การถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

Transformation of the Fluorescent-Protein Coding Gene in *Burkholderia glumae*

นราทิพย์ เกตุกอ
นลินรัตน์ พนิตธนวงศ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

Transformation of the Fluorescent-Protein Coding Gene in *Burkholderia glumae*

นราทิพย์ เกตุกอ
นลินรัตน์ พนิตธนวงศ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

TRANSFORMATION OF THE FLUORESCENT-PROTEIN CODING GENE IN *Burkholderia glumae*

NARATIP KETKO
NALINRAT PANITTANAWONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* Transformation of The Fluorescent-Protein Coding Gene in *Burkholderia glumae*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนราทิพย์ เกตุกอ รหัสนักศึกษา 57050836 นางสาวนลินรัตน์ พนิตธนวงศ์ รหัสนักศึกษา 57050838
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ	
ดร. สุทธิจิตร ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนราทิพย์ เกตุกอ รหัสนักศึกษา 57050836 นางสาวนลินรัตน์ พนิตธนวงศ์ รหัสนักศึกษา 57050838
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Burkholderia glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia oryzae* เมื่อบ่มเชื้อร่วมกันโดยใช้วิธี Co-Culture แต่เมื่อศึกษาในใบข้าวพบว่าใบข้าวที่ปลูกเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 แสดงอาการเป็นโรค ในขณะที่ใบข้าวที่ปลูกด้วย *B. glumae* สายพันธุ์ 2018 ไม่แสดงอาการเป็นโรค การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเครื่องมือที่สามารถใช้ติดตามแบคทีเรีย *B. glumae* โดยถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสง mcherry เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *mcherry* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Ptac* และความคงตัวของพลาสมิดภายในแบคทีเรีย ได้มีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน *Ptac::mcherry*::terminator และแทรกลงในพลาสมิด pBBR1MCS-5 ตั้งชื่อรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอที่ได้ใหม่นี้เป็นพลาสมิด pKB2 ถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด มีการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะ Gentamicin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 สำหรับใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด ผลการทดลองพบว่า *B. glumae* ที่ไม่มีพลาสมิดไม่สามารถเจริญได้ในอาหารวุ้น LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 µg/ml ขึ้นไป หลังจากถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* ด้วยวิธี Electroporation แล้วสีโคโลนีของแบคทีเรียเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงเมื่อมองด้วยตาเปล่าและเรืองแสงเมื่อมองภายใต้แสงสีฟ้า แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียได้รับพลาสมิด pKB2 ที่มีการแสดงออกของยีน *mcherry* นอกจากนั้นเมื่อผ่านการ Subculture ลงอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะซ้ำ 10 ครั้ง พลาสมิดสามารถคงตัวอยู่ในเซลล์ *B. glumae* ได้นานถึง 20 วัน พลาสมิด pKB2 ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ในการติดตามแบคทีเรียเพื่อศึกษาการอาศัยอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของต้นข้าว

คำสำคัญ : การถ่ายฝากยีน การแสดงออกของยีน ความคงตัวของพลาสมิด โปรตีนเรืองแสง

Title	Transformation of The Fluorescent-Protein Coding Gene in *Burkholderia glumae*
Students	Miss Naratip Ketko Student ID 57050836
	Miss Nalinrat Panittanawong Student ID 57050838
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst. Prof. Dr. Chokchai Kittiwongwattana

Abstract

Burkholderia glumae strains 2015 and 2018 were able to inhibit *Xanthomonas oryzae* and *Pyricularia oryzae in vitro*. However, rice inoculated with strain 2015 developed disease symptoms while those treated with strain 2018 did not. The aim of present study is to develop a molecular tool to investigate the colonization of both strains in rice using fluorescent protein *mcherry*. Expression of the *mcherry* gene was under control of *Ptac* promoter. The expression cassette, *Ptac*::*mcherry*::terminator, was ligated the pBBR1MCS-5 plasmid. The recombinant plasmid was named pKB2 and cloned in *Escherichia coli*. Subsequently, pKB2 was introduced to the two strains of *B. glumae* using electroporation. Transformed *B. glumae* colonies become pink and glowed when visualized with naked eyes and under the blue light transilluminator, respectively. Plasmid stability was tested by 10 times of repetitive subculture. Bacteria colonies were still resistant to gentamycin and fluoresced under the blue light. This indicated pKB2 could be used for tracking of bacterial cells in plants.

Keyword : Fluorescent Protein, Gene Expression, Gene Transformation, Plasmid Stability

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เข้าใจกระบวนการคิดวิเคราะห์ ตั้งสมมติฐานและแก้ไขปัญหาทางวิทยาศาสตร์ กลุ่มของข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ซึ่งเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของกลุ่มข้าพเจ้าที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ดูแลเอาใจใส่ และให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

การดำเนินการศึกษามิอาจสำเร็จลุล่วงไปได้หากปราศจากการสนับสนุนด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ สถานที่ในดำเนินการทดลอง และคณาจารย์ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ท้ายที่สุดนี้กลุ่มของข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยส่งเสริมการศึกษา และให้กำลังใจตลอดมา อีกทั้งขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือซึ่งกันและกัน และขอขอบคุณหนังสือ เอกสารงานวิจัยของทุกท่านที่ผู้จัดได้ศึกษาค้นคว้ารวมถึงใช้เป็นเอกสารอ้างอิงวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นราทิพย์ เกตุกอ
นลินรัตน์ พนิตธนวงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 โปรตีนเรืองแสง 3
2.1.1 การค้นพบโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein) 3
2.1.2 โครงสร้างโปรตีนเรืองแสงและความหลากหลายของโครโมฟอร์ 3
2.1.3 การนำโปรตีนเรืองแสงไปประยุกต์ใช้ในสิ่งมีชีวิต 4
2.2 การโคลนนิ่ง (DNA Cloning) 5
2.2.1 ขั้นตอนการโคลนนิ่ง 6
2.2.2 ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) 8
2.2.3 เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) 9
2.3*Burkholderia. glumae* 9
2.3.1 การก่อโรคของแบคทีเรีย *B. glumae* 10
2.3.2 การควบคุมการระบาดของเชื้อ *B. glumae* 10
2.3.3 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย *B. glumae* 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 12
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 12
3.3 สารเคมี 12
3.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ 13
3.5 ขั้นตอนการดำเนินการ 15

