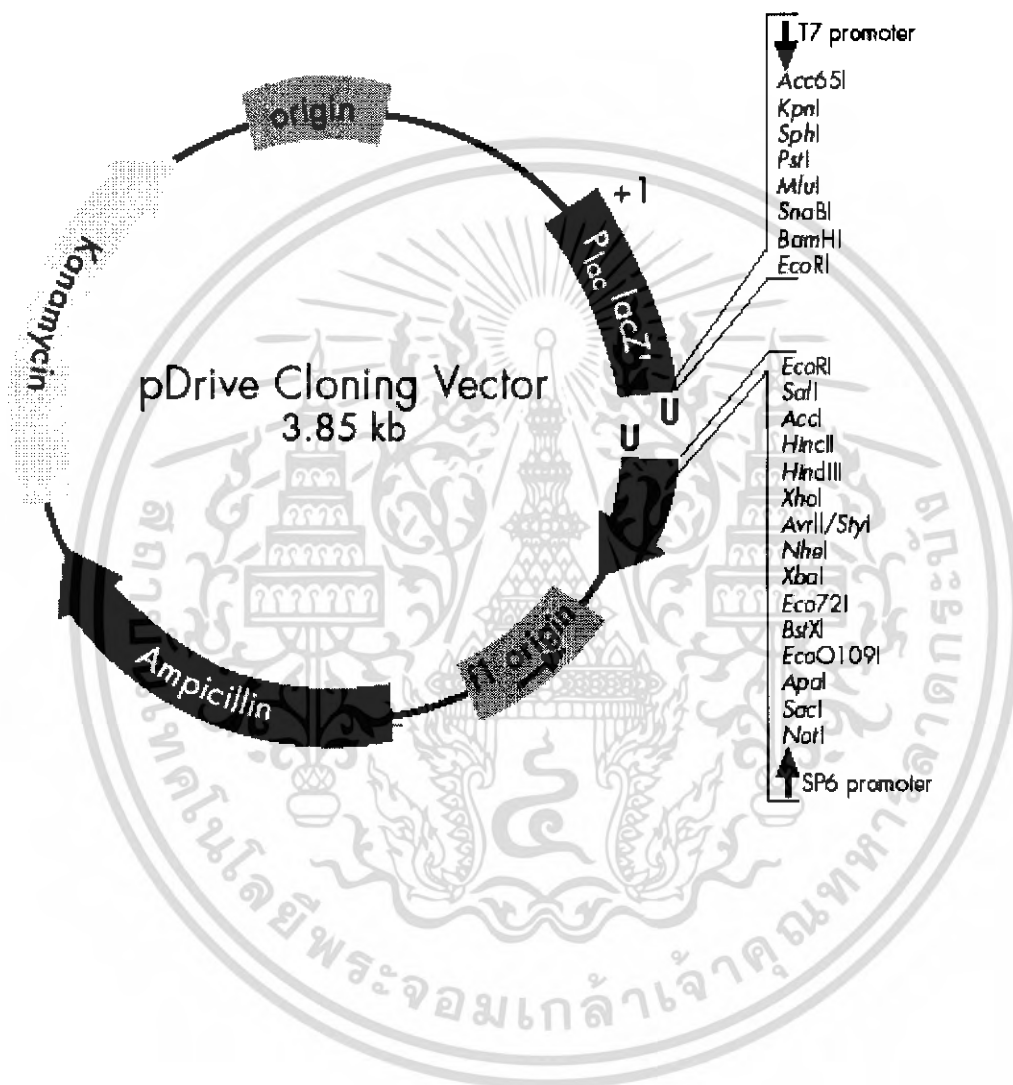
ชั่งซูโครสหรือกลีเซอรอล 40 กรัม และโบรโมไฟโนลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-Boric-EDTA 100 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

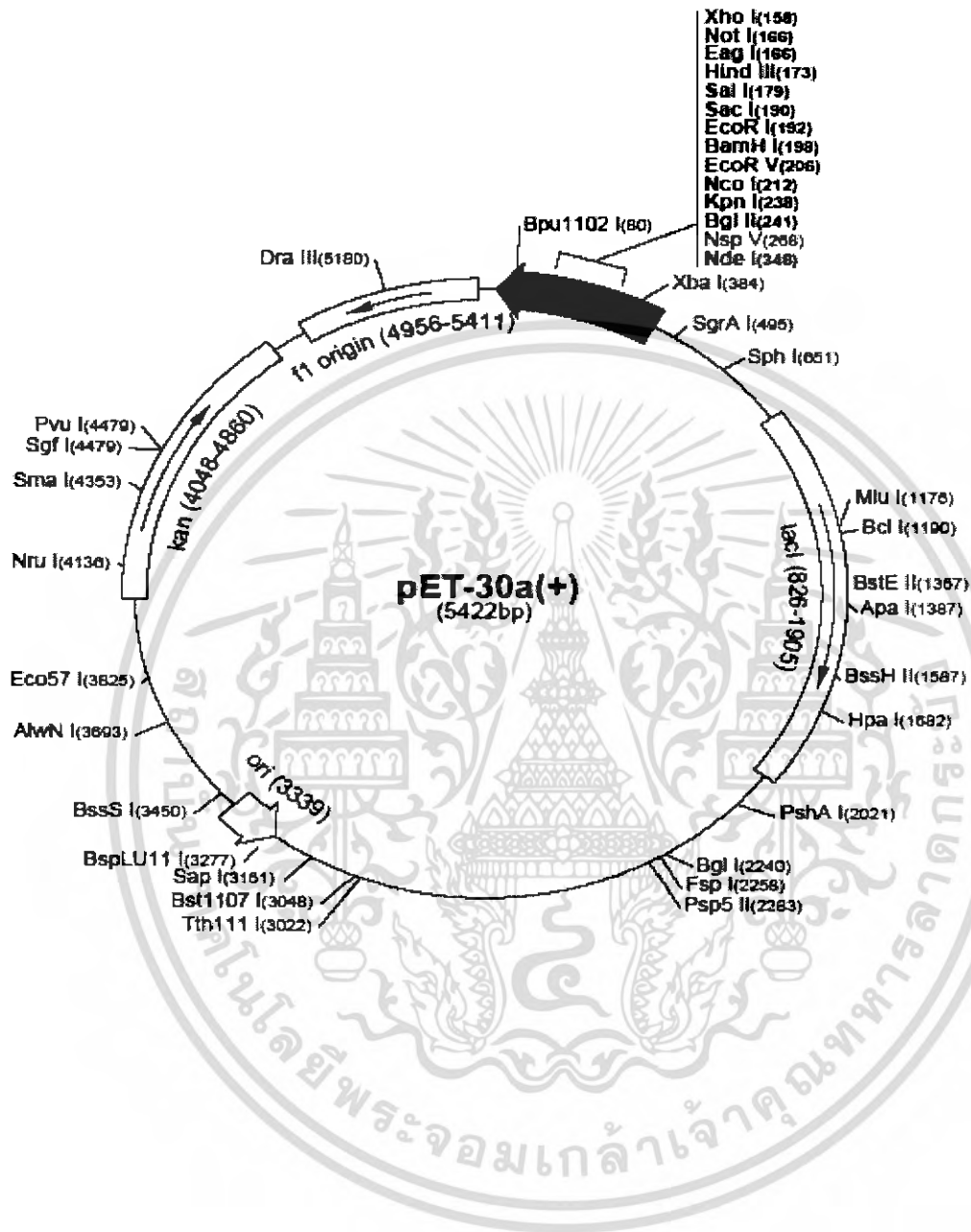
## ภาคผนวก ก

แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนที่ยีนของพลาสมิด pET30a (Novagen, USA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนที่ยีนของพลาสมิด pCR-T7-NT-TOPO (Invitrogen, USA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้