

การผลิตและการสลายโมเลกุลสัญญาณอะซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจากแบคทีเรีย  
ที่แยกได้จากกุ้งและบ่อเลี้ยงกุ้ง

PRODUCTION AND DEGRADATION OF ACYL-HOMOSERINE LACTONE  
SIGNAL MOLECULE FROM BACTERIA ISOLATED FROM SHRIMP AND  
SHRIMP POND



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KWTL-2008-SO-M-020-253

การผลิตและการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจากแบคทีเรีย  
ที่แยกได้จากกุ้งและบ่อเลี้ยงกุ้ง

PRODUCTION AND DEGRADATION OF ACYL-HOMOSERINE LACTONE  
SIGNAL MOLECULE FROM BACTERIA ISOLATED FROM SHRIMP AND  
SHRIMP POND



ศรินยา ใจตรง

SARINYA JAITRONG

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 81398  
วัน,เดือน,ปี..... 11 ส.ย. 2551

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการศึกษาและใช้ภายในเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
พ.ศ. 2551

**PRODUCTION AND DEGRADATION OF ACYL-HOMOSERINE LACTONE  
SIGNAL MOLECULE FROM BACTERIA ISOLATED FROM SHRIMP AND  
SHRIMP POND**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ **KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG** ไปใช้

2008

KMITL-2008-SC-M-020-253



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**  
**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการสลาย โมเลกุลสัญญาณ เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากแบคทีเรีย  
ที่แยกได้จากกุ้งและบ่อเลี้ยงกุ้ง

Production and Degradation of Acyl-homoserine Lactone Signal Molecule  
from Bacteria Isolated from Shrimp and Shrimp Pond

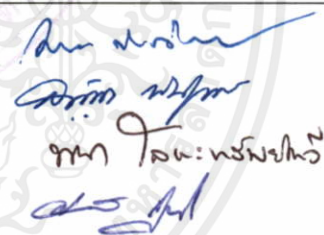
ชื่อนักศึกษา นางสาวศรินษา ใจตรง

รหัสประจำตัว 47063907

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.มาลินี	ต้นติยาภรณ์	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร.พนา	โศหะทรัพย์ทวี	
รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชิต	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 14 พฤษภาคม 2551 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามณเฑียรวิทยาลัย 1 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว  


(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกข้อมูล และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่..... ๑๕ .....เดือน..... พฤษภาคม..... พ.ศ. ๒๕๕๑.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการสลายโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งและบ่อเลี้ยงกุ้ง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศรินยา ใจตรง
รหัสประจำตัว	47063907
ปริญญาวิชา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

## บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารที่มีการเจริญเติบโตมากที่สุดในประเทศไทย ปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็คือ การติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคในบ่อเลี้ยง แบคทีเรียก่อโรคสามารถติดต่อสื่อสารระหว่างกันและผลิตปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งส่งผลต่อการลดจำนวนประชากรของสัตว์น้ำ กลไกการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์นี้เกิดขึ้นจากการทำงานของโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เมื่อเซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประชากรจนถึงระดับหนึ่ง เซลล์จะผลิตโมเลกุลสัณญาณออกมา โมเลกุลสัณญาณจะจับกับรีเซพเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เช่น การสังเคราะห์ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้งได้ 59 ไอโซเลท และสามารถตรวจพบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท (C1 และ T5) ที่ผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากการทำปฏิกิริยากับ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Vibrio furnissii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จากการเพิ่มปริมาณยีน *luxI* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของไอโซเลท C1 แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pDrive และนำพลาสมิดลูกผสมมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (VanI) ของ *Vibrio anguillarum* สูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์ จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1 และ T5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียสามารถผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโม

เซอร์รินแลคโตนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/5 LB ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตเนส และสารประกอบฟูราโนนซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน เริ่มจากนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSP3.102 ที่มียีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตเนสมาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* BL21(DE3) คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ชักนำทรานสฟอร์มเม้นท์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตเนสในปริมาณสูงโดยใช้สารละลาย IPTG และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตเนสมีขนาด 37-40 กิโลดาลตัน จากการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Profinia™ Protein Purification System พบว่าสามารถทำให้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตเนสบริสุทธิ์และอยู่ใน fraction ที่ 3 โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ใน fraction นี้ 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรสามารถลดโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตจากไอโซเลท C1 และ T5 ได้ จากการใช้สารประกอบฟูราโนนในการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน พบว่า ในอาหารที่มีฟูราโนนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดการเจริญเติบโตและลดการผลิตโมเลกุลสัญญาณของไอโซเลท C1 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis</b>	Production and Degradation of Acyl-homoserine Lactone Signal Molecule from Bacteria Isolated from Shrimp and Shrimp Pond
<b>Student</b>	Miss Sarinya Jaitrong
<b>Student ID</b>	47063907
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Year</b>	2008
<b>Thesis Adviser</b>	Assist. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

## ABSTRACT

Aquaculture is one of the fastest growing food producing industries in Thailand. One of the important aquacultural problems is bacterial infection in ponds. Pathogenic bacteria can communicate each other and subsequently produce virulence factors affecting in the decrease of host population. This mechanism is triggered by cell-to-cell communication signal molecule “Acyl-homoserine lactone (acyl-HSL)”. Acyl-HSL is produced when bacteria reach the threshold cell density, subsequently bind to the receptor and induce the target gene expressions such as synthesis of virulence factors. In this work, fifty nine isolates were screened from shrimp ponds and two isolates (C1 and T5) were found to produce acyl-HSL based on the reaction with reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136. Both isolates were identified by 16S ribosomal DNA analysis as *Vibrio furnissii* and *Pseudomonas aeruginosa*. The fragment of *luxI* encoding acyl-homoserine lactone synthase of isolate C1 was amplified, cloned into pDrive cloning vector and subsequently sequenced. The amino acid sequence analysis showed 74% similarity to acyl-homoserine lactone synthase (VanI) of *Vibrio anguillarum*. Isolates C1 and T5 were cultivated in 1/5 LB medium with a shaking speed of 250 rpm at 30 °C for 12 hours. It was found that the highest acyl-HSL production was shown at hour 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> of incubation time, respectively. In addition, the highest acyl-HSL production was found when cultivated in 1/5 LB medium containing 1.0% NaCl at 25 °C. The degradation of signal molecule acyl-HSL was studied by using recombinant acyl-homoserine lactonase and furanone, acyl-HSL analogue. The recombinant plasmid pSP3.102 containing *attM* encoding acyl-homoserine lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* was transformed to the competent cell *Escherichia coli* BL21(DE3).

A correct transformant was selected on kanamycin containing LB agar. The recombinant enzyme acyl-homoserine lactonase was induced by IPTG and analyzed by SDS-PAGE. It was found that the recombinant acyl-homoserine lactonase was 37-40 kDa in size. Overexpressed enzyme acyl-homoserine lactonase was purified by Profinia™ Protein Purification System. It was shown that the recombinant protein was only found in fraction 3. Acyl-homoserine lactone of isolates C1 and T5 was degraded by 0.02 mg protein/ml of the fraction 3 purified enzyme. Moreover, furanone with final concentration of 10 mM could decelerate growth of isolate C1 and decrease the acyl-HSL production.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการทำวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี จูตาภิชาติ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบริษัท Bio-Rad Laboratories Ltd. ที่กรุณาอนุเคราะห์ชุดทำโปรตีนให้บริษัท Profinia™ Protein Purification System

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ น.ส.วิภาวี แบบประเสริฐ น.ส.จตุมา ภาพสิงห์ น.ส.วิภาณี แบนคีรี และ น.ส.รุ่งอรุณ สุขสำราญ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณ น.ส.ศิริวิมล วุฒิสมบัติ เพื่อนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ พ.อ.सानนท์ นางศศิธร และนายสาธิต ใจตรง บิดา มารดาและพี่ชายของข้าพเจ้า ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ และสนับสนุนส่งเสริมด้านการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ศรินยา ใจตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญรูป.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	4
1.3 ขอบเขตของการศึกษา.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย.....	6
2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก.....	6
2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ.....	7
2.4 สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	8
2.5 การสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	13
2.6 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	14
2.6.1 ฟูราโนน.....	15
2.6.2 เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส.....	16
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
2.7.1 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	17
2.7.2 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	23
3.2 สารเคมี.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างยิ่งทั้งนี้ขอสงวนสิทธิ์ในสิ่งที่ปรากฏในเล่ม

# สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	23
3.2.2 ขาปฏิชีวนะ.....	23
3.2.3 เอนไซม์.....	23
3.2.4 ดิเอ็นเอมาตรฐาน.....	24
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดิเอ็นเอ.....	24
3.2.6 ชุดทดสอบ (kit).....	24
3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส.....	25
3.2.8 โปรตีนมาตรฐาน.....	25
3.2.9 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาโปรตีน.....	25
3.2.10 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	25
3.3 อุปกรณ์.....	26
3.4 สถานที่ทำวิจัย.....	26
3.5 วิธีการศึกษา.....	27
3.5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	27
3.5.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	28
3.5.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i> .....	31
3.5.4 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้.....	34
3.5.5 การศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้.....	34
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้เผยแพร่ลงมือที่สาธารณะซึ่งรวมถึงเจ้าของเอกสารฉบับนี้ทั้งที่มีหรือไม่มีชื่อ

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด โฮโมเซอรินแลคโตน.....	39
4.3 ผลการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	42
4.3.1 ผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5.....	42
4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส.....	43
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C1 และ T5.....	44
4.4 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>luxI</i> ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียไอโซเลท C1...	47
4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>luxI</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์ส.....	48
4.4.2 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> เข้ากับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	49
4.4.3 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	49
4.4.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	49
4.4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1.....	50
4.5 ผลการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด โฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5.....	55
4.5.1 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคทีเรียที่แยกได้.....	55
4.5.2 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิด โฮโมเซอรินแลคโตน ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ.....	56

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.5.3 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน ภายใต้อุณหภูมิต่างๆ.....	60
4.6 ผลการศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5.....	62
4.6.1 ผลการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนโดย ใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนเนส.....	62
4.6.2 ผลของสารประกอบฟูราโนนต่อการเจริญและการสลายโมเลกุล สัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้....	72
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	76
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	89
ภาคผนวก ค.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโซโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆ และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย.....	11
3.1 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	30
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	30
3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>luxI</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	31
3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	33
4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C1 และ T5 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน.....	47
4.2 ความคล้ายคลึงและความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน.....	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กลไกการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก.....	7
2.2 กลไกการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ.....	8
2.3 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3oxo-C6-HSL.....	9
2.4 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่เอซิลแตกต่างกัน.....	10
2.5 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	14
2.6 โครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่างเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนกับฮาโลเจนฟูราโนนที่ได้จาก <i>D. pulchra</i> .....	16
2.7 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส.....	17
4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้ง.....	39
4.2 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	41
4.3 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5.....	41
4.4 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C1 และ T5 จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์.....	43
4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA .....	44
4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบสของไอโซเลท C1 และ T5.....	46
4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>luxI</i> .....	48
4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม.....	50
4.9 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	51
4.10 โครมาโทแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1.....	52
4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1.....	53
4.12 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ไอโซเลท C1 และ T5.....	56
4.13 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์.....	58

## สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.14 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท T5 ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เฟอร์เซ็นต์.....	59
4.15 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส.....	61
4.16 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท T5 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส.....	61
4.17 พลาสมิดแสดงออกถูกผสม pSP3.102.....	63
4.18 พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII.....	64
4.19 ผลการวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังชักนำให้ผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 ใน 12.5 เฟอร์เซ็นต์โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	66
4.20 ผลการวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังจากทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์ใน 12.5 เฟอร์เซ็นต์โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	67
4.21 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1.....	69
4.22 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท T5.....	69
4.23 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของไอโซเลท C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB และเมื่อเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร.....	71

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ ไอโซเลท T5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB และเมื่อเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร.....	72
4.25 ผลของฟูราโนนต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ ไอโซเลท C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ที่เติมฟูราโนนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์.....	74
4.26 ผลของฟูราโนนต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของ ไอโซเลท T5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ที่เติมฟูราโนนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์.....	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในอดีตเป็นที่เข้าใจกันว่า แบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวนั้นมีรูปแบบการดำรงชีวิตอย่างอิสระ เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเมื่อมีอาหารพอเพียง แต่ในปัจจุบัน ด้วยความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ทำให้เราได้ทราบว่าแบคทีเรียไม่ได้ใช้อย่างอิสระ แบคทีเรียจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและมีการทำงานร่วมกันกับเซลล์อื่นๆ เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เช่น มีพฤติกรรมในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีอาหาร หรือมีการรวมกลุ่มกันสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) เป็นต้น แบคทีเรียมีความสามารถในการเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ไม่ว่าจะเป็นอาหาร อุณหภูมิ ความกดดัน พิเศษหรือสารพิษ ทำให้ต้องมีการปรับตัวในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้อย่างทันท่วงที เพื่อที่จะมีชีวิตรอดอยู่ต่อไป โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีเป็นสัญญาณติดต่อสื่อสารระหว่างกันและกันและร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง แบคทีเรียแกรมลบจะใช้โมเลกุลสัญญาณ (signal molecule) ขนาดเล็กในการติดต่อสื่อสาร เช่น สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (*N*-acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะสร้างเปปไทด์ (peptide) ขนาดเล็กในการติดต่อสื่อสาร (Dunny and Leonard, 1997; Greenberg, 2000)

ควอรัมเซนซิง (quorum sensing) เป็นกลไกการติดต่อสื่อสารของแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อจำนวนประชากรของเซลล์แบคทีเรีย นั่นคือ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นของประชากรสูง เซลล์จะผลิตโมเลกุลสัญญาณขนาดเล็กออกมาและสามารถจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ที่มีความจำเพาะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (Fuqua *et al.*, 1994) โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่แบคทีเรียผลิตขึ้นนี้ถูกสร้างจากเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (acyl-homoserine lactone synthase) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI การสร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะใช้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรโคอะมิโนและ acyl acyl-carrier protein (acyl-ACP) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นสารตั้งต้น (Moré *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996) เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แบ่งเซลล์และมีจำนวนประชากรหนาแน่น จะเกิดการสร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากโปรตีน LuxI ขึ้นมา หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxR ที่จำเพาะต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะเข้าจับกับโมเลกุลสัญญาณและทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมระดับการถอดรหัส (transcription regulator) ของยีนเป้าหมาย โปรตีน LuxR ประกอบด้วย 2 โดเมน (domain) คือ โดเมนด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ

(C-terminal DNA-binding domain) สำหรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมายและโดเมนด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (N-terminal acyl-homoserine lactone binding domain) เมื่อโปรตีน LuxR จับกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนแล้วจะส่งเสริมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างทางสรีรวิทยาได้

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่มีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่แบคทีเรียอยู่ร่วมด้วยสามารถจัดได้เป็น 2 ประเภท คือ ความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันหรือซิมไบโอซิส (symbiosis) เช่น แบคทีเรีย *Vibrio fischeri* กับปลาหมึก (*Euprymna scolopes*) เมื่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในอวัยวะของปลาหมึกเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประชากรมากพอ แบคทีเรียจะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนออกมา โมเลกุลเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนจะจับกับรีเซพเตอร์ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม LuxR เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ (complex) ซึ่งคอมเพล็กซ์นี้จะเข้าจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนลูซิเฟอเรส (luciferase) ทำให้เกิดการกระตุ้นการถอดและแปลรหัสของยีนลูซิเฟอเรส ส่งผลให้เกิดการเรืองแสงขึ้น (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht and Silverman, 1984; 1987) ปลาหมึกจะใช้การเรืองแสงที่อวัยวะที่แบคทีเรียอาศัยอยู่พรางตัวหนีศัตรูในยามค่ำคืน รวมถึงการหาคู่ผสมพันธุ์ ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียก็จะได้รับสารอาหารที่มีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ในตัวปลาหมึกเป็นการตอบแทน

ความสัมพันธ์อีกประเภทหนึ่งคือ ความสัมพันธ์แบบปรสิตระหว่างผู้ให้อาศัย (host) กับแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณและมีความสัมพันธ์เป็นแบบปรสิต ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งปกติแล้วเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic bacterium) ในมนุษย์และสัตว์ เมื่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* บุกรุกเข้าสู่ร่างกายของผู้ให้อาศัยจะผลิตปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factor) หลายชนิดที่ถูกควบคุมด้วยระบบควอรัมเซนซิง (Fuqua and Greenberg, 1998) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนชนิด 3-oxo-C12-HSL จากการทำงานของโปรตีน LasI เมื่อโมเลกุลสัญญาณเข้าจับกับรีเซพเตอร์ LasR จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อีลาสเทส (elastase) ที่ทำหน้าที่ย่อยอีลาสติน (elastin) และคอลลาเจน (collagen) นอกจากนี้ ยังยับยั้งการทำงานของอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น (Passador *et al.*, 1993) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เข้าไปเจริญอยู่ในปอดของผู้ป่วยจะเข้าไปเกาะกับเนื้อเยื่อปอด จากนั้นจะเพิ่มจำนวนที่บริเวณพื้นผิวของปอดจนมีลักษณะเป็นชั้น ซึ่งมีคุณสมบัติที่เคลื่อนที่ได้ (twitching) หลังจากนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไมโครโคโลนี (microcolony) และขยายขนาดเป็นไบโอฟิล์มซึ่งมีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด บริเวณภายนอกไบโอฟิล์มจะถูกห่อหุ้มด้วยสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีช่องให้สารอาหาร แร่ธาตุ และน้ำ รวมถึงของเสียผ่านเข้าออกได้ การที่แบคทีเรียอยู่ร่วมกันเป็นไบโอฟิล์มจึงทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ (Parsek and Greenberg, 2000)

แบคทีเรียที่มีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์นั้นสามารถแยกได้จากหลายแหล่งที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่แล้วจะแยกได้จากดินและน้ำ เช่น แบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Vibrio* มักแยกได้จากน้ำทะเล น้ำในบริเวณปากแม่น้ำและแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามชายฝั่ง หรืออาจพบอยู่กับสัตว์ทะเลจำพวกปลาและปลาหมึก (Thompson *et al.*, 2004) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถแยกได้จากดินและน้ำ (Fuqua and Greenberg, 1998) ในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคก็อาจพบแบคทีเรียที่มีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ได้ เช่น แบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ซึ่งก่อให้เกิดโรคนุ่มเน่า (soft-rot) ในมะเขือเทศและพืชเศรษฐกิจอื่นๆ รวมทั้งแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งเนื้องอก (crown gall tumors) (Farrand *et al.*, 1996)

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รายได้หลักส่วนหนึ่งของประเทศจึงได้มาจากการส่งออกผลิตภัณฑ์ประมงต่างๆ โดยเฉพาะการส่งออกกุ้ง ซึ่งสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายหมื่นล้านบาท กุ้งที่เกษตรกรไทยนิยมนำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ กุ้งขาว กุ้งกุลาดำ เป็นต้น โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น อาหาร อุณหภูมิ ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำ พีเอช ความเค็ม ความหนาแน่น รวมถึงปัญหาการเกิดโรคระบาดอันจะทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Subasinghe, 1997) สาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอาจเนื่องมาจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย หรือ รา โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียฉวยโอกาส เช่น *Vibrio* sp. ที่ก่อโรค vibriosis (Moriarty, 1999; Zhang and Austin, 2000) การป้องกันและรักษาโรคของสัตว์น้ำโดยการใช้ยาปฏิชีวนะหรือยามาเขื่อนั้นยังไม่ค่อยประสบความสำเร็จมากนัก (Subasinghe, 1997) นอกจากนี้ การใช้ยาในความถี่และปริมาณสูงจะนำไปสู่การดื้อยาอย่างรวดเร็วและเกิดการตกค้างในตัวของกุ้ง การป้องกันโรคที่ประสบความสำเร็จทำได้โดยต้องปรับปรุงการจัดการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการป้องกันการติดเชื้อก่อโรคจากฟาร์มหนึ่งไปสู่อีกฟาร์มหนึ่ง การปรับปรุงคุณภาพน้ำ (Subasinghe, 1997) การหลีกเลี่ยงสภาวะเครียดและการมีสุขลักษณะที่ดี (Brock and Bullis, 2001)

ยุทธวิธีทางเลือกที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างประสบความสำเร็จมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้ระบบน้ำเขียว (Tendencia and dela Peña, 2003) การบำบัดโดยใช้แบคทีเรียโอฟาจ (Nakai and Park, 2002) การใช้โปรไบโอติก (Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Sakai, 1999; Smith *et al.*, 2003) การใช้วัคซีน (Newman, 1993; Gudding *et al.*, 1999; Heppell and Davis, 2000) และอีกวิธีการหนึ่งคือ การรบกวนการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานพบว่าแบคทีเรียก่อโรคที่มีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์จะบุกรุกเข้าไปในเซลล์ผู้ให้อาศัย จากนั้น จึงผลิตปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคออกมา จนกระทั่งมีประชากรมากเกินกว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ให้อาศัยจะรับได้ เซลล์ผู้ให้อาศัยจึงตายลง (Donabedian, 2003) ดังนั้น การยับยั้งการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคจะนำไปสู่การลดการผลิตปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (Jones *et al.*, 1993; Swift

et al., 1999) การรบกวนการติดต่อกึ่งสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคจึงน่าจะเป็นหนทางหนึ่งในการลดการความรุนแรงของโรคโดยไม่ต้องพึ่งยาปฏิชีวนะ

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 คัดเลือกแบคทีเรียจากกุ่มและบ่อเลี้ยงกุ่มที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตน
- 1.2.2 ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ่มและบ่อเลี้ยงกุ่มที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตน โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA
- 1.2.3 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สัญญาณโมเลกุลเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนในแบคทีเรียที่คัดเลือก
- 1.2.4 ศึกษาการผลิตและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนจากแบคทีเรียที่คัดเลือก
- 1.2.5 ศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนโดยใช้สารเคมีและรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตเนส

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษา

เก็บตัวอย่างกุ่มและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ่ม นำกุ่มและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ่มมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร LB นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทดสอบการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนกับเชื้อ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตน ในรูปของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตน เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน ศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ รวมทั้งศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตนโดยใช้สารฟูราโนนและรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรีนแลคโตเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดของแบคทีเรียจากกึ่งและน้ำในบ่อเลี้ยงกึ่งที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน รวมทั้งทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนและศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรีย อันจะนำมาซึ่งการพัฒนาแนวทางในการควบคุมการก่อโรคมของแบคทีเรียในกึ่ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

