สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MS3930* ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*

นางสาวพีรภา สุวรรณโชติ
นางสาวภัทรา ชาญชัย
นางสาวรุ่งอรุณ สุขสำราญ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72605
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 1176999
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of *MS3930* Gene Expression of *Mycobacterium smegmatis*

Peerapa Suwannachote

Pattra Charnchai

Rungaroon Suksamran

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การศึกษาการแสดงออกของยีน *MS3930* ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*
นักศึกษา	นางสาวพีรภา สุวรรณโชติ รหัส 46050133
	นางสาวภัทรา ชาญชัย รหัส 46050134
	นางสาวรุ่งอรุณ สุขสำราญ รหัส 46050137
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ ดร.จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาการแสดงออกของยีน *MS3930* ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*
นักศึกษา นางสาวพีรภา สุวรรณโชติ
นางสาวภัทรา ชาญชัย
นางสาวรุ่งอรุณ สุขสำราญ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา พ.ศ. 2549
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ควอรัมเซนซิงเป็นระบบการสื่อสารของเซลล์ประเภทหนึ่งในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์ โดยเมื่อความหนาแน่นของประชากรสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง เซลล์จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน ซึ่งโมเลกุลสัญญาณนี้จะเข้าจับกับรีเซพเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน สัญญาณโมเลกุลเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนสามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส ซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เมื่อโมเลกุลสัญญาณถูกทำลายและลดปริมาณลงจะนำไปสู่การลดความรุนแรงในการก่อโรค จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AttM กับลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ในธนาคารยีน พบว่า AttM จากเชื้อ *A. tumefaciens* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *MS3930* ของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*

โครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีน *MS3930* ในพลาสมิดแสดงออกเพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของโปรตีน โดยทำการสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ที่มีขนาด 957 คู่เบส จากเชื้อ *M. smegmatis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และ pET 200/D-TOPO พลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ได้ถูกนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* TOP10F′ และ TOP10 ตามลำดับ จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ทำการตรวจสอบทิศทางของผลิตภัณฑ์ PCR โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมระหว่างพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* แต่มีทิศทางการเชื่อมต่อที่กลับด้าน ส่วนพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมระหว่างพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* และมีทิศทางการเชื่อมต่อที่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study of *MS3930* Gene Expression of *Mycobacterium smegmatis*
Student	Miss Peerara Suwannachote
	Miss Pattra Charnchai
	Miss Roongaroon Suksamran
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

Quorum sensing is one of cell communication systems in Gram-negative bacteria responding to the cell density. When eell density increases to the threshold level, cell produces a signal molecule "acyl homoserine lactone". This signal molecule binds to the receptor and then activates the target gene expressions resulting in the different physiological expressions. Acyl homoserine lactone signal molecule can be destroyed by acyl homoserine lactonase encoded by *attM* of *Agrobacterium tumefaciens*. When this signal molecule is destroyed resulting to the decrease of disease virulence. The amino acid sequence of AttM was compared to other amino acid sequences in Genbank. It was found that AttM of *A. tumefaciens* was similar to the amino acid sequence encoded by *MS3930* of *Mycobacterium smegmatis* .

This special project aims to clone *MS3930* of *M. smegmatis* to the expression vector in order to study protein function and expression. The *MS3930* PCR product with a size of 957 bp from *M. smegmatis* was amplified by polymerase chain reaction. The PCR product was ligated to expression vector pCR T7/NT-TOPO and pET 200/D-TOPO. The recombinant plasmids were transformed into the competent cell *E.coli* TOP10F′ and TOP10, respectively. Transformants were selected on antibiotic containing LB agar. The direction of PCR product was detected by polymerase chain reaction. It was found that plasmid pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 was the recombinant expression plasmid of pCR T7/NT-TOPO and *MS3930* PCR product but showed the opposite ligation direction, plasmid pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4, 1.5 and 1.6 was the recombinant expression plasmid of pET 200/D-TOPO and *MS3930* PCR product and showed the correct ligation direction.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในภายหน้าต่อคณะผู้จัดทำ ซึ่งคณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ดร.จิดาภา ทิน้อย กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันทน์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่กรุณาอนุเคราะห์เชื้อ *Mycobacterium smegmatis* รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและคอยเอื้อเฟื้อให้คำปรึกษาต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างดำเนินงาน

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ โดยเฉพาะพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุลทุกท่านที่ช่วยเหลือและแนะนำจนทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และผู้ให้การอุปการะเลี้ยงดู รวมถึงสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุน ส่งเสริมทางด้านการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

น.ส.พีรภา สุวรรณโชติ
น.ส.ภัทรา ชาญชัย
น.ส.รุ่งอรุณ สุขสำราญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย	5
2.1.1 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก	6
2.1.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ	6
2.2 การยับยั้งระบบควอรัมเซนซิง (Quorum-quenching reagent)	10
2.3 เชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Mycobacteria)	11
2.3.1 *Mycobacterium tuberculosis*	12
2.3.2 *Mycobacterium smegmatis*	12
2.4 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย	13
2.4.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่ (PCR)	13
2.4.2 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	14
2.4.3 การตัดดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	16
2.4.4 เวกเตอร์ใช้ในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	17
2.4.5 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์	18
2.4.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	21
3.2 สารเคมี	21
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.2.2 ยาปฏิชีวนะ	21
3.2.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน	21
3.2.4 เอนไซม์	21
3.2.5 พลาสมิด	22
3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)	22
3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ	22
3.3 อุปกรณ์	23
3.4 วิธีการทดลอง	23
3.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	23
3.4.2 การสกัด crude DNA	24
3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *MS3930*	24
3.3.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยเทคนิค PCR	24
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	26
3.4.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	27
3.4.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* เข้ากับพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO และทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)	27
3.4.8 การสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม	29
3.4.9 การตรวจสอบผลการเชื่อมต่อ (ligation) ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสม	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
4.1 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน AttM ของ *A. tumefacience* กับลำดับกรดอะมิโนของมัยโคแบคทีเรีย	33
4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis*	35
4.3 ผลการสกัด crude DNA ของเชื้อ *M. smegmatis*	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmaits* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	38
4.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ให้บริสุทธิ์	41
4.6 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออกและทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)	43
4.7 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม	43
4.8 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	46
4.9 ผลการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก	56
ภาคผนวก ข	58
ภาคผนวก ค	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิต acyl-HSL	9
3.1	สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	25
3.2	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	25
3.3	สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase	26
3.4	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	26
3.5	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO	28
3.6	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO	28
3.7	ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI และ *Hin*dIII	30
3.8	องค์ประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930*	31
3.9	สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930*	31
3.10	องค์ประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930*	32
3.11	สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของชิ้น ผลิตภัณฑ์ PCR ในในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930*	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างพื้นฐานของ *N*-acyl homoserine lactone (acyl-HSL)	7
2.2	กลไกพื้นฐานของระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ	8
2.3	การจัดเรียงโครงสร้างของยีน *lux* ประกอบไปด้วยยีน *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* และ *luxE* ทำให้เกิดการเรืองแสงในสิ่งมีชีวิต และยีน *luxG* ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด	9
2.4	การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ด้วยเอนไซม์ acyl-HSL lactonase	11
2.5	เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*	12
2.6	เชื้อ *Mycobacterium smegmatis*	13
2.7	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	14
2.8	การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	15
2.9	การเชื่อมต่อดีเอ็นเอและการโคลนยีน	19
4.1	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *attM* จากเชื้อ *A. tumefaciens* กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis*	34
4.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* และบริเวณของไพรเมอร์ MS3930F$_1$ MS3930F$_2$ และ MS3930R$_1$	36
4.3	ผลการสกัด crude DNA จากเชื้อ *M. smegmatis*	37
4.4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะการจับตัว 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส	39
4.5	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะการจับตัว 60 และ 65 องศาเซลเซียส	41
4.6	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน *MS3930*	42
4.7	พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5	44
4.8	พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO- *MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 , 1.5 และ 1.6	45
4.9	ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	47
4.10	ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	49
4.11	ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-MS3930 1.3, 1.4, 1.5 และ1.6 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell to cell communication) โดยส่งสัญญาณในรูปของสารเคมี ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) เป็นการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์รูปแบบหนึ่งที่รู้จักกันเป็นอย่างดี โดยการตอบสนองจะขึ้นกับจำนวนประชากร นั่นคือเมื่อจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง สามารถทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างและการส่งสัญญาณทางเคมี โดยสัญญาณนี้จะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมาย และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียในที่สุด (Fugua และคณะ, 1994 ; Carlier และคณะ, 2003)

ในการติดต่อสื่อสารของแบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมบวกจะใช้สารพวกเปปไทด์สายสั้นๆ เป็นสัญญาณการสื่อสาร ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะใช้สัญญาณโมเลกุลขนาดเล็ก โดยโมเลกุลสัญญาณที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL สังเคราะห์จากเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทส (acyl-HSL synthase) โดยใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน และ acylated acyl-carrier protein (acyl-ACP) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น (Greenberg, 2000)

เอนไซม์ acyl-HSL synthase ของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ 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 และสายโซ่ข้างที่ตำแหน่งที่ 3 อาจอยู่ในรูปอิ่มตัว หรือรูปไฮดรอกซิล (C=OH) หรือรูปคาร์บอนิล (C-O) โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ C_4-HSL สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ ในขณะที่ $3OC_{12}$-HSL สามารถแพร่ผ่านได้เช่นกันแต่ในอัตราที่ช้ากว่า

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แบ่งเซลล์และมีประชากรหนาแน่นจะกระตุ้นการสร้างโมเลกุลสัญญาณ 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 ที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL (N-terminal acyl-HSL binding domain) เมื่อ LuxR จับกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลสัญญาณ ส่งเสริมให้เกิดการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้

ตัวอย่างของงานวิจัยควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสงที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (bioluminescense) ให้ขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ในแบคทีเรีย *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 เนื่องจากควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมความรุนแรงและการเจริญของเชื้อโรคในคนหรือพาโทเจน (pathogenesis) ในพืช ในปัจจุบันพบว่าระบบควอรัมเซนซิงที่ผลิต acyl-HSL นี้พบในแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) เช่น ปลาหมึกกับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และสามารถพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์แบบพาโทเจน เช่น เมื่อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เข้าไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย แบคทีเรียจะเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อนั้น (Daniels and Vanderleyden, 2003) แต่ละเซลล์เดี่ยวที่ติดกับผิวสัมผัสจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ซึ่งเรียกว่า twitching หลังจากนั้นเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) เกิดการขยายขนาด และหนาขึ้นกลายเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) เมื่อมีการเจริญสะสมมากขึ้นทำให้ยาปฏิชีวนะต่างๆ ไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง (Davies และคณะ, 1998) มีรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สาร acyl-HSL นั้น เซลล์ของแบคทีเรียไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ นั่นคือในสายพันธุ์กลายเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่ไม่มีการพัฒนาต่อไป ทำให้ไบโอฟิล์มที่ได้มีลักษณะแบน และเชื้อโรคสามารถถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบอีกว่าโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL สามารถควบคุมจำนวนของ virulence determinant ได้ และสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลนี้แสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง ดังนั้นการเข้าใจกลไกดังกล่าวสามารถนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรควิธีใหม่และการผลิตยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งไม่ฆ่าแบคทีเรียที่เป็นพาโทเจนโดยตรง หากแต่รบกวนความสามารถในการก่อโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL หรือยีนที่เกี่ยวข้องอาจนำไปสู่การควบคุมประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม

โมเลกุล acyl-HSL สามารถบ่งบอกถึงภาวะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเริ่มกลไกควบคุมประชากรของตัวเอง เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย acyl-HSL ได้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการกำหนดการเจริญและการตายของเชื้อแบคทีเรีย เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนส (acyl-HSL lactonase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อย acyl-HSL ได้ โดยเข้าไปย่อย acyl-HSL ที่บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วงแหวนแลคโตน เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ acyl-HSL lactonase ในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang และคณะ, 2002) เอนไซม์ acyl-HSL lactonase นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiA* หรือยีน *attM* และเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่ทำหน้าที่ย่อย acyl-HSL ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้

ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *attM* จาก *Agrobacterium tumefaciens* กับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย พบว่ายีน *MS3930* ของ *Mycobacterium smegmatis* สามารถถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความคลายคลึงกับยีน *attM* แต่ใน *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรควัณโรคกลับไม่พบยีนดังกล่าว จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน AttM นี้มีหน้าที่ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการโคลนยีน *MS3930* หรือ *attM* ของ *M. smegmatis* เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาการโคลนยีน *MS3930* ของ *M. smegmatis* ในพลาสมิดแสดงออก เพื่อนำโคโลนีที่ได้ไปใช้ในการศึกษาด้านการแสดงออกของโปรตีนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *MS3930* ต่อไปในอนาคต

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เริ่มจากการสกัด Crude DNA ของ *M. smegmatis* ออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR-T7-NT/TOPO และ pET200/D-TOPO นำพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ได้ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10F′ และ TOP10 ตามลำดับ จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมไปตรวจสอบการมีและทิศทางของผลิตภัณฑ์ PCR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้พลาสมิดแสดงออกลูกผสมของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis*

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *M. smegmatis*
2. สกัด crude DNA จากเชื้อ *M. smegmatis*
3. ออกแบบไพรเมอร์
4. เพิ่มปริมาณยีน *MS3930* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pCR-T7-NT/TOPO และ pET200/D-TOPO และนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10F′และ TOP10 ตามลำดับ
6. คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ
7. สกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมจากโคโลนีที่คัดเลือก
8. ตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII และตรวจสอบทิศทางของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ T7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย

ในอดีตมีการเข้าใจกันว่าแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเองอย่างอิสระโดยไม่จำเป็นต้องสื่อสารกับเซลล์อื่น ต่อมาภายหลังมีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีความสัมพันธ์หรือมีการทำงานร่วมกันกับเซลล์อื่นเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เช่น พฤติกรรมการเคลื่อนที่ไปในบริเวณที่เอื้อต่อการเจริญ ได้แก่ บริเวณที่มีอาหาร หรืออาจเป็นในลักษณะของการเปลี่ยนรูปแบบของการเจริญ เช่น การสร้างสปอร์ หรือไบโอฟิล์ม ซึ่งช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ต้องเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ได้แก่ ปริมาณของสารอาหาร ปริมาณของสารพิษ ความเป็นกรดด่าง แรงดันหรือแรงกดต่างๆ และความชื้น เป็นต้น บางครั้งการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนตั้งตัวไม่ทัน แบคทีเรียจึงมีความจำเป็นต้องปรับตัวทั้งในเรื่องโครงสร้าง สรีรวิทยา ตลอดจนพฤติกรรมต่างๆ ในการตอบสนองอย่างทันท่วงทีต่อการปรับเปลี่ยนของสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้นเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

สิ่งที่แบคทีเรียใช้ในการสื่อสาร หรือภาษาที่แบคทีเรียใช้ในการติดต่อสื่อสารระหว่างกัน คือ โมเลกุลสัญญาณเคมี (chemical signal molecule) ซึ่งแบคทีเรียผลิตขึ้นมา และปลดปล่อย โมเลกุลสัญญาณนั้นออกนอกเซลล์ มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียใช้โมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงในการควบคุมความประพฤติต่างๆ ของประชากรที่เจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน โดยที่การควบคุมดังกล่าวขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรีย (population density) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ควอรัมเซนซิง โดยอาศัยกลไกที่ว่า เมื่อเซลล์สร้างโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิง แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ โดยที่ในช่วงแรกๆ จำนวนของโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงยังมีไม่มากพอที่จะทำให้เซลล์แต่ละเซลล์สามารถรับรู้ (detect) สัญญาณได้ ต่อมาเมื่อมีการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับการกระตุ้นน้อยที่สุดที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา (threshold) ทำให้มีการส่งสัญญาณให้แต่ละเซลล์รับรู้ถึงความหนาแน่นของเซลล์ขณะนั้น จนมีผลกระตุ้นหรือกดการทำงานของยีนเป้าหมาย (target gene) ต่อไป พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ระบบควอรัมเซนซิงไม่ทางใดก็ทางหนึ่งในการอยู่ร่วมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นดังเช่นในพืช สัตว์ คน หรือแบคทีเรียด้วยกันเอง โดยความสัมพันธ์อาจเป็นแบบพึ่งพาอาศัยหรือแบบพาโทเจน และจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการสร้างปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงหลายชนิด เช่น โปรตีนที่บริเวณผิวหน้า (surface protein) และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่พบในแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่มักถูกควบคุมด้วยยีนในระบบควอรัมเซนซิงแทบทั้งสิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันเป็นที่เข้าใจกันแล้วว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สื่อสารกันด้วยโมเลกุลสัญญาณที่เซลล์แต่ละเซลล์ผลิตขึ้นมาในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนในทิศทางเดียวกัน โมเลกุลสัญญาณที่แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตขึ้นมามีความหลากหลายเพื่อให้การตอบสนองของประชากรเป็นไปอย่างเหมาะสมในสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ ทั้งนี้เพื่อความอยู่รอดของแบคทีเรียเอง โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่วิกฤตต่างๆ เช่น เชื้อที่เจริญอยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารบางอย่าง เป็นต้น การค้นพบความจริงของธรรมชาติดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียอาศัยกลไกของระบบควอรัมเซนซิงในการติดต่อสื่อสารซึ่งกันและกัน และในหลายๆ กรณีที่ทำให้เชื่อว่าแบคทีเรียสามารถสื่อสารกันได้หลายภาษาหรืออาจเป็นการสื่อสารระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกัน โดยใช้ภาษาหรือโมเลกุลสัญญาณที่เป็นสากล (universal signal) นอกจากนี้ ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบใช้โมเลกุลสัญญาณที่แตกต่างกันในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (กัลยา, 2548)