3.5.1 การเพิ่มปริมาณ Primer 1111F, Primer 1111R และ ยีนเรืองแสง *mcherry* โดยใช้วิธี PCR 15
3.5.2 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis 15
3.5.3 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification) 16
3.5.4 วัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 16
3.5.5 การตัดพลาสมิด pBBR1MCS-5 และยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) 16
3.5.6 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis 17
3.5.7 การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล (Gel Extraction) 17
3.5.8 การเชื่อม (Ligation) พลาสมิด pBBR1MCS-5 กับยีน *Ptac*::*mcherry* เข้าด้วยกัน 18
3.5.9 การนำพลาสมิด pKB2 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) *E. coli* และเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็ง LB Agar ที่มีสารละลาย X-Gal และ IPTG 18
3.5.10 การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pKB2 18
3.5.11 การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ 19
3.5.12 ทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin 19
3.5.13 การเตรียม Competent Cells โดยใช้วิธี Conventional Method 20
3.5.14 การเตรียม Competent Cells โดยใช้วิธี High Competency Method 20
3.5.15 การนำพลาสมิด pKB2 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) *B. glumae* 21
3.5.16 การทดสอบผลการ Transformation 21
3.5.17 ทดสอบความคงตัวของพลาสมิด pKB2 (Plasmid Stability) 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 23
4.1 การสร้างพลาสมิด pKB2 23
4.2 การถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* 26
4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส 29
4.4 การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin 32
4.5 การเตรียม Competent Cells ของแบคทีเรีย *B. glumae* 35
4.6 การถ่ายพลาสมิด pKB2 เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* 37
4.7 การคงตัวของพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* 39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 42
5.1 สรุปผลการวิจัย 42
5.2 ข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิง 44
ภาคผนวก 46

ภาคผนวก ก..... 47
ภาคผนวก ข..... 48

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator และ พลาสมิด pBBRIMCS-5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 26

4.2 แสดงความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด pKB2 ที่ถูกชะด้วย Elution Buffer ปริมาตร 30 µl 28

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4.1 แผนภาพแสดงการออกแบบ Primer 1111F และ 1111R 23

4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *mcherry* โดยใช้ไพรเมอร์ 1111F และ 1111R (M : 1 kb DNA Ladder, 1-3 : ชิ้นส่วนยีน *mcherry*) 24

4.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Bam*HI (M : 1 kb DNA Ladder, 1 : ชิ้นส่วน *Ptac*::*mcherry*::terminator) 25

4.4 แผนภาพแสดงการสร้างพลาสมิด pKB2 25

4.5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator จากการถ่ายฝากในแบคทีเรีย *E. coli* (M : 1 kb DNA Ladder, 1-24 : ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator) 27

4.6 ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดจากการถ่ายฝากยีนในแบคทีเรีย *E. coli* (M : 1 kb DNA Ladder, 1-4 : พลาสมิด pKB2 จากตัวอย่างที่ 3, 4, 8 และ 18) 27

4.7 แผนภาพแสดงตำแหน่งการจับของ Primer M13F, M13R, *mcherry*RT-R และ *mcherry*RT-F บนพลาสมิด pKB2 28

4.8 การตรวจสอบทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ในพลาสมิด pKB2 ที่สกัดจากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 3, 4, 8 และ 18 (M: 1 kb DNA Ladder, 1-4 : ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 677 คู่เบส, 5-9 : ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส) 29

4.9 การเปรียบเทียบลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 จากการตัดต่อด้วยโปรแกรม APE (เส้นบน) กับลำดับเบสของ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่วิเคราะห์ได้จากพลาสมิด pKB2 สกัดได้จากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 4 30

4.10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 จากการตัดต่อด้วยโปรแกรม APE (เส้นบน) กับลำดับเบสของ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่วิเคราะห์ได้จากพลาสมิด pKB2 สกัดได้จากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 18 31

4.11 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก-จ) และสายพันธุ์ 2018 (ช-ฎ) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0 µg/ml (ก, ช), 15 µg/ml (ข, ซ), 25 µg/ml (ค, ฌ), 35 µg/ml (ง, ญ), 45 µg/ml (จ, ฎ) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง 33

4.12 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก-จ) และ สายพันธุ์ 2018 (ช-ฎ) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0 µg/ml (ก, ช), 15 µg/ml (ข, ซ), 25 µg/ml (ค, ฌ), 35 µg/ml (ง, ญ), 45 µg/ml (จ, ฎ) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง 34

4.13 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 ในอาหาร LB broth ที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 42 ชั่วโมง โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร 35

4.14 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2018 ในอาหาร LB broth ที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 42 ชั่วโมง โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร 36
4.15 การเจริญของเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหาร Nutrient Agar หลังจากถูกเตรียมเป็น Competent Cells ด้วยวิธี High Competency Method..... 36
4.16 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) และ สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 25 µg/ml 37
4.17 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator จากการทำ PCR ใน *B. glumae* ที่ผ่านการถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 (M : 1 kb DNA Ladder, 1-16 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 17-24 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018)..... 38
4.18 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator จากการทำ PCR ใน *B. glumae* ที่ผ่านการถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 (M : 1 kb DNA Ladder, 1-8 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018) 38
4.19 การเรืองแสงของยีน *mcherry* ในแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 ที่ได้รับพลาสมิด (ก) และไม่ได้รับพลาสมิด (ข), สายพันธุ์ 2018 ที่ได้รับพลาสมิด (ง) และไม่ได้รับพลาสมิด (จ) ภายใต้แสงสีฟ้า การสังเกตด้วยตาเปล่าสายพันธุ์ 2015 (ค) และ สายพันธุ์ 2018 (ฉ)..... 39
4.20 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) และ สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 25 µg/ml..... 40
4.21 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator จากการทำ PCR โดยใช้ Primer M13F และ M13R (M : 1 kb DNA Ladder, 1-5 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 6-10 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018, Negative Control; 11-12 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 13-14 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018)..... 41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีความสำคัญต่อสังคมไทยมายาวนานในแง่การบริโภคเป็นอาหารหลักหรือนำไปแปรรูปเป็นผลผลิตอื่นๆ เพื่อการบริโภคหรือจำหน่าย ข้าวถูกนำไปใช้ในการแลกเปลี่ยนเป็นสินค้าและบริการตลอดจนเป็นรายได้ของประเทศในการส่งออก การพัฒนาและแก้ไขปัญหาผลผลิตข้าวจึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจมาอย่างต่อเนื่อง หัวข้อหนึ่งที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางคือการเฝ้าระวังและแก้ปัญหาโรคในข้าวเพื่อลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิต