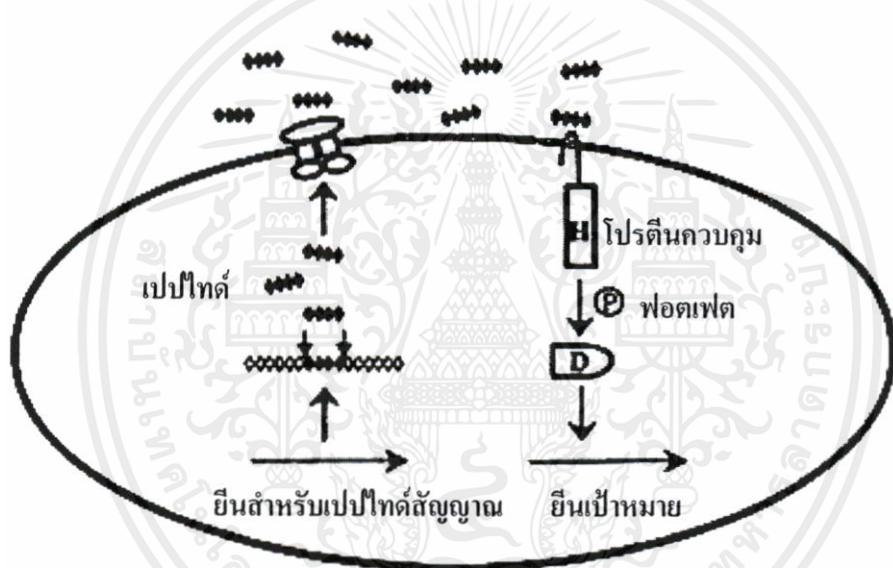
### 2.1 การสื่อสารของแบคทีเรีย

การสื่อสารของแบคทีเรียได้ถูกค้นพบขึ้นเมื่อประมาณ 30 ปีมาแล้ว โดยพบครั้งแรกในแบคทีเรียทะเลเรืองแสง *Vibrio fischeri* และ *V. harveyi* (Nealson and Hastings, 1979) แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้มีเอนไซม์ที่ตอบสนองต่อการเรืองแสง โดยเอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีนในโอเปอรอน *luxCDABE* (Engebrecht and Silverman, 1984; Miyamoto *et al.*, 1988) การเรืองแสงจะเกิดขึ้นโดยอาศัยกลไกที่ว่า เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนประชากรจนถึงระดับหนึ่ง จะมีการสร้างโมเลกุลสัญญาณที่ใช้ในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ และส่งโมเลกุลสัญญาณนี้ออกมานอกเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของโมเลกุลสัญญาณสูงขึ้นก็จะจับกับรีเซพเตอร์และเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดและแปลรหัสของยีนในโอเปอรอน *luxCDABE* ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ลูซิเฟอเรสและเกิดการเรืองแสงขึ้น (Nealson and Hastings, 1979) การติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์แบคทีเรียนั้นมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกทางสรีรวิทยาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะในแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. (Dawson and Sia, 1931) การคอนจูเกชัน (conjugation) ในแบคทีเรีย *Enterobacter faecalis* (Dunny and Winans, 1999) และการเกิดฟรุติติงบอดี (fruiting body) ใน *Myxococcus xanthus* (Dworkin and Kaiser, 1985) เป็นต้น ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถติดต่อสื่อสารกันได้โดยใช้โมเลกุลสัญญาณที่เซลล์แต่ละเซลล์ผลิตขึ้น มาในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่างๆ ในทิศทางเดียวกัน โมเลกุลสัญญาณที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมาจะมีความหลากหลายเพื่อให้การตอบสนองต่อประชากรแบคทีเรียเป็นไปอย่างเหมาะสมในสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ โดยสามารถแบ่งการติดต่อสื่อสารของแบคทีเรียได้เป็น 2 ชนิด คือ การติดต่อสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวกและการติดต่อสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งจะผลิตโมเลกุลสัญญาณที่แตกต่างกัน

### 2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก

เอกสารนี้แบคทีเรียแกรมบวกใช้การติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ในการควบคุมพฤติกรรมและการแสดงออกทางสรีรวิทยาเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น การสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ใน *Bacillus subtilis* (Hoch, 1993) และการสร้างปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคใน *Staphylococcus aureus* (Novick and Muir, 1999) กลไกพื้นฐานที่แบคทีเรีย

แกรมบวกแต่ละชนิดใช้ในการสื่อสารมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยจะหลั่งโมเลกุลสัญญาณประเภท โอลิโกเปปไทด์ออกมา โมเลกุลสัญญาณนี้จะไม่ถูกหลั่งออกไปนอกเซลล์โดยตรง แต่จะจับกับ โปรตีนขนส่งประเภท ABC (ATP-binding cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น โอลิโกเปปไทด์ซึ่ง มีขนาดเล็กกลง จากนั้น จึงถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ เปปไทด์นี้จะถูกจดจำจากโปรตีนเซนเซอร์ สำหรับไคเนส (sensor kinase protein) ที่เซลล์เมมเบรน เซนเซอร์ที่ได้รับเปปไทด์นี้จะเร่งปฏิกิริยา การเติมฟอสเฟตด้วยตนเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทีดีนและเกิดการย้ายหมู่ ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุมที่อยู่ข้างเคียง เมื่อมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนควบคุมบริเวณ กรดอะมิโนแอสปาร์เตตแล้ว โปรตีนนี้อาจกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้ เกิดการตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น (รูปที่ 2.1) (Novick and Muir, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997; Miller and Bassler, 2001)



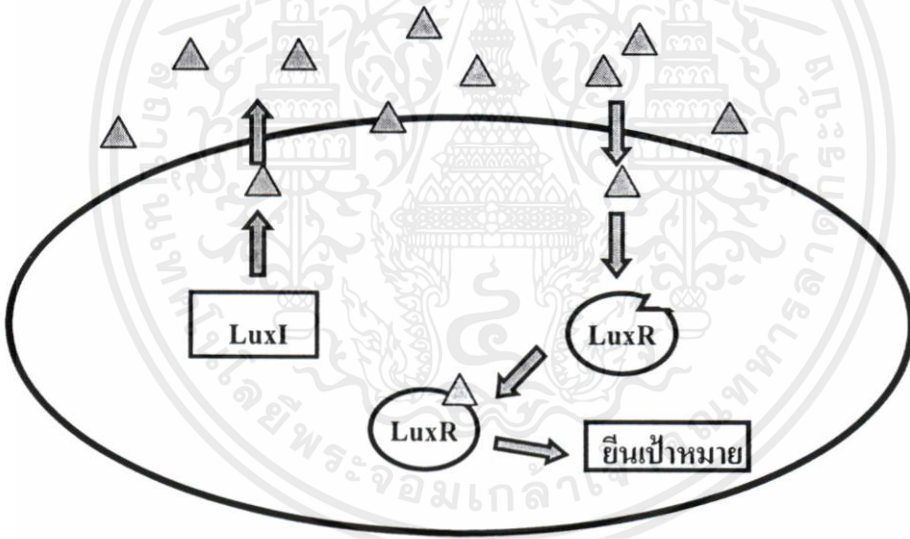
รูปที่ 2.1 กลไกการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Miller and Bassler (2001)

### 2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

ในทศวรรษที่ผ่านมา มีการค้นพบการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 25 ชนิด (Parsek and Greenberg, 2000) และพบว่าการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ใน แบคทีเรียแกรมลบเกือบทุกชนิดยกเว้น *V. harveyi* และ *M. xanthus* ล้วนมีกลไกคล้ายคลึงกับ *V. fischeri* กลไกของการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ประกอบด้วย โปรตีนควบคุม 2 ชนิดที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *luxI* และ *luxR* (รูปที่ 2.2) โดยโปรตีน LuxI มี คุณสมบัติเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ

เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนแล้วหลั่งออกมาออกเซลล์ เมื่อปริมาณโมเลกุลสัญญาณถึงระดับหนึ่ง โมเลกุลสัญญาณก็จะไปจับกับโปรตีน LuxR ซึ่งคอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นนี้เข้าจับกับโปรโมเตอร์ของ ยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการถอดรหัส โปรตีน LuxR จึงเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการ ถอดรหัสของยีน (Engebrecht and Silverman, 1984) โปรตีน LuxR ประกอบด้วย 2 โดเมน คือ โดเมนด้านปลาย C ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (C-terminal DNA-binding domain) ซึ่งจะจับกับ โปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายและสามารถจับกับโปรโมเตอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันได้หลายชนิด (Choi and Greenberg, 1991) และโดเมนด้านปลาย N ที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโม เซอรินแลคโตน (N-terminal acyl-homoserine lactone-binding domain) ส่วนโปรตีน LuxI จะ กระตุ้นให้มีการจับกันระหว่าง S-adenosylmethionine และ acyl acyl-carrier protein ได้อย่างจำเพาะ (Slock *et al.*, 1990) แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน แลคโตนได้มากกว่าหนึ่งชนิด โดยในการทำงานของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส เพื่อสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณต้องมีความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยเฉพาะ acyl acyl-carrier protein เป็นอย่างมาก (Miller and Bassler, 2001)



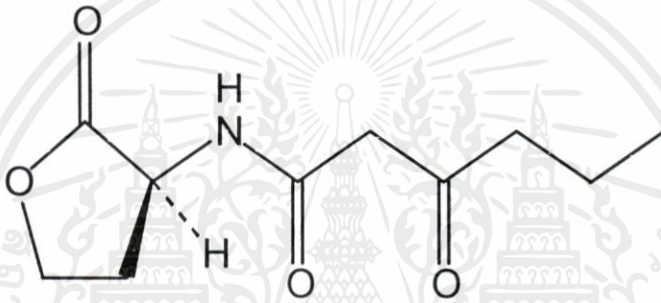
รูปที่ 2.2 กลไกการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Miller and Bassler (2001)

## 2.4 สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

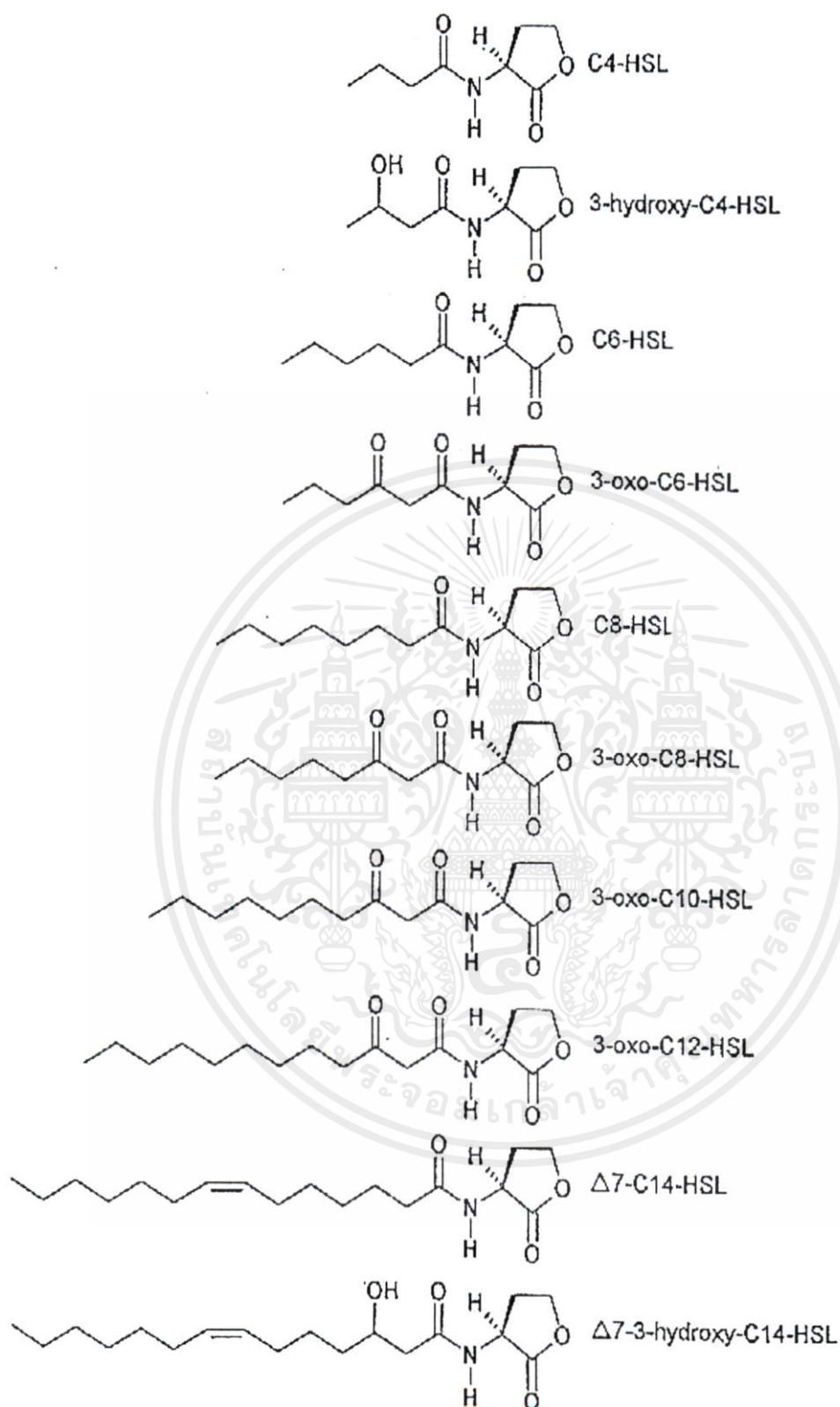
สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเป็นโมเลกุลสัญญาณที่ใช้ในการติดต่อสื่อสารระหว่าง เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแต่ละชนิดจะสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอริน แลคโตนที่มีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน ซึ่งประกอบด้วยหมู่เอซิล (acyl group) เชื่อมกับโฮโม

เซอร์รีนแลคโตน (homoserine lactone) โดยจะมีความแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่ข้างเอซิล (acyl side chain) ที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4-16 อะตอม จำนวนคาร์บอนที่พบมักเป็นเลขคู่ คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อาจมีหมู่แทนที่ (substituted group) ได้แก่ หมู่ออกซิ (oxo) และไฮดรอกซี (hydroxy) หรือไม่มีหมู่แทนที่ (Fuqua and Eberhard, 1999; Greenberg, 2000) ตัวอย่างของ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รีนแลคโตน ได้แก่ 3-oxo-C6-HSL ซึ่งมีความยาวของสายโซ่เอซิลที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอมและตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่เอซิลมีหมู่ oxo (รูปที่ 2.3) แบคทีเรียต่างชนิดกันจะมียีนที่ควบคุมการถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รีนแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไป (รูปที่ 2.4) โมเลกุลสัญญาณเหล่านี้จะส่งผลให้ กระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมายแตกต่างกันออกไปตามชนิดของแบคทีเรีย (ตารางที่ 2.1)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รีนแลคโตนชนิด 3-oxo-C6-HSL

ที่มา : สรัญญา (2546)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
**รูปที่ 2.4** โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่  
 เอซิลแตกต่างกัน

ที่มา : Fuqua and Eberhard (1999)

ตารางที่ 2.1 ชนิดของ โมเลกุลสัญญาณเอชดีโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆ และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

แบคทีเรีย	โปรตีนควบคุม	ชนิดของโมเลกุลสัญญาณ	หน้าที่
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	3-oxo-C6-HSL	การเรืองแสง
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AhyI/AhyR	C4-HSL	การผลิตเซอร์บิน โปรตีนเอส และเมทิลโดโปรตีนเอส
<i>Aeromonas salmonisida</i>	AsaI/AsaR	C4-HSL	การผลิตเอโกโซโปรตีนเอส
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	3-oxo-C8-HSL	การสังถ่าย Ti พลาสมิด
<i>Burkholderia cepacia</i>	CcpI/CcpR	C8-HSL	การผลิตโปรตีนเอสและซีเคอโรเฟอร์ (siderophore)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI/CviR	C6-HSL	การผลิตตีไวโอลาซิน (violacein) ไฮโดรเจนไซยาไนด์ สารปฏิชีวนะ เอโกโซโปรตีนเอส และเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitinolytic enzyme)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	EagI/EagR	3-oxo-C6-HSL	ยังไม่ทราบแน่ชัด
<i>Erwinia carotovora</i>	(a) ExpI/ExpR (b) CarI/CarR	3-oxo-C6-HSL	(a) สังเคราะห์เอนไซม์ที่หั่นออกนอกเซลล์ (b) สังเคราะห์สารปฏิชีวนะคาร์บาเพนัม (Carbapenem)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ExpI/ExpR	3-oxo-C6-HSL	ควบคุมการสังเคราะห์เพคตินเอส
<i>Erwinia stewartii</i>	EsaI/EsaR	3-oxo-C6-HSL	สังเคราะห์แคปซูลพอลิแซ็กคาไรด์ (capsular polysaccharide) และเกี่ยวข้องกับความสามารถของโรค
<i>Pseudomonas aerofaciens</i>	PszI/PszR	C6-HSL	สังเคราะห์สารปฏิชีวนะฟีนาซีน (phenazine)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	โปรตีนควบคุม	ชนิดของโมเลกุลสัญญาณ	ชิ้นเป้าหมายและหน้าที่
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(a) LasI/LasR (b) RhlI/RhlR	(a) 3-oxo-C12-HSL (b) C4-HSL	(a) การผลิตเอ็กโซโปรติเอส และการสร้างไบโอฟิล์ม (b) การผลิตแรมโนลิปิด (rhamnolipid)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	SolI/SolR	C6-HSL, C8-HSL	ยังไม่ทราบแน่ชัด
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	(a) RhiI/RhiR (b) CinI/CinR	(a) C6-HSL (b) 3-hydroxy-7-cis-C14-HSL	(a) เกี่ยวข้องกับฮิน rhizosphere (b) การควบคุมระบบควอรัมเซนซิงแบบเป็นขั้นๆ (Quorum sensing)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerI/CerR	7,8-cis-C14-HSL	ป้องกันการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrI/?	C4-HSL	การเคลื่อนที่ของเซลล์และการผลิตเอ็กโซโปรติเอส
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanI/VanR	3-oxo-C12-HSL	ยังไม่ทราบแน่ชัด
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YenI/YenR	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	ยังไม่ทราบแน่ชัด
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	(a) YpsI/YpsR (b) YtbI/YtbR	(a) 3-oxo-C6-HSL (b) C8-HSL	(a) การควบคุมระบบควอรัมเซนซิง แบบเป็นขั้นๆ (b) ควบคุมการรวมกลุ่มและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

ที่มา : Miller and Bassler (2001)

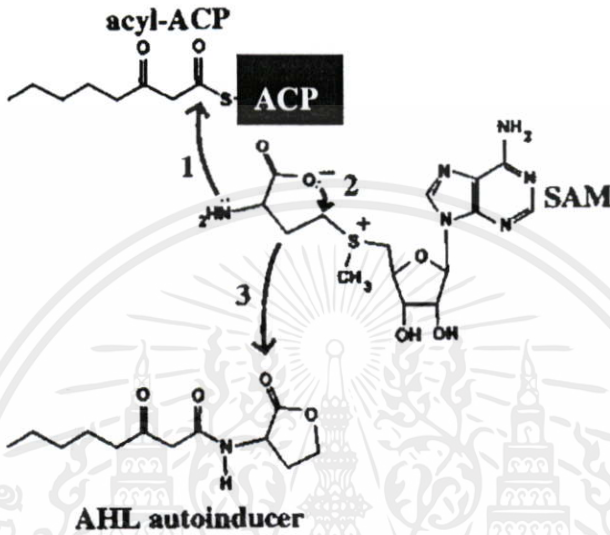
การทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น ใช้โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) แต่วิธีดังกล่าวนี้ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากไม่สามารถทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ จึงได้มีการพัฒนาการทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีปริมาณน้อยโดยใช้ reporter strain ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือมีความไวสูง แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็น reporter strain คือ *Escherichia coli* หรือ *A. tumefaciens* ที่มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมให้ไม่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ แต่จะมีรีเซพเตอร์จับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอก (Brelles-Mariño and Bedmar, 2001) รีเซพเตอร์นี้มักจะเชื่อมกับ reporter gene เช่น ยีนที่ผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (*luxCDABE*) (Boettcher and Ruby, 1995; Winson *et al.*, 1998) ยีนที่ผลิตฟลูออเรสเซนต์สีเขียว (green fluorescent protein) (Andersen *et al.*, 2001) ยีนที่ผลิตสีไวโอลาซีน (violacein) (Blosser and Gray, 2000; Ravn *et al.*, 2001) และยีนที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (*lacZ*) (Shaw *et al.*, 1997) เชื้อ reporter strain บางชนิดจะมีความจำเพาะต่อเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนบางโครงสร้างเท่านั้น แต่ก็มี reporter strain หลายชนิดที่สามารถตรวจสอบเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้หลายโครงสร้าง (Yan *et al.*, 2007)

แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยสายพันธุ์นี้ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม นั่นคือ ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 มียีน *luxR* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน LuxR ที่ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ ยีน *luxR* จะอยู่ติดกับโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* และภายในเซลล์ยังทำให้ขาดยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จึงไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ เมื่อรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ ก็จะทำให้เกิดกลไกกระตุ้นบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* ให้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (Fuqua and Winans, 1996)

## 2.5 การสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้น *S*-adenosylmethionine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรโคอะมิโน และกับ acyl-acyl carrier protein ที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยมีเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *luxI* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แบคทีเรียแต่ละชนิดจะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไปขึ้นกับความแตกต่างของลำดับกรโคอะมิโนในโปรตีน LuxI

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสมีบทบาทในการกระตุ้นการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยทำให้สารตั้งต้น *S*-adenosylmethionine จับกับ acyl-acyl carrier protein ด้วยพันธะเอไมด์ที่บริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของสายโซ่เอซิล จากนั้น จะเกิดการย้ายหมู่แลคโตน (lactonization) ของสารตัวกลางพร้อมกับเมธิลไทโออะดีโนซีน (methylthioadenosine) เกิดเป็นสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

ที่มา : Miller and Bassler (2001)

## 2.6 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

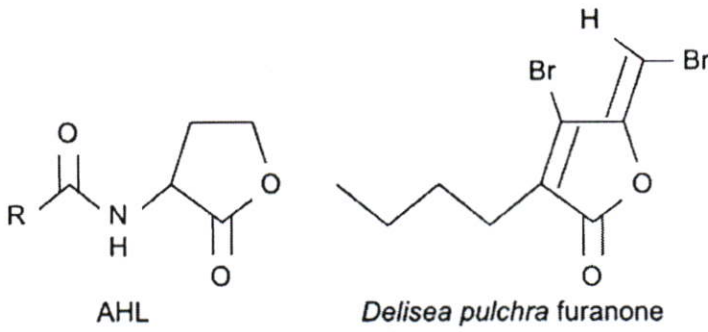
ปัจจุบันพบว่า การศึกษาการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคมียะประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและความรุนแรงของการเกิดโรคของแบคทีเรียก่อโรคในคนหรือในพืชได้ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด คือ การติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์เพื่อสร้างไบโอฟิล์มในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ซึ่งทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถทำลายเชื้อได้ มีรายงานวิจัยพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Davies *et al.*, 1998) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาในแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวเฉาในข้าวโพดหวาน โดยในแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะมี

คุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคลดลง (Beck von Bodman and Farrand, 1995) ดังนั้น สารเคมีหรือ เอนไซม์ที่สามารถยับยั้งการติดต่อดีเอ็นเอระหว่างเซลล์แบคทีเรียได้ จึงมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรียและความรุนแรงในการก่อโรค เอนไซม์ที่ยับยั้งการติดต่อดีเอ็นเอระหว่างเซลล์แบคทีเรียนั้นมีหลายชนิด เช่น เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส (acyl homoserine lactonase) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (Dong *et al.*, 2002) เอนไซม์เอซิลเลส (acylase) จากแบคทีเรีย *Ralstonia* และ *Variovorax paradoxus* (Leadbetter and Greenberg, 2000 ; Lin *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า สารเคมีบางชนิดที่พืชสร้างขึ้นมีผลยับยั้งการติดต่อดีเอ็นเอระหว่างเซลล์แบคทีเรียได้ เช่น ฟูราโนน (furanone) เป็นต้น (Givskov *et al.*, 1996)

### 2.6.1 ฟูราโนน (furanone)

ในสาหร่ายทะเลสีแดง *Delisea pulchra* มีการพัฒนากลไกในการป้องกันตัวเองจากการแพร่กระจายของแบคทีเรีย โดยผลิตสารฮาโลจีนฟูราโนน (halogenated furanone) (Givskov *et al.*, 1996) สารประกอบฮาโลจีนฟูราโนนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (รูปที่ 2.6) สารประกอบนี้จะเข้าจับกับโปรตีน LuxR ทำให้โปรตีน LuxR ไม่สามารถทำงานได้ (Manefield *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000) มีรายงานว่าสารประกอบ (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2-(5H)-furanone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารฮาโลจีนฟูราโนนลงในอาหารแข็งอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อก่อโรค *Serratia liquefaciens* ได้ (Givskov *et al.*, 1996) และฟูราโนนยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงที่อยู่ใน reporter plasmid ของ *S. liquefaciens* โดยไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ มีรายงานว่าฟูราโนนสามารถยับยั้งการผลิตสารพิษที่หลั่งออกมาออกเซลล์ (extracellular toxin) ในแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ได้ และเมื่อฉีดสารสกัดเชื้อจากที่ได้จากส่วนของ *V. harveyi* ที่เจริญในอาหารที่มีฮาโลจีนฟูราโนนให้แก่กุ้งก้ามกราม *Penaeus monodon* พบว่าอัตราการตายของกุ้งลดลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับฟูราโนน (Manefield *et al.*, 2000) และจากการทดลองในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* PAO1 พบว่า เมื่อเติม (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2-(5H)-furanone ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ (Hentzer *et al.*, 2003) การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