2.1.1 การติดต่อสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกมีภาษาที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างกันและสามารถตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์สูงได้ เมื่อโมเลกุลสัญญาณถูกสร้างขึ้นส่งผลให้เกิดการกระตุ้นทำให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาต่างๆ ของเซลล์ เช่น ความสามารถในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (uptake DNA) ในแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus pneumonia* ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Staphylococcus aureus* การสืบพันธุ์แบบคอนจูเกชัน (conjugation) ของ *Enterococcus faecalis* และการผลิตไมโครซิน (microcin) ของ *Lactobacillus sake* และ *Carnobacterium piscicola* (Kleerebezem และคณะ, 1997)

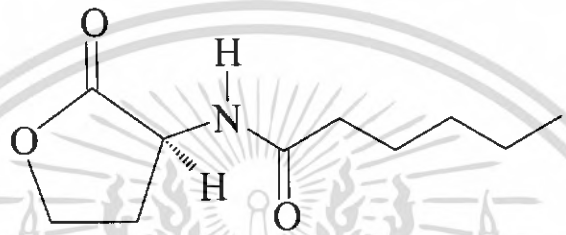
แบคทีเรียแกรมบวกส่งสัญญาณโมเลกุลจำพวกโอลิโกเปปไทด์ ซึ่งไม่สามารถแพร่ออกนอกเซลล์ได้โดยตรง แต่จะส่งออกนอกเซลล์โดยจับโปรตีนขนส่งประเภท ABC (ATP-binding cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโอลิโกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กลงและจึงถูกส่งผ่านออกนอกเซลล์ เปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติหรือฟีโรโมน โดยมีโปรตีนเซนเซอร์สำหรับไคเนสที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวจดจำ เซนเซอร์ที่ได้รับสัญญาณเปปไทด์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตด้วยตัวเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทิดีน และเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุม (regulator) ที่อยู่ข้างเคียง เพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น ดังนั้นกระบวนการขนส่งสัญญาณหรือการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวกจึงจัดเป็นแบบ phosphorylase cascade โดยเรียกการควบคุมประชากรเซลล์ด้วยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้ว่าเปปไทด์ควอรัมเซนซิง (กัลยา, 2548)

2.1.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

แบคทีเรียแกรมลบมีการติดต่อสื่อสารโดยใช้สาร acyl-HSL เป็นโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิง แบคทีเรียแต่ละชนิดจะสังเคราะห์ acyl-HSL ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วยหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอซิล (acyl group) เชื่อมต่อกับวงแหวนโฮโมเซอรีนแลคโตน (homoserine lactone) ที่เชื่อมกันด้วยไนโตรเจนอะตอม แต่โครงสร้างอาจแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) โดยมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4-16 อะตอม และจำนวนคาร์บอนมักพบเป็นจำนวนคู่ คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อาจมีการเติมหมู่ต่างๆ ได้แก่ หมู่ oxo (C=0) และ hydroxyl (C-OH) นอกจากนี้อาจพบพันธะคู่ ในโมเลกุลของสายโซ่เอซิลในแบคทีเรียบางชนิด เช่น พบ 7,8-cis-*N*-(3-hydroxytetradecenoyl) homoserine lactone ที่ผลิตจากเชื้อ *Rhizobium leguminosarum* และ 7,8-cis-*N*-(tetradecenoyl) homoserine lactone จากเชื้อ *Rhodobacter sphaerhoides* เป็นต้น



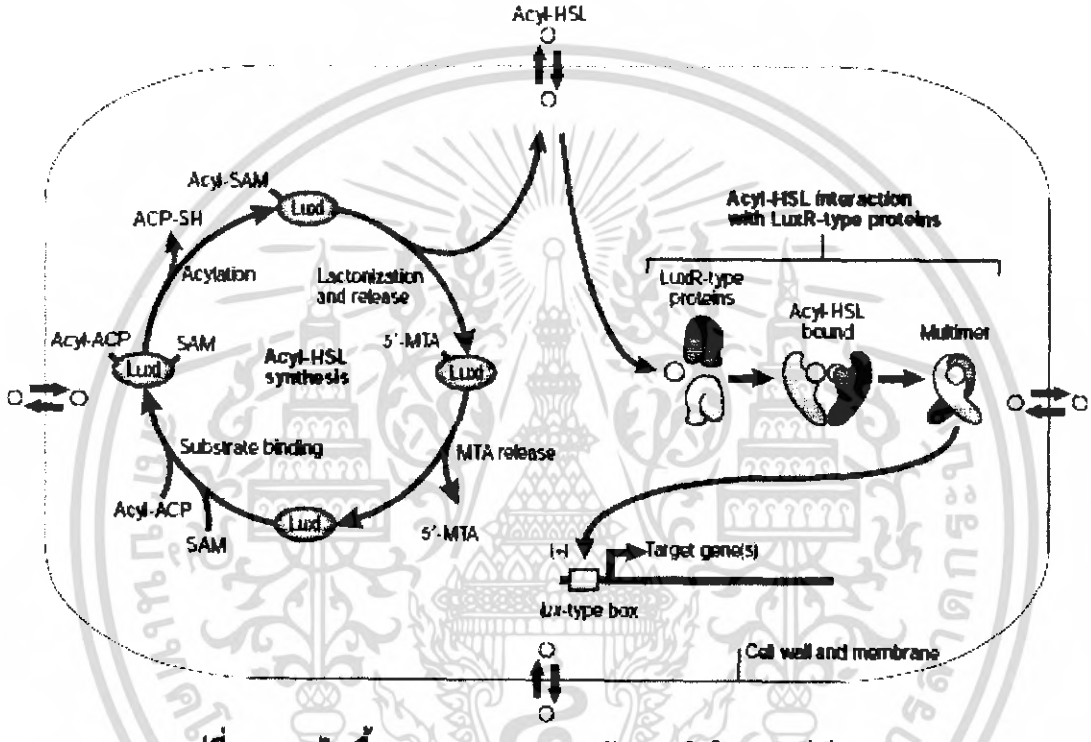
รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของ *N*-acyl homoserine lactone (acyl-HSL)
ที่มา : Schauder and Bassler (2001)

สาร acyl-HSL เป็นโมเลกุลสัญญาณชนิดแรกที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ สามารถสกัดได้จากส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) หรือไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative HPLC ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานว่าโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL มีบทบาทในเรื่องอื่นๆ นอกไปจากการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสัญญาณ แบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ได้มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณ ที่ไม่ใช่ acyl-HSL ได้อีกด้วย เช่น เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืชสามารถผลิตสาร 3-hydroxy palmitic acid methyl ester

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่ากลไกของระบบควอรัมเซนซิงในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีนควบคุม 2 ชนิดที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *luxI* และ *luxR* โดยที่โปรตีน LuxI หรือ acyl-HSL synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL แล้วส่งสัญญาณออกมานอกเซลล์ จนกระทั่งความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่ง โมเลกุลสัญญาณจะเข้าไปจับกับโปรตีนควบคุม LuxR ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสัญญาณและ *luxI* สารประกอบเชิงซ้อนจะไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้ให้มีการถอดรหัสของยีนเป้าหมายเกิดขึ้น LuxR จึงทำหน้าที่เป็น transcriptional activator protein นั่นเอง โมเลกุลของ LuxR ประกอบด้วย 2 โดเมน คือ ด้านปลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N (N-terminal) ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ส่วนด้านปลาย C (C-terminal) เป็น DNA binding domain ทำหน้าที่จับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย โดยที่ LuxR จะสามารถจับกับโปรโมเตอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันได้หลายชนิด ส่วนLuxI กระตุ้นให้มีการจับกันระหว่าง *S-adenosyl methionine* (SAM) กับ acyl-acyl carrier protein (acyl ACP) อย่างจำเพาะ ดังรูปที่ 2.2 โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสังเคราะห์โมเลกุล acyl-HSL ได้มากกว่า 1 ชนิด จึงเชื่อกันว่าการทำงานของเอนไซม์ acyl-HSL synthase ในการสังเคราะห์สารสัญญาณย่อมต้องมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น โดยเฉพาะส่วนของ acyl carrier protein (ACP) เป็นอย่างมาก

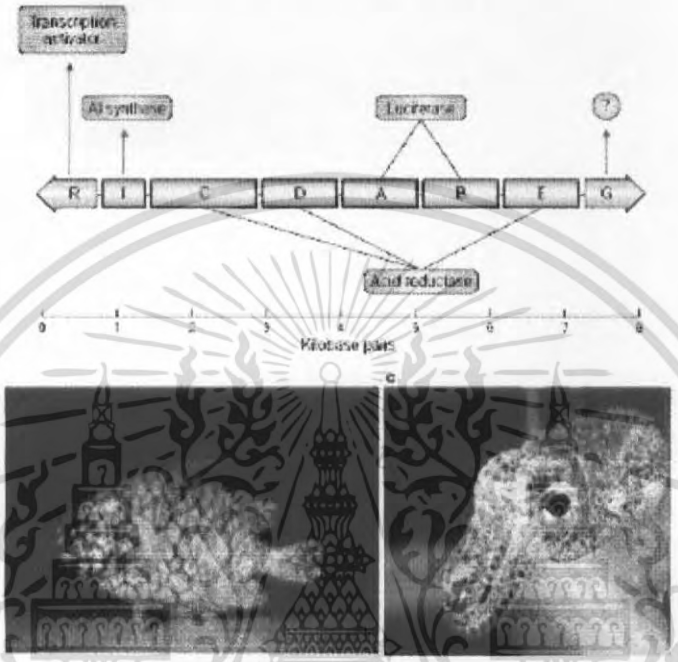


รูปที่ 2.2 กลไกพื้นฐานของระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ
ที่มา : *Fuqua and Greenberg (2002)*

การค้นพบวงจรการควบคุมระบบควอรัมเซนซิงใน *V. fischeri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในทะเล ชอบอาศัยอยู่ในอวัยวะของปลาทะเลและปลาหมึกหลายชนิด โดยที่ปลาและปลาหมึกอาศัยการเรืองแสงที่อวัยวะดังกล่าว ซึ่งเกิดจากการกระทำของแบคทีเรียเพื่อล่อให้เหยื่อเข้ามาติดกับหรือใช้ในการพรางตัวเพื่อหนีศัตรูในยามค่ำคืน รวมไปถึงการหาคู่ผสมพันธุ์ ในขณะเดียวกันแบคทีเรียได้รับสารอาหารที่มีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ในตัวปลาหรือปลาหมึกเป็นการตอบแทน การเรืองแสงสามารถเกิดขึ้นเมื่อเซลล์แบคทีเรียเพิ่มจำนวนอยู่ในอวัยวะของปลาและปลาหมึกมีปริมาณมากพอจนสามารถกระตุ้นกลไกของของระบบควอรัมเซนซิง ซึ่งเป็นกลไกที่ถูกควบคุมโดยโปรตีนสองชนิดคือโปรตีน LuxI และ LuxR โดยที่ LuxI หรือ acyl-HSL synthase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL เมื่อมีปริมาณ acyl-HSL มากพอ acyl-HSL สามารถเข้าจับกับโปรตีน LuxR เกิดเป็นสารประกอบ acyl-HSL-LuxR และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าไปจับกับโปรโมเตอร์ของลูซิเฟอเรสโอเปอรอน (luciferase structural operon) มีผลกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนได้เป็นเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ทำให้มีการเรืองแสงเกิดขึ้น ดังรูปที่ 2.3 และกลไกนี้มีถูกกระตุ้นทุกครั้งที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้นจนถึงระดับควอรัม นอกจากนี้ยังมีสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิดที่สามารถผลิต acyl-HSL โดยถ้าโปรตีนที่จำเพาะต่อโมเลกุลสัญญาณแตกต่างกันจะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.3 การจัดเรียงโครงสร้างของยีน *lux* ประกอบไปด้วยยีน *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* และ *luxE* ทำให้เกิดการเรืองแสงในสิ่งมีชีวิต และยีน *luxG* ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด

ที่มา : Fuqua and Greenberg (2002)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิต acyl-HSL

ที่มา : Fuqua and Greenberg (2002)

Bacteria	Regulators[a]	Signal	Target function
Vibrio fischeri	LuxR–LuxI AinR–AinS[b]	3-oxo-C6-HSL C8-HSL	Bioluminescence Bioluminescence, ?
Pseudomonas aeruginosa	LasR–LasI RhlR–RhlI	3-oxo-C12-HSL C4-HSL	Virulence and biofilm development Virulence and rhamnolipids
Agrobacterium tumefaciens	TraR–TraI	3-oxo-C8-HSL	Virulence plasmid copy number and conjugal transfer
Erwinia carotovora	CarR–CarI ExpR	3-oxo-C6-HSL	Carbapenem antibiotics and exoenzymes
Pantoea stewartii	EsaR–EsaI	3-oxo-C6-HSL	Exopolysaccharide
Rhodobacter sphaeroides	CerR–CerI	Δ7-C14-HSL[b]	Aggregation
Vibrio anguillarum	VanR–VanI	3-oxo-C10-HSL	None yet identified

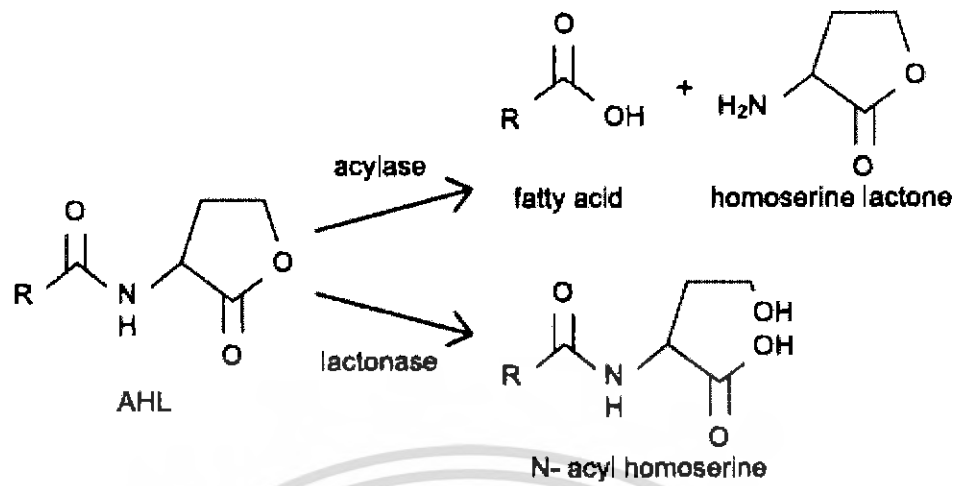
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การยับยั้งระบบควอรัมเซนซิง (Quorum-quenching reagent)