โรครวงไหม้ในข้าว (Panicle Blight Disease) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* สร้างสาร Toxoflavin จากการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย (Quorum Sensing System) ปัจจุบันโรคดังกล่าวยังไม่พบในประเทศไทยแต่ยังมีการเฝ้าระวังการระบาดของโรคอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ดีแบคทีเรีย *B. glumae* บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติไม่ก่อโรคและบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ด้วย งานวิจัยนี้มีที่มาจากการค้นพบแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 จากต้นข้าว แบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าว *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia oryzae* ในจานทดลอง อย่างไรก็ดีเมื่อทดสอบกับต้นข้าวแล้วพบว่าสายพันธุ์ 2015 ก่อโรคในข้าว ในขณะที่สายพันธุ์ 2018 ไม่ก่อโรคและยับยั้งการเกิดโรคในต้นข้าวได้ด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าความแตกต่างดังกล่าวระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์อาจเกิดมาจากความสามารถในการครอบครองพื้นที่ (Colonization) แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการตัดต่อยีน *mcherry* ที่กำหนดการสร้างโปรตีนเรืองแสงเข้ากับพลาสมิดและถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้งานวิจัยยังต้องการทดสอบความคงตัวของพลาสมิดที่มียีน *mcherry* ว่าจะสามารถคงอยู่ภายในแบคทีเรียได้นานเพียงใด สิ่งที่ได้จากการทดลองนี้จะเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการติดตามและตรวจสอบการเข้าครอบครองพื้นที่ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในต้นข้าวว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไรและพลาสมิดที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษากับแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์อื่นๆ ต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาการส่งถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสง *mcherry* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ tac (*Ptac*) เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae*
2) เพื่อศึกษาความคงตัวพลาสมิดที่มียีนโปรตีนเรืองแสง *mcherry* ในแบคทีเรีย *B. glumae*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองในงานวิจัยนี้คือแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018
2) การส่งถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสง *mcherry* เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์
3) ศึกษาความคงตัวของพลาสมิดที่มียีนโปรตีนเรืองแสง ในระยะเวลา 20 วัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) พลาสมิดที่มียีน *mcherry* เพื่อใช้ถ่ายฝากในแบคทีเรีย *B. glumae*
2) การคงอยู่ของพลาสมิดที่มียีน *mcherry* ในแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้ง 2 สายพันธุ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนเรืองแสง

2.1.1 การค้นพบโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein)

โปรตีนเรืองแสงมีหลากหลายชนิดแต่ที่รู้จักกันดีและถูกค้นพบเป็นชนิดแรกคือโปรตีนเรืองแสงสีเขียว หรือ Green Fluorescent Protein (GFP) ในช่วงต้นทศวรรษที่ 1960 (Shimomura *et al.*, 1962) ชิโมมุระและจอห์นสันคัดแยกโปรตีนจากแมงกะพรุนสปีชีส์ *Aequorea victoria* บริเวณชายฝั่งของอ่าวฟรายเดย์ทางตะวันออกของอเมริกาเหนือและตัดเพียงบางส่วนของแมงกะพรุนมาสกัดเป็นน้ำคั้น ต่อมาสังเกตเห็นน้ำคั้นของแมงกะพรุนเรืองแสงสีฟ้าในขณะที่ชิโมมุระกำลังเทน้ำคั้นลงในอ่าง ณ ขณะนั้นทั้งคู่เข้าใจว่าเกิดจากปฏิกิริยาเคมีของประจุแคลเซียมจากน้ำทะเลที่ปะปนเข้ามาด้วย ตลอดช่วงเวลานั้นทั้งคู่ยังคงช่วยกันเก็บตัวอย่างน้ำคั้นจากแมงกะพรุนอย่างต่อเนื่อง เมื่อได้น้ำคั้นจากแมงกะพรุนครบ 1,000 ตัว และนำมาสกัดจนได้สารบริสุทธิ์ที่เรืองแสงสีฟ้าได้และตั้งชื่อว่าโปรตีนเอควาริน (Aequorin Protein) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้เป็นจุดเริ่มต้นในงานวิจัยของทั้งคู่ในปีต่อมา

ในปี ค.ศ. 1962 การค้นพบของทั้งคู่ได้ตีพิมพ์ลงวารสารวิชาการซึ่งได้บรรยายว่าโปรตีนเอควารินที่แยกได้นี้มีสีเขียวเล็กน้อยเมื่อถูกแสงแดด มีสีออกเหลืองเมื่อถูกแสงจากหลอดไฟและเรืองแสงสีเขียวเมื่อได้รับยูวี โดยการเรืองแสงของโปรตีนนี้ขึ้นอยู่กับอนุภาคแคลเซียมซึ่งทำให้เกิดการเปล่งแสงสีฟ้าและพลังงานบางส่วนที่ได้จากการเรืองแสงสีฟ้าจะไปกระตุ้นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งเรืองแสงสีเขียว โปรตีนนี้ภายหลังถูกเรียกใหม่ว่าโปรตีนเรืองแสงสีเขียวหรือจีเอฟพี หลายปีต่อมาชิโมมุระก็ได้ค้นพบว่าแท้จริงแล้วโปรตีนนี้มีส่วนประกอบของสารที่ทำให้เกิดสีหรือที่เรียกว่า โครโมฟอร์ (Chromophore) ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามารถเปล่งแสงที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่นแสงสีเขียวเมื่อได้รับแสงยูวี

2.1.2 โครงสร้างโปรตีนเรืองแสงและความหลากหลายของโครโมฟอร์

โครงสร้างของโปรตีน GFP มีลักษณะเหมือนกับโปรตีนทั่วไปประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ลำดับ ได้แก่ ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และ ตติยภูมิ โครงสร้างปฐมภูมิหรือโครงสร้างหลักของโปรตีน GFP เป็นการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน 238 โมเลกุล น้ำหนัก 25 KDa โครงสร้างทุติยภูมิเกิดจากการทำปฏิกิริยาด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กันเกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างกันได้เป็นโครงสร้าง 3 มิติแบบ beta sheets (β-sheets) อยู่ในรูปที่พับและทบกันไปมา โครงสร้างตติยภูมิมีลักษณะเป็นแผ่น 11 แผ่นบิดเป็นเกลียวคล้ายกระบอกเกิดเป็นโครงสร้างผลึกของ GFP บริเวณตรงกลางมีกลุ่มของโครโมฟอร์เป็นกรดอะมิโนสายสั้นสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น UV – Visible คือ 100-800 นาโนเมตร สำหรับโปรตีน GFP โครโมฟอร์คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 65-67 ได้แก่ Ser-Tyr-Gly กรดอะมิโนตัวแรกของโครโมฟอร์ตำแหน่งที่ 65 สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นได้ในขณะที่ตำแหน่งที่ 66 ได้แก่ Tyr66 และ ตำแหน่งที่ 67 ได้แก่ Gly67 นั้นต้องอนุรักษ์ไว้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ จึงทำให้โครโมฟอร์เป็นส่วนที่สำคัญของโปรตีนเรืองแสงเนื่องจากโครงสร้างที่แตกต่างกันภายในโมเลกุลมีผลต่อสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของโปรตีน เช่นโปรตีน mcherry กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 65 คือ Histidine มีความยาวคลื่นแสงในการกระตุ้น 587

นาโนเมตร ความยาวคลื่นในการปล่อยพลังงาน 610 นาโนเมตร morange มีความยาวคลื่นแสงในการกระตุ้น 548 นาโนเมตร ความยาวคลื่นในการปล่อยพลังงาน 562 นาโนเมตร กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 65 คือ Threonine และ Topaz กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 65 คือ Lysine มีความยาวคลื่นแสงในการกระตุ้น 514 นาโนเมตร ความยาวคลื่นในการปล่อยพลังงาน 521 นาโนเมตร (Dmitriy *et al.*, 2010)