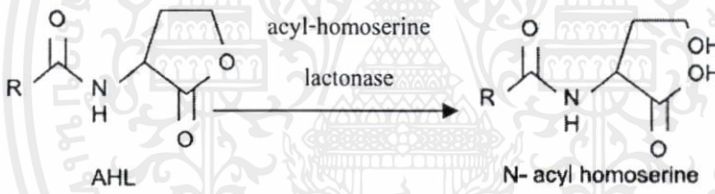
รูปที่ 2.6 โครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่างเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนกับฮาโลจีเนทฟุราโนนที่ได้จาก *D. pulchra*

ที่มา : Defoirdt *et al.* (2004)

### 2.6.2 เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอส

เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งการทำงานของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *aiiA* (AiiA : AHL inactivating activity) ซึ่งพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 240B1 (Dong *et al.*, 2000) จากการวิเคราะห์ทางเคมีและชีวเคมีพบว่า โปรตีน AiiA มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสที่ย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนบริเวณวงแหวนแลคโตน (รูปที่ 2.7) และพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถทำให้ 3-oxo-C6-HSL มีความเข้มข้นลดลงจาก 20 ไมโครโมลาร์เหลือเพียง 5 ไมโครโมลาร์ภายในเวลา 10 นาที (Dong *et al.*, 2001) นอกจากนี้ มีรายงานการพบโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ AiiA ในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หลายสปีชีส์ รวมทั้ง *Bacillus cereus* และ *B. mycoides* เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AiiA ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AiiA มีความคล้ายกันถึงร้อยละ 90 (Defoirdt *et al.*, 2004) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแล้ว แบคทีเรียแกรมลบก็มีการสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสจากยีน *attM* โดยโปรตีน AttM มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน AiiA ร้อยละ 35 (Dong *et al.*, 2002) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสเหล่านี้เป็นพอลิเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยของกรดอะมิโน 250-260 หน่วย มีรายงานว่า เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการทำลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตมาจากเชื้อก่อโรคบางชนิด (Dong *et al.*, 2000) เมื่อยีน *aiiA* ในแบคทีเรีย

*E. carotovora* มีการแสดงออกจะระงับการปล่อยสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนออกนอกเซลล์และลดการสังเคราะห์เอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่ เพคเททที่หลั่งออกมาออกเซลล์ (extracellular pectate) ไลเอส (lyase) เพคตินไลเอส (pectin lyase) และพอลิกลาแลคทูโรเนส (polygalacturonase) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคในพืชอีกด้วย (Dong *et al.*, 2000) นอกจากนี้ ยังมีการทดลองนำยีน *aiiA* ของแบคทีเรียเข้าไปเพิ่มจำนวนในจีโนมของโอบิยาสูบและมันฝรั่งโดยอาศัยกระบวนการทรานสฟอร์มเมชันของแบคทีเรีย *Agrobacterium sp.* เพื่อให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในพืชทั้งสอง โดยหวังว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะช่วยให้พืชป้องกันการบุกรุกจาก *E. carotovora* ได้ เนื่องจากมีการทำลายโมเลกุลสัญญาณที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เท่ากับเป็นการรบกวนการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชทำได้ยากขึ้น และผลจากการทดลองพบว่า มันฝรั่งที่ได้รับยีน *aiiA* จะทนต่อเชื้อ *E. carotovora* ในปริมาณสูงๆ ได้ดีกว่าต้นยาสูบ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้พืชทั้งสองจะสามารถผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้มากขึ้น แต่ก็ยังพบอาการของโรคจุดเน่า เพียงแต่เกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (Dong *et al.*, 2001 ; 2004)



รูปที่ 2.7 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส

ที่มา : Defoirdt *et al.* (2004)

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.7.1 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Hanzelka และ Greenberg (1995) ศึกษาความสามารถของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ติดฉลากด้วย  $^3\text{H}$  ในการจับกับเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่มีการแสดงออกของโปรตีน LuxR จาก *V. fischeri* พบว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ติดฉลากด้วย  $^3\text{H}$  สามารถจับกับเซลล์ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิดที่ถูกตัดบริเวณด้านปลาย C ในโปรตีน LuxR แต่ไม่จับ

กับเซลล์ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิดที่ถูกตัดบริเวณด้านปลาย N ในโปรตีน LuxR ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า บริเวณปลายด้าน N ในโปรตีน LuxR เป็นบริเวณเข้าจับของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1996 Hanzelka และ Greenberg ศึกษาการผลิต 3-oxo-C6-HSL ใน *E. coli* ซึ่งได้รับพลาสมิดที่มียีน *luxI* ของ *V. fischeri* พบว่าทั้งเมทไทโอนีน (methionine) S-adenosylmethionine (SAM) จำเป็นต่อการสังเคราะห์ 3-oxo-C6-HSL ไซโคลิวซีน (cycloleucine) ที่เป็นตัวช่วยในการสังเคราะห์ SAM สามารถขัดขวางการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า SAM จำเป็นต่อการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมากกว่าเมทไทโอนีน จากการวิเคราะห์ปริมาณของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตขึ้นและติดฉลาก  $^{15}\text{N}$ -เมทไทโอนีน ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ทำให้ทราบแน่ชัดว่า SAM เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Schaefer และคณะ (1996) ศึกษาการแยกโปรตีน LuxI จากแบคทีเรีย *V. fischeri* ให้บริสุทธิ์ และศึกษานิวคลีโอไทด์ของสารตั้งต้นของโปรตีน LuxI ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 3-oxo-C6-HSL และ C6-HSL โดยพบว่า SAM และ acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ที่มีความยาวของคาร์บอน 6 อะตอมในหมู่เอซิล (hexanoyl-ACP) มีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 3-oxo-C6-HSL และ C6-HSL มากที่สุด เมื่อมีการแทนที่ SAM ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น เมทไทโอนีน เอส-อะดีโนซิลโฮมอซิเตอีน โฮโมเซอริน หรือโฮโมเซอรินแลคโตนจะไม่พบการสังเคราะห์ 3-oxo-C6-HSL และ C6-HSL

Hanzelka และคณะ (1999) พบว่านอกจากโปรตีน LuxI ใน *V. fischeri* ที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3-oxo-C6-HSL แล้ว ยังมีโปรตีน AinS อีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน C8-HSL แต่ไม่จับโปรตีน AinS อยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม LuxI แต่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน LuxM ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน 3-oxo-C4-HSL ในแบคทีเรีย *V. harveyi* จากการสกัดโปรตีน AinS ให้บริสุทธิ์และศึกษานิวคลีโอไทด์ของสารตั้งต้นที่โปรตีน AinS ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณ พบว่าโปรตีน AinS ใช้ SAM และ octanoyl-ACP เป็นสารตั้งต้นเหมือนกันกับโปรตีน LuxI ดังนั้น จึงจัดให้โปรตีน AinS เป็นโปรตีนกลุ่มที่ 2 ของเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด

ไม่ผ่านการแก้ไขหรือตัดแต่งเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
 McDougald และคณะ (2000) ศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *luxR* ของ *Vibrio vulnificus* ซึ่งเป็นยีนที่มีคุณลักษณะคล้ายคลึงกับยีน *luxR* ที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการ

ถอดรหัสของยีนใน *lux operon* ของ *V. harveyi* จากการทดลองพบว่า ยีนนี้ถอดและแปลรหัสได้เป็น open reading frame (ORF) ที่สมบูรณ์ จึงตั้งชื่อยีนนี้ว่า *smcR* เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *luxR* ของ *V. harveyi* พบว่ามีความเหมือนร้อยละ 90 และมีความคล้ายคลึงร้อยละ 95 จึงอาจเป็นไปได้ว่ายีน *smcR* นี้ น่าจะอยู่ในกลุ่มของยีนที่ตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นอกจากนี้ ยังนำดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* และ *Vibrio* sp. อีก 6 สายพันธุ์ไปไฮบริดซ์กับตัวติดตามของยีน *luxR* พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมียีนดังกล่าว จึงสรุปได้ว่ายีน *luxR* นั้นพบได้ทั่วไปในแบคทีเรียทะเลที่อยู่ในกลุ่ม *Vibrio*

Gray และ Garey (2001) วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของโปรตีนในกลุ่ม LuxI และ LuxR ทั้งหมด 76 ตัวที่พบในแบคทีเรียแกรมลบหลายสายพันธุ์ โดยพบว่าโปรตีน LuxI และ LuxR ที่ควบคุมการสร้างและการทำงานของโมเลกุลสัญญาณเหล่านี้มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกัน นอกจากนี้ เมื่อมีวิวัฒนาการของแบคทีเรีย จะมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้ได้

Buch และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากแบคทีเรีย *V. anguillarum* หลายสายพันธุ์ โดยนำเซลล์แบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้ reporter strain *A. tumefaciens* (pTLR4) และ *Chromobacterium violaceum* (CV026) วิเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณด้วยเทคนิค TLC พบว่า *V. anguillarum* ทุกสายพันธุ์ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C12-HSL และจากการศึกษาการผลิต 3-oxo-C12-HSL ของ *V. anguillarum* ในปลา rainbow trout พบว่า เมื่อนำตัวอย่างไตและกล้ามเนื้อของปลาที่มีชีวิต ปลาที่ใกล้ตาย และปลาที่เพิ่งตายไป ซึ่งได้รับเชื้อมาวิเคราะห์พบว่า ปลาทุกชนิดมี 3-oxo-C12-HSL

Bruhn และคณะ (2004) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเนื้อหมูที่อยู่ในภาชนะปิดสุญญากาศ 5 ตัวอย่างและนำมาทดสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ 96 ไอโซเลท และพบว่ามี 92 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว จะเป็นแบคทีเรีย *Hafnia alvei* จากการคัดเลือกว่า *H. alvei* 6 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงและเก็บส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC แสดงให้เห็นว่าค่า  $R_f$  และโครงสร้างของเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่แบคทีเรียผลิตได้มีความคล้ายคลึงกับ 3-oxo-C6-HSL และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) ช่วยยืนยันได้ว่าเป็น 3-oxo-C6-HSL นำไปใช้

Buchholtz และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนใน *V. anguillarum* โดยเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต จากผลการทดลองในหลอดทดลองพบว่า แบคทีเรีย *V. anguillarum* หลายสายพันธุ์และหลายซีโรไทป์ (serotype) ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิดเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงสภาวะในหลอดทดลองต่างๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเหล็ก มีผลต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC สามารถวัดปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่แบคทีเรียผลิตได้สูงที่สุดใน 3-oxo-C10-HSL และ 3-hydroxy-C6-HSL ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียด้วยเทคนิค HPLC-high resolution Mass Spectrometry ยังพบโครงสร้างของ 3-hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL และ 3-oxo-C12-HSL จากการศึกษาในปลาที่ได้รับเชื้อแล้ว นำสารสกัดจากปลาที่ติดเชื้อมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC-high resolution Mass Spectrometry พบสาร 3-oxo-C10-HSL 3-hydroxy-C6-HSL ในอวัยวะของปลาที่ตายด้วยโรค Vibriosis เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในหลอดทดลองกับในเนื้อเยื่อปลาที่ได้รับเชื้อพบว่า สามารถพบ 3-hydroxy-C10-HSL ในปริมาณสูงในหลอดทดลอง ในขณะที่พบ 3-hydroxy-C6-HSL ในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ

Medina-Martínez และคณะ (2006a) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิต C4-HSL ของ *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ 519 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ระหว่าง  $10^8$ - $10^9$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบการผลิต C4-HSL และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงพบการผลิต C4-HSL ในปริมาณเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ ในอาหารเหลว LB ที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.1 และ 0.2 เชื้อมีการผลิต C4-HSL แต่ไม่พบ C4-HSL ในอาหารที่เติมกลูโคสร้อยละ 1.0

Pinto และคณะ (2007) ตรวจพบการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในแบคทีเรียแกรมลบชนิดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychotrophic bacteria) ที่แยกได้จากน้ำนมดิบที่แช่เย็น พบว่าแบคทีเรียจำนวนร้อยละ 84 จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดนั้นสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ แสดงว่าการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสามารถพบได้ทั่วไปในแบคทีเรียชนิดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ และเป็นไปได้ว่าควอรัมเซนซิงอาจมีบทบาทสำคัญต่อการเน่าเสียของอาหาร และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yan และคณะ (2007) ได้ศึกษาการวัดปริมาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้ reporter strain ที่สร้างจากแบคทีเรีย *E. coli* ที่มียีน *luxR* และยีน *luxICDABE* ของ *V. fischeri* โดยวัดค่าจากการเรืองแสง พบว่า สามารถวัดปริมาณ 3-oxo-C6-HSL ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 3 นาโนโมลาร์ และสามารถวัดปริมาณ C8-HSL ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 780 นาโนโมลาร์ การทดสอบด้วยวิธีนี้มีความไวสูงมาก นอกจากนี้ ยังมีข้อดีอีกหลายประการ เช่น รวดเร็ว ไม่ต้องสกัดตัวอย่างหรือทำตัวอย่างให้เข้มข้นและใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย

## 2.7.2 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Dong และคณะ (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *aiiA* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 240B1 พบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้หลายชนิด จากการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียนี้อยู่ในสปีชีส์ *B. thuringiensis* จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนที่ได้พบว่า โปรตีนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีนนี้อยู่ในกลุ่มของโปรตีนเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Hentzer และคณะ (2003) ศึกษาการลดความรุนแรงของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* PAO1 โดยการใช้สารเคมีเป็นตัวยับยั้งการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ พบว่าฟูราโนน-ซี30 (furanone-C30) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟูราโนนที่ได้จากธรรมชาติ สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลที่ใช้ในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ และศึกษาผลของฟูราโนนต่อการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ที่ได้รับฟูราโนนนั้นมีความไวต่อยาปฏิชีวนะโทบรามัยซิน (tobramycin) และ SDS มากขึ้น นอกจากนี้ ยังแสดงให้เห็นว่าฟูราโนนยังทำงานได้ดีในปอดของหนูที่ติดเชื้อของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มี reporter plasmid ที่มียีนเรืองแสง (*gfp*) เชื่อมกับยีน *lasB* โดยพบว่าเมื่อหนูได้รับฟูราโนนจากการฉีดเข้าไปทางใต้ผิวหนังและเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง จะพบสัญญาณเรืองแสงจาก *P. aeruginosa* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เมื่อฟูราโนนหมดไปจากกระแสเลือด สัญญาณการเรืองแสงก็จะปรากฏขึ้นอีกครั้ง

Park และคณะ (2003) ศึกษา ยีน *ahID* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. โดยเริ่มจากแยกเชื้อที่สามารถย่อยเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3-oxo-C6-HSL ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ ในจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ไอโซเลท IBN 110 ซึ่งอยู่ในจีโนม *Arthrobacter* sp. สามารถเจริญได้รวดเร็วในอาหารที่มี 3-oxo-C6-HSL และสามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่

และหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันได้หลายชนิด เมื่อเพาะเลี้ยง *Arthrobacter* sp. IBN 110 ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคพืช *E. carotovora* พบว่าสามารถลดปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนและกิจกรรมการย่อยสลายเพคเตท (pectate lyase activity) ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นได้ทำการโคลนยีน *ahID* จาก *Arthrobacter* sp. IBN 110 และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีน *ahID* สามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 273 หน่วยและจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass Spectrometry แสดงให้เห็นว่าโปรตีน AhID สามารถย่อยสลายวงแหวนแลคโตนของ 3-oxo-C6-HSL เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AhID กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนชนิดอื่น เช่น โปรตีน AiiA จาก *Bacillus* sp. 240B1 โปรตีน AiiA จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kyushuensis* และโปรตีน AttM จาก *A. tumefaciens* พบว่า มีความเหมือนกัน (identity) ร้อยละ 25, 26 และ 21 ตามลำดับถึงแม้ว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกันน้อย แต่ก็สามารถพบลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ HXD H~H~D ของเอนไซม์ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนอนุรักษ์นี้มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

Ulrich (2004) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน AiiA ที่ได้จาก *Bacillus anthracis* ใน *Burkholderia thailandensis* พบว่า ไม่สามารถตรวจพบ C10-HSL และ C8-HSL แต่พบ C6-HSL ในปริมาณที่ลดลง นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน AiiA ที่ได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ A24 ใน *B. thailandensis* พบว่าปริมาณการผลิต C6-HSL, C8-HSL และ C10-HSL ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ สรุปผลการทดลองทั้งหมดได้ว่า การแสดงออกของโปรตีน AiiA ใน *B. thailandensis* ทำให้ลดการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการรวมกลุ่มการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนแปลงการใช้สารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 (Ti)(pCF218)(pCF372)

3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$  *lac* U169 ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15)  
*hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)

3.1.3 *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.2.1.1 Luria-Bertani medium (LB)

3.2.1.2 AT medium

3.2.1.3 SOB medium

#### 3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

3.2.2.1 สเปกตินอมัยซิน (spectinomycin) (Sigma, USA)

3.2.2.2 เตตราไซคลิน (tetracycline) (Wako Pure Chemical, Japan)

3.2.2.3 แอมพิซิลลิน (ampicillin) (Wako Pure Chemical, Japan)

3.2.2.4 กานามัยซิน (kanamycin) (Sigma, USA)

#### 3.2.3 เอนไซม์

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

3.2.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)

3.2.3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Promega, USA)

3.2.3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (Promega, USA)

3.2.3.5 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงบนสื่อใดๆ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.4.1 ฝาแฝดแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Invitrogen, USA)
- 3.2.4.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

### 3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

- 3.2.5.1 อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.5.2 เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.5.3 ดิออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) (Promega, USA)
- 3.2.5.4 สีข้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) (ซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโมไฟนิลอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 1 เท่า)
- 3.2.5.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.5.6 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)
- 3.2.5.7 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.8 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.9 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) (Merck, Germany)
- 3.2.5.10 ไลโซไซม์ (lysozyme) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)
- 3.2.5.11 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)
- 3.2.5.12 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE-buffer saturated phenol) (USB, USA)
- 3.2.5.13 คลอโรฟอร์ม (chloroform) (Sigma, USA)
- 3.2.5.14 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol) (Sigma, USA)
- 3.2.5.15 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.5.16 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.5.17 สารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก)
- 3.2.5.18 สารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม กรุณาแจ้งให้ชัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

- 3.2.6.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (PCR Cloning Kit) (Qiagen, Germany)

3.2.6.2 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen, Germany)

3.2.6.3 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit) (Qiagen, Germany)

### 3.2.7 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase activity)

3.2.7.1 O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (ONPG) (Sigma Aldrich, Germany)

3.2.7.2 บัฟเฟอร์ Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06 โมลาร์,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04 โมลาร์, KCl 0.01 โมลาร์,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 โมลาร์, เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) 0.05 โมลาร์)

3.2.7.3 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

### 3.2.8 โปรตีนมาตรฐาน

3.2.8.1 BenchMark™ Protein Ladder (ขนาด 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 และ 220 กิโลดาลตัน) (Invitrogen, USA)

### 3.2.9 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาโปรตีน

3.2.9.1 อะคริลาไมด์ (acrylamide) (Bio-Rad, USA)

3.2.9.2 บิส-อะคริลาไมด์ (bis-acrylamide) (Bio-Rad, USA)

3.2.9.3 บัฟเฟอร์ Electrode 5 เท่า (Tris-HCl 0.125 โมลาร์, glycine 7.2 เปอร์เซ็นต์, SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์)

3.2.9.4 โบรโมฟีนอลบลู (Sigma, USA)

3.2.9.5 สีย้อมโปรตีน (coomassie brilliant blue R-250 0.25 เปอร์เซ็นต์, เมทานอล 5 เปอร์เซ็นต์, กรดอะซิติก 7.5 เปอร์เซ็นต์)

3.2.9.6 บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์แถบโปรตีน (Tris-HCl 0.5 โมลาร์, SDS 10 เปอร์เซ็นต์, กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์, โบรโมฟีนอลบลู 0.5 เปอร์เซ็นต์, เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์)

3.2.9.7 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) (Bio-Rad, USA)

3.2.9.8 Bradford Reagent (Bio-Rad, USA)

เอกสารนี้  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.10 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน

3.2.10.1 ฟุราโนน (2,5,-Dimethyl-4-hydroxy-(2H)-furanone) (Sigma, USA)

### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) Olympus, UFX-DX, Japan
- 3.3.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) Hirayama, Hiclave HV-50, Japan
- 3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle, Z383K, Germany
- 3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ISSCO, HS123, Thailand
- 3.3.5 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) Gallenkamp, T490188, UK
- 3.3.6 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) Scientific promotion, Binder control, Japan
- 3.3.7 เครื่องผสมสาร (vortex) Genies 2, USA
- 3.3.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan
- 3.3.9 คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
- 3.3.10 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator ultrasonic cleanser) Vibracell, A064400, USA
- 3.3.11 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงแบบหัว probe (sonicator ultrasonic) Vibracell, CV-33, USA
- 3.3.12 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) Perkin Elmer, DNA thermal cycler 480, USA
- 3.3.13 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) Amersham Pharmacia Biotech, Sweden
- 3.3.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) Cyberscan, 2000, Singapore
- 3.3.15 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) Bio-Rad, model 1000, USA
- 3.3.16 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (thermoblock) Biosan, TDB-120 Thermostat, Germany
- 3.3.17 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเอกสารโรสเจล (gel documentation analysis) Syngene, BTS-20-M Germany
- 3.3.18 ชุดทำโปรตีนให้บริสุทธิ์อัตโนมัติ Profinia™ Protein Purification System (Biorad, USA)
- 3.3.19 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.3.20 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)

### 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร  
 ลาดกระบัง

## 3.5 วิธีการศึกษา

### 3.5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน

#### 3.5.1.1 การเก็บตัวอย่างกึ่งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกึ่งและการคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกึ่งของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กึ่งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกึ่ง อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา นำตัวอย่างกึ่งมาลอกเปลือกออก ตัดเนื้อเยื่อออกมาบดให้ละเอียด กระจายเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อในอาหาร LB จากนั้น นำแบคทีเรียที่อยู่ในอาหาร LB และน้ำจากบ่อเลี้ยงกึ่งมาเจือจางในระดับ  $10^{-1}$  และ  $10^{-2}$  ต่อจากนั้น ปิเปิดน้ำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมา 100 ไมโครลิตร มากระจายบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง แยกเชื้อจนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกัน

#### 3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.5.1.1 มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง

#### 3.5.1.3 การศึกษาปริมาณของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนโดยวิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase activity)

##### 3.5.1.3.1 การแยกส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงดังวิธีในข้อ 3.5.1.2 และแยกส่วนใสด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใส (supernatant) นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

##### 3.5.1.3.2 การเตรียมเชื้อ reporter strain *A. tumefaciens* A136

นำเชื้อ *A. tumefaciens* A136 จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิตร และมียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกติโนมายซิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของอาหาร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกติโนมายซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของอาหาร ตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.4 ถึง 0.5

### 3.5.1.3.3 การวิเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอสซีไอเอ็มเซอร์รีนแลคโตนโดยวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

ปิเปตสารละลายเซลล์จากข้อ 3.5.1.3.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เดิมส่วนใส่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในข้อ 3.5.1.3.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและบันทึกผล ปิเปตเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเติมบัฟเฟอร์ Z (ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.06 โมลาร์, โซเดียมไคไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 โมลาร์, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.001 โมลาร์, เบต้าเมอแคปโตเอทานอล 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ SDS ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside (ONPG) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้น นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตรตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสตามวิธีการคำนวณของ Sambrook และ Russel (2001) ดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส} = \frac{1,000 \times [A_{420} - (1.75 \times A_{550})]}{\text{เวลา (นาที)} \times 0.1 \times A_{660}}$$

### 3.5.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอเอ็มเซอร์รีนแลคโตนโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