สิ่งมีชีวิตทั้งคน พืช และสัตว์ล้วนมีกลไกในการป้องกันตนเองจากการทำลายของเชื้อโรค เช่น การสร้างแอนติบอดี ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายของผู้ให้อาศัยเป็นระยะ เวลาหนึ่งแล้ว แสดงว่าในระยะแรกที่ร่างกายยังไม่มีภูมิต้านทานที่มากพอ เชื้ออาจฉวยโอกาสในช่วงนี้สร้างกลไกขึ้นมาเพื่อเอาชนะการต่อต้านของผู้ให้อาศัย โดยเฉพาะการใช้กลไกของระบบควอรัมเซนซิงในการกระตุ้นยีนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ด้วยเหตุผลนี้จึงมีความพยายามที่หาสารหรือเอนไซม์ที่สามารถไปยับยั้งการทำงานของระบบควอรัมเซนซิงในเชื้อก่อโรคเหล่านี้ เพื่อตัดวงจรการสื่อสารของเซลล์แบคทีเรียไม่ให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ จึงเรียกสารที่มีฤทธิ์ยังยั้งระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรีย เรียกกว่า quorum-quenching reagent ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ เพื่อหวังผลในการควบคุมเชื้อก่อโรคดังกล่าว และเมื่อไม่กี่ปีมานี้ได้มีการศึกษาถึงชนิดและโครงสร้างของสารเคมี หรือ เอนไซม์ที่สามารถตัดวงจรการสื่อสาร หรือการทำงานของระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียได้ โดยมีเป้าหมายสำคัญ คือ เพื่อต้องการหยุดยั้งความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคให้ได้นั่นเอง

acyl-HSL lactonase เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สาร acyl-HSL ซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiA* ในเชื้อ *Bacillus* 240B1 จากการทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนกับโปรตีนที่ทราบลำดับกรดอะมิโนแน่นอนยังพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มของ zinc-binding metallohydrolase การวิเคราะห์ทางเคมีและชีวเคมีแสดงว่า AiiA เป็น acyl-HSL lactonase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยวงแหวนแลคโตนของ acyl-HSL ดังรูปที่ 2.4 และยังพบ AiiA homologue ในเชื้อ *B. thuringiensis* หลาย subspecies รวมทั้ง *B. cereus* และ *B. mycoides* และเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสามารถสังเคราะห์ acyl-HSL lactonase ได้เช่นกัน เช่น AiiA homologue ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *attM* ในเชื้อ *A. tumefaciens* นับได้ว่า acyl-HSL lactonase เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการทำลายสารสัญญาณชนิด acyl-HSL ที่ผลิตมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด การแสดงออกของยีน *aiiA* ในเชื้อ *E. carotovora* สามารถระงับการปลดปล่อยสาร acyl-HSL ออกนอกเซลล์ และลดการสังเคราะห์เอนไซม์อีกหลายชนิด เช่น เพคเตทที่มีการสร้างและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีผลลดความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคในพืชอีกด้วย ในกรณีของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน และมียีน *aiiA* พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สามารถสะสม acyl-HSL รวมทั้งไม่มีการสังเคราะห์ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณ acyl-HSL ด้วยเอนไซม์ acyl-HSL lactonase
ที่มา : Dong และคณะ (2000)

2.3 เชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Mycobacteria)

เชื้อมัยโคแบคทีเรีย เป็นเชื้อรูปท่อนที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 0.2-0.6 ไมโครเมตร x 1-10 ไมโครเมตร บางครั้งเชื้อมัยโคแบคทีเรียเรียงตัวเป็นเส้นสายที่แตกกิ่งก้าน ผนังเซลล์มีไขมันจำนวนมาก จึงทำให้ผิวเซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ และทำให้เชื้อมัยโคแบคทีเรียทนทานต่อสารทำลายเชื้อ (disinfectant) รวมทั้งทนต่อการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) และสีจิมซ่า (Giemsa stain) แต่ถ้าย้อมติดสีแล้วสามารถทนต่อการล้างด้วยกรดได้ จึงเรียกเชื้อมัยโคแบคทีเรียนี้ว่าแบคทีเรียทนกรด ผนังเซลล์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย มีความซับซ้อน เชื้อมัยโคแบคทีเรียมีทั้งแบบเจริญช้าและเจริญเร็ว โดยพวกที่เจริญช้า เช่น *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterim avium-intracellulare* มีการแบ่งตัวทุกๆ 12-24 ชั่วโมง การแยกเชื้อพวกที่เจริญเร็วต้องใช้เวลามากกว่า 3 วัน ในขณะที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เจริญช้าต้องใช้เวลามากกว่า 3-8 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังมี *Mycobacterim leprae* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน และไม่สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

มัยโคแบคทีเรียที่พบแล้วมีอย่างน้อย 41 สปีชีส์ และที่แยกได้จากคนมีมากกว่า 27 สปีชีส์ แต่เชื้อส่วนใหญ่ที่พบในคนมี 6 สปีชีส์ คือ *M .tuberculosis*, *M. avium-intracillulare complex*, *Mycobacterim kansasii*, *Mycobacterim fortuitum*, *Mycobacterim chelonae* และ *M.leprae* เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญในคน คือ *M. tuberculosis* ที่ทำให้เกิดวัณโรคและ *M. leprae* ทำให้เกิดโรคเรื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 *Mycobacterium tuberulosis*

M. tuberculosis เป็นแบคทีเรียกลุ่มไฟลัม Actinobacteria โดย *M. tuberculosis* เป็นพวกที่เจริญได้ในที่มีอากาศ และไม่สามารถตรวจว่าเป็นแกรมบวกหรือลบ การเจริญของเชื้อจะแบ่งตัวทุกๆ 16-20 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีการแบ่งเซลล์ช้ากว่ามาก เช่น เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* ที่แบ่งตัวทุก 20 นาที ลักษณะของเชื้อเป็นรูปท่อนขนาดเล็ก ดังรูปที่ 2.5 สามารถทนต่อกรดอ่อน และสามารถทนอยู่ในที่แห้งแล้งเป็นเวลาหลายอาทิตย์แต่เชื้อจะสามารถเจริญได้ภายในผู้ให้อาศัย

การที่ *M. tuberculosis* มีความสามารถทนกรดได้เป็นเพราะมีปริมาณไขมันมากที่ผนังเซลล์ สีย้อมสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่ผนังเซลล์จึงจับสีไว้ การย้อมสีด้วยวิธีนี้ถ้าเป็นเชื้อจากเนื้อเยื่อและเสมหะ เชื้อติดสีไม่สม่ำเสมอและเป็นแถบๆ เพราะมีแวคิวโอลและสารพอลิฟอสเฟต นอกจากนี้ยังอาจย้อมด้วยสีคาร์บอน-ออรามีน (carbon-auramine) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตการเรืองแสงเห็นเป็นสีเหลืองสว่าง

นอกจากนี้ เชื้อ *M. tuberculosis* ยังมีกรดไมโคลิกที่เรียกว่า คอร์ดแฟกเตอร์ (cord factor) ซึ่งเป็นสารประกอบ tregalose-6,6'-dimycolate อยู่ที่ผนังเซลล์ ทำให้เกิดการขัดขวางกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียในเซลล์ฟาโกไซต์และเนื้อเยื่อ นอกจากเชื้อมีปริมาณไขมันมากซึ่งรวมทั้งกรดไขมันและคอมเพล็กซ์ลิพิดแล้ว ยังประกอบด้วยโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเกี่ยวกับการเป็นแอนติเจน

รูปที่ 2.5 เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Image:TB_Culture.jpg

2.3.2 *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis เป็นแบคทีเรียกลุ่มไฟลัม Actinobacteria ลักษณะของเชื้อเป็นรูปท่อนขนาดเล็ก ดังรูปที่ 2.6 มีลักษณะคล้ายกับ *M. tuberculosis* แต่เชื้อ *M. smegmatis* ไม่เป็นเชื้อก่อโรคและการที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *M. tuberculosis* ทำให้มีการนำเชื้อ *M. smegmatis* มาทำการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นรูปแบบตัวอย่างของเชื้อ *M. tuberculosis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 เชื้อ *Mycobacterium smegmatis*

ที่มา : http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/

Img/graphics/hatfull/hatfull02.jpgs/lr/0804703.jpg

2.4 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

2.4.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

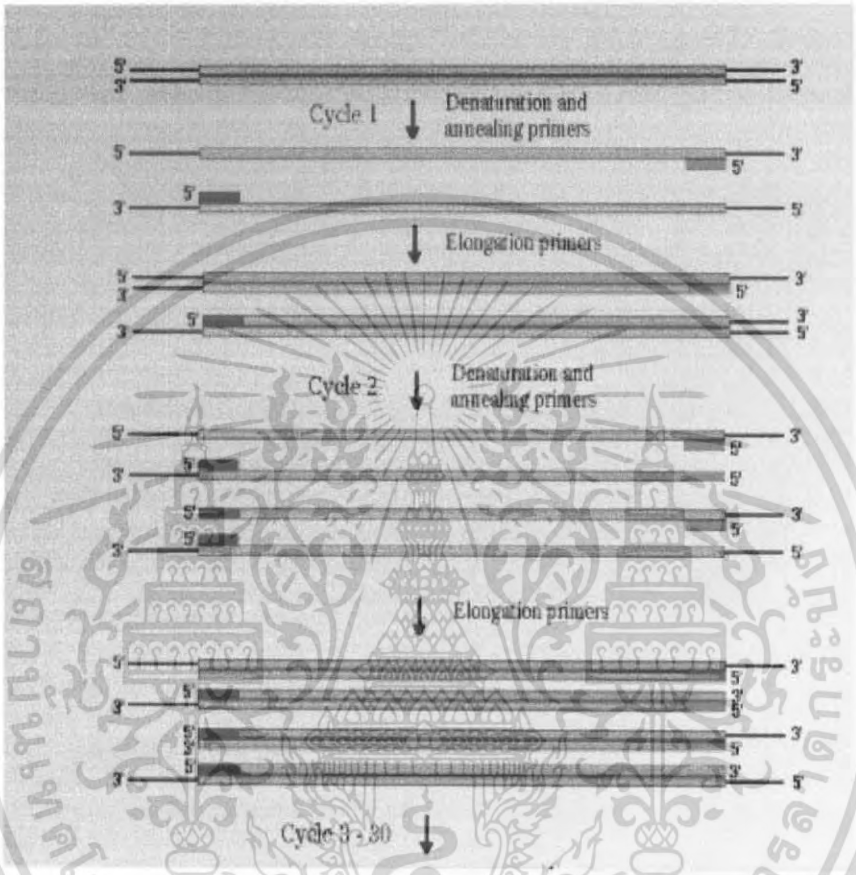
ปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือ Polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มสารพันธุกรรมดีเอ็นเอที่สนใจในเวลาอันรวดเร็วดังรูปที่ 2.7 โดยอาศัยจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบหรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template) และใช้ไพรเมอร์ (primer) หรือโอลิโกนิวคลีโทด์ที่มีขนาด 15-20 เบส เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ได้รับการออกแบบมาจากเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบจึงเข้าจับได้ดี ไพรเมอร์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ primer ด้าน forward และ primer ด้าน reverse โดยไพรเมอร์แต่ละตัวจะเข้าจับกับปลาย 3′ ของดีเอ็นเอแต่ละสายของดีเอ็นเอเกลียวคู่ หลังจากการเข้าจับของไพรเมอร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำหน้าที่สร้างสายดีเอ็นเอต่อไป โดยนำดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (dNTPs ประกอบด้วย dATP, dGTP, dTTP และ dCTP) ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเข้าต่อ ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มียีนที่สนใจ การเพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว สามารถทำได้โดยผ่านกระบวนการ 3 ขั้นตอนต่อไปนี้เป็นจำนวนหลายรอบ

1. การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation) เป็นการใช้อุณหภูมิสูงที่ 94-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่กลายเป็นสายเดี่ยว

2. การเข้าจับของไพรเมอร์ (primer annealing) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 44-45 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบ โดยที่ดีเอ็นเอจะไม่กลับมาจับกันเอง อุณหภูมิที่ใช้อาจแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของการหลอมตัว (Tm) และอัตราส่วนของเบส G ต่อ C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 . การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากไพรเมอร์ (primer extension) โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เอนไซม์นี้แยกได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ โดยนำ dNTPs ที่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเข้ามาต่อ และสร้างสายดีเอ็นเอที่สนใจได้



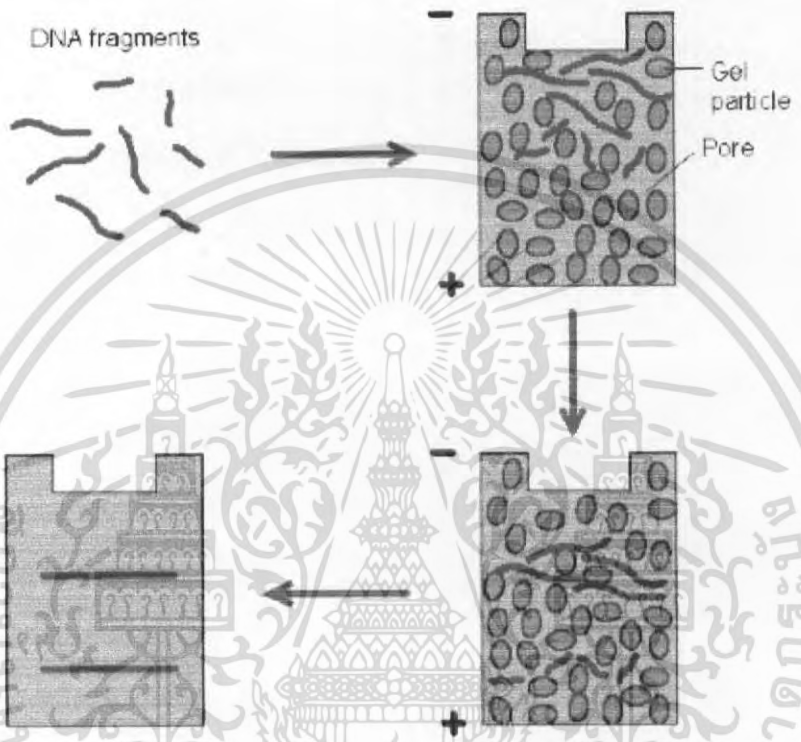
รูปที่ 2.7 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่
ที่มา : www.nhrbc.org/im_age/PCR%20cycle.gif

2.4.2 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส เป็นวิธีการแยกสารชีวโมเลกุลที่มีประจุ ดังรูปที่ 2.8 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านอะกาโรสเจลซึ่งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน อะกาโรสเป็นพอลิเมอร์สายตรงซึ่งเกิดจากโครงสร้างที่ต่อกันของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose โดยสกัดได้จากสาหร่ายทะเล เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเนื่องจากมีหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากในสารละลายที่เป็นกลางหรือเบสอ่อนผ่านตัวกลางอะกาโรส ทำให้ดีเอ็นเอผ่านเข้าหาขั้วบวก หลังจากการแยกดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส อะกาโรสที่ได้นำไปย้อมในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ เอทิเดียมโบรไมด์สามารถแทรกเข้าไปในโมเลกุลของเบส เมื่อนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต การเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงของเอทิเดียมโบรไมด์ทำให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้ โดยทั่วไปสามารถใช้เจลได้ 2 ชนิด คือ พอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และอะกาโรสเจล (agarose gel) การใช้อะกาโรสเจลสามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ได้ดีกว่าพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งสามารถแยกกรดนิวคลีอิกที่มีขนาดโมเลกุลได้ถึง 50 กิโลเบส ส่วนพอลิอะคริลาไมด์เจลแยกกรดนิวคลีอิกได้ประมาณ 500 คู่เบส (http://th.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis)



รูปที่ 2.8 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ที่มา : http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/veterin/vet69/Biochemistry%20Web%

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากมีแรงเสียดทานสูงกว่า และไม่สามารถผ่านรูพรุนของอะกาโรสได้ดีเท่ากับโมเลกุลขนาดเล็ก การเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางมีค่าแปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนเบส

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีปริมาณของอะกาโรสมาก ทำให้รูพรุนที่ได้มีขนาดเล็ก ดีเอ็นเอจึงเคลื่อนที่ได้ช้า เหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก ในขณะที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำมีปริมาณอะกาโรสน้อย ทำให้รูพรุนที่ได้มีขนาดใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกัน ทำให้ไม่สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กได้ จึงเหมาะในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. รูปร่างของดีเอ็นเอ สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดของโมเลกุลเท่ากัน รูปร่างของดีเอ็นเอจะเป็นตัวบ่งชี้อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ โดยดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเกลียวขด (supercoil หรือ superhelix) มีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด ตามด้วยดีเอ็นเอสายตรง (linear) และดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวง (circular)