2.1.3 การนำโปรตีนเรืองแสงไปประยุกต์ใช้ในสิ่งมีชีวิต

โปรตีนเรืองแสงเป็นเครื่องมือที่มีบทบาทสำคัญต่องานทางด้านชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ มีส่วนช่วยให้เข้าใจการศึกษาการรวมกลุ่มของจุลินทรีย์ (Bioflim) สามารถใช้ติดฉลากโปรตีน (Protein Labeling) ที่ต่างชนิดกันด้วยสีที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ง่ายยิ่งขึ้น และยังใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์

ตัวอย่างของการประยุกต์ใช้โปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรียได้แก่ การศึกษาการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ด้วยโปรตีนเรืองแสง mcherry การศึกษาครั้งนี้ใช้โปรโมเตอร์ *Ptac* ควบคุมการแสดงออกของยีนดังกล่าว และโคลนชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิด 3 ชนิด ได้แก่ PBK-miniTn7 Transposon, pBBR1MCS-5 และ pME6031 ได้เป็นพลาสมิดชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ pMP7604, pMP7605 และ pMP7607 ตามลำดับ โดยแบคทีเรีย *P. putida* ที่ได้รับพลาสมิดเหล่านี้ถูกตั้งชื่อสายพันธุ์เป็น *P. putida* PCL1479, *P. putida* PCL1480 และ *P. putida* PCL1481 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *P. putida* ที่ได้รับพลาสมิดต่างชนิดกันมีการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงดังนี้ *P. putida* PCL1480 มีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์จะเห็นการเรืองแสงสีแดงอย่างชัดเจน รองลงมาคือ *P. putida* PCL1479 และ *P. putida* PCL1481 ตามลำดับ ซึ่งการเปล่งแสงของแสงฟลูออเรสเซนต์สอดคล้องกับความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จากการวัดโดยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ดังนั้นการโคลนยีน *mcherry* โดยใช้ pBBR1MCS-5 เป็นพาหะในแง่ของการแสดงออกทำให้เกิดการแสดงออกได้ดีกว่าการใช้พลาสมิด PBK-miniTn7 Transposon และ pME6031 เมื่อนำแบคทีเรียที่มียีน *mcherry* ทั้ง 3 สายพันธุ์บ่มลงบนพื้นผิวแก้ว 24 ชั่วโมงและในรากมะเขือเทศเป็นเวลา 7 วัน จากนำเชื้อแบคทีเรียไปวิเคราะห์การเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล (Confocal Microscopy) พบว่าไบโอฟิล์มที่ขึ้นบนผิวแก้วแพร่กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน ตรงข้ามกับไบโอฟิล์มในรากมะเขือเทศมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มเพียงบางบริเวณของราก *Pseudomonas putida* PCL1480 ที่ได้รับพลาสมิด pMP7605 เรืองแสงสีแดงมากที่สุดทั้งบนผิวแก้วและในรากมะเขือเทศ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *mcherry* ข้างต้นว่ายีน *mcherry* ที่ถูกโคลนลงในพลาสมิด pBBR1MCS-5 ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนมากที่สุด ดังนั้นการนำโปรตีนเรืองแสงมาใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุศาสตร์สามารถติดตามแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้งในสภาพแวดล้อม หลอดทดลอง และ ในสิ่งมีชีวิต (Ellen *et al.*, 2010)

2.2 การโคลนนิ่ง (DNA Cloning)

การโคลนนิ่งดีเอ็นเอคือการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจโดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้ากับพาหะ (Vector) เกิดเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่เรียกว่า รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียทำหน้าที่เก็บรักษาและเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอมีดังนี้

1) เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ตัดโมเลกุลดีเอ็นเอในบริเวณที่มีลำดับเบสที่ถูกจดจำได้โดยการตัดของเอนไซม์จะทำให้เกิดโมเลกุลดีเอ็นเอปลายเปิดทั้งสองด้าน 2 รูปแบบได้แก่ ปลายเรียบ (Blunt End) เป็นปลายที่ไม่มีสายดีเอ็นเอยื่นออกมา และปลายเหนียว (Sticky End) เป็นปลายเปิดที่มีดีเอ็นเอสายหนึ่งยื่นออกมา รูปแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ยื่นออกมานี้เป็นพื้นฐานของการสร้างดีเอ็นเอสายผสม เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดพลาสมิดที่จุดจำเพาะทำให้เกิดปลายเปิดที่มีสภาพเป็นปลายเหนียวและใช้เอนไซม์เดียวกันนี้ตัดโมเลกุลดีเอ็นเอในพลาสมิดทำให้เกิดปลายเหนียวที่มีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกลงในเวคเตอร์ เมื่อเอาดีเอ็นเอทั้งสองส่วนนี้มาผสมเข้ากันในหลอดทดลองที่มีสภาวะเหมาะสมจะทำให้เกิดการเข้าคู่เบสระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดและถูกปิดเชื่อมด้วยการทำงานของเอนไซม์ไลเกส (T4 Ligase) (Leland *et al.*, 2554)

2) ดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะทำหน้าที่ขนส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านและมีหน้าที่จำลองตัวเองไปพร้อม ๆ กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นให้ได้ปริมาณมาก ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการโคลนยีนต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ 2 ประการ ประการแรกต้องสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้และประการที่สองเมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้วต้องจำลองแบบตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวน ในธรรมชาติสามารถพบเห็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะดังกล่าว 2 ชนิดได้แก่ พลาสมิดและโครโมโซมของไวรัส

พลาสมิดเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เป็นรูปวงแหวนปิดสามารถดำรงอยู่ร่วมกับโครโมโซมได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย พลาสมิดทุกชนิดประกอบด้วยลำดับเบสอย่างน้อยหนึ่งบริเวณที่สามารถทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของพลาสมิดได้เรียกบริเวณดังกล่าวนี้ว่า จุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (Origin of Replication) ทำให้พลาสมิดเหล่านี้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แบคทีเรียได้โดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้จากยีนบนโครโมโซมของแบคทีเรีย ภายในโมเลกุลพลาสมิดมียีนที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อตัวเซลล์เอง ตัวอย่างเช่น การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียทำให้มีความสามารถที่จะดำรงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Chloramphenicol หรือ Amplicilin คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เป็นวิธีการสำหรับคัดเลือกเซลล์โคลนในห้องปฏิบัติการโดยแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะจะเป็นแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (วิสุทธิ์, 2536)

pBBR1MCS เป็นชื่อของพลาสมิดที่สามารถเพิ่มจำนวนและคงตัวอยู่ได้ในแบคทีเรียแกรมลบหลากหลายจีนัส (Broad-host-range cloning vector) จัดเป็นพลาสมิดกลุ่ม IncP ซึ่งพลาสมิดกลุ่มนี้มีแนวโน้มที่จะไม่คงตัวเนื่องจากมีระยะเวลาสั้นในการคงตัวอยู่ในเซลล์ มีการรายงานถึงคุณลักษณะของพลาสมิด pBBR1MCS ว่ามีขนาด 4.7 Kb ประกอบด้วยบริเวณสำหรับโคลนนิ่ง (Multiple cloning site) 16 ตำแหน่งภายในยีน *lacz* มียีนเครื่องหมายเป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลและสามารถคงอยู่ได้ในแบคทีเรียมากกว่า 4 สัปดาห์ โดยปราศจากการคัดเลือกโดยยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามยีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลมีข้อจำกัดในการใช้กับแบคทีเรียแกรม