#### 3.5.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขี่ยเชื้อทั้งหมดมากระจายในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีไลโซไซม์ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายฟีนอลอิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 420 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน พลิกหลอดกลับป้อมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ นำส่วนที่เป็นของเหลวมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิมิตัวจนไม่เห็นตะกอนสีขาวระหว่างชั้นฟีนอลกับชั้นของน้ำ ดูดส่วนใสมาดำเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น

3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (พีเอช 7.5) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอลอิมิตัวปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้น สกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซอเมทิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซอเมทิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ดูดส่วนใสมาเติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ 10 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (พีเอช 7.5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.5.2.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัมในฟลาस्कที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเจลสตาบิลไรเซอร์ส่วนเจลสตาบิล 1 ส่วนต่ออะกาโรส 100 ส่วน เทใส่แม่พิมพ์ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วนำเจลมาวางบนอ่าง (chamber) เทบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA ลงไปในอ่างจนท่วมเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

### 3.5.2.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

#### (Polymerase Chain Reaction : PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ FDNA (5'-TCCTACGCGAGGCAGCAGT-3') และไพรเมอร์ RDNA (5'-TTGTGCGGGCCCCCGTCAAGT-3') (วิภาวี, 2547) และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 3 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1
ไพรเมอร์ FDNA 5 มิลลิโมลาร์	2.5
ไพรเมอร์ RDNA 5 มิลลิโมลาร์	2.5
แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์	3
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	1
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	34.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที } 35 รอบ
Annealing	50	
Primer Extension	72	
Final Extension	72	10 นาที

#### 3.5.2.4 การแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิสดังวิธีในข้อ 3.5.2.2 แล้ว ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำนักเจล จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด หลังจากทีเจลละลายเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำนักเจล ผสมให้เข้ากัน นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน collection tube ปิดฝาสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่

เติมบัพเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.5.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม Blast (Altschul *et al.*, 1997)

## 3.5.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI*

### 3.5.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกตามวิธีในข้อ 3.5.1.2 และสกัดจีโนมดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ

3.5.2.1 เพิ่มปริมาณยีน *luxI* ใช้คู่ไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> (5'-GA(A/G)(A/T)C(A/T)GATGAGTA(T/C)GA-3') และ QSI<sub>2</sub> (5'-GATGT(T/G)AC(T/C)GTTACATA-3') (วิภาวี, 2547) โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเหมือนดังตารางที่ 3.1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 3 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที } 30 รอบ
Annealing	40	
Primer Extension	72	
Final Extension	72	10 นาที

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังในข้อที่ 3.5.2.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ดังในข้อที่ 3.5.2.4 ต่อไป

### 3.5.3.2 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.5.2.4 มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive (ภาคผนวก ข) ปฏิกิริยา ligation mixture 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัพเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต) pDrive 50 นาโนกรัม

ผลิตภัณฑ์ PCR 40 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ligation mixture บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

### 3.5.3.3 การเตรียม Competent Cell และการทรานสฟอร์มเมชัน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน คุณเซลล์แขวนลอย 0.4 มิลลิลิตรลงในอาหาร SOB 100 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง คุณเซลล์แขวนลอยใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ 100 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น ละลายตะกอนด้วยสารละลาย RF1 33.3 มิลลิลิตร (1/3 ของปริมาตร SOB) แช่น้ำแข็ง 15 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย RF2 4 มิลลิลิตร (1/25 ของปริมาตร SOB) แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร ปิเปต competent cell 100 ไมโครลิตร และสารละลาย ligation 10 ไมโครลิตรที่ได้จากข้อ 3.5.3.2 ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมากระจายบนอาหารแข็ง LB ที่เตรียมขบวนการหมักให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำงานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pDrive ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิด pDrive หลังจากที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินจึงทำให้ได้โคโลนีสีขาว

### 3.5.3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis

นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.5.3.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมขบวนการหมักให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ด้วยสารละลาย Solution I ที่ประกอบด้วยซูโครส 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (พีเอช 8) 25 มิลลิโมลาร์ และ EDTA (พีเอช 8) 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น เติมน้ำสารละลาย Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล และ SDS 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา ตั้งหลอดทิ้งไว้บน

น้ำแข็ง จากนั้น เติมสารละลาย Solution III ซึ่งเตรียมโดยนำไปผสมอะซีเตทเข้มข้น 5 โมลาร์ 60 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 10 วินาที ตั้งหลอดทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสใส่หลอดใหม่เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (พีเอช 7.5) 20 ไมโครลิตร

### 3.5.3.5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ (200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	7
ปริมาตรสุทธิ	20

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 3.5.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และหยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Reactions วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน *luxI* ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับโปรตีน LuxI ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastX

### 3.5.4 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

#### 3.5.4.1 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 75 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.1.3.3

#### 3.5.4.2 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 75 มิลลิเมตร โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.1.3.3

#### 3.5.4.3 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนภายใต้อุณหภูมิต่างๆ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 75 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.1.3.3

### 3.5.5 การศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

#### 3.5.5.1 การสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส

##### 3.5.5.1.1 การทรานสเฟอร์พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21 (DE3)

เอกสารนี้ทำการทรานสเฟอร์พลาสมิด *pET30a-attM* ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *attM* นำเข้าจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส (วิภาวี, 2547) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) ตามวิธีในข้อที่ 3.5.3.3 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการ

ทรานสฟอร์มเมชัน โดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.5.5.1.2 การสกัดพลาสมิด pET30a-attM และตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์

PCR โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

นำโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.5.1.2 มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkali lysis ตามวิธีในข้อที่ 3.5.3.4 ทดสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* โดยนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 3.5.5.1.3 การทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pET30a-attM

เพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET30a-attM จำนวน 1 โคลน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 นำเซลล์มาเจือจางในระดับ  $10^{-5}$  และ  $10^{-6}$  นำเชื้อที่เจือจางในระดับ  $10^{-5}$  มากระจายบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ร่วมกับยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร และอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และนำเชื้อที่เจือจางในระดับ  $10^{-6}$  มากระจายบนอาหารแข็งสูตร LB และอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคลน

### 3.5.5.1.4 การชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโซโมเซอร์รินแลคโตเนสและการทำให้บริสุทธิ์

นำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET30a-attM จำนวน 1 โคลน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงเติมสารละลาย Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนต์ริฟัจ ตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แยกเซลล์ด้วยเครื่องกำเนิด

คลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 เฮอร์เซ็นต์ของ Amplitude ให้ความในการปล่อยคลื่นเสียง 5 วินาที สลับกับการหยุดปล่อยคลื่นเสียง 5 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น นำสารละลายโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Profinia™ Protein Purification System (Bio Rad, USA) โดยนำคอลัมน์ Bio-Scale™ Minicartridges ที่เก็บไว้ในเอทานอลความเข้มข้น 20 เฮอร์เซ็นต์มาล้างด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน เดิมบัฟเฟอร์ Equilibrate เพื่อปรับให้ภายในคอลัมน์มีบัฟเฟอร์ Equilibrate จากนั้น จึงใส่สารละลายโปรตีนที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้างโดยใช้ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้น เดิมบัฟเฟอร์ Elution เพื่อชะโปรตีนที่ต้องการออกมา โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะเข้าสู่ขั้นตอน desalting เพื่อกำจัดอิมิดาโซลออก โดยผ่านคอลัมน์ Minicartridge ใหม่และชะด้วยบัฟเฟอร์ Elution นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยเทคนิค โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

### 3.5.5.1.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์

#### เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียม stacking gel ซึ่งประกอบด้วยอะคริลาไมด์ 4.8 เฮอร์เซ็นต์ T, 0.43 เฮอร์เซ็นต์ C ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.125 โมลาร์ พีเอช 6.8 และ Resolving gel ซึ่งประกอบด้วยอะคริลาไมด์ 12.5 เฮอร์เซ็นต์ T, 11.3 เฮอร์เซ็นต์ C ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.375 โมลาร์ พีเอช 8.8 เมื่อแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลมาไว้ใน chamber เดิม electrode buffer ให้ท่วมเจล ผสมสารละลายโปรตีน 10 ไมโครลิตรกับซีซ้อม 10 ไมโครลิตร (Tris-HCl 0.5 โมลาร์, โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เฮอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 1 มิลลิลิตร, โบรโมฟินอลบลู 0.5 เฮอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเบต้าเมอแคปโตเอทานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยอดโปรตีนมาตรฐานและสารละลายโปรตีนที่ต้องการศึกษาไปในช่อง แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 20 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมโปรตีนในเจลด้วยสี coomassie brilliant blue R250 และกำจัดสีส่วนเกินด้วยสารละลาย destaining

### 3.5.5.1.6 การศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสต่อการ

#### เจริญเติบโตและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดเลือก

เอกสารนี้ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ดังในข้อที่ 3.5.1.2 ใน เดิมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.5.5.1.4 ปริมาณ 0.2 มิลลิกรัม โปรตีนต่อ มิลลิลิตรในชั่วโมงที่แบคทีเรียผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุด วัดค่าการ

ดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.1.3.3

### 3.5.5.2 การสลายโพลีแลกทูโลสด้วยเอนไซม์แลคโตสโดยใช้สารประกอบฟิวราโนน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ดังในข้อที่ 3.5.1.2 เติบโตฟิวราโนนความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ในอาหารที่เพาะเลี้ยง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.1.3.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยเก็บตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบ่อเลี้ยงกุ้ง อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ นำเชื้อที่ได้มาศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนในรูปการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส นำแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนมาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* rDNA จากนั้น ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดแยก เช่น ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ และศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้สารประกอบฟูราโนนและรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตเนส

#### 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 4.1 ก) ตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา (รูป 4.1 ข) มาคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB จนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้งหมด 59 ไอโซเลท โดยแยกได้จากน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 10 ไอโซเลท ตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา จำนวน 22 และ 27 ไอโซเลท ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) จากการศึกษาลักษณะโคโลนิของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่ามีความแตกต่างกันในรูปร่าง สี และลักษณะภายนอกที่ปรากฏ เมื่อวิเคราะห์จากรูปร่างของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB พบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ โคโลนีกลมค่อนข้างรี และไม่มีรูปร่าง นอกจากรูปร่างของโคโลนีที่แตกต่างกันแล้ว สีของโคโลนีก็ยังมี ความแตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะพบโคโลนีสีขาว ครีမ် และสีเหลือง มีบางไอโซเลทเท่านั้นที่พบโคโลนีมีสีเขียว แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง สอดคล้องกับงานวิจัยของกุลวรา (2534) ที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้หลาย



ก

ข

รูปที่ 4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้งของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก) บ่อเลี้ยงกุ้ง อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา (ข)

ชนิด ประกอบด้วย *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *V. harveyi*, *Vibrio fluvialis*, *V. anguillarum*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio splendidus*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Plesiomonas* sp. และ *Aeromonas caviae*

ในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ ทำการคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ซึ่งเป็นอาหารสูตรสมบูรณ์ เนื่องจากประกอบด้วยเปปโตเนและยีสต์สกัดที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ อาหาร LB ยังมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มหรือแบคทีเรียทนเค็มที่เจริญได้ในธรรมชาติ เช่น ในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB เช่นเดียวกับรายงานของ Medina-Martínez และคณะ (2006b) ที่ใช้อาหารสูตร LB ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. ที่คัดแยกได้จากอุจจาระและปลา นอกเหนือจากอาหาร LB แล้ว ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียในอาหารสูตรอื่น เช่น อาหาร NB (Nutrientbroth) โดย Lio-Po และคณะ (2005) เก็บตัวอย่างแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. จากน้ำเขียวที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Broth (NB) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15 กรัมต่อลิตร

#### 4.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน สามารถทำได้โดยการทดสอบกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่เป็น reporter strain จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส โดยอาศัยหลักการที่ว่าภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 มียีน *luxR* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน LuxR ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ ยีน *luxR* จะอยู่ติดกับโปรโมเตอร์ (promotor) ของยีน *lacZ* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส แต่

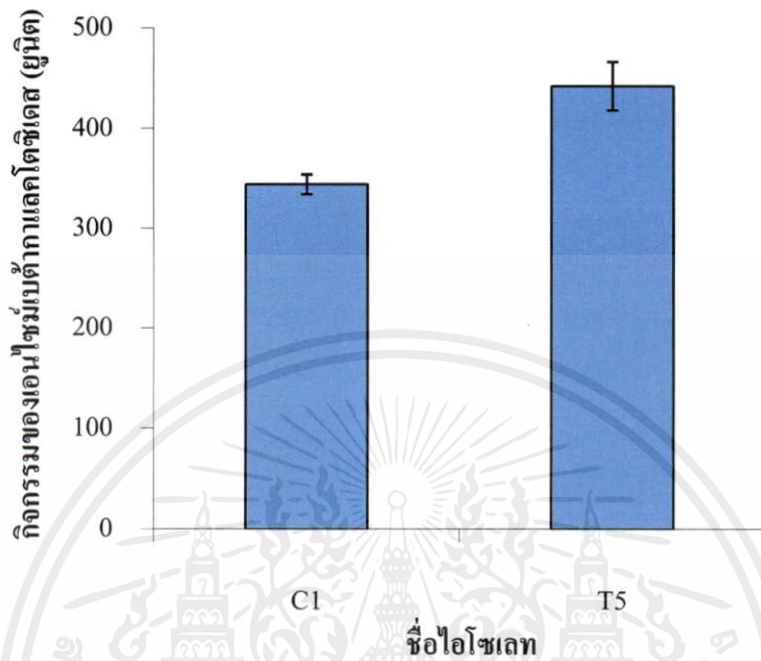
ภายในเซลล์ขาดยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน จึงไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua and Winans, 1996) เมื่อรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ หรือจากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ จะมีกลไกไปกระตุ้นการทำงานของ *lacZ* ให้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็น reporter enzyme ในการติดตามการแสดงออกของยีนและใช้ศึกษาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ โดยการรวมโปรโมเตอร์ที่สนใจเข้ากับยีนของเบต้ากาแลคโตซิเดส วิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำได้โดยวัดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารสีเหลืองของ Nitrophenol จากการย่อยสารตั้งต้น ONPG (Ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีด้วยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุคมวรรณ, 2536) ปฏิกริยาเกิดขึ้นดังสมการ

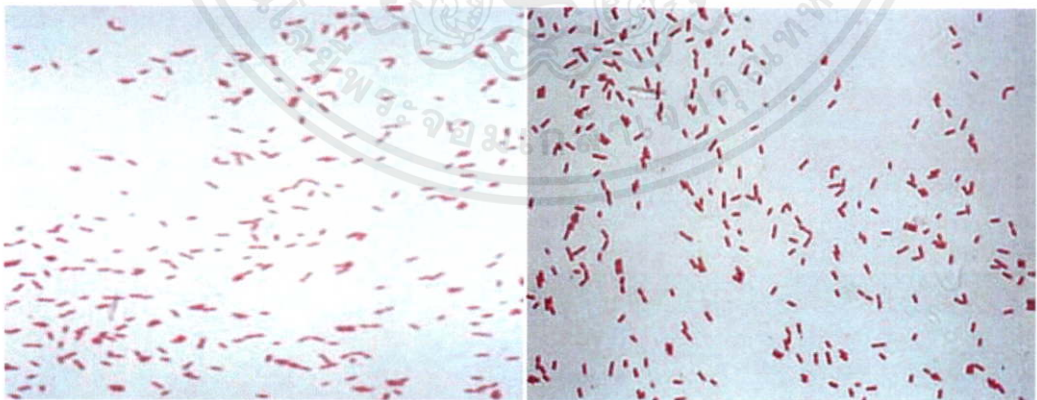


จากการนำแบคทีเรียจากกิ่งและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งบริษัทจำนวน 59 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้ reporter strain *A. tumefaciens* A136 ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า มีตัวอย่างแบคทีเรียเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C1 และ T5 ที่สามารถตรวจพบโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน โดยมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเท่ากับ 335 และ 437 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) แบคทีเรียไอโซเลท C1 คัดแยกได้จากตัวลูกกุ้ง มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก นูน และไอโซเลท T5 คัดแยกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง มีลักษณะโคโลนีกลม สีเขียว ขนาดใหญ่ นูน ขอบเรียบ เรืองแสง เมื่อนำมาศึกษารูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการติดสีแกรม ปรากฏว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีรูปร่างลักษณะเป็นรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ (รูปที่ 4.3)

ในจำนวนแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมด 59 ไอโซเลท มีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถตรวจพบโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน อาจเนื่องมาจากตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บมาได้ทั้งหมดนั้นมีทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบจะติดต่อสื่อสารกันโดยใช้โมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน (Fuqua *et al.*, 1994) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะติดต่อสื่อสารกันโดยใช้โมเลกุลเปปไทด์ขนาดเล็ก (Dunny and Leonard, 1997) ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน ดังนั้น จึงไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ นอกจากนี้ รีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ reporter strain *A. tumefaciens* A136 นั้นอาจจำเพาะกับโครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตน



รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน



ก

ข

รูปที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท C1 (ก) และ T5 (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะผิดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางโครงสร้างเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่ถูกผลิตมาจากแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ ส่วนสาเหตุอีกประการหนึ่งก็คือ อาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บส่วนใส อาจไม่เหมาะสม ทำให้รีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ *A. tumefaciens* A136 ไม่สามารถตรวจพบโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้ หรืออาจตรวจพบได้เพียงเล็กน้อย จากนั้น จึงนำแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ที่ตรวจพบโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนไปทำการศึกษานิคของแบคทีเรีย โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ต่อไป

### 4.3 ผลการศึกษานิคของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท C1 และ T5 เพื่อที่จะจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรียนำมาวิเคราะห์ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนี้ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastN

#### 4.3.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5

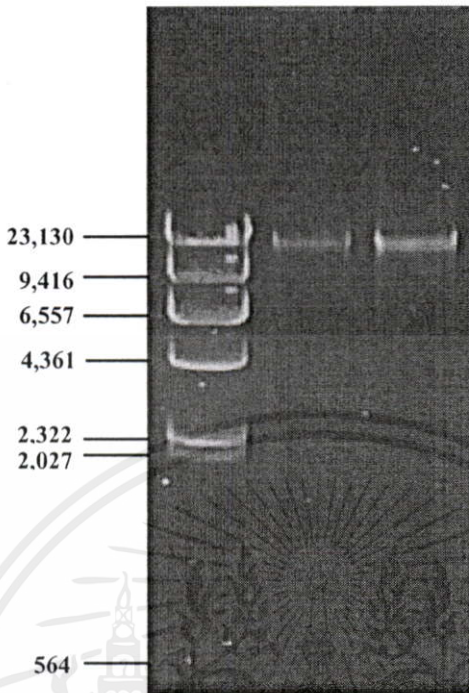
จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1 และ T5 บนอาหารแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลโดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของทั้ง 2 ไอโซเลทปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบ (รูปที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C1 และ T5 มีขนาดประมาณ 23,130 คู่เบสและมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ไม่มีรอยบันของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกย่อย และไม่ปรากฏแถบของอาร์เอ็นเอที่อยู่ต่ำกว่าแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรสต่อไป

ขนาด (คู่เบส)

M

1

2



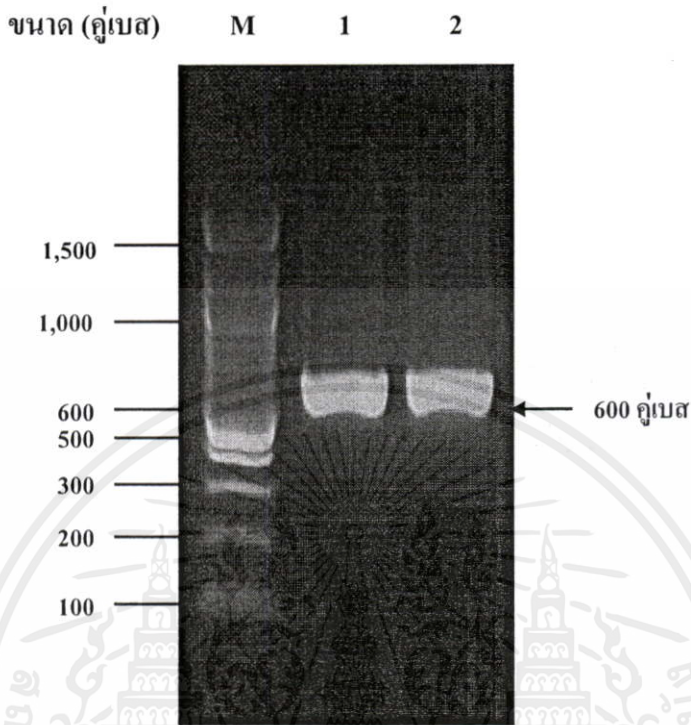
รูปที่ 4.4 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C1 และ T5 จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
- 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C1
- 2 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท T5

#### 4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ดังวิธีการในข้อ 3.5.2.3 ใช้คู่ไพรเมอร์ FDNA และ RDNA และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) ที่ 50 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 2 ไอโซเลท 1 แถบ (รูปที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 2 ไอโซเลท มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.5) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ (วิภาวี, 2547) จากนั้น จึงได้ทำการตัดแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเจลและนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจาก

เจด (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ต่อไป



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

- |   |   |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder               |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต C1 |
| 2 | ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต T5 |

#### 4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต C1 และ T5

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 599 คู่เบส โดยมีความเหมือนกัน 507 คู่เบส และต่างกัน 92 คู่เบส (รูปที่ 4.6) จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของแต่ละไอโซเลตมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ไอโซเลต C1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับกับเบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. โดยมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Vibrio furnissii*

สูงสุดถึง 99 เปอร์เซ็นต์และไอโซเลท T5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Psuedomonas aeruginosa* สูงสุดถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียไอโซเลท C1 จัดเป็นแบคทีเรีย *V. furnissii* และไอโซเลท T5 จัดเป็นแบคทีเรีย *P. aeruginosa* แบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้พบได้ทั่วไปในบ่อเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากสามารถเจริญในน้ำกร่อย หรือน้ำทะเล หรือในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ มีรายงานพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* หลายสปีชีส์สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ เช่น *Vibrio anguillarum* ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C10-HSL (Milton *et al.*, 1997) *V. fisheri* ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C6-HSL (Engebrecht *et al.*, 1983) และ *V. harveyi* ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-hydroxy-C4-HSL (Bassler *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมเลกุลสัญญาณจากแบคทีเรีย *V. furnissii* สำหรับแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ 2 ชนิด คือ 3-oxo-C12-HSL จากโปรตีนในกลุ่ม LasI/LasR และ C4-HSL จากโปรตีนในกลุ่ม RhII/RhIR (De Kievit and Iglewski, 2000) เนื่องจากมีผู้ได้ศึกษา ยีน *lasI* และ ยีน *rhII* ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ไว้ก่อนหน้าแล้ว ในวิทยานิพนธ์นี้ จึงได้สนใจศึกษา ยีน *luxI* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 (*V. furnissii*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะตีพิมพ์หรือในรูปแบบอื่นใด และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C1 และ T5 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ไอโซเลท	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
C1	<i>Vibrio furnissii</i> (M1)	99
	<i>Vibrio furnissii</i> (ATCC 35106)	99
	<i>Vibrio fluvialis</i> (ATCC 389T)	98
	<i>Vibrio sinaloensis</i> (CAIM 636)	98
	<i>Vibrio metschnikovii</i> (H050610-1)	98
T5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SG-1)	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PBCC1)	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MG-P13)	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MML 2212)	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IL1)	99