4. ความต่างศักย์ไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเป็นสัดส่วนกับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ นั่นคือ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอมากขึ้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น ในกรณีที่ศักย์ไฟฟ้าสูงมาก อาจประสบปัญหาเรื่องประสิทธิภาพในการแยกได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเคลื่อนที่เร็วมาก ในขณะที่การแยกยังไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้การใช้ศักย์ไฟฟ้าสูง อาจนำไปสู่ปัญหาในด้านการเกิดความร้อนสูง อันอาจส่งผลทำให้อะกาโรสเจลหลอมได้ ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม คือ 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร

5. ทิศทางของสนามไฟฟ้า ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 50-100 กิโลเบส ไม่สามารถแยกได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบธรรมดา เนื่องจากมีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นจึงต้องมีการปรับเปลี่ยนทิศทางของสนามไฟฟ้าทีละน้อยในเวลาสั้นๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันใช้เวลาไม่เท่ากันในการจัดเรียงตัว ส่งผลให้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ๆ ได้ เทคนิคในการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่โดยการสลับการเคลื่อนที่ของสนามไฟฟ้าในเวลาอันสั้น เรียกว่า Pulsed-field gel electrophoresis

6. อุณหภูมิ โดยทั่วไป อุณหภูมิไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสจึงทำได้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตาม หากความเข้มข้นของอะกาโรสเจลน้อยกว่าร้อยละ 0.5 จะทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. เอทิเดียมโบรไมด์ เอทิดียมโบรไมด์เป็นสารเรืองแสงที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสามารถเข้าจับกับเบสในสายของดีเอ็นเอ ในกรณีที่เจลมีเอทิเดียมโบรไมด์มีผลในการลดการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอร้อยละ 15 เนื่องจากเอทิเดียมโบรไมด์เคลื่อนที่ในทิศทางตรงกันข้ามกับดีเอ็นเอ เอทิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังในการทำการทดลองเป็นพิเศษ ระวังการปนเปื้อนของเอทิเดียมโบรไมด์กับตัวผู้ทดลองและอุปกรณ์อื่นๆ รวมทั้งวิธีการในการกำจัด

8. ชนิดของบัฟเฟอร์ องค์ประกอบและความแข็งแรงของประจุของสารที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่มักใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส มี 3 ชนิด คือ Tris-acetate EDTA (TAE), Tris-borate EDTA (TBE) และ Tris-phosphate EDTA (TPE)

2.4.3 การตัดดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ กลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ภายในสายคู่ของดีเอ็นเอด้วยความจำเพาะต่อบริเวณจดจำของเอนไซม์หรือการจัดเรียงลำดับของเบส เอนไซม์ตัดจำเพาะจัดเป็นเอนโดนิวคลีเอส ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างจากเอนไซม์ที่ใช้สลายดีเอ็นเอหรือ DNase ซึ่งไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของเบส เอนไซม์กลุ่มนี้แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในปี พ.ศ.2496 นักวิทยาศาสตร์ได้ตั้งข้อสังเกตว่า ถ้านำโมเลกุลของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์ หนึ่งนำไปใส่ให้กับแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่ง สามารถตรวจพบว่ามีสายดีเอ็นเอขาดเป็นท่อนๆ มีขนาดและจำนวนคงที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสมอ ต่อมาอธิบายได้ว่า ดีเอ็นเอที่ถูกตัดเป็นชิ้นส่วนต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อลำดับการเรียงตัวของเบสขนาดเพียง 4-6 นิวคลีโอไทด์ จึงเรียกว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ กัน ปัจจุบันพบเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้มากกว่า 250 ชนิด แบ่งตามคุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้ในงานพันธุวิศวกรรม คือ ชนิดที่ เรียกว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ type II เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ และตัดภายในกลุ่มนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเท่านั้น ได้ผลผลิตเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอนหลังจากตัดดีเอ็นเอที่สนใจและดีเอ็นเอของตัวพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การเชื่อมดีเอ็นเอสองท่อนนี้เข้าด้วยกันโดยเอนไซม์ไลเกส ปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้น คือ การสร้างพันธะ $3'$, $5'$- ฟอสโฟไดเอสเตอร์โดยใช้ ATP และ NAD^+ ถ้าดีเอ็นเอที่ต้องการเชื่อมให้เป็นสายเดียวกันมีปลายเปิดเป็นปลายเหนียว และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัวเดียวกันจะมีปลายเหนียวที่ยื่นออกมา ปลายทั้งสองมีลำดับเบสที่จับคู่สมกันได้สนิท นั่นคือ ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่กรณีที่ดีเอ็นเอที่ต้องการเชื่อมให้เป็นสายเดียวกันมีปลายเปิดเป็นปลายทู่ ซึ่งสามารถต่อกับปลายทู่ด้วยกันต้องใช้เอนไซม์ terminal transferase เติมนิวคลีโอไทด์ให้มีลักษณะคล้ายปลายยื่นเสียก่อน จึงนำมาเชื่อมต่อด้วยไลเกสในขั้นตอนต่อไป และนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเติมต้องมีลำดับเบสที่จับคู่สมกันได้สนิท (สรวง, 2536 ; http://www.il.mahidol.ac.th/course/dna/chapter/chapter4application.htm)

2.4.4 เวกเตอร์ใช้ในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

เวกเตอร์ คือ ดีเอ็นเอซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะในการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เพื่อเพิ่มจำนวนคุณสมบัติที่สำคัญของเวกเตอร์ เวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) มีหลายชนิด เช่น พลาสมิด (plasmid) แบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) คอสมิด (cosmid) หรือลูกผสมของพลาสมิดและ แบคทีริโอฟาจ เวกเตอร์ที่นิยมใช้เป็นเวกเตอร์ซึ่งสามารถรับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็ก น้อยกว่า 10 กิโลเบส โดยพลาสมิดจะเป็น circular extrachromosomal DNA ที่มีการแบ่งตัวอย่างอิสระไม่ขึ้นกับ chromosomal DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน มีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตนเองในแบคทีเรีย มีตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) หลายชนิดที่มีตำแหน่งตัดเพียงอย่างละ 1 ตำแหน่ง มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ซึ่งช่วยในการนำเข้าสู่เซลล์และสามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้พลาสมิดมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น แอมพิซิลิน เตตราซัยคลิน หรือ คลอแรมฟีนิคอล ซึ่งเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา การเลือกพลาสมิดให้เหมาะสมกับ ดีเอ็นเอที่สนใจ ควรคำนึงถึงหลักการ 2 ประการ ดังนี้

1. พลาสมิดสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอที่สนใจทำให้สามารถสร้างเป็นพลาสมิดลูกผสมได้

2. พิจารณาคุณสมบัติในการต้านยาของพลาสมิด โดยเฉพาะยีนที่แสดงคุณสมบัตินี้สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับดีเอ็นเอที่สนใจหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72605

เวกเตอร์มีส่วนประกอบหลักๆ ดังนี้

1. Origin of replication คือ มีบริเวณของดีเอ็นเอที่สามารถเริ่มต้นเพิ่มจำนวนสร้างดีเอ็นเอใหม่ของเวกเตอร์ได้ในเซลล์เจ้าบ้าน

2. Multiple restriction site (polylinker site) คือ มีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด

3. Antibiotic resistance marker (selectable marker) คือ ยีนที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) เพื่อช่วยในการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านหรือแบคทีเรียที่มีหรือไม่มีดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)

2.4.5 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์

การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ดังรูปที่ 2.9 ทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของเวคเตอร์ที่ใช้ ถ้าใช้พลาสมิดจะใช้วิธีใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรงเรียกว่า ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) โดยทำเซลล์ผู้รับซึ่งมักเป็น *E.coli* ซึ่งอยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน (competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น $CaCl_2$ หรือไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, Rb^{+}, Co^{2+}, K^{+} และ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น แล้วนำเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งานนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อกับดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจากพลาสมิดสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ดีเอ็นเอสที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* แล้วจึงทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดนี้เปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยนำไปแช่อ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอนั้นจึงแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจอยู่ภายใน โดยการเติมยาปฏิชีวนะที่จำเพาะลงไป ซึ่งเซลล์ที่ไม่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจจะไม่สามารถเจริญได้

ประสิทธิภาพการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานสฟอร์เมชันนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น รูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีการทำให้เซลล์เป็น competent เป็นต้น พลาสมิดที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อน (supercoil) สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าพลาสมิดแบบเส้นตรงหรือวงแหวนปลายเปิด พลาสมิดที่มีขนาดเล็กเสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ถ้าพลาสมิดมีขนาดใหญ่กว่า 15 กิโลเบส พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำมาก ระยะของเซลล์ที่ดีที่สุดในการทำเป็น competent คือ เซลล์ที่เจริญถึงระยะ log phase (http://home.biotec.or.th /News Center /my_documents/my_files/3C26D_06_Transformation.pdf#)

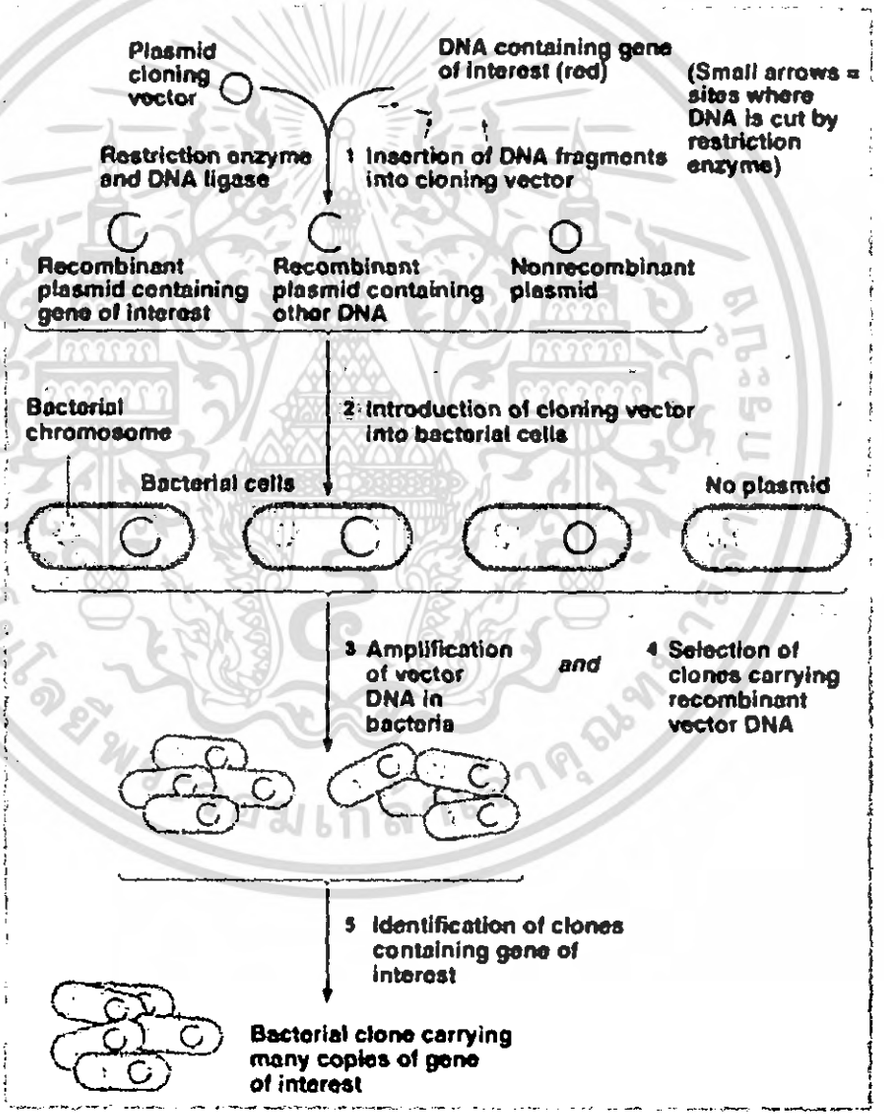
2.4.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน โดยแต่ละวิธีอาศัยหลักการที่คล้ายคลึงกัน 3 ประการดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีในอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะเพื่อเป็นอาหารสำหรับคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งภายในมียีนต้านยาปฏิชีวนะจะสามารถเจริญเติบโตและขยายปริมาณได้ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีพลาสมิดดีเอ็นเอไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ระหว่างที่เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตพลาสมิดดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเพียงพอสำหรับใช้ในการโคลนยีน การเพิ่มจำนวนพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ซึ่งจำลองตัวเองได้ยากกว่าพลาสมิดขนาดเล็ก จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารสมบูรณ์ (rich medium) ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มปริมาณพลาสมิดได้มากขึ้น 4-6 เท่า



รูปที่ 2.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอและการโคลนยีน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีเก็บเซลล์และการแตกเซลล์

วิธีที่ง่ายสำหรับการเก็บเซลล์แบคทีเรีย อาจทำโดยอาศัยเทคนิคการปั่นเหวี่ยงหรือการกรอง เมื่อได้เซลล์แบคทีเรียแล้วต้องนำเซลล์ที่ได้มาทำให้เซลล์แตก เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ การแตกเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้ดีเทอร์เจนต์ทั้งชนิดที่มีประจุและไม่มีประจุ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ การใช้ด่างหรือการใช้ความร้อน การเลือกวิธีในการแตกเซลล์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ขนาดของพลาสมิด ชนิดของแบคทีเรียให้อาศัย *E. coli* และเทคนิคที่เหมาะสมในแต่ละห้องปฏิบัติการ หากต้องการสกัดพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่า 15 กิโลเบส ควรต้องใช้วิธีแตกเซลล์ที่ไม่รุนแรง โดยนำเซลล์แบคทีเรียมากระจายในสารละลายซูโครส และเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ และ EDTA เพื่อแตกผนังเซลล์และเมมเบรนชั้นนอก จากนั้นจึงเติม SDS (sodium dodecyl sulfate) เพื่อแตก spheroplast วิธีนี้ช่วยลดความรุนแรงในการแตกเซลล์และปลดปล่อยพลาสมิดดีเอ็นเอออกมา ส่วนพลาสมิดที่มีขนาดเล็กสามารถสกัดได้โดยใช้วิธีที่รุนแรงกว่า นั่นคือภายหลังการเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ และ EDTA อาจนำเซลล์มาทำให้แตกโดยวิธีการต้มหรือวิธีการใช้ด่าง วิธีการทั้งสองนี้ทำให้เกิดการทำลายพันธะระหว่างเบส ทำให้จีโนมิกดีเอ็นเอถูกทำลาย แต่สายของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นวงไม่ถูกทำลาย และหากปรับสภาวะให้กลับสู่สภาวะปกติ พลาสมิดดีเอ็นเอก็จะมีรูปร่างดังเดิม

3. การทำพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

การทำพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคการปั่นเหวี่ยงสมดุล (equilibrium centrifugation) ภายในคอลัมน์ซึ่งมีเกรเดียนท์ของซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) และเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือราคาแพงและเสียเวลานานจึงได้มีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ ออกมาใช้ วิธีที่ใช้แยกดีเอ็นออกจากอาร์เอ็นเอหรือโปรตีนสามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอสซึ่งย่อยอาร์เอ็นเอและเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งย่อยโปรตีน นอกจากนี้ยังอาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ฟีนอลคลอโรฟอร์มเดิมลงไป ทำให้โปรตีนเสียสภาพและอยู่ระหว่างชั้นของน้ำและชั้นฟีนอล หลังจากนั้นจึงนำสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์มาตกตะกอนในสารละลายบางชนิด เช่น แอลกอฮอล์ ขั้นตอนทั้งหมดนี้สามารถนำมาปรับใช้กับเซลล์แบคทีเรียที่มีปริมาณน้อย ตั้งแต่ 1 มิลลิลิตร จนกระทั่งถึง 1 ลิตร โดยเรียกวิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในปริมาณน้อยว่า minipreps ปริมาณมากว่า maxipreps

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Mycobacterium smegmatis* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันทน์ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.1.2 *E.coli* TOP10F′ [*lacI*^{q} Tn10(*tet*^{R})] *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *nup*G *recA1 ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rpsL*(*Str*^{R}) *end*A1 λ^{-}

3.1.3 *E.coli* TOP 10 (F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *nup*G *recA1 ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L(*Str*^{R}) *end*A1 λ^{-})

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหาร Middlebrook 7H9 Broth หรือ Middlebrook 7H10 agar

3.2.1.2 อาหาร Luria bertani

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

3.2.2.1 แอมพิซิลิน (ampicillin)

3.2.2.2 กานามัยซิน (kanamycin)