ลบบางจีนัสที่ทนต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลตามธรรมชาติอยู่แล้ว ดังนั้นจึงมีการสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่โดยการตัดต่อยีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลออกแล้วโคลนยีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดอื่นลงไปแทนได้แก่ kanamycin (Km^R), Amplicilin (Amp^R), Tetracycline (Tet^R) และ Gentamycin (Gm^R) เกิดเป็นพลาสมิด 4 ชนิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะแตกต่างกันคือ pBBR1MCS-2, pBBR1MCS-3, pBBR1MCS-4 และ pBBR1MCS-5 ตามลำดับ การสร้างยีนเครื่องหมายเหล่านี้โดยใช้ pBBR1MCS เป็นโครงหลักของพลาสมิดทำให้เพิ่มการใช้ประโยชน์มากขึ้นในแบคทีเรียแกรมลบที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ (Michael *et al.*, 1995)

2.2.1 ขั้นตอนการโคลนนิ่ง

ขั้นตอนการโคลนนิ่งประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 การแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ โดยเรียกโมเลกุลดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอลูกผสม และเชื่อมดีเอ็นเอทั้งสองส่วนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลเกสที่ทำหน้าที่สร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester Bond) ระหว่างพลาสมิดกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขั้นตอนที่ 2 ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน จุดประสงค์ของการนำเข้าสู่เซลล์คือการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยสิ่งแวดล้อมภายในเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อถ่ายพลาสมิด (Transformation) เข้าสู่เซลล์แล้วจะต้องมีขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (Isolation of Transformed Cells) และคัดแยกรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มียีนที่เราสนใจแทรกอยู่ด้วย (Screening for Insert-Containing DNA)

สำหรับการโคลนยีนนั้นขั้นตอนการนำโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสมที่สร้างขึ้นในหลอดทดลองเข้าเซลล์เจ้าบ้านนั้นเป็นสิ่งจำเป็น โดยมีวิธีการอยู่หลายวิธีและกระบวนการนี้ถูกเรียกว่า ทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation) ในที่นี้จะอธิบายเพียง 3 วิธี ดังนี้ 1) วิธีธรรมชาติ (Natural Method) แบคทีเรียหลายสปีชีส์มีความสามารถตามธรรมชาติที่จะรับเอาโมเลกุลดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกเข้าสู่เซลล์ ความสามารถนี้เรียกว่า Competence และจำกัดอยู่เฉพาะบางช่วงของระยะการเจริญเติบโต (Growth Phase) ของแบคทีเรียเท่านั้นภาวะ Competence นั้นถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยให้แบคทีเรียมีความสามารถทางกระบวนการทางชีวเคมีใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะของการขาดแคลนอาหาร หรือภาวะความเครียดอื่น ๆ หากการทดลองในห้องปฏิบัติการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเกิดการ Transformation ได้เองตามธรรมชาติก็เพียงแต่บ่มเซลล์ที่อยู่ในระยะจำเพาะของการเจริญเติบโตกับโมเลกุลดีเอ็นเอ หลังจากนั้นก็จะทำให้เกิดการรับเอาโมเลกุลดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ 2) วิธีทางเคมี (Chemical Transformation) ประสิทธิผลของการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการใช้สารเคมีกับเซลล์ ตัวอย่างเช่น ในสภาวะปกติเซลล์ *Escherichia coli* ไม่สามารถรับดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์ได้ แต่ถ้าใช้สารละลาย $CaCl_2$ ที่เย็น บ่มเซลล์แล้วตามด้วยการใช้ความร้อนและความเย็นอย่างรวดเร็วจะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์รับเอาดีเอ็นเอเข้าไปภายในเซลล์ได้ ทั้งนี้เซลล์แบคทีเรียที่จะนำมา Transformation ต้องถูกเตรียมให้อยู่ในสภาพที่พร้อมในการซึมผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอภายนอกเข้าสู่เซลล์ว่า Competent Cells 3) การใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) โดยใส่เซลล์ลงไปในคูเวต (Cuvette) ซึ่งตั้งอยู่ระหว่างอิเล็กโทรด 2 ตัว อิเล็กโทรดทำให้เกิดความต่างศักย์ไหลผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยกระแสไฟฟ้าจะไปรบกวนโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติยอมให้สารผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ในช่วงเวลาสั้น แต่ในขณะเดียวกันกระแสไฟฟ้าก็ทำให้เกิดการตายของเซลล์ส่วนหนึ่งอีกด้วย ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ Transformation ควรเป็นสภาวะที่

ทำให้เกิดความสมดุลระหว่างปริมาณเซลล์ที่ถูกฆ่ากับปริมาณเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการรับเอาดีเอ็นเอเข้าไปภายในเซลล์ (มณีวรรณ, 2553)

Competent Cells ที่ถูกเตรียมในสภาวะอุณหภูมิต่ำสำหรับใช้กับวิธี Electroporation ทำให้แบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะตาย จึงได้มีการทดลองศึกษาวิธีการเตรียม Competent Cells เปรียบเทียบระหว่าง 1) เตรียม Competent Cells บนน้ำแข็งตามวิธีการดั้งเดิม 2) เตรียมเหมือนข้อที่ 1 และแช่เซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็งก่อนที่นำมาถ่ายพลาสมิด 15 นาที 3) เตรียมเหมือนข้อที่ 1 และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาทีก่อนจะนำมาถ่ายพลาสมิด 4) ทุกขั้นตอนของการเตรียม Competent cells ทำที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการนำพลาสมิด pGB-amp-Ptet-plul1880 เข้าสู่ *E. coli* GB2005 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มียาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน โดยอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการทดลองนี้อยู่ในช่วง 24-28 °C พบว่าวิธีการเตรียม Competent Cells แบบข้อ 4 คือทุกขั้นตอนเตรียมที่อุณหภูมิห้องมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการถ่ายพลาสมิดวัดผลจากจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารและเพื่อยืนยันว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการถ่ายพลาสมิดได้ทำการทดลองเพิ่มโดยเตรียม Competent Cells ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 15 นาทีก่อนจะนำมาถ่ายพลาสมิด ผลที่ได้คือจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้เตรียม Competent Cells เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดหรือตายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและอุณหภูมิห้องในช่วง 24-28 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียม Competent Cells นอกจาก *E. coli* GB2005 ยังนำอุณหภูมิดังกล่าวไปทดลองในแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *B. glumae* PG1, *Argobacterium sp.*, *Photorhabdus* sp. และ *Xenorhabdus* sp. (QiangTu *et al.*, 2016)

การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้รับพลาสมิดทำได้โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นผสมกับยาปฏิชีวนะ จะมีเพียงเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะอยู่เท่านั้นที่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในอาหารดังกล่าวโดยโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะจะประกอบด้วยโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมและโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดเปล่าซึ่งเกิดขึ้นได้จากในขั้นตอนการโคลนนิ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจไม่ได้แทรกเข้าไปในพลาสมิดหรือการตัดพลาสมิดไม่สมบูรณ์โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะเป็นเพียงการตรวจสอบว่าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่ จึงต้องมีขั้นตอนการคัดแยกโคโลนีเหล่านี้เพื่อยืนยันว่าเซลล์แบคทีเรียได้รับดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ วิธีการที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ Blue-White Colony Screening ในพลาสมิดมียีนสร้างเอนไซม์ β-Galactosidase หรือยีน *lacz* เป็นยีนรายงานผลและมีตำแหน่งตัดต่อ (Cloning Site) ชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ภายในยีน ตามปกติยีน *lacz* จะสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งย่อยน้ำตาลแลคโตสแต่ถ้ายีนนี้ถูกรบกวนโดยการแทรกด้วยยีนอื่นเข้าไปจะทำให้ยีน *lacz* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ β-Galactosidase ได้อีก ด้วยคุณสมบัติข้อนี้จึงนำมาใช้แยกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดเปล่ากับเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ออกจากกันโดยใส่สารมีชื่อว่า X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β-D-Galactopyranoside) เป็นสารตั้งต้นไม่มีสีของเอนไซม์ β-Galactosidase ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและอนุพันธุ์ของอินโนซิล ปกติเอนไซม์นี้ถูกสังเคราะห์โดยเซลล์ *E. coli* เมื่อมีน้ำตาลแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์นี้สามารถทำได้โดยใช้สาร IPTG (Iso-Propyl-Thiogalactoside) ถ้าแบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีนที่สนใจแทรกอยู่ยีน *lacz* จะสามารถสร้างเอนไซม์ β-Galactosidase และตัดโมเลกุลสาร X-Gal

ออกเป็นน้ำตาลกาแลคโตสกับอนุพันธ์ของอินโนซิลเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอากาศทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของไดโบรโมไดคลอโร (Dibromodichloro Derivative) ซึ่งมีสีฟ้า แต่ถ้าแบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มียีนแทรกอยู่บริเวณ Cloning Site ยีน *lacz* จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ β-Galactosidase ได้ทำให้ไม่เกิดการตัดโมเลกุลสาร X-Gal จึงเห็นโคโลนีแบคทีเรียเป็นสีขาว (มณีวรรณ, 2553)

2.2.2 ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

การโคลนจำเป็นต้องนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการไปฝากไว้ในแบคทีเรีย มีขั้นตอนที่ละเอียดและใช้เวลานานเป็นสัปดาห์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับเทคนิค PCR ที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ข้อได้เปรียบอีกอย่างคือต้องการตัวอย่างดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็สามารถนำมาเพิ่มปริมาณและหาลำดับเบสที่เหลือได้อย่างสมบูรณ์ แนวคิดเกี่ยวกับปฏิกิริยา PCR อาศัยธรรมชาติของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยสายโพลินิวคลีโอไทด์ 2 สายที่ยึดติดกันโดยพันธะไฮโดรเจนวิธีการเพิ่มดีเอ็นเอทำในหลอดทดลองโดยจะต้องเลือกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) ที่เป็นสายสั้นๆ เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอส่วนหัวและส่วนท้ายของดีเอ็นเอที่ต้องการ เมื่อให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอจะทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์นั้นแยกออกจากกันและเปิดทางให้ไพรเมอร์เข้าสู่ตำแหน่งทั้งส่วนหัวและส่วนท้ายของสายพอลินิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์แต่ละตัวจะทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์โพลินิวคลีโอไทด์สายใหม่โดยใช้สายเดิมเป็นต้นแบบ การสังเคราะห์โพลินิวคลีโอไทด์สายใหม่นี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Polymerase ในระยะแรกของการพัฒนาเทคนิค PCR มีปัญหาอย่างหนึ่งคือการใช้ความร้อนสูงในการแยกสายดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้กันอยู่ทั่วไปไม่สามารถคงสภาพและทำงานได้ดีในสภาวะที่ความร้อนสูงเช่นนั้น ปัญหานี้ได้รับการแก้ไขโดยการใช้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่สกัดได้จากแบคทีเรียชนิด *Thermus aquaticus* ซึ่งอาศัยอยู่ตามบริเวณบ่อน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิสูงถึง 70-80 °C เอนไซม์ของแบคทีเรียชนิดนี้จึงมีความคงทนและทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เมื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เสร็จสิ้นโดยสมบูรณ์ในรอบแรกจะได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ 2 โมเลกุลที่เหมือนกันทุกประการ จากนั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเริ่มต้นใหม่ในรอบสองโดยโพลินิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุลนั้นจะแยกออกจากกันอีกทำให้ได้สายโพลินิวคลีโอไทด์ 4 สายเกิดการสังเคราะห์สายโพลินิวคลีโอไทด์จากสายต้นแบบโดยการทำงานของเอนไซม์ Polymerase เช่นในรอบแรกจนกระทั่งกระบวนการสังเคราะห์ในรอบสองนี้เสร็จสิ้นลงจนได้ดีเอ็นเอ 4 โมเลกุล กระบวนดังกล่าวก็จะดำเนินในรอบต่อ ๆ ไป จนทำให้เกิดโมเลกุลดีเอ็นเอมากขึ้นเป็นทวีคูณเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะมีดีเอ็นเอทั้งสิ้น 2^n โมเลกุล เมื่อ n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR นับว่าเทคนิค PCR มีความรวดเร็วในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอปริมาณมากภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงเมื่อเทียบกับเทคนิคดีเอ็นเอสายผสม

มีการนำปฏิกิริยา PCR มาใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจหาเชื้อก่อโรคในพืช เทคนิค PCR รูปแบบต่าง ๆ ถูกพัฒนาให้มีความจำเพาะและความไวต่อเชื้อก่อโรค Multiplex PCR และ SYBR Green real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่มีผลกระทบต่อการก่อโรคในข้าวได้แก่ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* และ *Burkholderia glumae* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน glycosyltransferase ใน *X. oryzae* pv. *oryzae* ยีน *AvrRxo* ใน *X. oryzae* pv. *oryzicola* และบริเวณลำดับเบสของ Internal Transcribed Spacer ใน *B. glumae* ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์คือ 1 ng/µl

จากนั้นเจือจางตัวอย่างตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} ng/µl เพื่อทดสอบความไวของไพรเมอร์ต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ Multiplex PCR สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 สายพันธุ์พร้อม กันในหนึ่งหลอดพีซีอาร์ที่ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์ผสมและมีความไวอยู่ในระดับพิโกกรัมในขณะที่ SYBR Green Real-Time PCR มีความไวถึงระดับเฟมโตกรัมซึ่งถือว่าความจำเพาะและความไวของเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประโยชน์ต่อการตรวจสอบเชื้อก่อโรคในข้าวเป็นอย่างยิ่งรวมถึงใช้ในการคาดการณ์โรคอีกด้วย (Wen Lua *et al.*, 2014)