#### 4.4 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียไอโซเลท C1

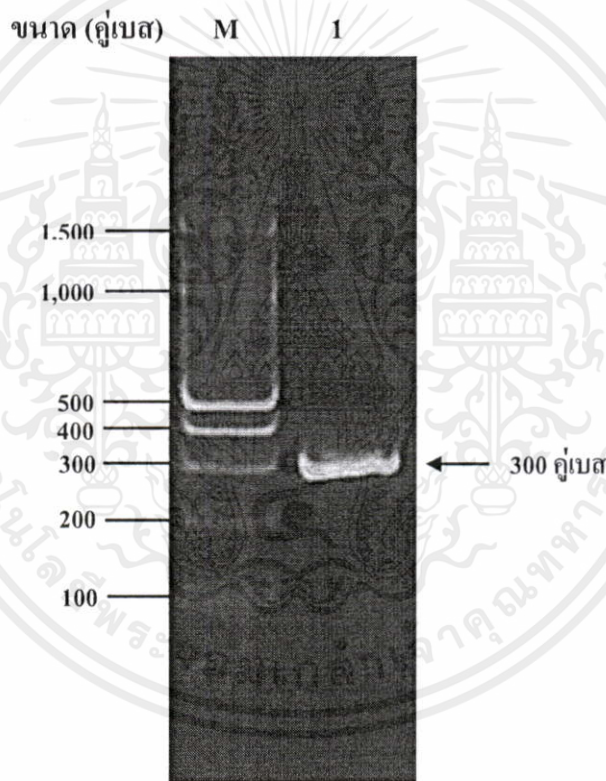
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ทำได้โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท C1 นำมาเพิ่มปริมาณยีน *luxI* โดยใช้คูโพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub> ใช้อุณหภูมิในการจับตัวที่ 40 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้น สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งนั้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกสิ่งเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *luxI* ของไอโซเลท C1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และใช้คู่ไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub> ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อให้จำเพาะกับยีน *luxI* ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. ใช้อุณหภูมิในการจับตัวที่ 40 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ (รูปที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส จากนั้น ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) เพื่อนำไปเชื่อมกับพลาสมิด pDrive ต่อไป



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI*

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ของไอโซเลท C1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* เข้ากับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* DH5 $\alpha$

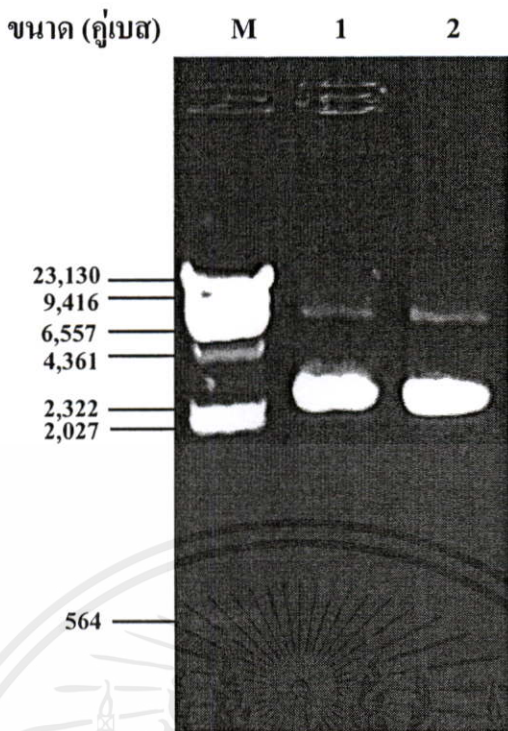
นำชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของยีน *luxI* จากคูโพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub> ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 คู่เบสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชันจากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เวกเตอร์ pDrive มียีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินและมีบริเวณ multiple cloning site อยู่ในยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ X-gal เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน เมื่อเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site จึงทำให้ยีนดังกล่าวไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ ส่งผลทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ทำให้โคโลนีที่ได้เป็นสีขาว จากการทรานสฟอร์มเมชัน คัดเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 2 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

#### 4.4.3 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

จากการนำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkali lysis ตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ว่า pQSC1.1 และ pQSC1.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร พบว่า พลาสมิด pQSC1.1 และ pQSC1.2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.8) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอกับปริมาณของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าพลาสมิด pQSC1.1 และ pQSC1.2 มีปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้น นำพลาสมิดลูกผสม pQSC1.1 และ pQSC1.2 ไปทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป

#### 4.4.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pQSC1.1 และ pQSC1.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการตัดไปวิเคราะห์ด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ไม่ถูกตัดกับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วย



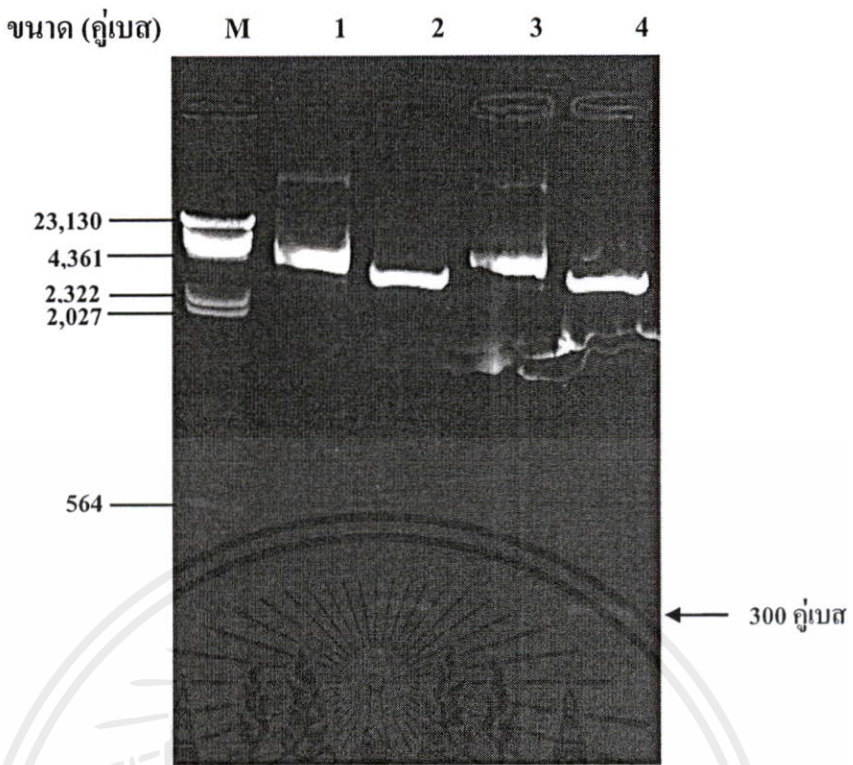
รูปที่ 4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

M	ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III
1	พลาสมิด pQSC1.1
2	พลาสมิด pQSC1.2

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า ในเลนของพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสอง เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 3,800 และ 300 คู่เบส (รูปที่ 4.9 เลนที่ 2 และ 4) โดยแถบแรกเป็นแถบของพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ส่วนแถบที่สองเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 300 คู่เบส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตัดพลาสมิด pQSC1.1 และ pQSC1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ จึงเลือกพลาสมิด pQSC1.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

#### 4.4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1

จากการนำพลาสมิด pQSC1.1 ซึ่งเป็นพลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ของยีน *luxI* จากคูไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub> มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer ใช้ไพรเมอร์ T7 ซึ่งเป็นไพรเมอร์สากลในการวิเคราะห์

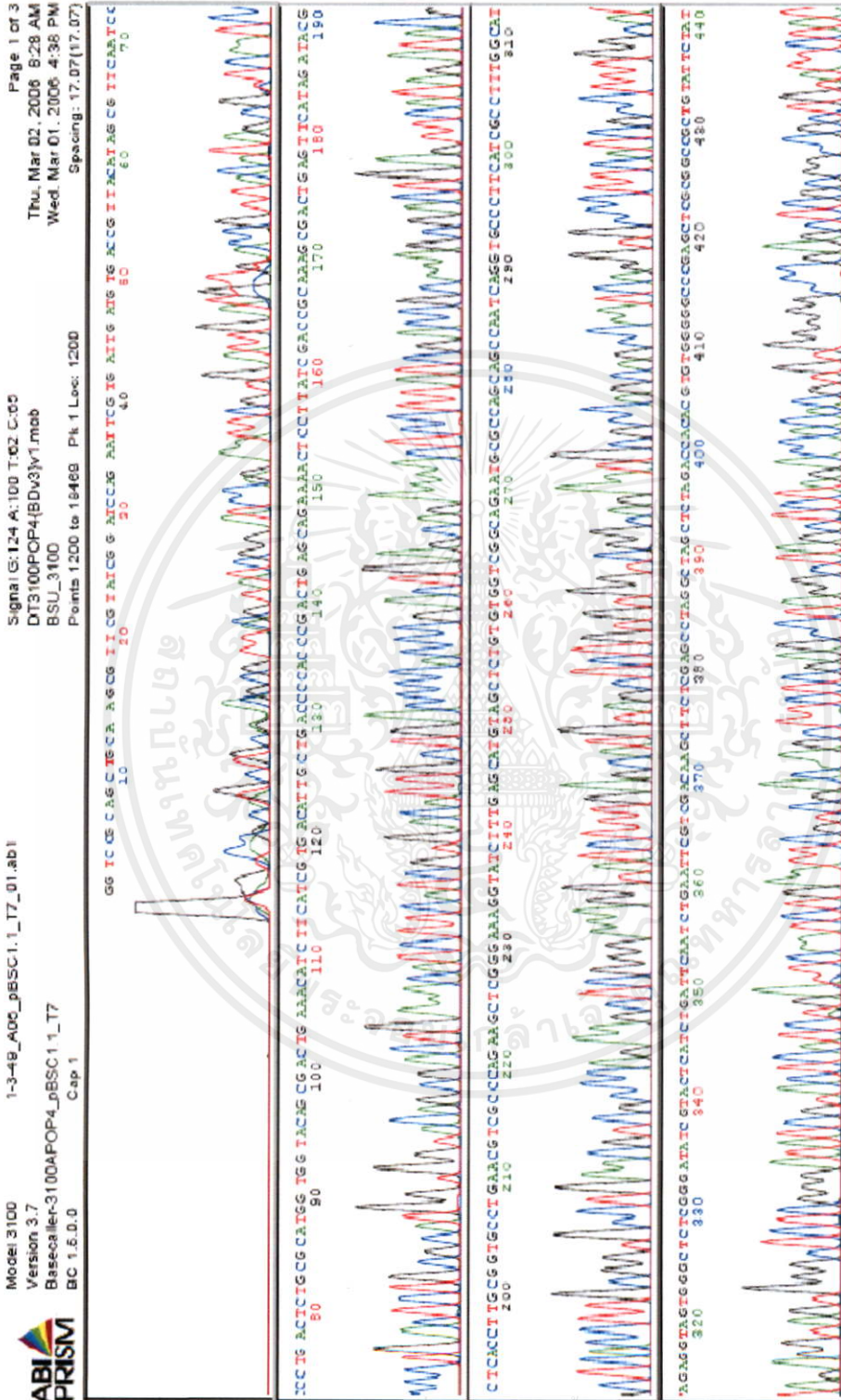


รูปที่ 4.9 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M	ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>
1	พลาสมิด pQSC1.1
2	พลาสมิด pQSC1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>
3	พลาสมิด pQSC1.2
4	พลาสมิด pQSC1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>

ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยแสดงผลดังโครมาโทแกรมรูปที่ 4.10 และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pQSC1.1 มีขนาด 308 คู่เบส (รูปที่ 4.11)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นกรดอะมิโน จะได้กรดอะมิโนทั้งสิ้น 102 หน่วย (รูปที่ 4.11) นำลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pQSC1.1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส ซึ่งเป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม LuxI โดยมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (VanI) ของแบคทีเรีย *V. anguillarum* สูงสุดถึง 84 เปอร์เซ็นต์ และมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (LuxI) ของแบคทีเรีย *V. fischeri* และ *V. salmonicida* สูงถึง 69 และ 65 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

QSI <sub>1</sub>											
1	<b>GAG</b>	<b>TCA</b>	<b>GAT</b>	<b>GAG</b>	<b>TAC</b>	<b>GAT</b>	ATT	CCG	AGA	GCC	30
	E	S	D	E	Y	D	I	P	R	A	
31	CAC	TAC	CTC	TAT	GCC	AAA	GGC	GAT	GAA	GGG	60
	H	Y	L	Y	A	K	G	D	E	G	
61	CAC	CTT	ATT	GGC	TGC	TGG	CGC	ATT	CTG	CCG	90
	H	L	I	G	C	W	R	I	L	P	
91	ACC	ACA	CAG	AGC	TAC	ATG	CTC	AAA	GAT	ACC	120
	T	T	Q	S	Y	M	L	K	D	T	
121	TTT	CCC	GAG	CTT	CTG	GGC	GAC	GTT	CAG	GCA	150
	F	P	E	L	L	G	D	V	Q	A	
151	CCG	CAA	GGT	GAG	CGT	ATC	TAT	GAA	CTC	AGT	180
	P	Q	G	E	R	I	Y	E	L	S	
181	CGC	TTT	GCG	GTC	GAT	AAG	GAG	TTT	TCT	GCT	210
	R	F	A	V	D	K	E	F	S	A	
211	CAG	TCG	GGT	GGG	GTC	AGC	AAT	GTC	ACG	ATG	240
	Q	S	G	G	V	S	N	V	T	M	
241	AAG	ATG	TTT	CAG	TCG	CTG	TAC	CAC	CAT	GCG	270
	K	M	F	Q	S	L	Y	H	H	A	
271	CAG	AGT	CAG	GGG	ATT	GAA	CGC	QSI <sub>2</sub>			
	Q	S	Q	G	I	E	R	<b>TAT</b>	<b>GTA</b>	<b>ACA</b>	300
								Y	V	T	
301	<b>GTC ACA TC</b>										308
	V	T									

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1  
กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ QSI<sub>1</sub> และ QSI<sub>2</sub>

ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากไอโซเลท C1 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. เช่นเดียวกับ *V. anguillarum*, *V. fischeri* และ *V. salmonicida* ดังนั้น ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิดไฮโดรไลสอินแลคโตนซินเทสในแบคทีเรียไอโซเลท C1 ก็จึงมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอซิดไฮโดรไลสอินแลคโตนซินเทสในกลุ่ม *Vibrio* ด้วยกันสูง จากรายงานพบว่า *V. anguillarum* ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรไลสอินแลคโตนซิน 3-oxo-C10-HSL ซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโดรไลสอินแลคโตนที่มีจำนวนคาร์บอนของสายโซ่เอซิด 10 ตัว (Milton *et al.*,

1997) ส่วนแบคทีเรีย *V. fischeri* และ *V. salmonicida* ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนชนิด 3-oxo-C6-HSL ซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีจำนวนคาร์บอนของสายโซ่เอซิด 6 ตัว ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่โมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนของไอโซเลท C1 จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ 3-oxo-C10-HSL มากกว่า 3-oxo-C6-HSL นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pQSC1.1 กับเอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสในกลุ่มแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Burkholderia* sp. พบว่า มีความคล้ายคลึงกัน 56-60 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Burkholderia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในวงศ์ (family) เดียวกัน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตเอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน

**ตารางที่ 4.2** ความคล้ายคลึงและความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pQSC1.1 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ชนิดของแบคทีเรีย	กรดอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Acyl-homoserine-lactone synthase (VanI)	84	74
<i>Vibrio fischeri</i>	Acyl-homoserine-lactone synthase (LuxI)	69	61
<i>Vibrio salmonicida</i>	Acyl-homoserine-lactone synthase (LuxI)	65	53
<i>Burkholderia graminis</i>	autoinducer synthesis protein	60	48
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	autoinducer synthesis protein	60	47
<i>Burkholderia phymatum</i>	autoinducer synthesis protein	59	44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	autoinducer synthesis protein (LasI)	59	43
<i>Burkholderia dolosa</i>	Acyl-homoserine lactone synthetase	59	40
<i>Burkholderia thailandensis</i>	autoinducer synthase (BpsI)	59	36
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acyl-homoserine-lactone synthase (MupI)	57	47
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	autoinducer synthesis protein	57	41
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	autoinducer synthase (BpsI)	56	35

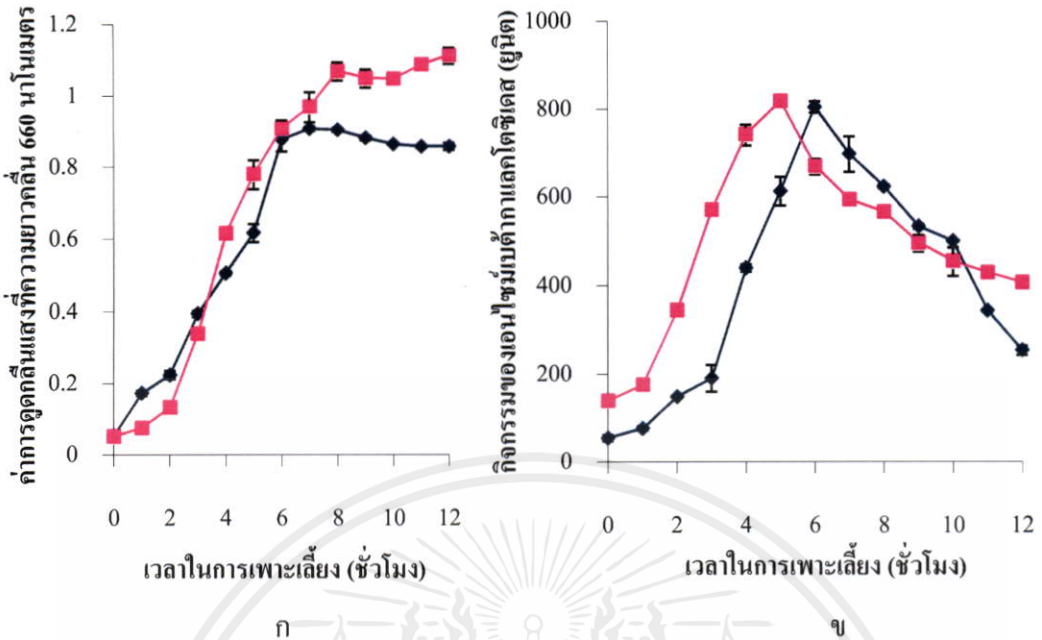
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 ผลการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5

### 4.5.1 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่คัดแยกจากบ่อเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C1 และ T5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร 1/5 LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เก็บส่วนใสจากการการเพาะเลี้ยงทุกๆ 1 ชั่วโมง มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกัน เชื้อไอโซเลท C1 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 7 ส่วนเชื้อไอโซเลท T5 มีการเจริญเติบโตช้าใน 2 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.12 ก) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของไอโซเลททั้งสองระหว่างการเจริญเติบโต พบว่า ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงนั้น จะพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเวลาผ่านไปกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าสูงขึ้น โดยไอโซเลท C1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดเท่ากับ 804 ยูนิตในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และไอโซเลท T5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดเท่ากับ 816 ยูนิต ในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลง (รูปที่ 4.12 ข)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการเจริญเติบโต โดยในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง เชื้อจะอยู่ในระยะ lag phase ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ จึงไม่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณ เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น เข้าสู่ระยะ log phase และมีความหนาแน่นของประชากรมากพอ จึงเริ่มมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณซึ่งโมเลกุลสัญญาณนี้จะแพร่ออกไปนอกเซลล์ เข้าสู่เซลล์ข้างเคียงและเข้าจับกับรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ข้างเคียง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่างๆ และกระตุ้นการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนด้วย จนกระทั่งเมื่อเชื้อเจริญมีการเจริญเติบโตลดลง เข้าสู่ระยะ stationary phase ระดับของโมเลกุลสัญญาณก็จะลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Fuqua และคณะ (1994) ที่ได้รายงานไว้ว่าเมื่อแบคทีเรียแกรมลบเจริญเติบโตจนถึงระดับหนึ่งจะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิล



รูปที่ 4.12 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้งไอโซเลท C1 (—◆—) และ T5 (—■—)

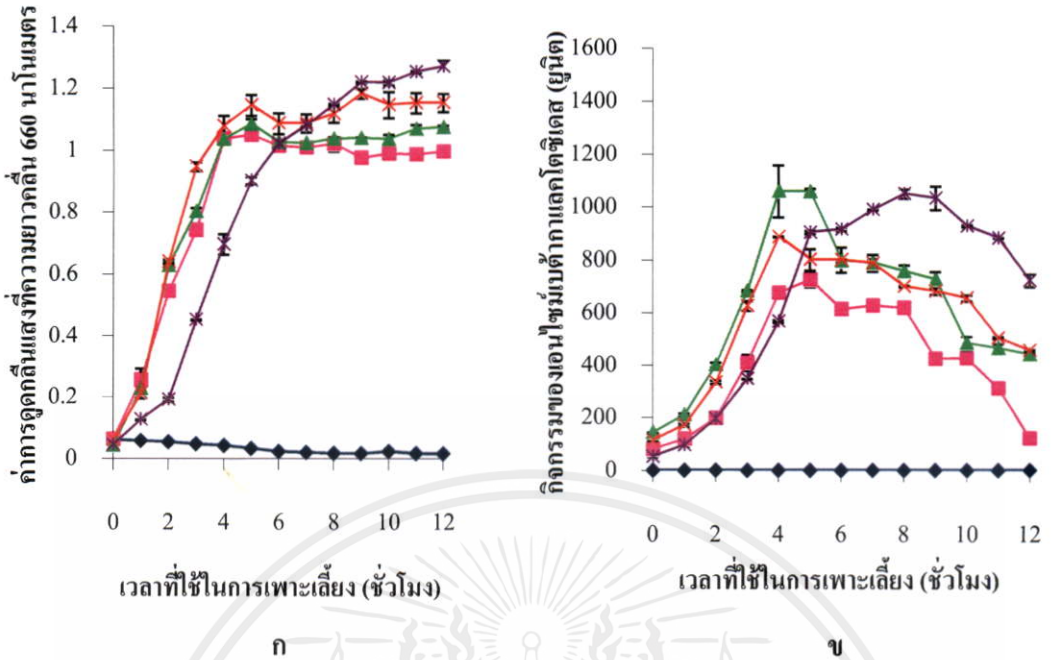
ไฮโมเชอรินแลคโตนออกมานอกเซลล์ โมเลกุลสัญญาณจะไปจับกับรีเซพเตอร์ของยีนเป้าหมาย กระตุ้นให้ยีนเป้าหมายเกิดการแสดงออกเพื่อควบคุมความหนาแน่นของจำนวนประชากรแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทไฮโมเชอรินแลคโตนของแบคทีเรียไอโซเลท T5 จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าเชื้อไอโซเลท C1 โดยจะเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณในชั่วโมงที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตโมเลกุลสัญญาณได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นระยะ mid-log phase แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไอโซเลท T5 สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณได้ดีในระยะ mid-log phase และหลังจากนั้น การผลิตโมเลกุลสัญญาณจะลดลง ถึงแม้ว่าจะยังมีการเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Pearson และคณะ (1994) ที่พบว่า *P. aeruginosa* ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทไฮโมเชอรินแลคโตนในระยะ mid-log phase สูงกว่าระยะ stationary phase

#### 4.5.2 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทไฮโมเชอรินแลคโตนภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ

จากการศึกษาผลของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทไฮโมเชอรินแลคโตนของแบคทีเรีย โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร 1/5 LB ทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 660 นาโนเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการการเพาะเลี้ยงทุกๆ 1 ชั่วโมง มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท C1 ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ แต่เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.13 ก) นอกจากนี้ ยังพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท C1 เจริญได้ช้าในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.0 เปอร์เซ็นต์ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น เชื้อจึงเจริญเติบโต (รูปที่ 4.13 ก) แสดงว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ถ้าขาดเกลือโซเดียมคลอไรด์แบคทีเรียจะไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* นั้นโดยปกติแล้ว ดำรงชีวิตอยู่อาศัยเป็นอิสระในแหล่งน้ำที่มีความเค็ม เช่น น้ำทะเล น้ำกร่อย เป็นต้น ดังนั้น เมื่อขาดเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลต้องการโซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) เพื่อใช้ในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ที่แตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรีย *Alteromonas haloplankis* ต้องการโซเดียมไอออนในการขนส่ง  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) และฟรุกโตส (D-fructose) (Drapeau *et al.*, 1966) แบคทีเรีย *V. fischeri* ต้องการโซเดียมไอออนในการขนส่ง AIB แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ต้องการ  $\text{Na}^+$  ในการขนส่ง AIB, ซูโครส (Kakinuma and Unemoto, 1985) และกรดอะมิโน (Tokuda and Unemoto, 1982) ในสถานะอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.0 เปอร์เซ็นต์เป็นสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เนื่องจากในสถานะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงจะมีผลให้เกิดแรงดันออสโมติกสูง ซึ่งอาจมีผลให้เซลล์เกิดปรากฏการณ์พลาสโมไลซิส (plasmolysis) ทำให้เซลล์เหี่ยว อย่างไรก็ตาม เซลล์อาจใช้เวลาในการปรับตัวให้สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ และเจริญเติบโตต่อไปตามปกติ จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 ในอาหาร 1/5 LB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด

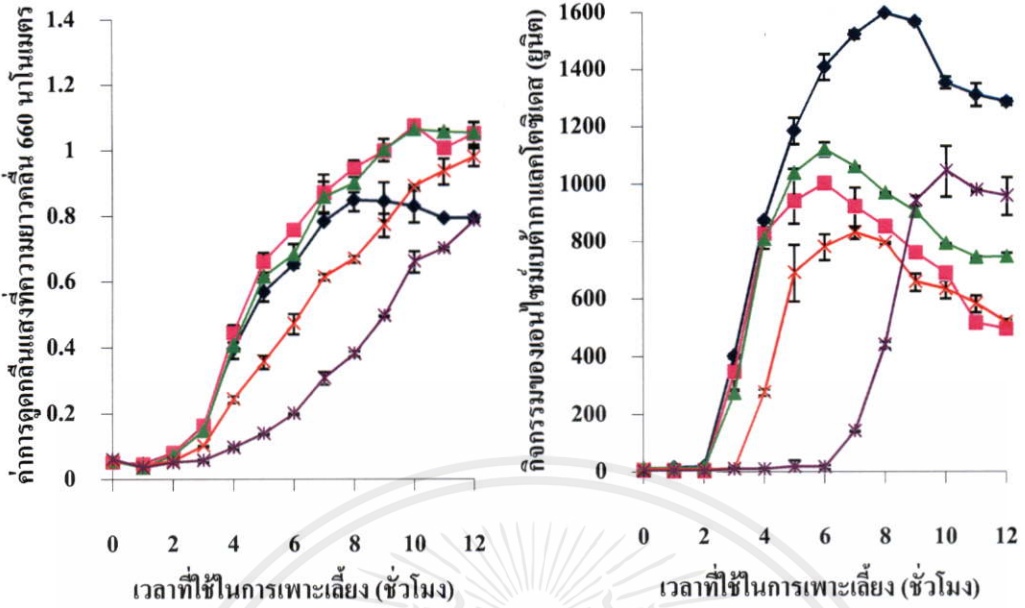
จากการทดลอง ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของไอโซเลท C1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เมื่อขาดเกลือโซเดียมคลอไรด์ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 ในอาหาร 1/5 LB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จะพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน โดยพบกิจกรรมอยู่ในระดับต่ำในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสก็จะเพิ่มสูงขึ้น จนกระทั่งอยู่ในระดับสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 และ 5 จากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ก็จะลดลง (รูปที่ 4.13 ข) นอกจากนี้ ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียม



รูปที่ 4.13 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 (—◆—), 0.5 (—■—), 1.0 (—▲—), 2.5 (—×—) และ 5.0 (—\*—) เปอร์เซ็นต์

คลอไรด์ 5.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 (รูปที่ 4.13 ข) ซึ่งช้ากว่าสภาวะอื่น เป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ช้าในระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ในการทดลองแปรผันความเข้มข้นของเกลือ จึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโซไมเซอร์รินแลคโตนของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Medina-Martínez และคณะ (2006b) ที่รายงานว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มีส่วนประกอบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด C4-HSL ของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ต่างๆ

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท T5 ในอาหาร 1/5 LB ที่แปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท T5 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ช้ากว่าในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเจริญได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.14 ก) แสดงว่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่สูงมีผลต่อการเจริญของไอโซเลท T5 ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อแรงดันออสโมติก ทำให้แบคทีเรียต้องปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลของน้ำในเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ในขณะที่การขาดเกลือโซเดียมคลอไรด์นั้นไม่มีผล



**รูปที่ 4.14** การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของแบคทีเรียไอโซเลท T5 ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆), 5 (■), 1.0 (▲), 2.5 (×) และ 5.0 (✱) เปอร์เซ็นต์

ต่อการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท T5 เนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลท T5 ไม่จำเป็นต้องใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโตซึ่งต่างจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 ที่เป็นแบคทีเรียชอบเค็ม

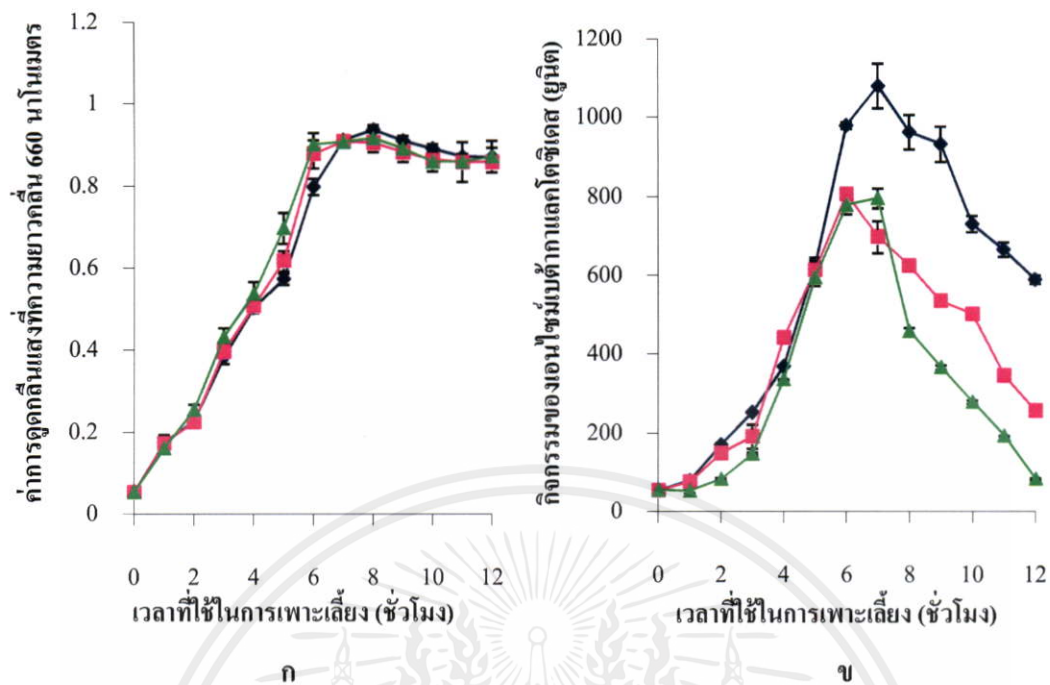
จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของไอโซเลท T5 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าสูงสุด (รูปที่ 4.14 ข) เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะอยู่ในระดับปานกลาง และเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ จะตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสช้ากว่าสภาวะอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.0 เปอร์เซ็นต์ จะเริ่มผลิตโมเลกุลสัญญาณในชั่วโมงที่ 7 และผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 10 (รูปที่ 4.14 ข) จากผลการทดลองพบว่า การผลิตโมเลกุลสัญญาณของแบคทีเรียไอโซเลท T5 มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อเช่นกัน ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เชื้อแบคทีเรียจะเจริญเติบโตช้า ส่งผลให้มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณช้ากว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า การขาดเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลให้แบคทีเรียไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณได้ในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะที่มีเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 4.5.3 ผลการศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนภายใต้อุณหภูมิต่างๆ

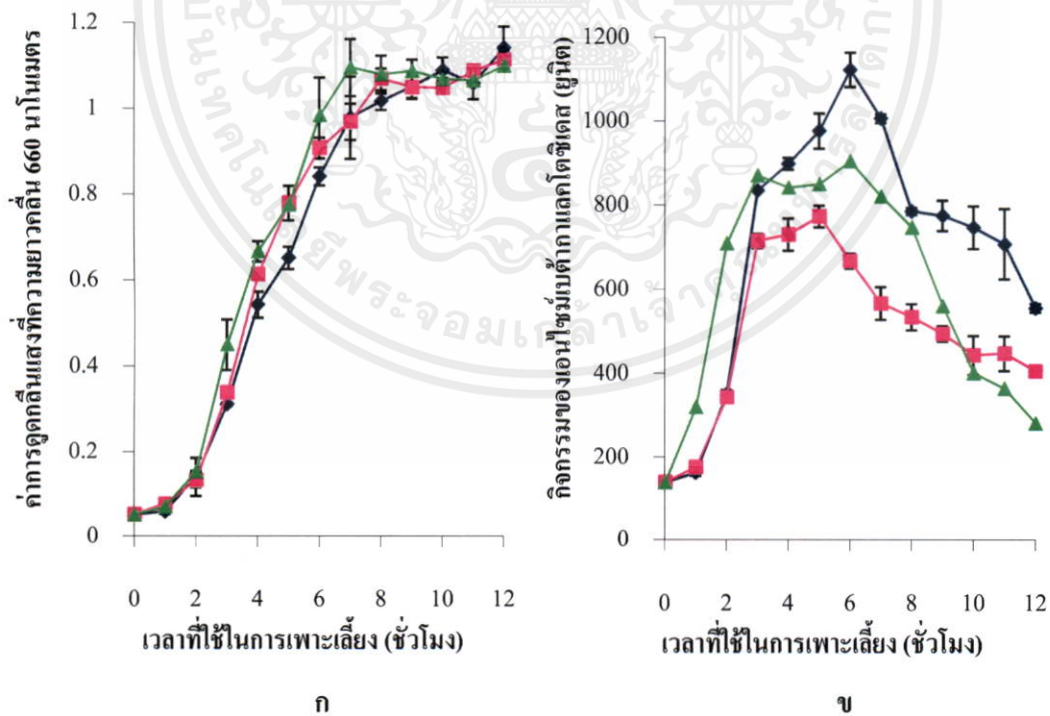
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า ไอโซเลททั้งสองมีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกันและมีความหนาแน่นของเซลล์ใกล้เคียงกัน เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.15 ก และ 4.16 ก)

จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท C1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไอโซเลท C1 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำหรือสามารถพบดำรงชีวิตเป็นปรสิตในสัตว์น้ำที่มีอุณหภูมิไม่สูงมากนัก ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้จึงสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีช่วงอุณหภูมิกว้าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gooch และคณะ (2002) ที่รายงานว่า *V. parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่ในหอยนางรมสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และ Miles และคณะ (1997) ได้รายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท T5 ก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เช่นกัน แบคทีเรียไอโซเลท T5 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรีย *P. aeruginosa* นั้น เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ ต้องการธาตุอาหารเพียงเล็กน้อย สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ก็พบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะมีค่าสูงสุด (รูปที่ 4.15 ข และ 4.16 ข) แสดงให้เห็นอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณของเชื้อแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนี้ ภายในเซลล์แบคทีเรีย จะมีการทำงานของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสในอัตราที่สูงขึ้น ส่งผลให้พบโมเลกุลสัญญาณในปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณของเชื้อแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป ในรายงานของ Medina-Martinez และคณะ (2006a) พบว่าที่อุณหภูมิ 22 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด C4-HSL ของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* 519 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าแคโรทีน (ข) ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 (—◆—) 30 (—■—) และ 35 (—▲—) องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.16 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าแคโรทีน (ข) ของแบคทีเรียไอโซเลท T5 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 (—◆—) 30 (—■—) และ 35 (—▲—) องศาเซลเซียส

## 4.6 ผลการศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท C1 และ T5

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้วิธีการสลายโมเลกุลสัญญาณ 2 วิธี คือ ใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสและใช้สารประกอบฟูราโนน

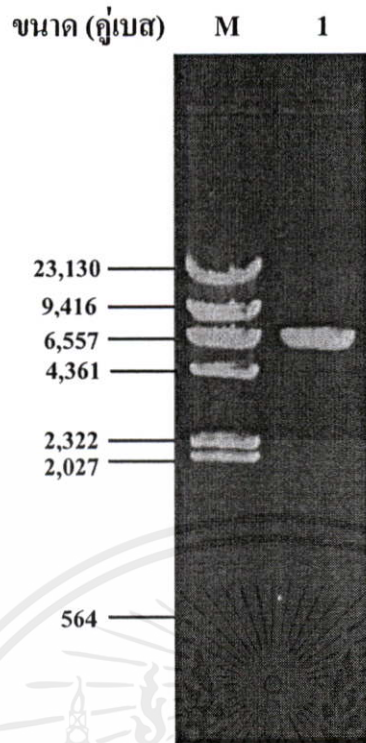
### 4.6.1 ผลการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส

ในการศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสนี้ ได้ใช้พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102 (pET30a-attM) ซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน attM ของ *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส โดยเริ่มจาก ทำการสกัดพลาสมิด pSP3.102 และทดสอบการมีอยู่ของยีนที่ผลิตเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสในพลาสมิด pSP3.102 ด้วยการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII ทดสอบความเสถียรของพลาสมิดแสดงออก pSP3.102 จากนั้นเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิดแสดงออก pSP3.102 แล้วชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสในปริมาณสูงด้วยสารละลาย IPTG แดกเซลล์แล้วนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ไปใช้สลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ต่อไป

#### 4.6.1.1 ผลการสกัดพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102

จากการนำ *E. coli* ที่มีพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkali lysis นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (รูปที่ 4.17) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ค่าที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบว่า พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102 มีปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้น นำพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102 ไปทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII ต่อไป

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



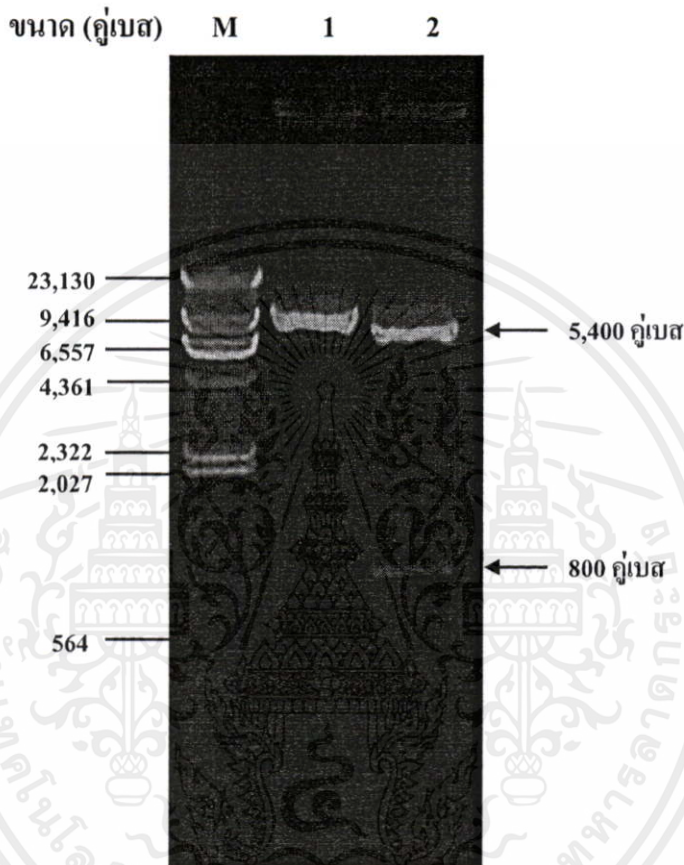
รูปที่ 4.17 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III  
 1 พลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102

#### 4.6.1.2 ผลการตรวจสอบพลาสมิดแสดงออกลูกผสม pSP3.102 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

เนื่องจากยีน *attM* ที่อยู่ในพลาสมิด pSP3.102 นั้น ได้มาจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ *attM-f* (5'-AGTTCCAAGGGAGGATCCCCGAGTGACCGAT-3') ซึ่งไพรเมอร์นี้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (G/GATCC) และไพรเมอร์ *attM-r* (5'-TATCTGGCCGTAAGCTTGC GCGTTCTATTT-3') ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (A/AGCTT) ดังนั้น จึงนำพลาสมิด pSP3.102 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิดไฮโดรอลิซอินแลคโตเนสซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดไปวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบระหว่างพลาสมิด pSP3.102 ที่ไม่ถูกตัดกับพลาสมิด pSP3.102 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III พบว่า ในเลนของพลาสมิด pSP3.102 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 5,400 และ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.18 เลนที่ 2) โดยแถบแรกที่มีขนาด 5,400 คู่เบสเป็นแถบของพลาสมิด pET30a ส่วนแถบที่สองเป็นแถบของ

ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* ที่มีขนาด 800 คู่เบส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตัดพลาสมิด pSP3.102 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และพลาสมิดคือเอ็นเอ็มจีชิ้นส่วนของยีน *attM* ของ *A. tumefaciens* ที่ต้องการ จากนั้น จึงนำพลาสมิด pSP3.102 ไปทดสอบความเสถียรของพลาสมิดเอ็นเอ็มจีต่อไป



รูปที่ 4.18 พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

- M    ดีเอ็นเอ็มมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III  
1    พลาสมิด pSP3.102  
2    พลาสมิด pSP3.102 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

#### 4.6.1.3 ผลการทดสอบความเสถียรของพลาสมิดแสดงออกถูกผสม pSP3.102

จากการทดสอบความเสถียรของพลาสมิด pSP3.102 ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pSP3.102 ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้น นำ 1 โคโลนีที่ขึ้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.6 จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาเจือจางในอัตราส่วน  $10^5$  และ  $10^6$  นำเซลล์แขวนลอยที่เจือจางในอัตราส่วน  $10^5$

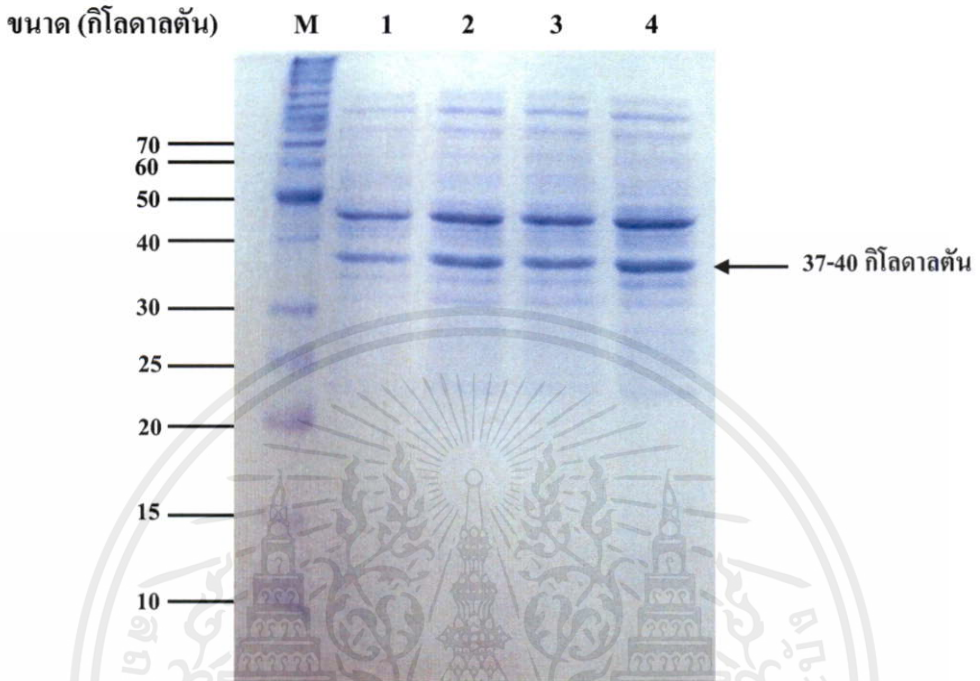
มากระจายลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และอาหารแข็ง LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ร่วมกับยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน พบว่า ไม่ปรากฏโคโลนียบนอาหารทั้ง 2 แบบ เนื่องจาก IPTG ที่ใส่ลงไปให้อาหารมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ ในการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์นั้น มักจะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดถูกผสมให้อยู่ในช่วงระยะ log phase จากนั้น จึงทำการชักนำด้วยสารละลาย IPTG ซึ่งจะไปยังการเจริญเติบโตและชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แทน

จากการนำเซลล์แขวนลอยที่เจือจางในอัตราส่วน  $10^{-6}$  มากระจายลงบนอาหารแข็ง LB และอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ปรากฏว่าพบจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง LB และอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินเท่ากับ 106 และ 90 โคโลนี ตามลำดับ ดังนั้น *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pSP3.102 และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 มีจำนวน  $90-106 \times 10^6$  โคโลนี แต่เมื่อชักนำด้วยสารละลาย IPTG กลับไม่พบโคโลนี แสดงให้เห็นว่าเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) มีพลาสมิด pSP3.102 อยู่ในเซลล์ และถูกชักนำได้ด้วยสารละลาย IPTG จากนั้น นำเชื้อที่ได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสต่อไปได้

#### 4.6.1.4 ผลการชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส

จากการนำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pSP3.102 จำนวน 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 จึงชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสโดยการเติมสารละลาย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แยกเซลล์โดยใช้คลื่นกัมมันตภาพรังสีความถี่สูงที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของแอมพลิจูด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละเลนหอยอดสารละลายโปรตีนให้มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 20 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ปรากฏแถบของโปรตีนหลายแถบ และพบแถบโปรตีนเข้มที่มีขนาด 37-40 กิโลดาลตันซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดโปรตีนที่ต้องการคือ 37.8 กิโลดาลตัน

ภายหลังชักนำด้วยสารละลาย IPTG (รูปที่ 4.19) จากนั้น จึงนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

M โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

1 แล็บโปรตีนก่อนการชักนำ

2 แล็บโปรตีนหลังการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

3 แล็บโปรตีนหลังการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง

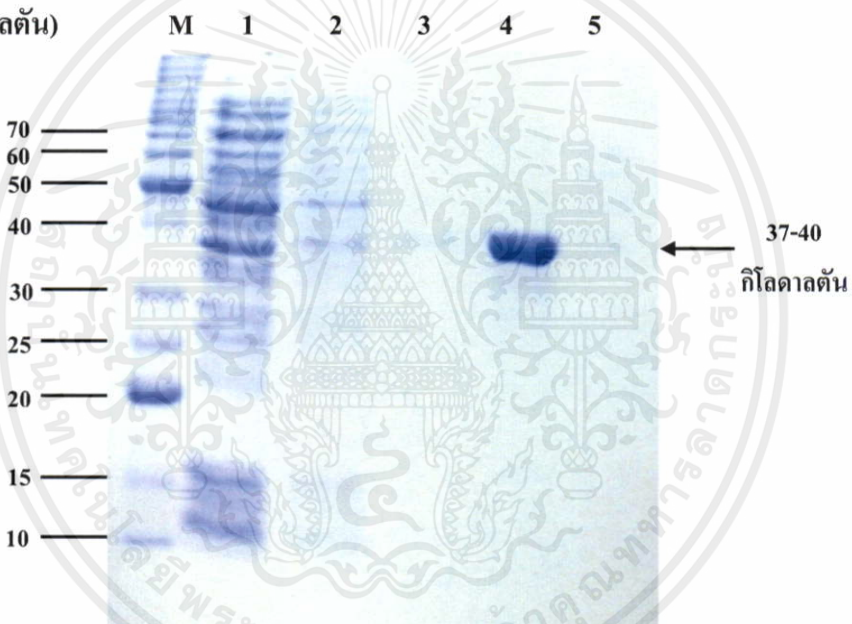
4 แล็บโปรตีนหลังการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง

#### 4.6.1.5 ผลการทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำโปรตีนให้บริสุทธิ์อัตโนมัติ Profinia™ Protein Purification System

จากการนำสารละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส ภายหลังจากชักนำด้วยสารละลาย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาทำให้บริสุทธิ์โดยชุดทำโปรตีนให้บริสุทธิ์อัตโนมัติ Profinia™ Protein Purification System จะโปรตีนออกจากคอลัมน์และเก็บสารละลายโปรตีนทั้งหมด 4 fraction นำสารละลายที่ได้ในแต่ละ fraction มา 20 ไมโครลิตร มา