3.2.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.3.1 แลมบ์ดา (λ) marker ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.2.3.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600,700, 800, 900, 1,000, 1,200, 1,517 คู่เบส) (Promaga, USA)

3.2.3.3 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600,700, 800, 900, 1,000, 2,650 คู่เบส) (BioExcellence, ประเทศไทย)

3.2.4 เอนไซม์

3.2.4.1 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promaga, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (Invitrogen, USA)

3.2.4.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Biolab, USA)

3.2.4.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (Biolab, USA)

3.2.4.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Biolab, USA)

3.2.5 พลาสมิด

3.2.5.1 pCR T7/NT-TOPO (ขนาด 2,870 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.2.5.2 pET 200/D-TOPO (ขนาด 5,741 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.6.1 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN, Germany)

3.2.6.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit) (QIAGEN, Germany)

3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.2.7.I อะกาโรส (agarose) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)

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

3.2.7.3 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.7.4 สีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye)

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)

3.2.7.7 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.2.7.8 ไลโซโซม์ (lyzozyme)

3.2.7.9 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

3.2.7.10 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด

3.2.7.11 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ที่เย็นจัด

3.2.7.12 กลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 86

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

3.2.7.14 สารละลายที่ 1 solution I (สารละลายกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7.15 สารละลายที่ 2 solution II (NaOH 0.2 มิลลิโมลาร์, SDS 1 เปอร์เซ็นต์)

3.2.7.16 สารละลายที่ 3 solution III (CH_3COOK 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-Labortech รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี

3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี

3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

3.3.5 เครื่องผสมสาร (vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (ineubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น

3.3.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipments) บริษัท Amersham PharmaciaBiotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน

3.3.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล (documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น Bts-20.M ประเทศเยอรมนี

3.3.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน

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

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

3.3.13 เครื่องแก้ว (glasswares)

3.3.14 ไมโครปิเปต

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.4.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *M. smegmatis*

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 หรือ อาหารแข็ง Middlebrook 7H10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli*

นำโคโลนีเดี่ยวมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินหรือกานามัยซิน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 100 หรือ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเก็บในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 86 ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอล 300 ไมโครลิตร และเชื้อ 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส และส่วนที่เหลือให้ปิเปตออกมาครั้งละ 1,500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และ ปิเปตส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำเช่นนี้จนกระทั่งไม่เหลืออาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บเซลล์ที่ได้ไว้เพื่อทำการสกัดพลาสมิดต่อไป

3.4.2 การสกัด crude DNA

นำโคโลนีของเชื้อ *M. smegmatis* จำนวน 1 ลูป มากระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสหรือ crude DNA ออกมาใส่หลอดทดลองใหม่

3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *MS3930*

3.4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *MS3930* เพื่อโคลนเข้าพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MS3930* ของแบคทีเรีย *M. smegmatis* ที่ได้จากธนาคารยีนมาทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยให้ชื่อไพรเมอร์ว่า $MS3930F_1$ และ $MS3930R_1$

3.4.3.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *MS3930* เพื่อโคลนเข้าพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO

โดยใช้ไพรเมอร์ด้าน reverse เดิมแต่เปลี่ยนไพรเมอร์ด้าน forward โดยออกแบบด้านปลาย 5' ให้มีเบส CACC เพิ่มขึ้นมา และให้ชื่อไพรเมอร์ว่า $MS3930F_2$

3.4.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

3.4.4.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* เพื่อโคลนเข้าพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปริมาณสารที่ใช้แสดงไว้ดังตารางที่ 3.1 และใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ดังตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* เพื่อโคลนเข้าพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปริมาณสารที่ใช้แสดงไว้ดังตารางที่ 3.3 และใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.75
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	6
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs)	2
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930F_1$)	5
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930R_1$)	5
Taq DNA polymerase	0.5
ดีเอ็นเอต้นแบบ(crude DNA)	2
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	รอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	35
Annealing	65	1	
Primer extension	72	1	
Final extension	72	5	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.75
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	6
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs)	2
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930F_2$)	5
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930R_1$)	5
Pfu DNA polymerase	0.5
ดีเอ็นเอต้นแบบ(crude DNA)	2
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	รอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	35
Annealing	65	1	
Primer extension	72	1	
Final extension	72	5	1

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

เตรียมเจลเข้มข้นร้อยละ 0.8 ซึ่งประกอบด้วยอะกาโรสหนัก 0.16 กรัม และ บัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนแล้วรอจนอุ่นจึงเติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทใส่แม่พิมพ์ซึ่งประกอบด้วยถาดรองและหวี (หลีกเลี่ยงการโดนแสง) เมื่อเจลแข็งจึงดึงหวีออกแล้วย้ายแผ่นเจลพร้อมถาดรองลง gel chamber เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน และดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้นนำเจลที่ได้ไปส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ตด้วยชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ตลงหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเจลละลายหมด ดูดสารละลายเจลครั้งละ 750 ไมโครลิตร ใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ทำซ้ำจนสารละลายเจลหมด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ก้นหลอดทิ้ง ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเติมบัฟเฟอร์ EB ลงใน QIAquick spin column 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์มาทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสต่อไป

3.4.7 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* เข้ากับพลาสมิดแสดงออก และ การทรานสฟอร์มเมชัน

3.4.7.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และการทรานสฟอร์มเมชัน

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* จากคู่ไพรเมอร์ $MS3930F_1$ และ $MS3930R_1$ (ขนาด 957 คู่เบส) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO (ขนาด 2,870 คู่เบส) มีปริมาณส่วนประกอบที่ใช้ดังตารางที่ 3.5 โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม (negative control) ซึ่งมีเฉพาะเวคเตอร์เท่านั้น และชุดทดลอง (positive control) ซึ่งมีทั้งเวคเตอร์และผลิตภัณฑ์ PCR นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นปิเปตสารจากชุดควบคุมและชุดทดลองอย่างละ 2 ไมโครลิตร แยกลงใน One Shot® *E.coli* TOP10F′ อย่างละหลอด และกลับหลอดไปมา บ่มหลอดทั้งสองในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบเวลาย้ายไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (heat-shock) จากนั้นย้ายไปวางในน้ำแข็งทันที ปิเปต SOC medium ใส่หลอดปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าแนวนอนที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตสารจากชุดควบคุมและชุดทดลองที่ผ่านการทรานสฟอร์มเมชัน 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว (spread plate technique) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน โดยโคโลนีของเชื้อที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินจะสามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO

สารเคมี	ชุดควบคุม (ไมโครลิตร)	ชุดทดลอง (ไมโครลิตร)
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930*	-	1
Salt solution หรือ Dilute salt Solution	1	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	4	3
pCR T7/NT-TOPO vector	1	1
ปริมาตรสุทธิ	6	6

3.4.7.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และการทรานสฟอร์มเมชัน

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* จากคู่ไพรเมอร์ MS3930F_2 และ MS3930R_1 (ขนาด 961 คู่เบส) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด p200/D-TOPO (ขนาด 5,741 คู่เบส) มีปริมาณส่วนประกอบที่ใช้ดังตารางที่ 3.6 โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม (negative control) ซึ่งมีเฉพาะเวคเตอร์เท่านั้น และ ชุดทดลอง (positive control) ซึ่งมีทั้งเวคเตอร์และผลิตภัณฑ์ PCR นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้น ปิเปตสารจากชุดควบคุมและชุดทดลองอย่างละ 2 ไมโครลิตร แยกลงใน One Shot® *E.coli* TOP10 อย่างละหลอดและกลับหลอดไปมา บ่มหลอดทั้งสองในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบเวลาย้ายไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (heat-shock) จากนั้นย้ายไปวางในน้ำแข็งทันที ปิเปต SOC medium ใส่หลอดปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าแนวนอนที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตสารจากชุดควบคุมและชุดทดลองที่ผ่านการทรานสฟอร์มเมชัน 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว (spread plate technique) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนโดยโคโลนีของเชื้อที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินจะสามารถเจริญได้

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO

สารเคมี	ชุดควบคุม (ไมโครลิตร)	ชุดทดลอง (ไมโครลิตร)
ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930*	-	1
Salt solution หรือ Dilute salt Solution	1	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	4	3
pET 200/D-TOPO vector	1	1
ปริมาตรสุทธิ	6	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8 การสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม

3.4.8.1 การสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยด่างและความร้อน (Alkali lysis)

ปิเปตสารละลายที่ 1 (solution I) ซึ่งประกอบไปด้วยไลโซไซม์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ได้จากการเก็บเซลล์ ปิเปตสารละลายเซลล์ขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ จากนั้นปิเปตสารละลายที่ 2 (solution II) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝาให้แน่นและกลับหลอดไปมา ต่อมาปิเปตสารละลายที่ 3 (solution III) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงหลอด ปิดฝาให้แน่น กลับหลอดไปมา แช่หลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสออกให้หมด คว่ำหลอดจนแห้งแล้วละลายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ -4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสต่อไป

3.4.8.2 การสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยชุดทดสอบ QIAprep Spin Miniprep Kit

ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ซึ่งมี RNase ที่ทำหน้าที่ย่อยอาร์เอ็นเอผสมอยู่ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วกระจายเซลล์ด้วยเครื่องผสมสาร ปิเปตบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด กลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ปิเปตบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรใส่ในหลอด และกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ดูดส่วนใสครั้งละ 850 ไมโครลิตรใส่ใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนส่วนใสจากการตกตะกอนที่ได้หมดลง ล้างพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ใน QIAquick spin column ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปั่นหลอดเปล่าอีก 1 ครั้ง เปลี่ยนหลอดทดลองใหม่รองด้านล่าง QIAquick spin column จากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงใน QIAquick spin column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ -4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสต่อไป

3.4.8.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ BioExcellence

ละลายตะกอนด้วยสารละลาย cell suspension solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ จนตะกอนเซลล์ละลายหมดจากนั้นเติมสารละลาย cell lysis solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดช้าๆ จนสังเกตเห็นความหนืดใส จึงเติมสารละลาย neutralization solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตรกลับหลอดเช่นเดิมจนสังเกตเห็นตะกอนขุ่นขาว จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสลงหลอดใหม่ (หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนตะกอน) เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำออกมาคว่ำบนกระดาษ หรืออาจใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศจนดีเอ็นเอแห้ง จึงละลายตะกอนพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.4.9 การตรวจสอบผลการเชื่อมต่อ (*ligation*) ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสม

3.4.9.1 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* โดยนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.4.8 มาตัดด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Eco*RI และ *Hin*dIII ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.7 จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน และนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบในการตัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI และ *Hin*dIII

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)			
	*Bam*HI	*Eco*RI	*Hin*dIII	*Bam*HI+*Hin*dIII
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6.5	6.5	6.5	6
10 เท่าของบัฟเฟอร์ K	1	1	1	1
เอนไซม์ *Eco*RI	-	0.5	-	0.5
เอนไซม์ *Bam*HI	0.5	-	-	0.5
เอนไซม์ *Hin*dIII	-	-	0.5	-
พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม	2	2	2	2
ปริมาตรสุทธิ	10	10	10	10

3.4.9.2 ตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม

1. การตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 กับไพรเมอร์ $MS3930F_1$ และ คู่ไพรเมอร์ T7 กับไพรเมอร์ $MS3930R_1$ เป็นตัวตรวจสอบโดยมีองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.8 และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 กับ ไพรเมอร์ MS3930F_2 คู่ไพรเมอร์ T7 กับไพรเมอร์ MS3930R_1 เป็นตัวตรวจสอบโดยมีองค์ประกอบการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.10 และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.8 องค์ประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR *T7/NT-TOPO-MS3930*

สารเคมี	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	T7 primer + Forward primer	T7 primer + Reward primer
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	34.75	34.75
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	5
แมกนีเซียมคลอไรด์	3	3
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต	1	1
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (MS3930F_1)	2.5	-
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (MS3930R_1)	-	2.5
T7 ไพรเมอร์	2.5	2.5
Taq DNA polymerase	0.25	0.25
พลาสมิดดีเอ็นเอ	1	1
ปริมาตรสุทธิ	50	50

ตารางที่ 3.9 สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930*

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	รอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	35
Annealing	55	1	
Primer extension	72	1	
Final extension	72	10	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.10 องค์ประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930*

สารเคมี	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	T7 primer + Forward primer	T7 primer + Reverse primer
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	35.25	35.25
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	5
แมกนีเซียมคลอไรด์	3	3
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต	1	1
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930F_2$)	2.5	-
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 ($MS3930R_1$)	-	2.5
T7 ไพรเมอร์	2.5	2.5
Taq DNA polymerase	0.25	0.25
พลาสมิดดีเอ็นเอ	0.5	0.5
ปริมาตรสุทธิ	50	50

ตารางที่ 3.11 สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930*

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	รอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	35
Annealing	50	1	
Primer extension	72	1	
Final extension	72	10	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

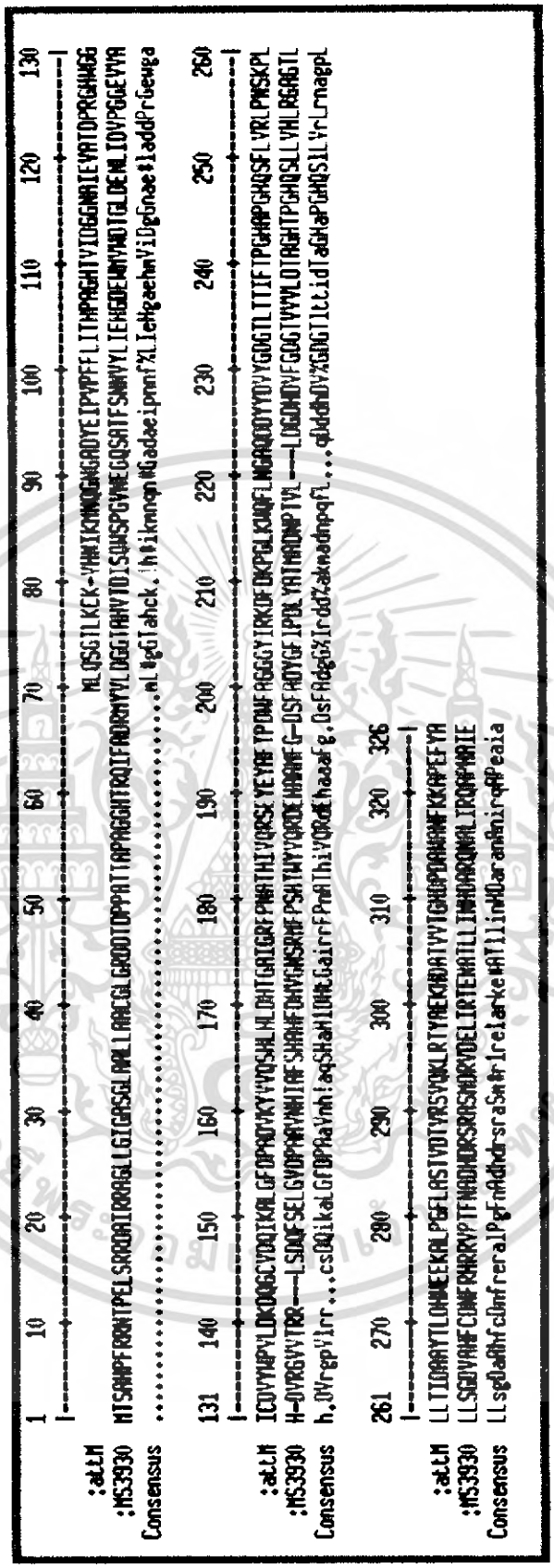
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *MS3930* โดยนำลำดับกรดอะมิโนที่ถอดและแปลรหัสจากยีน *attM* ของเชื้อ *A. tumefaciens* มาเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่ถอดและแปลรหัสจากยีนภายในจีโนมของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* มากที่สุดจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MS3930* มาทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* แล้วทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ให้บริสุทธิ์เพื่อเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดแสดงออกแล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมจากโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ มาทำการวิเคราะห์การมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR และตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าให้ผลการทดลองแต่ละขั้นเป็นดังนี้

4.1 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน AttM ของ *A. tumefaciens* กับลำดับกรดอะมิโนของมัยโคแบคทีเรีย

จากการนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดและแปลรหัสของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดและแปลรหัสของยีนภายในจีโนมของมัยโคแบคทีเรียหลายสายพันธุ์พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *attM* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* มากที่สุดถึงร้อยละ 35.5 (รูปที่ 4.1) โดยลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 2 ชนิดมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ กรดอะมิโนของยีน *attM* ของเชื้อ *A. tumefaciens* มีกรดอะมิโน 256 ตัว ในขณะที่กรดอะมิโนของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* มีถึง 318 ตัว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการลดลงของกรดอะมิโนบางตัวที่ไม่จำเป็นต่อหน้าที่ในสิ่งมีชีวิตที่สูงขึ้นหรืออาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของจีนัสทั้งสอง อย่างไรก็ตามยังมีกรดอะมิโนที่เหมือนกันถึง 91 ตัวทำให้เชื่อว่ายีนทั้ง 2 ตัวน่าจะถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่คล้ายคลึงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *attM* จากเชื้อ *A. tumefaciens* กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis*

4.2.1 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 957 คู่เบส ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* (รูปที่ 4.2) ที่ได้จากธนาคารยีนมาทำการออกแบบไพรเมอร์โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน forward จากบริเวณเริ่มต้นของการแปลรหัสและออกแบบไพรเมอร์ด้าน reverse จากบริเวณสิ้นสุดการแปลรหัสจะได้ไพรเมอร์ด้าน forward มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5′ATGACCTCGGCACACCCTTT 3′ ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า MS3930F_1 มีค่า Tm เท่ากับ 61 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ด้าน reverse มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5′ TCACTCGATCGCATG CGGGG 3′ ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า MS3930R_1 มีค่า Tm เท่ากับ 65 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไพรเมอร์มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 957 คู่เบส

4.2.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 957 คู่เบส ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* (รูปที่ 4.2) ที่ได้จากธนาคารยีนมาทำการออกแบบไพรเมอร์โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน forward จากบริเวณเริ่มต้นของการแปลรหัสและออกแบบไพรเมอร์ด้าน reverse จากบริเวณสิ้นสุดการแปลรหัสจะได้ไพรเมอร์ด้าน forward มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา 4 ตัว คือ CACC หน้าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ MS3930F_1 จะได้ไพรเมอร์ MS3930F_2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5′CACCATGACCTCG GCACACCCTTT 3′ มีค่า Tm เท่ากับ 69 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ด้าน reverse ซึ่งใช้ไพรเมอร์ตัวเดิมคือไพรเมอร์ MS3930R_1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5′TCACTCGATCGCATGC GGGG 3′ มีค่า Tm เท่ากับ 65 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไพรเมอร์มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 961 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CACCATG ACC TCG GCA CAC CCT TTT MS3930F$_2$

ATG ACC TCG GCA CAC CCT TTT MS3930F$_1$

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 TGA

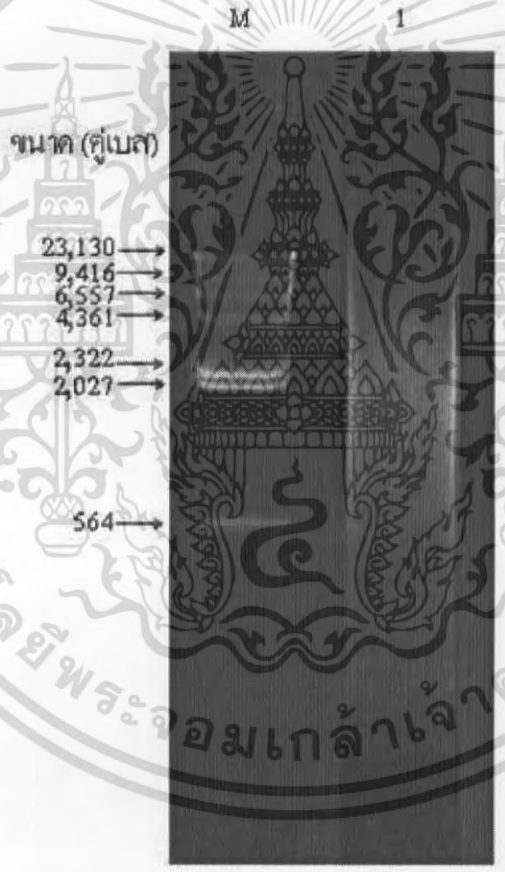
GCC CCG CAT GCG ATC GAG TGA MS3930R$_1$

รูปที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* และบริเวณของไพรเมอร์ MS3930F$_1$ MS3930F$_2$ และ MS3930R$_1$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการสกัด crude DNA ของเชื้อ *M. smegmatis*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. smegmatis* ในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 หรือ อาหารแข็ง Middlebrook 7H10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน นำโคโลนีของเชื้อ *M. smegmatis* มาสกัด crude DNA ดังวิธีทำในข้อที่ 3.4.2 และวิเคราะห์ปริมาณ crude DNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบดีเอ็นเอของ crude DNA ของเชื้อ *M. smegmatis* มีลักษณะเป็นปื้นยาวมีขนาดต่ำกว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 23,000 คู่เบส ของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (รูปที่ 4.3) โดยแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ระหว่าง 500 และ 2,000 คู่เบส ซึ่งเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่มีขนาด 957 คู่เบส การที่ crude DNA มีขนาดเล็กอาจเนื่องมาจากการทำลาย DNA ของเอนไซม์ DNase ระหว่างกระบวนการสกัด crude DNA



รูปที่ 4.3 ผลการสกัด crude DNA จากเชื้อ *M. smegmatis*
เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
เลนที่ 1 crude DNA จากเชื้อ *M. smegmatis*

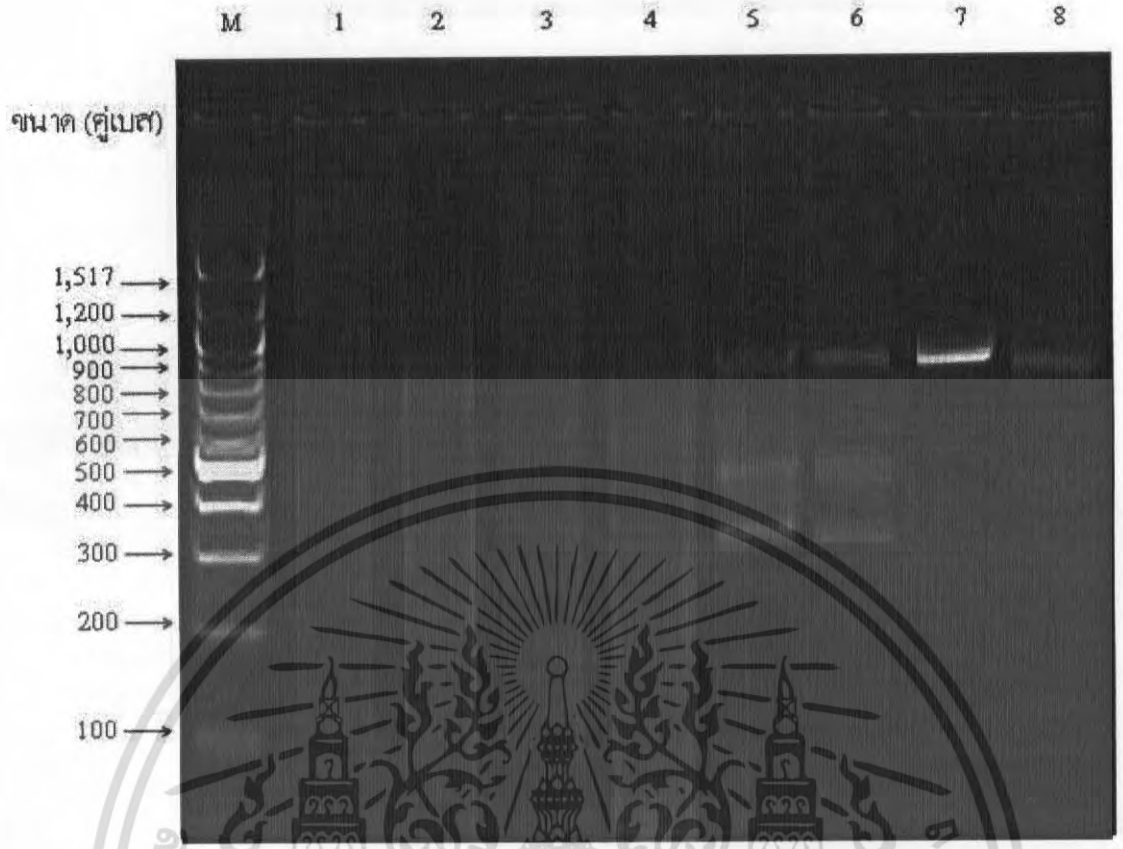
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmaits* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.1 และใช้สภาวะดังตารางที่ 3.2 จากข้อที่ 3.4.4.1 และใช้ไพรเมอร์ $MS3930F_1$ และ $MS3930R_1$ ที่ได้ออกแบบไว้จากข้อ 4.2.1 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแปรผันอุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส และแปรผันความเข้มข้นของ crude DNA (ไม่เจือจางและเจือจาง 10 เท่า) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิของการจับตัว 50 และ 55 องศาเซลเซียส แต่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR 3 แถบที่มีขนาด 300, 600 และประมาณ 900-1,000 คู่เบส ที่อุณหภูมิการจับตัว 60 องศาเซลเซียสและพบผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ที่อุณหภูมิของการจับตัว 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.4) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้คือขนาด 957 คู่เบส จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* คือเมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจาง และที่อุณหภูมิการจับตัว 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.4 เลนที่ 8) ทั้งนี้เนื่องจากในจีโนมของเชื้อ *M. smegmatis* มีปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส G และ C สูง และค่า Tm ของไพรเมอร์ $MS3930F_1$ และ $MS3930R_1$ เท่ากับ 61 และ 65 องศาเซลเซียสตามลำดับ จึงทำให้ต้องใช้อุณหภูมิในการจับตัวค่อนข้างสูงในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* นอกจากนี้เมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจางทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีปริมาณมากกว่าเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางเนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า และสารอื่นๆ ใน crude DNA ไม่มีผลรบกวนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* จาก *M. smegmatis* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 65 องศาเซลเซียสมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะการจับตัว 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Promaga, USA)

เลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจางและอุณหภูมิการจับตัว 50 ^{o}C

เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่เจือจาง10เท่าและอุณหภูมิการจับตัว 50 ^{o}C

เลนที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจางและอุณหภูมิการจับตัว 55 ^{o}C

เลนที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่เจือจาง10เท่าและอุณหภูมิการจับตัว 55 ^{o}C

เลนที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจางและอุณหภูมิการจับตัว 60 ^{o}C

เลนที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่เจือจาง10เท่าและอุณหภูมิการจับตัว 60 ^{o}C

เลนที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจางและอุณหภูมิการจับตัว 65 ^{o}C

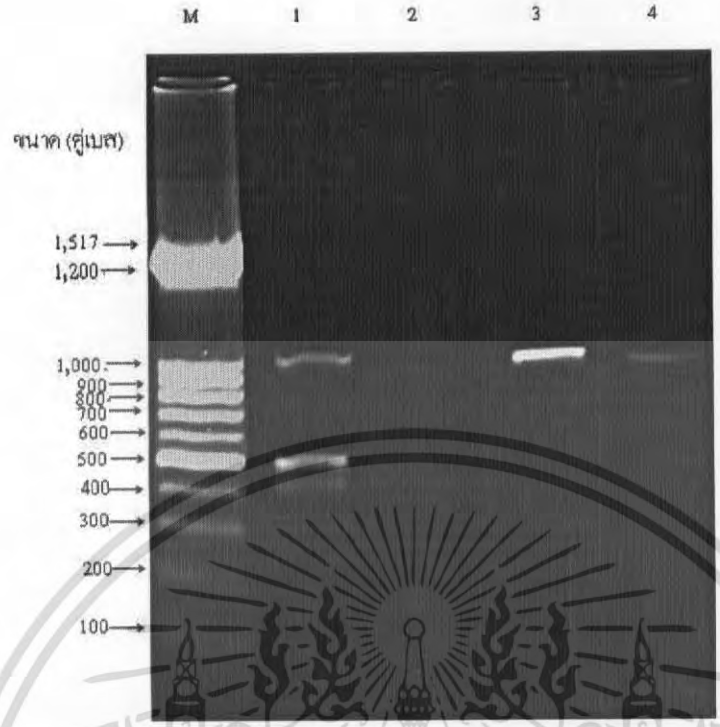
เลนที่ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ที่เจือจาง10เท่าและอุณหภูมิการจับตัว 65 ^{o}C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.3 และใช้สภาวะดังตารางที่ 3.4 จากข้อที่ 3.4.4.2 และใช้ไพรเมอร์ $MS3930F_2$ และ $MS3930R_1$ ที่ได้ออกแบบไว้จากข้อ 4.2.2 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแปรผันอุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 60 และ 65 องศาเซลเซียส และแปรผันความเข้มข้นของ crude DNA (ไม่เจือจางและเจือจาง 10 เท่า) นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR 3 แถบที่มีขนาด 400, 500 และ ขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ที่อุณหภูมิของการจับตัว 60 องศาเซลเซียส ของการใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจาง แต่ที่อุณหภูมิเดียวกันของการใช้ crude DNA เจือจาง 10 เท่า ไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR และพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ที่อุณหภูมิของการจับตัว 65 องศาเซลเซียสของการใช้crude DNA ไม่เจือจาง โดยที่สภาวะอุณหภูมิเดียวกันของการใช้ crude DNA เจือจาง 10 เท่า ให้ผลเช่นเดียวกันแต่แถบมีความจางกว่า (รูปที่ 4.5) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการเจือจาง crude DNA เป็น 10 เท่ายังมีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แต่หากสภาวะอุณหภูมิการจับตัวไม่เหมาะสมอาจทำให้มีการจับตัวของสายดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์อย่างไม่จำเพาะ หรือเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ด้าน forward และไพรเมอร์ด้าน reverse จนปรากฏแถบดีเอ็นเออื่นที่ไม่ต้องการ และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* คือเมื่อใช้ crude DNA ไม่เจือจาง และที่อุณหภูมิการจับตัว 65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากในจีโนมของ *M. smegmatis* มีปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส G และ C สูง และค่า Tm ของไพรเมอร์ $MS3930F_2$ และ $MS3930R_1$ มีค่า 69 และ 65 ตามลำดับ จึงทำให้ต้องใช้อุณหภูมิในการจับตัวค่อนข้างสูงในการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *MS3930* จากเชื้อ *M. smegmatis* หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* จาก *M. smegmatis* ที่อุณหภูมิของการจับตัว 65 องศาเซลเซียสมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



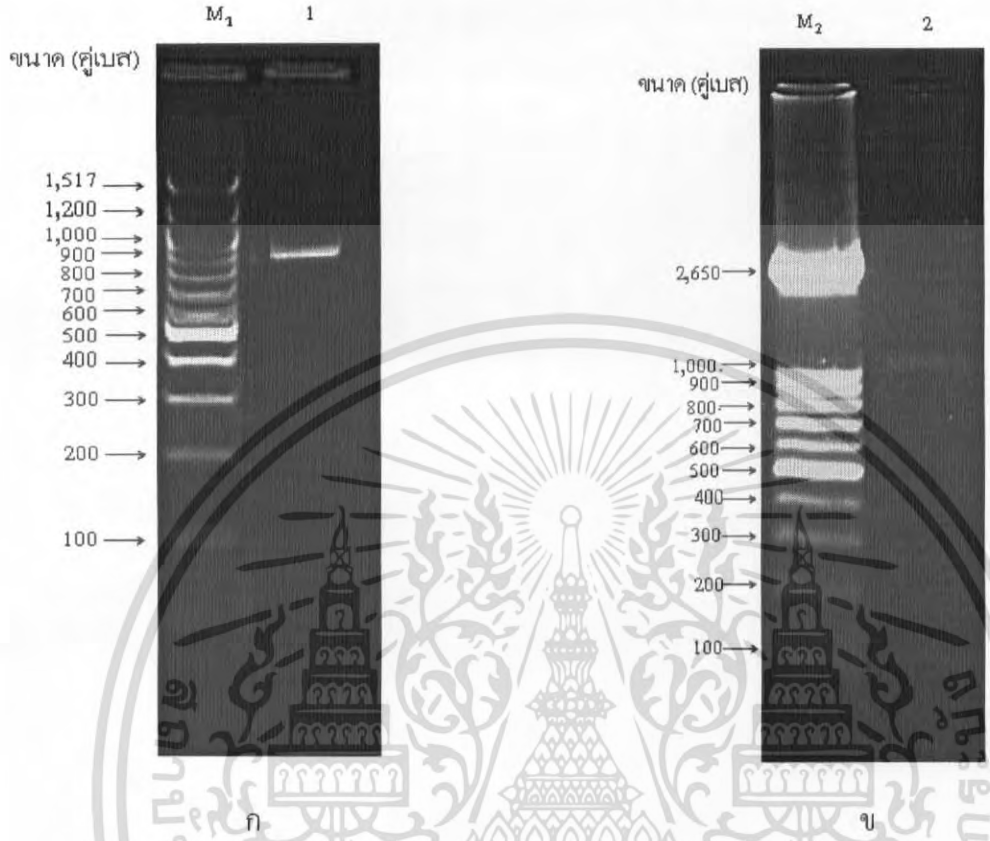
รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะการจับตัว 60 และ 65 องศาเซลเซียส
เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Promaga, USA)
เลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ไม่เจือจาง และอุณหภูมิการจับตัว 60 ^{O}C
เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA เจือจาง 10 เท่า และอุณหภูมิการจับตัว 60 ^{O}C
เลนที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA ไม่เจือจาง และอุณหภูมิการจับตัว 65 ^{O}C
เลนที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ crude DNA เจือจาง 10 เท่า และอุณหภูมิการจับตัว 65 ^{O}C