2.2.3 เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการแยกและวิเคราะห์โมเลกุลของสารชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และ อาร์เอ็นเอเป็นต้น วิธีนี้อาศัยกระแสไฟฟ้า ความมีขั้วของสารและความแตกต่างของขนาดโมเลกุลที่ต้องการแยก การแยกโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกนั้นจะใช้เจลที่ละลายในบัฟเฟอร์ทำให้เกิดการก่อตัวขึ้นเป็นโครงตาข่าย โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะเคลื่อนไปตามช่องในเนื้อเจลโดยใช้แรงดันของกระแสไฟฟ้า เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตบนดีเอ็นเอทำให้ประจุของดีเอ็นเอมีค่าเป็นลบ ประจุลบบนโมเลกุลนี้จะเป็นเสมือนแรงดันที่ทำให้ดีเอ็นเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก เนื้อเจลจะเป็นตัวกั้นขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลทำให้โมเลกุลถูกกักอยู่ในเนื้อเจลนั้นได้ โมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านเนื้อเจลได้ง่ายกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่และดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงเคลื่อนที่ช้ากว่าดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวน ตรวจสอบตำแหน่งของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลโดยวิธีการย้อมสีเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) หรือสารเรืองแสงชนิดอื่น เช่น SYBR Safe เมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker) ที่ทราบขนาดบนเจลเดียวกันจะทำให้สามารถคาดคะเนขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ศึกษาได้

2.3 *Burkholderia glumae*

ในปี ค.ศ. 1992 แบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* 7 สปีชีส์ ถูกนำมาแยกเป็นจีนัสใหม่คือ *Burkhoderia* ยกตัวอย่างเช่น *B. cepacia* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในหัวหอม *B. glumae* และ *B. plantarii* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในข้าว หลังปี ค.ศ. 1994 จีนัส *Burkholderia* ก็มีแบคทีเรียที่ถูกจัดอยู่ในจีนัสนี้เพิ่มขึ้นมากกว่า 30 สปีชีส์ ลักษณะทางสรีรวิทยาของ *B. glumae* คือเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการออกซิเจนในกระบวนการหายใจ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา 2 เส้นที่ขั้วเซลล์ เซลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง ขนาด 0.5 × 0.7-1.5 × 2.5 µm (กว้างxยาว) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 11 - 40 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30 -35 °C ภายในเซลล์มีดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส G+C 68.2 % การตรวจหา *B. glumae* ในเนื้อเยื่อพืชสามารถใช้ได้ทั้งเทคนิค Conventional PCR, Reverse Transcription - PCR และ Rep - PCR โดยไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมาจากบริเวณ 16S – 23S rDNA Spacer Realtime - PCR ถูกพัฒนาให้สามารถตรวจสอบ *B. glumae* ในเมล็ดข้าวเพื่อหาจำนวนแบคทีเรีย Rep - PCR เป็นเทคนิคที่นำมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. glumae* ตามตำแหน่งภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันพบว่าเทคนิค Rep - PCR สามารถตรวจสอบ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้จาก 25 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Jong *et al.*, 2011)

2.3.1 การก่อโรคของแบคทีเรีย *B. glumae*

B. glumae ได้รับการพิจารณาว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรครวงไหม้ในข้าว โรคนี้ทำให้ต้นข้าวมีอาการกล้าเน่า กาบใบเน่า รวงไหม้ เมล็ดลีบ และเมล็ดด่าง โรคนี้ได้ส่งผลกระทบต่อหลายประเทศในแถบแอฟริกา อเมริกาเหนือ และ อเมริกาใต้ ปัจจุบันมีการรายงานว่าพบโรครวงไหม้ในทวีปเอเชีย ได้แก่ประเทศ เกาหลี ญี่ปุ่น เวียดนาม ศรีลังกา ไทย และ จีน (Haung *et al.*, 2016) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูง ประมาณ 30-35 °C และเจริญได้แม้ที่อุณหภูมิ 40 °C หากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้เชื้อเจริญแพร่ระบาดได้มากขึ้นและเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ผ่านทางเมล็ดพันธุ์ซึ่งจะทำให้แพร่ระบาดในวงกว้างอย่างรวดเร็ว (วันวิสาข์ และคณะ 2560) ในปี ค.ศ. 1993 มีการตรวจพบ *B. glumae* ในบริเวณอื่น ๆ ของข้าว ได้แก่ เอพิเดอมิส พาเรงไคมา และใบ การติดเชื้อที่ใบเป็นส่วนสำคัญเพราะเป็นบริเวณแรกที่ข้าวจะเริ่มแสดงอาการของโรค จากการศึกษาฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียลงบนต้นข้าวพบว่าจะแสดงอาการทางใบธงก่อนเสมอตามด้วยที่รวงข้าวดังนั้นการแสดงอาการที่ใบธงสามารถใช้คาดคะเนโรคที่จะเกิดบนรวงข้าวได้ นอจากก่อโรคในข้าวแล้ว *B. glumae* สามารถเข้าสู่พืชชนิดอื่น ๆ และก่อให้เกิดอาการใบเหลือง เช่น พริกไทย มะเขือเทศ และ งา (Rebecca *et al.*, 2011)