วิเคราะห์ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 20 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder พบแถบของโปรตีนขนาด 37-40 กิโลดาลตันในปริมาณสูงกว่าก่อนการชักนำซึ่งเป็นแถบของโปรตีนที่ต้องการใน fraction ที่ 3 (รูป 4.20 เลนที่ 4) และไม่พบแถบโปรตีนที่สนใจใน fraction ที่ 2 และ 4 (รูปที่ 4.20 เลนที่ 3 และ 5) นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนที่ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้น จึงนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปทดสอบกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ต่อไป

ขนาด (กิโลดาลตัน)



**รูปที่ 4.20** ผลการวิเคราะห์แถบของโปรตีนใน fraction ต่างๆ ภายหลังการทำให้รีคอมบิแนนท์-เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสให้บริสุทธิ์ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

M โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder

1 แถบโปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์

2 แถบโปรตีนที่ได้จาก fraction ที่ 1

3 แถบโปรตีนที่ได้จาก fraction ที่ 2

4 แถบโปรตีนที่ได้จาก fraction ที่ 3

5 แถบโปรตีนที่ได้จาก fraction ที่ 4

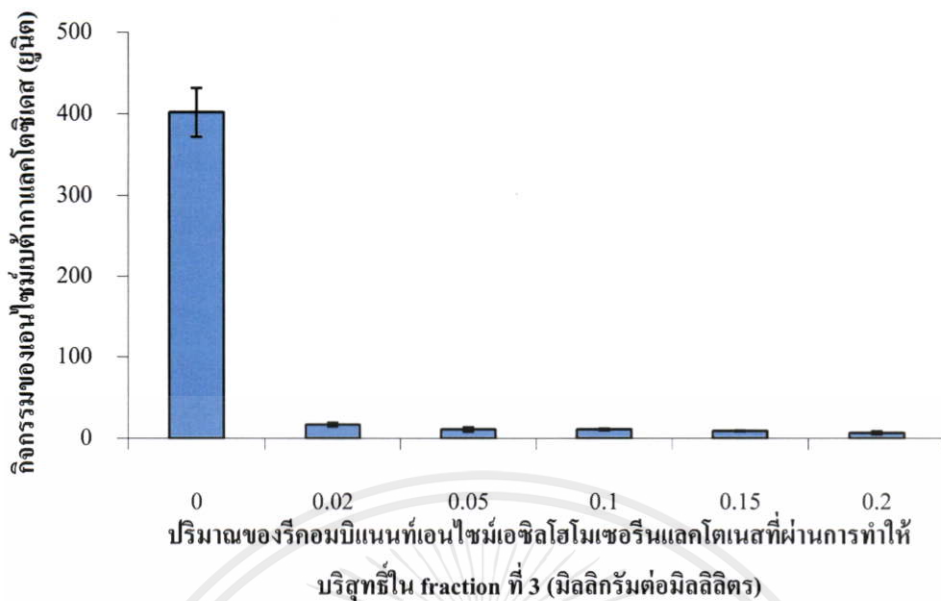
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในสิ่งที่ปรากฏ และขออภัยถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6.1.6 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่เหมาะสมต่อการ ย่อยโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

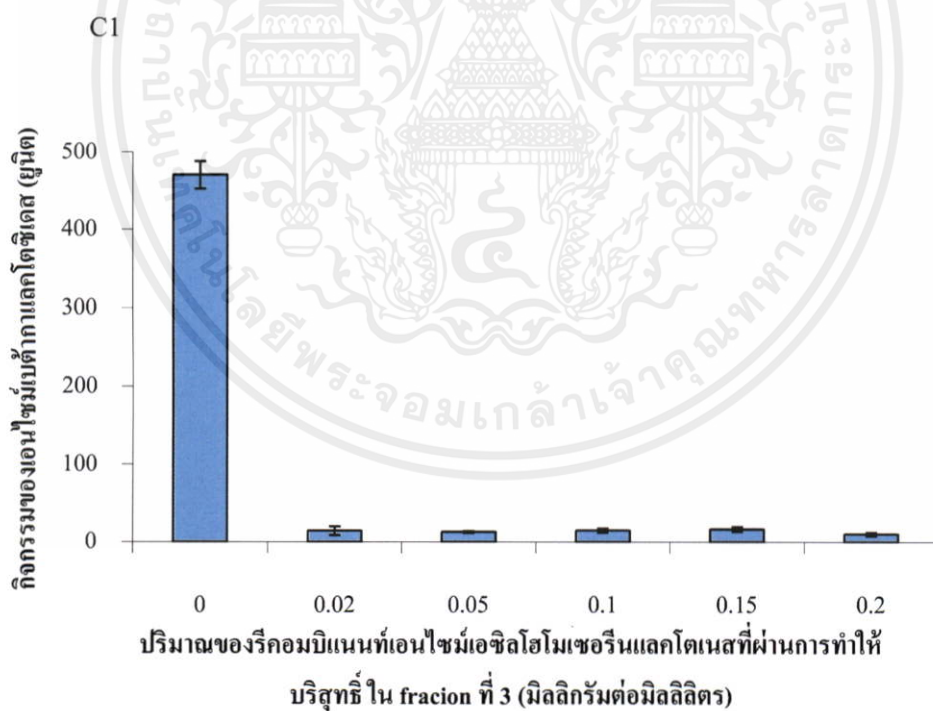
จากการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ที่มีปริมาณโปรตีน 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มาบ่มรวมกับส่วนสไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1 และ T5 ที่มีโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในปริมาตรสุทธิ 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำผลที่ได้จากการบ่มมาวิเคราะห์ปริมาณของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่เหลืออยู่ จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสโดย reporter strain *A. tumefaciens* A136 พบว่า เมื่อไม่มีการเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ลงไปในส่วนสไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมีค่าเท่ากับ 402 และ 470 ยูนิต ตามลำดับ เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรลงไปในส่วนสไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลท C1 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลงจนมีค่าเท่ากับ 17, 11, 11, 9 และ 7 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.21)

เมื่อเติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรลงไปในส่วนสไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลท T5 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลงจนมีค่าเท่ากับ 14, 13, 14, 16 และ 10 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.22)

จากผลการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 สามารถย่อยสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ได้ เนื่องจากเอนไซม์นี้ทำงานโดยการย่อยสลายวงแหวนแลคโตน ดังนั้น ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 จะผลิตโมเลกุลสัญญาณที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน แต่เนื่องจากมีวงแหวนแลคโตนเหมือนกัน จึงทำให้ย่อยโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทได้ การใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสจึงมีข้อดีคือ สามารถย่อยโมเลกุลสัญญาณได้หลายโครงสร้าง นอกจากนี้ ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 3 ปริมาณ 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรเพียงพอที่จะย่อยโมเลกุลสัญญาณของแบคทีเรียทั้งสอง จากนั้น นำความเข้มข้นนี้ไปทดสอบผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสต่อการเจริญและการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทต่อไป



รูปที่ 4.21 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนีสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท



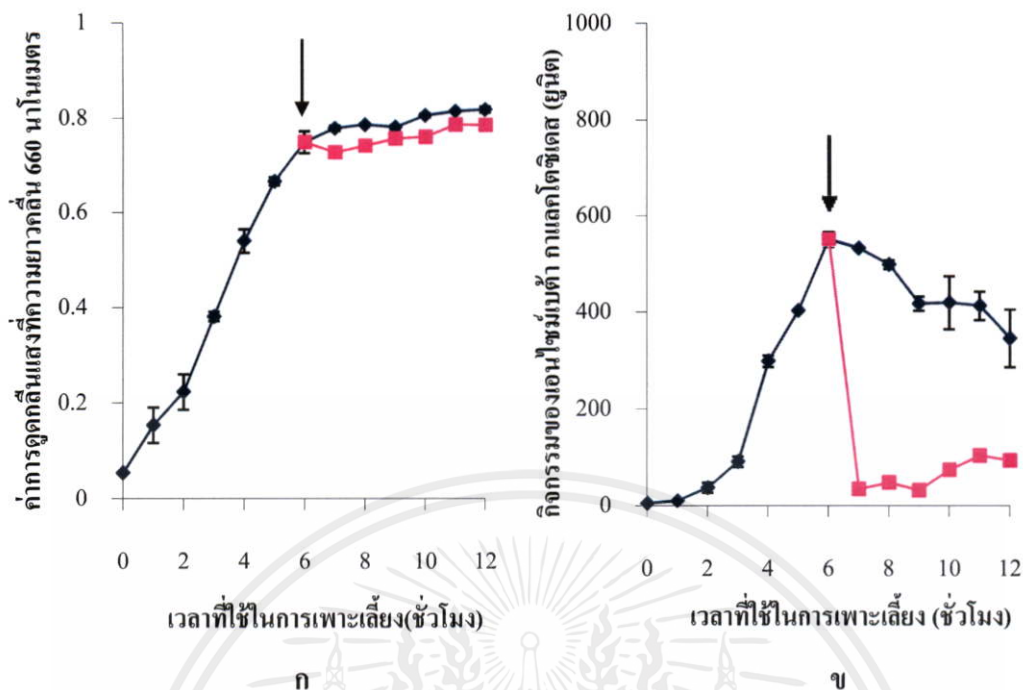
รูปที่ 4.22 ปริมาณรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนีสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโมเลกุลสัณฐานเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท

#### 4.6.1.7 ผลของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสต่อการเจริญและการ สลายโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท C1 และ T5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร 1/5 LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับไอโซเลท C1 และในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงสำหรับไอโซเลท T5 วัดการเจริญโดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการการเพาะเลี้ยงทุกๆ ชั่วโมงมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า ในสถานะที่ไม่เติมรีคอมบิแนนท์ เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสนั้น แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีการเจริญอย่างรวดเร็วแล้วเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงสำหรับแบคทีเรียไอโซเลท C1 และชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงสำหรับแบคทีเรียไอโซเลท T5 (รูปที่ 4.23 ก, รูปที่ 4.24 ก) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่สูงสุด จากนั้น ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ก็ลดลงเนื่องจากแบคทีเรียสามารถควบคุมจำนวนประชากรของตนเองได้แล้ว (รูปที่ 4.23 ข, รูปที่ 4.24 ข)

ในสถานะที่เติมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรลงไปในช่วงที่มีการผลิตโมเลกุลสัณญาณสูงสุด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมีการเจริญลดลงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากบัฟเฟอร์ที่เป็นตัวทำลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์นั้นมีผลจากความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย จากการวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของทั้ง 2 ไอโซเลทพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสลดลงจนถึงระดับต่ำสุดภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นผลมาจากรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่เติมลงไปนั้นจะย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส แต่เมื่อเวลาผ่านไป สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้โดยพบสูงขึ้นแต่เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.23 ข, รูปที่ 4.24 ข) อาจเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสลดลง ทำให้ไม่สามารถย่อยโมเลกุลสัณญาณได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ประกอบกับเซลล์แบคทีเรียยังสามารถเจริญได้ จึงมีการผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสได้แม้ว่าปริมาณจะไม่สูงเหมือนช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง

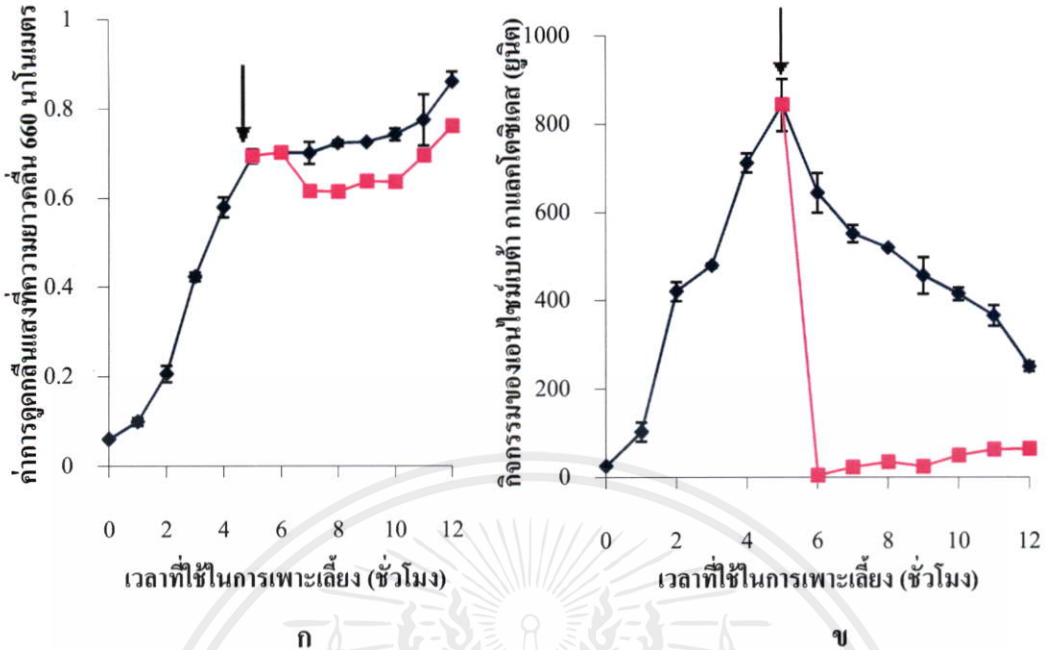
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ สามารถย่อยโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ แต่แบคทีเรียต่างชนิดกันก็จะผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ไอโซเลท C1 จัดเป็นแบคทีเรีย *V. furnissii*



**รูปที่ 4.23** ผลของริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (ข) ของไอโซเลท C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB (—◆—) และเมื่อเติมสารละลายริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (—■—) ลูกศรแสดงเวลาที่เติมสารละลายริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส

ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน เช่น *V. fischeri* ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C6-HSL (Eberhard *et al.*, 1981) *V. anguillarum* ผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C10-HSL (Milton *et al.*, 1997) ส่วนไอโซเลท T5 ที่จัดเป็นแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณชนิด 3-oxo-C12-HSL (Pearson *et al.*, 1994) และ C4-HSL (Pearson *et al.*, 1995) จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน และโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตขึ้นมาสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสได้ ดังนั้น การศึกษาการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสจึงน่าจะเป็นหนทางหนึ่งในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียและลดความรุนแรงในการก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.24** ผลของริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction ที่ 3 ต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส (ข) ของไอโซเลท T5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB (◆) และเมื่อเติมสารละลายริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (■) ลูกศรแสดงเวลาที่เติมสารละลายริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนส

#### 4.6.2 ผลของสารประกอบฟูราโนนต่อการเจริญและการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

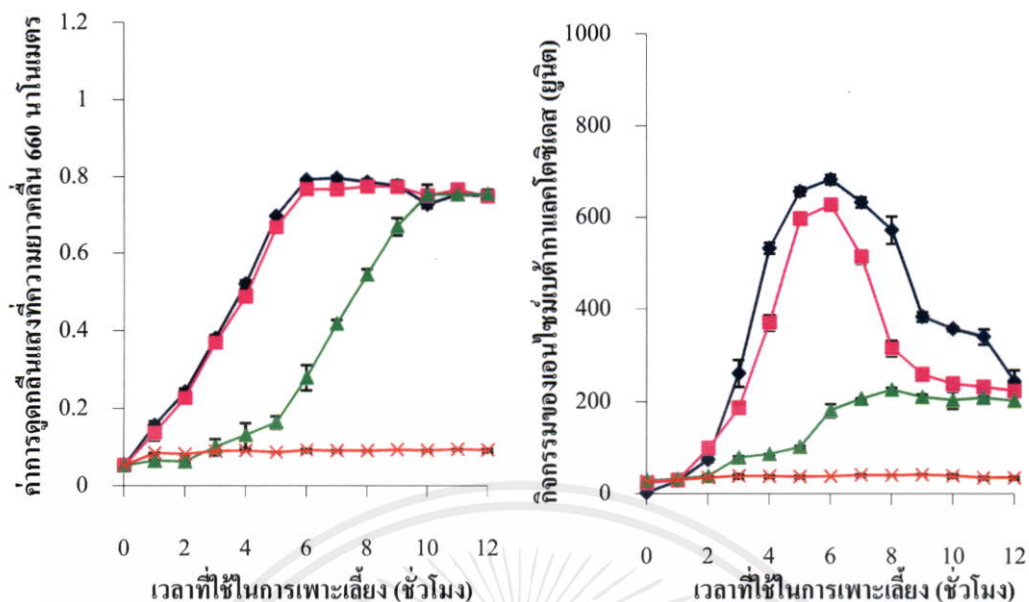
จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1 และ T5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร 1/5 LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เติมน้ำตาลฟูราโนนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ ศึกษาการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทุกๆ ชั่วโมงมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฟูราโนนและที่มีฟูราโนน 1 มิลลิโมลาร์ มีรูปแบบการเจริญคล้ายคลึงกัน คือ มีการเจริญได้ดีใน 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.25 ก) จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 ในอาหารที่มีฟูราโนน 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท C1 มีระยะ lag phase ยาวนานประมาณ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase แล้วเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 ในอาหารที่มีฟูราโนน 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (รูปที่ 4.25 ก) จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท T5 ในอาหารที่มีฟูราโนน 0, 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท T5 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีฟูราโนน 0, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีฟูราโนน 100 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.26 ก)

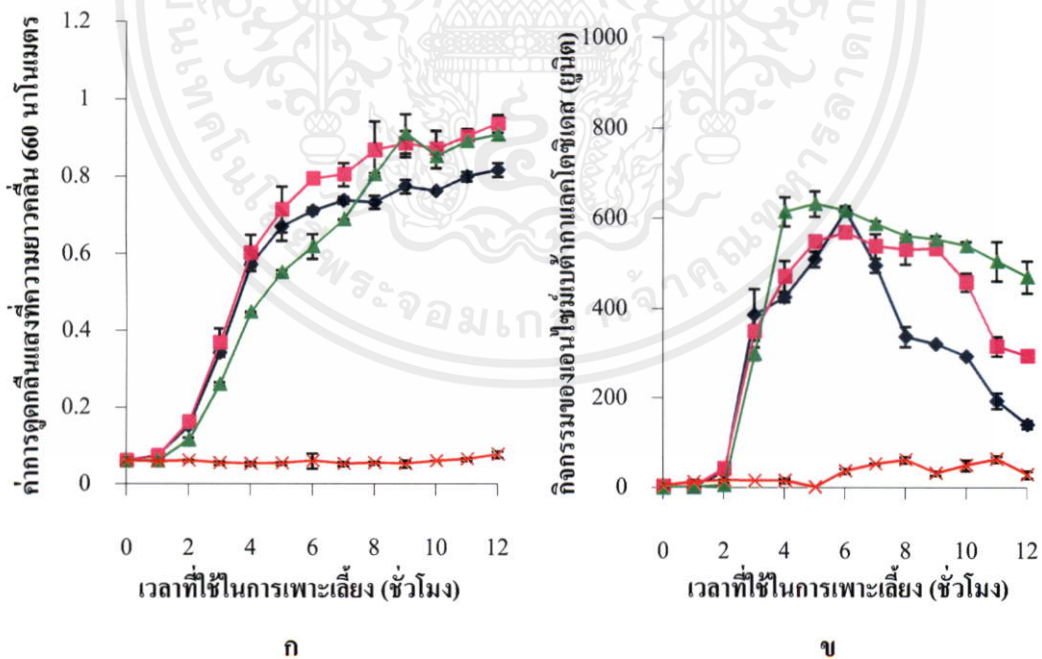
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายฟูราโนนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อชะลอการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท C1 โดยทำให้ไอโซเลท C1 เจริญได้ช้าลง แต่ความเข้มข้นนี้กลับไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไอโซเลท T5 และสารละลายฟูราโนนความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ฟูราโนนจัดเป็นสารประกอบเคมีที่มีลักษณะวงแหวน จัดอยู่ในกลุ่มแลคโตน โดยทั่วไปสามารถพบเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สังเคราะห์มาจากพืชในจีนัส *Angelica* สารประกอบฟูราโนนมีอนุพันธ์ได้หลายชนิด เช่น 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone ซึ่งจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์หรือมิวทาเจน dichloro-5-pentyl-2(3H)-furanone ใช้เป็นยาฆ่าแมลง ฆ่าวัชพืชและฆ่าลูกน้ำยุง เป็นต้น จากผลการทดลอง จึงเป็นไปได้ว่าสารละลายฟูราโนนที่ความเข้มข้นสูงอาจเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญเติบโตได้

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 พบว่า ในอาหารที่ไม่มีฟูราโนนและอาหารที่มีฟูราโนนความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสคล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะค่อยๆ สูงขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย จนถึงระดับที่สูงสุด จากนั้นปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ก็ลดลงซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการเจริญเติบโต ในขณะที่เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท C1 ในอาหารที่มีฟูราโนนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะมีการผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสช้ากว่าและอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.25 ข) เป็นผลเนื่องมาจากการชะลอการเจริญเติบโตนั่นเอง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของไอโซเลท T5 ในอาหารที่ไม่มีฟูราโนนและอาหารที่มีฟูราโนนความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ก็มีรูปแบบคล้ายกัน กล่าวคือ ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะค่อยๆ สูงขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย จนถึงระดับที่สูงสุด จากนั้นปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ก็ลดลง (รูปที่ 4.26 ข)

จากผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่าฟูราโนนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลยับยั้งการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยตรง แต่สารละลายฟูราโนนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์มีผลชะลอการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อแบคทีเรียไอโซเลท C1 ชลอการเจริญเติบโตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ และอาจส่งผลให้เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสที่ทำหน้าที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณทำงานได้ลดลง ผลการทดลองแตกต่างจากผลการทดลองของ Hentzer และคณะ (2003) ที่รายงานว่าเมื่อเติม (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2-(5H)-furanone ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.25 ผลของฟูราโนนต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของไอโซเลต C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ที่เติมฟูราโนนที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 (◆), 1 (■), 10 (▲) และ 100 (×) มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.26 ผลของฟูราโนนต่อการเจริญ (ก) และการผลิตโมเลกุลสัณญาณเอซิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ของไอโซเลต T5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB ที่เติมฟูราโนนที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 (◆), 1 (■), 10 (▲) และ 100 (×) มิลลิโมลาร์

ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์สามารถลดการแสดงออกของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* PAO1 ได้ และ Givskov และคณะ (1996) ที่ได้รายงานว่ามีเอเดิม (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2-(5H)-furanone ลงในอาหารแข็งอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อก่อโรค *Serratia liquefaciens* ได้เนื่องจากสารประกอบฟูราโนนเหล่านี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน สารประกอบนี้จะเข้าจับกับโปรตีน LuxR ทำให้โปรตีน LuxR ไม่สามารถทำงาน (Manefield *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้ พบว่า ฟูราโนน (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-(2H)-furanone) ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อการยับยั้งโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เนื่องจากโครงสร้างของฟูราโนนมีความแตกต่างกับโครงสร้างของฟูราโนนที่ได้รายงานไว้ ทำให้ไม่สามารถเข้าจับกับรีเซพเตอร์ได้ ส่งผลให้สามารถลดการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

5.1 จากการคัดแยกแบคทีเรียจากกุ้งและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB พบว่าได้แบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน 59 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียเพียง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสโดยใช้ reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* A136 ได้ จากการศึกษานิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (GenBank) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท C1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Vibrio furnissii* 99 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท T5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Pseudomonas aeruginosa* 99 เปอร์เซ็นต์