4.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ให้บริสุทธิ์

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่อุณหภูมิการจับตัวที่เหมาะสมมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN, Germany) เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจรบกวนปฏิกิริยาการเชื่อมต่อไป โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 900-1,000 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้คือขนาด 957 คู่เบส เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และขนาด 961 คู่เบส เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO (รูปที่ 4.6 ก และ ข) จากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR มีความเข้มข้น 32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน *MS3930* ที่ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ก) และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน *MS3930* ที่ใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ข)

เลน M_1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Promaga, USA)

เลน M_2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Bioexcellence, ประเทศไทย)

เลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ขนาด 957 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ขนาด 961 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออกและการทรานสฟอร์มเมชัน

4.6.1 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และการทรานสฟอร์มเมชัน

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามข้อที่ 4.5 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO (ภาคผนวก ค) แล้วนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* TOP10F′ดังวิธีในข้อ 3.4.7.1 และทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าได้โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ 5 โคโลนี แล้วนำโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะแต่ละโคโลนี มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมตั้งชื่อว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5 ตามลำดับ

4.6.2 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และการทรานสฟอร์มเมชัน

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามข้อที่ 4.5 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO (ภาคผนวก ค) แล้วนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* TOP10 ดังวิธีในข้อ 3.4.7.2 และทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าได้โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ 6 โคโลนี นำแต่ละโคโลนีมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม ตั้งชื่อว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 ตามลำดับ

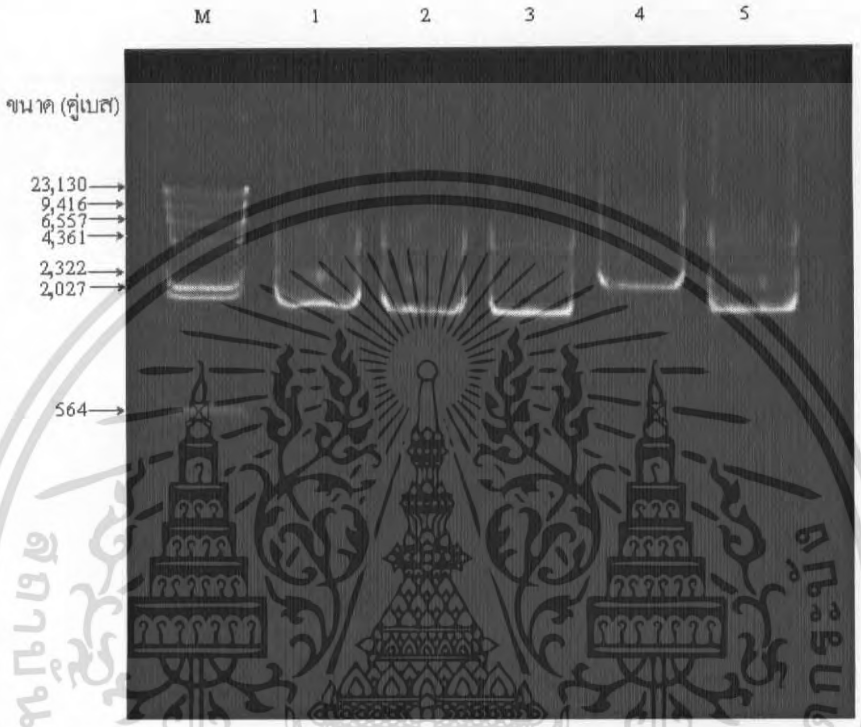
4.7 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม

4.7.1 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930*

จากการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยชุดทดสอบ (QIAprep Spin Miniprep Kit) (QIAGEN, Germany) ดังข้อที่ 3.4.8.2 ตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5 จากนั้นนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสมมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีแถบดีเอ็นเอที่สูงกว่าพลาสมิดแสดงออกลูผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2, 1.3 และ 1.5 (รูปที่ 4.7) จึงคาดว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 เป็นพลาสมิดแสดงออก ลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO กับผลิตภัณฑ์ PCR จึงนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



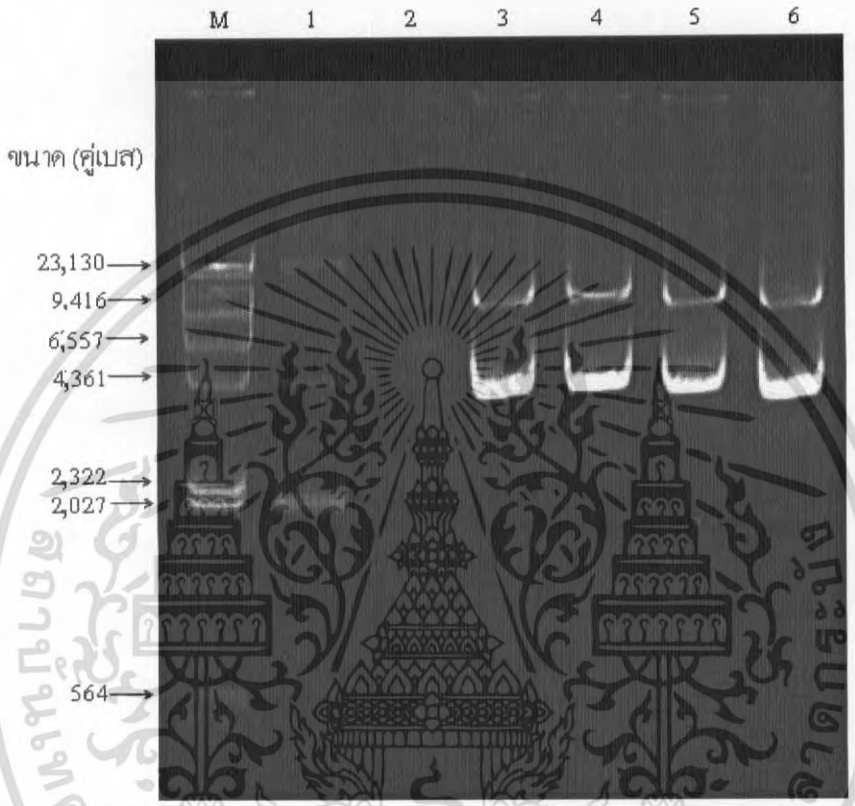
รูปที่ 4.7 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5
เลน M คือเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
เลนที่ 1 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.1
เลนที่ 2 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.2
เลนที่ 3 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.3
เลนที่ 4 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.4
เลนที่ 5 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.5

4.7.2 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930*

จากการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยชุดทดสอบ (BioExcellence, ประเทศไทย) ดังข้อที่ 3.4.8.3 ตั้งชื่อพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่ได้ว่า pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4. 1.5 และ 1.6 จากนั้นนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสมมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200 /D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4. 1.5 และ 1.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สูงกว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200 /D-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2 (รูปที่ 4.8) จึงคาดว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4. 1.5 และ 1.6 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อของพลาสมิด pET 200/D-TOPO กับผลิตภัณฑ์ PCR จึงนำมาตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



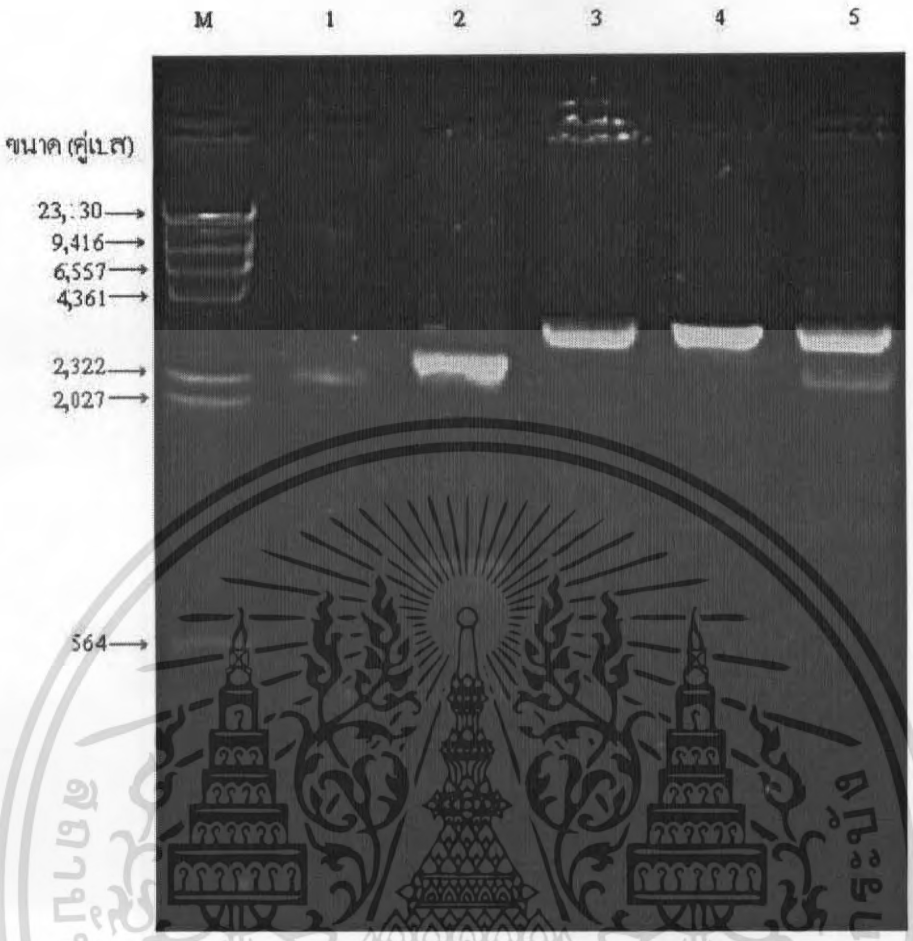
รูปที่ 4.8 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO- *MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 , 1.5 และ 1.6
เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
เลนที่ 1 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.1
เลนที่ 2 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.2
เลนที่ 3 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.3
เลนที่ 4 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.4
เลนที่ 5 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.5
เลนที่ 6 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET200/D-TOPO *MS3930* 1.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Hin*dIII และ *Eco*RI ทีละตัว พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างละ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส (รูปที่ 4.9 เลนที่ 3, 4 และ 5) แสดงว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดละ 1 บริเวณ และจากแผนที่แสดงบริเวณการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO (ภาคผนวก ค) พบว่าพลาสมิดแสดงออกpCRT7/NT-TOPO มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 ที่บริเวณด้านหน้าของบริเวณเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออก และมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ที่บริเวณด้านหลังของบริเวณเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออก จึงทดลองตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ด้วยคู่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.9 เลนที่ 2) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 บริเวณคือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่บริเวณด้านหน้าของบริเวณเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออก และมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ที่บริเวณด้านหลังของบริเวณเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออกจึงทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 แถบ ซึ่งขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้คือขนาด 957 คู่เบส ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* และ 2,870 คู่เบส ของพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO สรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCRของยีน *MS3930* กับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO จึงนำพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ไปตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

เลนที่ 1 พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4

เลนที่ 2 พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

เลนที่ 3 พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เลนที่ 4 พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

เลนที่ 5 พลาสมิด pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 ผลการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสม โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.9.1 ผลการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสม ลูกผสม pCR T7/NT-TOPO- *MS3930* 1.4 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

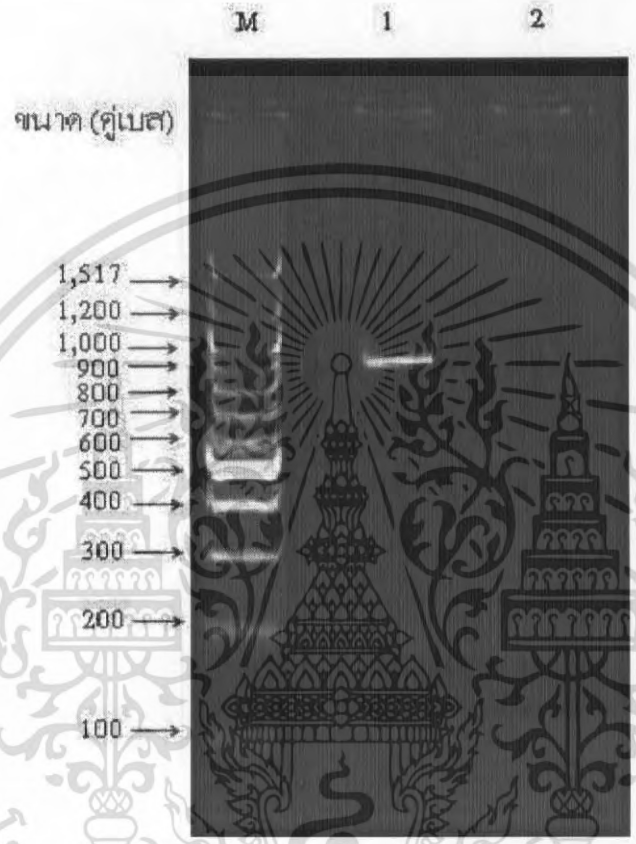
จากการนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับ MS3930F_1 และ T7 กับ MS3930R_1ใช้สารเคมีดังตารางที่ 3.8 และใช้สภาวะดังตารางที่ 3.9 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน(รูปที่ 4.10) เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับไพรเมอร์ MS3930F_1 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับไพรเมอร์ MS3930R_1แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีด้าน T7 ใกล้กับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน reverse และมีด้าน T7 ไกลกับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน forward ซึ่งจากแผนที่แสดงบริเวณการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO (ภาคผนวก ค) พบว่าหากมีการเชื่อมต่อของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน MS3930 ในทิศทางที่ถูกต้องควรจะมี ด้าน T7 ใกล้กับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน forward และมีด้าน T7 ไกลกับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน reverse จึงสรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 มีการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน MS3930 กับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO แต่มีทิศทางการเชื่อมต่อที่กลับด้าน

4.9.2 ผลการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดแสดงออกลูกผสม ลูกผสม pET 200/D-TOPO-MS3930 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-MS3930 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับ MS3930F_2 และ T7 กับ MS3930R_1ใช้สารเคมีดังตารางที่ 3.10 และใช้สภาวะดังตารางที่ 3.11 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน(รูปที่ 4.11) เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับไพรเมอร์ MS3930 R_1 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 กับไพรเมอร์ MS3930 F_2 แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 มีด้าน T7 ใกล้กับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน forward และมีด้าน T7 ไกลกับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน reverse ซึ่งจากแผนที่แสดงบริเวณการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pET200/D-TOPO (ภาคผนวก ค) พบว่าหากมีการเชื่อมต่อของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ในทิศทางที่ถูกต้องควรจะมีด้าน T7 ใกล้กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณของไพรเมอร์ด้าน forward และมีด้าน T7 ไกลกับบริเวณของไพรเมอร์ด้าน reverse จึงสรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 มีการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* กับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และมีทิศทางการเชื่อมต่อในทิศทางที่ต้องการ