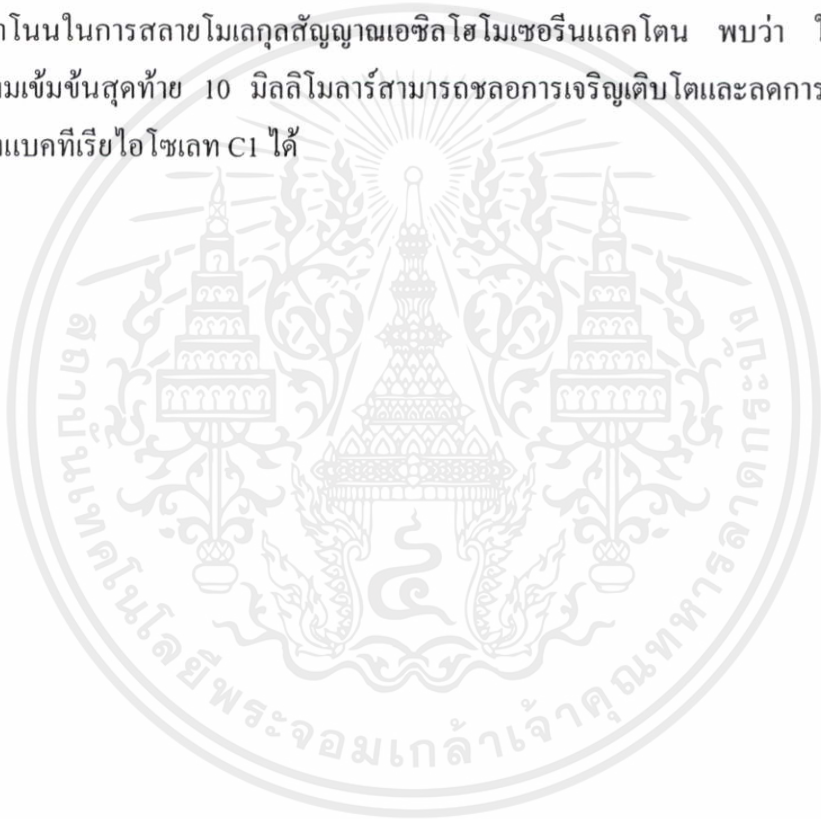
5.2 จากการเพิ่มปริมาณยีน *luxI* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียไอโซเลท C1 โดยใช้คูโพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาสำหรับยีน *luxI* ของแบคทีเรีย *Vibrio* sp. พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *luxI* ของไอโซเลท C1 ขนาดประมาณ 300 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pDrive ได้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและตั้งชื่อว่า pQSC1.1 นำพลาสมิด pQSC1.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 308 คู่เบส แล้วเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนซินเทส (VanI) ของ *Vibrio anguillarum* ถึง 84 เปอร์เซ็นต์

5.3 จากการศึกษากการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลท C1 และ T5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1/5 LB เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ แบคทีเรียสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/5 LB ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5.4 จากการศึกษากการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเนส เริ่มจากนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSP3.102 ที่มียีน *attM* ของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนสมาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* BL21(DE3) คัดเลือกโคลนที่ได้รับการ

ทรานสฟอร์มเมชันบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ชักนำทรานฟอร์มเม้นท์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตเนสในปริมาณสูงโดยใช้สารละลาย IPTG และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตเนสมีขนาด 37-40 กิโลดาลตัน จากการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Profinia™ Protein Purification System พบว่าสามารถทำให้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิดโฮโมเซอรินแลคโตเนสบริสุทธิ์และอยู่ใน fraction ที่ 3 โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ใน fraction นี้ 0.02 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร สามารถลดโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท C1 และ T5 ได้

5.5 จากการศึกษการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนโดยใช้สารประกอบฟูราโนนในการสลายโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน พบว่า ในสารละลายฟูราโนนความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดการเจริญเติบโตและลดการผลิตโมเลกุลสัญญาณของแบคทีเรียไอโซเลท C1 ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2534. “การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.” ศูนย์  
ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน กองเพาะเลี้ยงชายฝั่ง กรมประมง.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย.
- วัฒนาวัลย์ ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุคมวรภัณฑ์. 2536. *เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุ  
วิศวกรรม*. เล่มที่ 2. นครปฐม : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน.
- วิภาวี แบบประเสริฐ. 2547. “การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของ *Vibrio sp.*  
ที่คัดแยกจากน้ำทะเล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สร้อยญา พันธุ์พุกภัย. 2546. “การส่งสัญญาณและการสื่อสารของเซลล์แบคทีเรีย.” *วารสาร  
วิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*. 12 : 36-43.
- Altschul, S.F., Madden, T.M., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.  
1997. “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search  
programs.” *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-3402.
- Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin,  
S. and Givskov, M. 2001. “Gfp-based N-acylhomoserine-lactone sensor systems for  
detection of bacterial communication.” *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 575–585.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., Silverman, M.R. 1993. “Intercellular signalling in  
*Vibrio harveyi*-sequence and function of genes regulating expression of luminescence.”  
*Mol. Microbiol.* 9 : 773-786.
- Beck von Bodman, S. and Farrand, S. 1995. “Capsular polysaccharide biosynthesis and  
pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acyl homoserine lactone  
autoinducer.” *J. Bacteriol.* 177 : 5000-5008.
- Blosser, R.S. and Gray, K.M. 2000. “Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum*  
provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers.” *J.  
Microbiol. Methods.* 40 : 47–55.
- Boettcher, K.J. and Ruby, E.G. 1995. “Detection and quantification of *Vibrio fischeri*  
autoinducer from symbiotic squid light organs.” *J. Bacteriol.* 177 : 1053–1058.

- Brelles-Mariño, G. and Bedmar, J.U. 2001. "Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria." **J. Biotechnol.** 91 : 197-209.
- Brock, J.A. and Bullis, R. 2001. "Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp." **Aquaculture.** 197 : 137-159.
- Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Flodgaard, L.R., Neilsen, K.F., Larsen, T.O., Givskov, M. and Gram, L. 2004. "Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 70 : 4293-4302.
- Buch, C., Sigh, J., Neilsen, J., Larsen, J.L. and Gram, L. 2003. "Reduction of acylated homoserine lactone by different serotype of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout." **Sys. Appl. Microbiol.** 26 : 338-349.
- Buchholtz, C., Neilsen, K.F., Milton, D.L., Larsen, J.L. and Gram, L. 2006. "Profiling of acylated homoserine lactone of *Vibrio anguillarum* *in vitro* and *in vivo* : Influence of growth condition and serotype." **Sys. Appl. Microbiol.** 29 : 433-445.
- Choi, S.H. and Greenberg, E.P. 1991. "The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88 : 11115-11119.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costeton, J.W., and Greenberg, E.P. 1998. "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." **Science.** 280 : 295-298.
- Dawson, M. and Sia, R. 1931. "*In vitro* transformation of pneumococcal types I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types *in vitro*." **J. Exp. Med.** 54 : 681-699.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. and Verstraete, W. 2004. "Disruption of bacterial quorum sensing : an unexplored strategy to fight infections in aquaculture." **Aquaculture.** 240 : 69-88.
- De Kievit T.R., and Iglewski, B.H. 2000. "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships." **Infect. Immunol.** 68 : 4839-4849.
- Donabedian, H. 2003. "Quorum sensing and its relevance to infectious disease." **J. Infect.** 46 : 207-214.

- Dong, Y. H., Xu, J.L., Li, X.Z. and Zhang, H.B. 2000. "AiiA, an enzyme that inactivates the acyl homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*." **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97 : 3526-3531.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, X.T. and Zhang, L.H. 2001. "Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase." **Nature.** 411 : 813-819.
- Dong, Y.-H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.-H. 2002. "Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species." **Appl. Environ. Microbiol.** 68 : 1754– 1759.
- Dong, Y.-H., Zhang, X.F., Xu, J.L. and Zhang L.H. 2004. "Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference." **Appl. Environ. Microbiol.** 70 : 954-960.
- Drapeau, G.R., Matula, T.I. and MacLeod, R.A. 1966. "Nutrition and metabolism of marine bacteria. XV. Relation of Na<sup>+</sup> activated transport to the Na<sup>+</sup> requirement of a marine pseudomonad for growth." **J. Bacteriol.** 92 : 63-71.
- Dunny, G.M. and Leonard, B.A. 1997. "Cell-cell communication in gram positive bacteria." **Annu. Rev. Microbiol.** 51 : 527-564.
- Dunny, G.M. and Winans, S.C. 1999. **Cell-Cell Signaling in Bacteria.** Washington DC : ASM Press.
- Dworkin, M and Kaiser, D. 1985. "Cell interaction in myxobacterial growth and development." **Science.** 230 : 18-24.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H. and Oppenheimer, N.J. 1981. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase." **Biochemistry.** 20 : 2444-2449.
- Engbrecht, J., Nealson, K. and Silverman, M. 1983. "Bacterial bioluminescence : isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*." **Cell.** 32 : 773-781.
- Engbrecht, J. and Silverman, M. 1984. "Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81 : 4154-4158.
- Engbrecht, J. and Silverman, M. 1987. "Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence." **Nucleic Acids Res.** 15 : 10455-10467.

- Farrand, S.K., Hwang, I. and Cook, D.M. 1996. "The *tra* region of nopaline type Ti plasmid is a chimera with elements related to transfer system of RSF1010, RP4 and F." **J. Bacteriol.** 179 : 7089-7097.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. "Quorum sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators." **J. Bacteriol.** 176 : 269-275.
- Fuqua, W.C. and Winans, S.C. 1996. "Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10." **Mol. Microbiol.** 20 : 1199-1210.
- Fuqua, W.C. and Greenberg, E.P. 1998. "Self perception in bacteria : quorum sensing with acylated homoserine lactones." **Curr. Opin. Microbiol.** 1 : 183-189.
- Fuqua, C. and Eberhard A. 1999. **Cell-Cell Signaling in Bacteria.** Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Gatesoupe, F.J., 1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture.** 180 : 147– 165.
- Givskov, M., de Nys, R., Manfield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S. 1996. "Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling." **J. Bacteriol.** 178 : 6618– 6622.
- Gooch, J.A., Depaola, A., Owers, J., Marshall, D.L., 2002. "Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters." **J. Food Prot.** 65 : 970-974.
- Gray, K.M. and Garey, J.R. 2001. "The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators." **Microbiol.** 147 : 2379-2387.
- Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria." **J. Microbiol.** 38(3) : 117-121.
- Gudding, R., Lillehaug, A. and Evensen, Ø. 1999. "Recent developments in fish vaccinology." **Vet. Immunol. Immunopathol.** 72 : 203– 212.
- Hanzelka, B.L. and Greenberg, E.P. 1995. "Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain." **J. Bacteriol.** 177(3) : 815-817.
- Hanzelka, B.L. and Greenberg, E.P. 1996. "Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis." **J. Bacteriol.** 178 : 5291-5294.

- Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E. and Greenberg, E.P. 1999. "Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein." **J. Bacteriol.** 181 : 5766-5770.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riede, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eber, L. Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. and Givskov, M. 2003. "Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors." **EMBO.** 22 : 3803-3815.
- Heppell, J. and Davis, H.L. 2000. "Application of DNA vaccine technology to aquaculture." **Adv. Drug Deliv.** 43 : 29-43.
- Hoch, J.A. 1993. "Regulation of the phosphorylay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*." **Annu. Rev. Microbiol.** 47 : 441-465.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J.R., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., Winson, M.K., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1993. "The Lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*." **EMBO J.** 12 : 2477-2482.
- Kakinuma, Y., and Unemoto, T. 1985. "Sucrose uptake is driven by the Na<sup>+</sup> electrochemical potential in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*." **J. Bacteriol.** 163 : 1293-1295.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M. 1997. "Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal transduction system in gram-positive bacteria." **Mol. Microbiol.** 24 : 895-904.
- Leadbetter, J. R., and Greenberg, E. P. 2000. "Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*." **J. Bacteriol.** 182 : 6921-6926.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J. Y., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. and Zhang, L. H. 2003. "Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes." **Mol. Microbiol.** 47 : 849-860.
- Lio-Po, G.D., Leño, E.M., Peñaranda, M.D., Villa-Franco, A.U., Sombito, C.D. and Guanzon Jr., N.G. 2005. "Anti-luminous *Vibrio* factors associated with the 'green water' grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*." **Aquaculture.** 250 : 1-7.

- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S., 1999. "Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein." **Microbiology**. 145 : 283– 291.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S.A., de Nys, R. and Kjelleberg, S., 2000. "Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists." **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 2079–2084.
- McDougald, D., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. 2000. "The marine pathogen *Vibrio vulnificus* encodes a putative homologue of *Vibrio harveyi* regulator gene, *luxR* : a genetic and phylogenetic comparison." **Gene**. 248 : 213-221.
- Medina-Martínez, M.S., Uyttendaele, M., Demoldera, V., and Debevere, J. 2006a. "Effect of temperature and glucose concentration on the *N*-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*." **Food Microbiol.** 23 : 534–540.
- Medina-Martínez, M.S., Uyttendaele, M., Demoldera, V., and Debevere, J. 2006b. "Influence of food system conditions on *N*-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas* spp." **Int. J. Food Microbiol.** 23 : 534–540.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J., McMeekin, T.A., 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. **Int. J. Food Microbiol.** 38, 133-142.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. "Quorum sensing in bacteria." **Annu. Rev. Microbiol.** 55 : 165-199.
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1997. "Quorum sensing in *Vibrio anguillarum* : characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone." **J. Bacteriol.** 179(9) : 3004-3012.
- Miyamoto, C.M., Boylan, M., Graham, A.F. and Meighen, E.A. 1988. "Organization of the *lux* structural genes of *Vibrio harveyi*. Expression under T7 bacteriophage promoter, mRNA analysis, and nucleotide sequence of *luxD* gene." **J. Biol. Chem.** 263 : 13393-13399.
- Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. and Winans, S.C. 1996. "Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of a defined substrates." **Science**. 272 : 1655-1658.

- Moriarty, D.J.W. 1999. "Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria." In: Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Green, P. (Eds.), **Microbial Biosystems: New Frontiers, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**, Halifax, Canada.
- Nakai, T. and Park, S.C. 2002. "Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture." **Res. Microbiol.** 153 : 13-18.
- Nealson, K.H., and Hastings J.W. 1979 "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." **Microbiol. Rev.** 43 : 496-518.
- Newman, S.G. 1993. "Bacterial vaccines for fish." **Annu. Rev. Fish Dis.** 3 : 145- 185.
- Novick, K.P., and Muir, T.W. 1999. "Cell-cell communication in gram positive bacteria." **Annu. Rev. Microbiol.** 2 : 40-45.
- Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Tum, D.Y. and Lee J.K. 2003. "AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria." **Microbiol.** 149 : 1541-1550.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97 : 8789-8793.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H. 1993. "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene requires cell-to-cell communication." **Science.** 260 : 1127-1130.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D. and Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1994. "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91 : 197-201.
- Pearson, J.P. Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1995. "A second N-acylhomoserine lactone synthase signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92 : 1490-1494.
- Pinto, U.M., Viana, E.S., Martins, M.L. and Vanetti, M.C.D. 2007. "Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk." **Food Control.** 18 : 1322-1327.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นโดยอัตโนมัติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. and Givskov, M. 2000. "How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1." **Microbiol.** 146 : 3237–3244.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M. and Gram, L. 2001. "Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics." **J. Microbiol. Methods.** 44 : 239–251.
- Sakai, M. 1999. "Current status of fish immunostimulants." **Aquaculture.** 172 : 63– 92.
- Sambrook, J and Russel, D.W. 2001. **Molecular Cloning.** 3<sup>rd</sup> ed. China : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan JR, J.E. and Greenberg, E.P. 1996. "Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing : Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93 : 9505-9509.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan Jr., J.E., Rinehart, K.L. and Farrand, S.K. 1997. "Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94 : 6036–6041.
- Slock, J.D., VanRiet, D., Kolibachuk, D. and Greenberg, E.P. 1990. "Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR proteins defined by mutational analysis." **J. Bacteriol.** 172 : 3974-3979.
- Smith, V.J., Brown, J.H. and Hauton, C. 2003. "Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?" **Fish Shellfish Immunol.** 15 : 71–79.
- Subasinghe, R., 1997. "Fish health and quarantine." Review of the State of World Aquaculture, FAO Fisheries Circular, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy, 886 : 45–49.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1999. "Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*." **Infect. Immun.** 67 : 5192– 5199.
- Tendencia, E.A. and dela Peña, M. 2003. "Investigation of some components of the greenwater system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria." **Aquaculture.** 218 : 115–119.

- Thompson, F.L., Iida, T., and Swing, J. 2004. "Biodiversity of Vibrios." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 68 : 403-431.
- Tokuda, H., and Unemoto, T. 1982. "Characterization of the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*." **J. Biol. Chem.** 257 : 10007-10014.
- Ulrich, R.L. 2004. "Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*." **Appl. Environ. Microbiol.** 70 : 6173-6180.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64 : 655-671.
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P. and Stewart, G.S. 1998. "Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing." **FEMS Microbiol. Lett.** 163 : 185-192.
- Yan, L., Allen, M.S., Simpson, M.L., Sayler, G.S. and Cox, C.D. 2007. "Direct quantification of N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone in culture supernatant using a whole-cell bioreporter." **J. Microbiol. Methods.** 68 : 40-45.
- Zhang, X.-H. and Austin, B., 2000. "Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids." **J. Fish Dis.** 23 : 93-102.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

#### ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT Medium

#### ส่วนประกอบ

แอมโมเนียมซัลเฟต	2	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	2	กรัมต่อลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	10.7	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.16	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.010	มิลลิกรัมต่อลิตร
เพอริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.005	มิลลิกรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.75	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

#### ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
-------------------------------	----	-------------

ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลาย RF1

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมอะซิเตรด ( $CH_3COOK$ )	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ )	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน

### สารละลาย RF2

ส่วนประกอบ

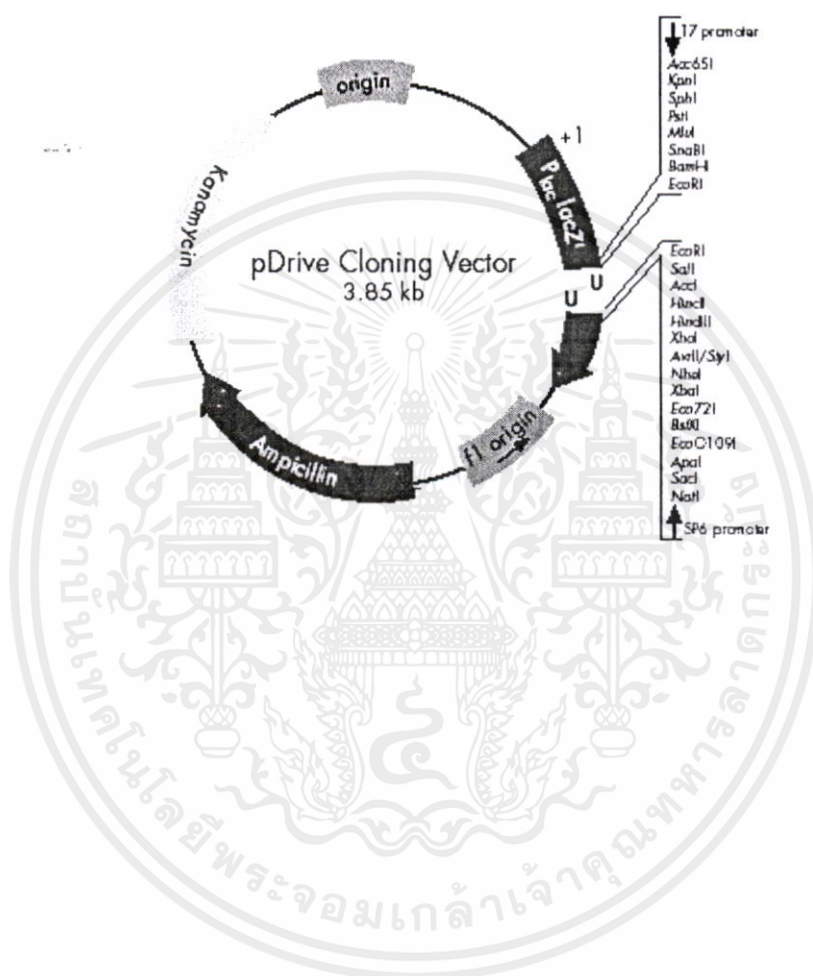
MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ )	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดอะซิติก แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ลำดับที่	ไอโซเลท	ที่มา	ลักษณะโคโลนี
1	A1	ตัวกุ้ง	กลม สีครีม ผิวหน้ามันเยิ้ม
2	A2	ตัวกุ้ง	ค่อนข้างรี สีขาว ขอบนอกของโคโลนีทึบแสง
3	A3	ตัวกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก
4	A4	ตัวกุ้ง	กลม สีครีม ขนาดเล็ก ผิวหน้าไม่มัน
5	A5	ตัวกุ้ง	กลม สีเหลือง
6	A6	ตัวกุ้ง	ค่อนข้างรี สีขาว ค่อนข้างโปร่งแสง
7	A7	ตัวกุ้ง	กลม สีขาว ขนาดเล็ก ทึบแสง
8	A8	ตัวกุ้ง	กลม สีขาว ตรงกลางโคโลนีทึบแสง
9	A9	ตัวกุ้ง	ขารรี สีขาว โปร่งแสง
10	A10	ตัวกุ้ง	ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ สีขาวครีม ผิวหน้ามันวาว
11	B1	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีครีม ทึบแสง มัน นูน ขอบไม่เรียบ
12	B2	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว เล็ก แบน ค่อนข้างโปร่งแสง
13	B3	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว เล็ก ค่อนข้างโปร่งแสง
14	B4	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาว กระจายปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ ขอบไม่เรียบ โปร่งแสง
15	B5	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีม ขอบไม่เรียบ มีเส้นใย
16	B6	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว ขนาดเล็ก ขอบทึบแสง ตรงกลางโปร่งแสง
17	B7	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขอบโปร่งแสง ตรงกลางทึบแสง
18	B8	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม นูน
19	B9	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็กมาก ทึบแสง
20	B10	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขอบโปร่งแสง ผิวค้ำนูนนอกแบน ตรงกลางนูน
21	C1	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก นูน
22	C2	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีครีม ขนาดเล็ก
23	C3	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง
24	C4	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาว ขนาดค่อนข้างใหญ่ ขอบเรียบ แบน
25	C5	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ที่มา	ลักษณะโคโลนี
26	C6	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก
27	C7	ตัวลูกกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีมเหลือง ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ
28	C8	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาว ขนาดเล็ก ขอบเรียบ เรืองแสงเมื่อส่องกับแสง
29	C9	ตัวลูกกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ โปร่งแสง
30	C10	ตัวลูกกุ้ง	กลม สีขาวครีม ขนาดเล็ก
31	C11	ตัวลูกกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีมเหลือง ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ
32	C12	ตัวลูกกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ
33	D1	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีมปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ เรืองแสงเห็นเป็นสีชมพู
34	D2	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ตรงกลางกลมนูน
35	D3	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีมเหลือง ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ
36	D4	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ขอบไม่เรียบ โคโลนีขนาดใหญ่
37	D5	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม โปร่งแสง ขอบเรียบ
38	D6	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ทึบแสง ผิวหน้ำมัน
39	D7	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาว โคโลนีขนาดใหญ่ โปร่งแสง เรืองแสง
40	D8	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ปกคลุมทั่วงานเพาะเชื้อ โปร่งแสง
41	T1	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว นูน ขอบเรียบ ขอบนอกค่อนข้างใส
42	T2	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว นูน ขอบเรียบ
43	T3	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
44	T4	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ
45	T5	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีเขียวใส ขนาดใหญ่ นูน ขอบเรียบ เรืองแสง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ที่มา	ลักษณะโคโลนี
46	T6	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีเหลือง ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
47	T7	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ
48	T8	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	ค่อนข้างรี สีเหลือง ขอบเรียบ
49	T9	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีเหลือง นูน
50	T10	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีเหลืองทอง ขอบเรียบ
51	T11	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ ผิวหน้ำมัน ค่อนข้างแบน
52	T12	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	ไม่มีรูปร่าง สีขาว ปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ
53	T13	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม ผิวหน้ำมัน นูน
54	T14	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาวครีม นูนมาก
55	T15	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวขุ่น ปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ
56	T16	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม มันวาว ปกคลุมทั่วจาน เพาะเชื้อ
57	T17	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว โปร่งแสง
58	T18	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	กลม สีขาว ผิวหน้ำมัน ขอบเรียบ
59	T19	น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง	รูปร่างไม่แน่นอน สีขาว ปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวศรินยา ใจตรง เกิดเมื่อวันที่ 14 ตุลาคม พ.ศ. 2524 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 71/7 หมู่ 7 ตำบลโสรธร อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา ในปี พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปีพ.ศ. 2551



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้