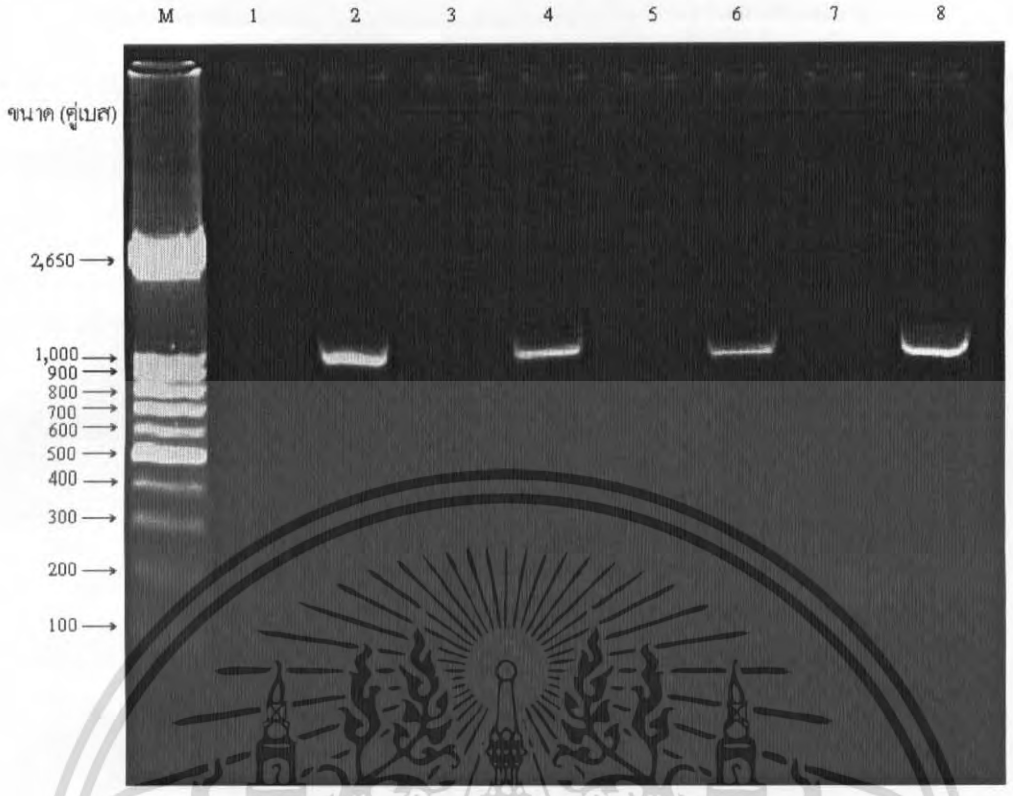
รูปที่ 4.10 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน100 bp Ladder (Promega, USA)

เลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 F_1

เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 R_1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-MS3930 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Bioexcellence, ประเทศไทย)

เลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 F_2

เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.3 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 R_1

เลนที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.4 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 F_2

เลนที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.4 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 R_1

เลนที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.5 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 F_2

เลนที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.5 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 R_1

เลนที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.6 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 F_2

เลนที่ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pET 200/D -TOPO-*MS3930* 1.6 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ T7 และ MS3930 R_1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การสร้างพลาสมิดแสดงออกลูกผสมของยีน *MS3930* โดยใช้พลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและใช้ไพรเมอร์คู่ MS3930F$_1$ และ MS3930R$_1$ สรุปว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ที่ได้มีขนาด 957 คู่เบส สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสคือที่อุณหภูมิการจับตัว 65 องศาเซลเซียส และใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจาง

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO และ ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย TOP10F' แล้วทำการคัดแยกด้วยยาปฏิชีวนะ ได้โคโลนีที่ผ่านการคัดแยก 5 โคโลนี นำแต่ละโคโลนีมาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมตั้งชื่อว่า พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5 และจากการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pCR T7/NT-TOPO-*MS3930* 1.4 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* กับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO แต่จากการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออกโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 กับ MS3930F$_1$ และคู่ไพรเมอร์ T7 กับ MS3930R$_1$ สรุปได้ว่าผลการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* กับพลาสมิดแสดงออก pCR T7/NT-TOPO มีทิศทางที่กลับด้าน

5.2 การสร้างพลาสมิดแสดงออกลูกผสมของยีน *MS3930* โดยใช้พลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MS3930* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและใช้ไพรเมอร์คู่ MS3930F$_2$ และ MS3930R$_1$ สรุปว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ที่ได้มีขนาด 961 คู่เบส สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสคือที่อุณหภูมิการจับตัว 65 องศาเซลเซียส และใช้ crude DNA ที่ไม่เจือจาง

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และ ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย TOP10 แล้วทำการคัดแยกด้วยยาปฏิชีวนะ ได้โคโลนีที่ผ่านการคัดแยก 6 โคโลนี นำแต่ละโคโลนีมาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมตั้งชื่อว่า พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 จากการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิดแสดงออกโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 กับ MS3930F$_2$ และคู่ไพรเมอร์ T7 กับ MS3930R$_1$ สรุปได้ว่าพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pET 200/D-TOPO-*MS3930* 1.3, 1.4, 1.5 และ1.6 เป็นพลาสมิดแสดงออกลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์PCRของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* กับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO และมีทิศทางการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *MS3930* ของเชื้อ *M. smegmatis* กับพลาสมิดแสดงออก pET 200/D-TOPO ในทิศทางที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา ปรีชานุกูล. 2548. ภาษาของแบคทีเรีย : ภาควิชาจุลชีววิทยา และปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

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

Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y., and Faure D. 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity . *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8) :4989-4993.

Daniels, R. and Vanderleyden, 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 bacteria biofilm. Science. 280 : 259-298.

Fuqua C. and Greenberg E. 2002. Listenning in on bacteria : acyl-homoserine lactone signaling. *Nature*.25:685-695.

Fugua , W.C., Winans ,S.C., and Greenberg , E.P. 1994. Census and consensus in bacteria ecosystem : the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Microbiol.* 50:727-751.

Greenberg E. 2000. Acyl homoserine lactonc quorum sensing in bacteria. *The journal of Microbiology*. 38(3):117-121.

Kleerebezem, M., Quardri, 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.

[Online].Available : http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/veterin/vet69/Biochemistry

[Online].Available :http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_smegmatis

[Online].Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis

[Online].Available : http://home.biotec.or.th/NewsCenter/my_documents/my_files/3C26D_06_ Transformation.pdf#

[Online].Available : www.nhrbc.org/im_age/PCR%20cycle.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://stang.sc.mahidol.ac.th/text/pdf/thesis/2004/MICRO_2004_C486g.pdf

[Online].Available : http://th.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis

[Online].Available : http://www.il.mahidol.ac.th/course/dna/chapter/chapter4application.htm

[Online].Available : http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/1827.JPG

[Online].Available: http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/Img/graphics/hatfull/hatfull02.jpgs /lr /0804703.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. ส่วนประกอบของอาหาร MIDDLEBROOK 7H9 BROTH

Ammonium sulfate	0.5	กรัม
Monopotassium phosphate	1	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Sodium citrate	0.1	กรัม
Magnesium sulfate	50	มิลลิกรัม
Calcium chloride	0.5	มิลลิกรัม
Zinc sulfate	10	มิลลิกรัม
Copper sulfate	10	มิลลิกรัม
L-Glutamic acid	0.5	กรัม
Ferric ammonium citrate	40	มิลลิกรัม
Pyridoxine	10	มิลลิกรัม
Biotin	0.5	มิลลิกรัม

นำสารละลายที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ความเข้มข้น 4.7 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.6 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบเสริม

Albumin fraction V, Bovine	5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Catalase (beef)	0.3	มิลลิกรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกลีเซอรอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ส่วนประกอบอาหารเหลว LB

แบคโตทริปโตน	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัมต่อลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยโซเดียมคลอไรด์ให้เป็น 7.4 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็ง เติมวุ้น 15 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมยาปฏิชีวนะหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เรียบร้อยแล้ว โดยรอให้อุณหภูมิอาหารไม่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเสียสภาพของยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ส่วนประกอบสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking DNA)

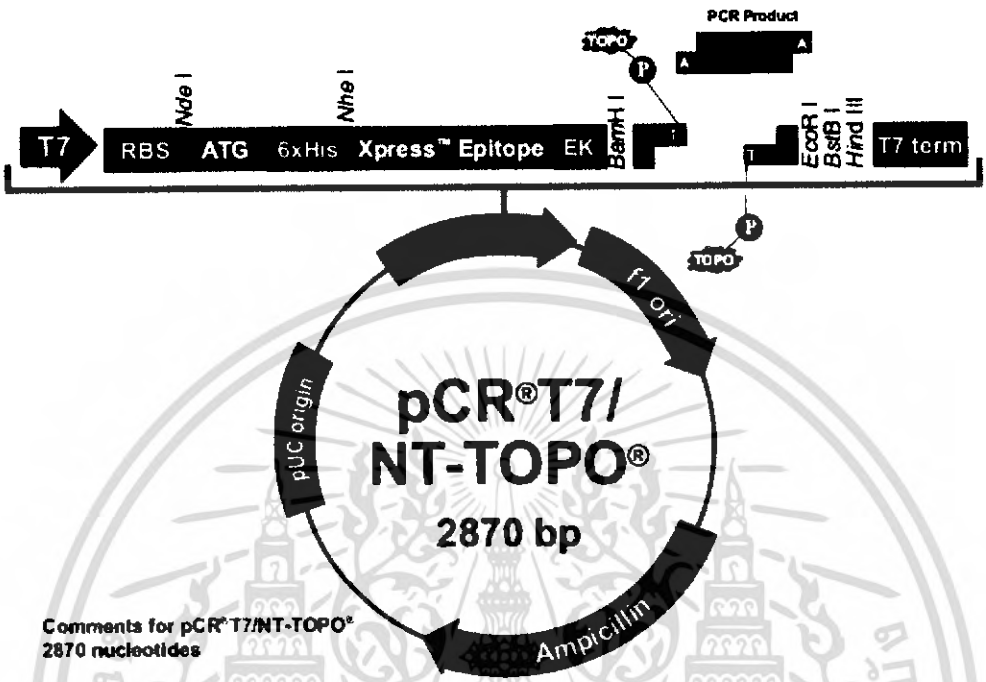
ซูโครสหรือกลีเซอรอล	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-Boric-EDTA	1	เท่า

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

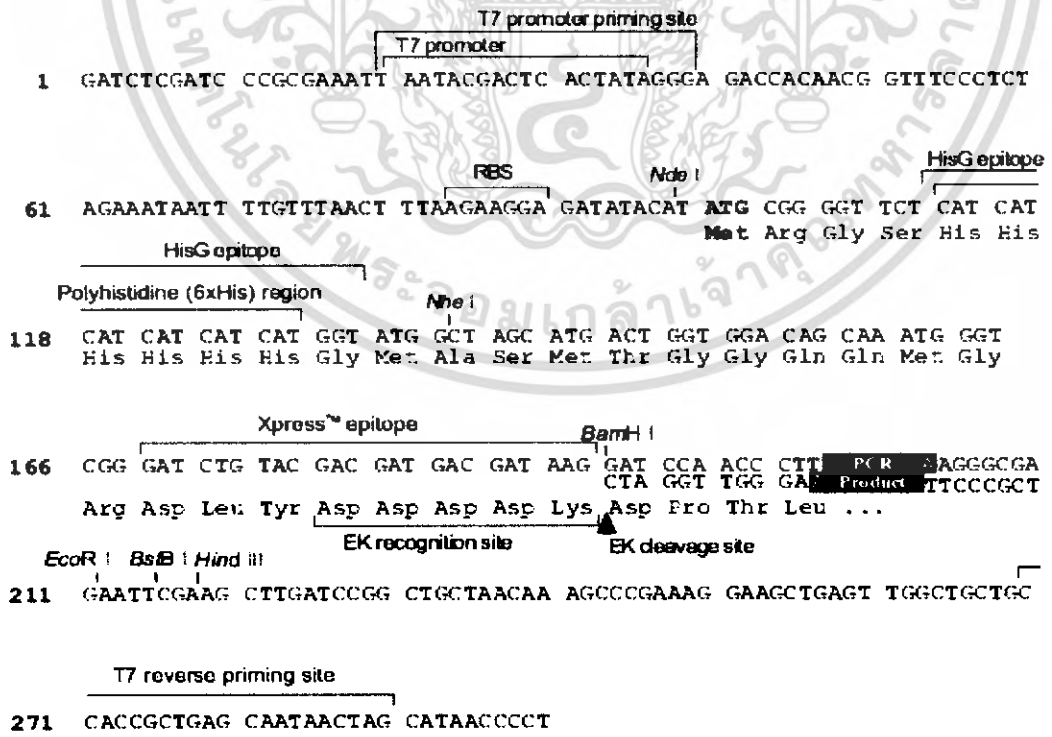
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. แผนที่ยีนของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO

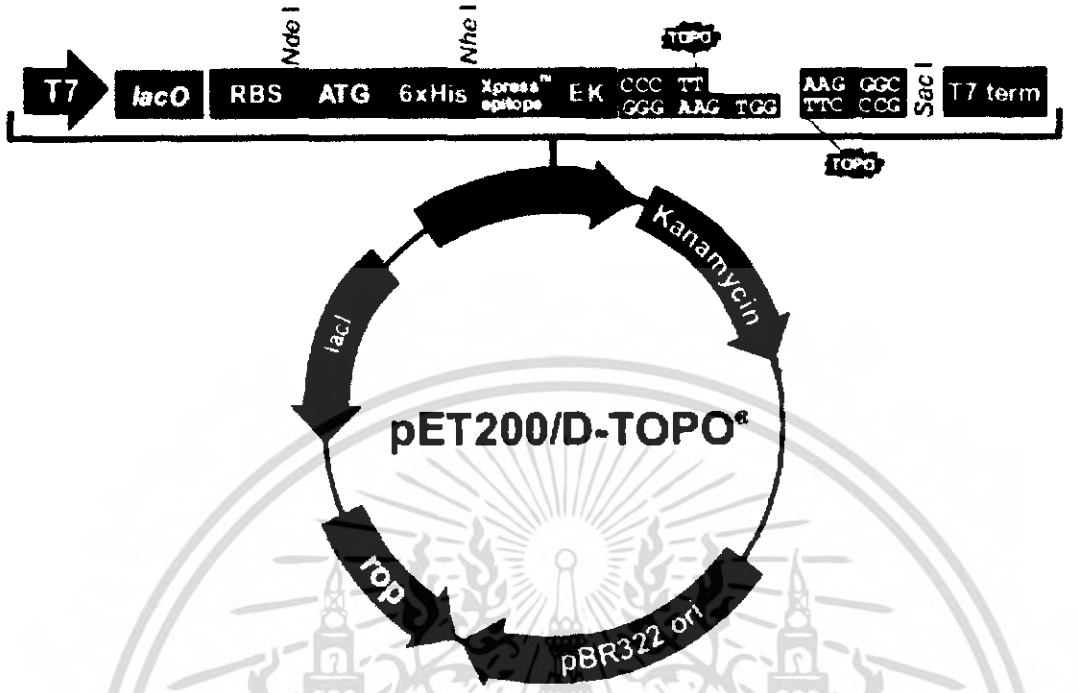


2. แผนที่แสดงบริเวณการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pCR T7/NT-TOPO

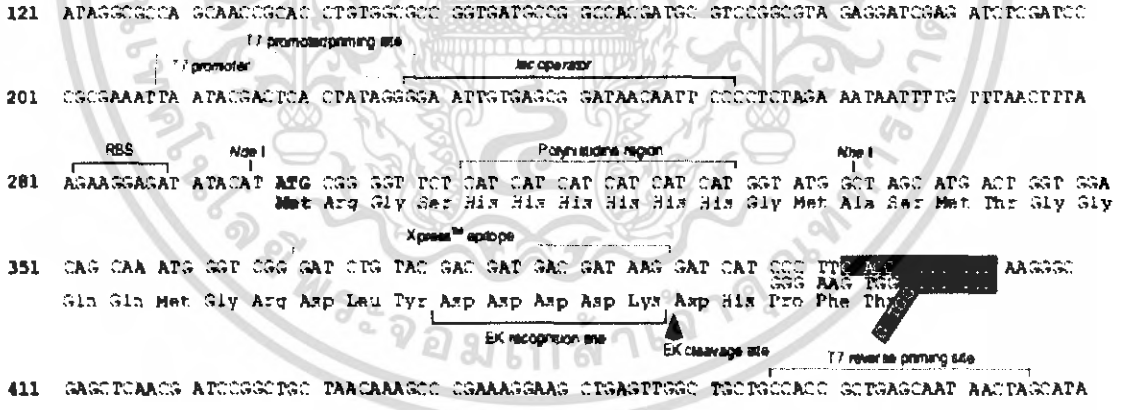


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แผนที่ยีนของพลาสมิด pET200/D-TOPO



4. แผนที่แสดงบริเวณการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pET200/D-TOPO



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้