2.3.2 การควบคุมการระบาดของเชื้อ *B. glumae*

จากปัญหาหาการแพร่ระบาดในต้นข้าว ทำให้มีการพัฒนาวิธีการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ *B. glumae* ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีววิทยา การควบคุมทางเคมี (Chemical Control) ทำได้โดยฉีดพ่นกรดออกโซลินิค (Oxolinic Acid) เป็นอนุพันธุ์ของ Quinoline ลงบนต้นข้าว วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการรักษาเมล็ดพันธุ์และควบคุมโรค การศึกษาประสิทธิภาพของกรดออกโซลินิคในด้านควบคุมโรคใช้วิธี Direct Immunofluorescent โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี จากการทดลองฉีดพ่นกรดออกโซลินิคลงบนเมล็ดข้าวแล้วเตรียมเป็นสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อจุ่มลงในสารละลายแอนติบอดิ (Antibody) พบว่าหากในต้นข้าวมีแบคทีเรียซึ่งเปรียบเสมือนเป็นแอนติเจนจะสามารถจับกับแอนติบอดีได้และเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์จะพบการเรืองแสงของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Fluorescein Isothiocynate (FITC) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นอ่อนที่ฉีดพ่นกรดออกโซลินิคมีเพียง 3 % ที่แสดงอาการของโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มต้นอ่อนที่ไม่ได้รับสารมีจำนวนต้นอ่อนถึง 92 % ที่แสดงอาการของโรค อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีดังกล่าวมีข้อเสีย เนื่องจากตามธรรมชาติแบคทีเรีย *B. glumae* มียีน *GyrA* ทำหน้าที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ DNA Gyrase โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 83 เป็นกรดอะมิโนเซอรีน ซึ่งแตกต่างกันในสายพันธุ์ต้านทานที่มีกรดอะมิโนเป็น อาร์จินีน หรือ ไอโซริวซีน ความแตกต่างนี้มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียแบบ Missense Mutations จากการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้ค่า Parasitic Fitness ของแบคทีเรียในรวงข้าวเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการคัดแยก *B. glumae* สายพันธุ์ต้านทานที่จะพบในต้นข้าวที่ผ่านการฉีดพ่นกรดออกโซลินิค ดังนั้นจะเห็นว่าวิธีทางเคมีไม่สามารถควบคุมเชื้อ *B. glumae* ได้ทุกสายพันธุ์และประกอบกับปัจจุบันมีความต้องการลดการใช้สารเคมีในทางเกษตร นักวิจัยจึงพยายามที่จะหาวิธีการควบคุมศัตรูพืชแบบอื่น หนึ่งในนั้นคือใช้จุลินทรีย์เป็นตัวควบคุม (Biological Control) แบคทีเรียสายพันธุ์ไม่ก่อโรค เช่น *Burkholderia* spp. บางสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรครวงไหม้ได้ จึงนำคุณสมบัตินี้มาใช้เป็นวิธีในการควบคุมโรคทางชีวภาพ ในหลอดทดลอง *B. gladioli* สายพันธุ์ไม่ก่อโรคสามารถป้องกันโรครวงไหม้ได้

เกือบจะสมบูรณ์เมื่อบ่มร่วมกับ *B. glumae* ที่คัดแยกมาจากนาข้าว แต่สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อ *B. gladioli* ในการป้องกันโรครวงไหม้ในนาข้าวยังคงต้องประเมินผลต่อไป (Milton *et al.*, 2011)

2.3.3 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย *B. glumae*

Toxoflavin และ Lipase เป็นปัจจัยที่ทำให้ *B. glumae* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในข้าว Toxoflavin จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นพิษต่อพืช ลดการยืดขยายของลำต้น ราก และทำให้พืชเจริญช้า มีความเป็นพิษต่อข้าวอย่างมาก การบกพร่อง Toxoflavin และ Lipase ใน *B. glumae* ทำให้ความรุนแรงของแบคทีเรียลดลงจนเกือบจะกลายเป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรค การสร้างสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับระบบ Quorum Sensing System (QS) หากทำให้ระบบนี้ไม่สามารถทำงานได้ แบคทีเรียก็จะสูญเสียความสามารถในการก่อโรค

ระบบ QS เป็นระบบการสื่อสารที่เกิดจากการสร้างสารที่เรียกว่า Autoinducer ทำหน้าที่เปรียบเสมือนสื่อกลางในการสื่อสารเกิดขึ้นระหว่างเซลล์แบคทีเรียและเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดรวมทั้งยีนที่เกี่ยวของกับการก่อโรค (Virulence Gene) Autoinducer คือสาร สัญญาณ (Signaling Molecule) ที่แบคทีเรียสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุ่มเพิ่มมากขึ้นสารสัญญาณที่สร้างก็จะมีปริมาณมากขึ้นจนสามารถกระตุ้นให้เข้าสู่ระบบ Quorum sensing เพื่อใช้ในการสื่อสารกับแบคทีเรียเซลล์อื่น ๆ และ Autoinducer จะแพร่กลับเข้าไปจับกับตัวรับที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียและมีผลไปกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียชนิดเดียวกันที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงรวมทั้งตัวเองให้ตอบสนองโดยการแสดงออกยีนต่าง ๆ ปัจจุบันพบสารในกลุ่มนี้หลายชนิดในแบคทีเรียแกรมลบ เรียกชื่อรวม ๆ ว่า Acyl Homoserine Lactones (AHLs) โมเลกุล AHL ถูกสร้างภายในเซลล์โดยเอนไซม์ AHL synthase ซึ่งมียีน *luxI* ควบคุมการแสดงออกและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์จนกระทั่งมีการสะสมของสาร AHLs ในปริมาณมากพอก็จะแพร่กลับเข้าสู่เซลล์โดยไปจับกับโปรตีนที่เรียกว่า LuxR กลายเป็นโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่ประกอบด้วย AHL และ LuxR โปรตีนคอมเพล็กซ์ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็น Transcription Factor กระตุ้นการแสดงออกของยีน ต่าง ๆ รวมทั้งยีน *luxI* ให้สร้าง AHL เพิ่มมากขึ้นด้วย (ญฏารัตน และมณฑล, 2557)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Escherichia coli

Burkholderia glumae สายพันธุ์ 2015 และ 2018

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria-Bertani (LB) Broth

Luria-Bertani (LB) Agar

Nutrient Agar (NA)

3.3 สารเคมี

pGEMT-mcherry

Ptac::mcherry

Primer 1111F

Primer 1111R

Primer M13R

Primer M13F

1X DNA Ligase Buffer

5X Reaction Buffer

5X PCR Buffer

10X T4 DNA Ligase Buffer

5X PCR Buffer

FADF Buffer

Wash Buffer

W1 Buffer

Elution Buffer

1X Tris-Borate (TBE) Buffer

10X 3.1 Buffer

2 mM dNTP

Taq 2g Fast Hotstar

Q5 (High Fidelity Enzyme)

*Bam*HI (Restriction Enzyme)

*Pst*I (Restriction Enzyme)

Taq Polymerase

T4 Ligase

FAPD1

FAPD2

FAPD3

Gentamicin

Sterile Distilled Water

Normal Saline 0.85 %

300 mM Sucrose

10% Glycerol

50% Glycerol

1% (v/w) Agarose Gel

Loading Dye

Neo Green

1 kb DNA Marker Ladder

Barium Chloride

$MgCl_2$

Sulfuric Acid

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside)

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactoside)

Gentamicin

Normal Saline 0.85%

3.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

แท่งแก้ว

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate)

ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

มีดผ่าตัด (Surgical Blade)

Centrifuge Tube ขนาด 50 ml

Microtubes ขนาด 1.5 ml

Microtubes ขนาด 200 µl

Autopipette ขนาด 0.5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl และ 100-1000 µl พร้อม Tips

Collection Tube

FADF Column
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารละลาย (Spin Down Centrifuge)
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Centrifuge)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker)
Vortex Mixer
เครื่องชั่ง (Analytical Balance)
สไลด์แก้ว (Glass Slide)
กระจกปิดสไลด์ (Cover Slip)
กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound Microscope)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
ไมโครเวฟ (Microwave)
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler)
เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมระดับนาโน (Nanodrop)
ชุดสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (DNA Extraction Kit)
ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (Gel/PCR Purification Kit)
ชุด Agarose Gel Electrophoresis พร้อม Power Supply
ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow Cabinet)
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.5 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.5.1 การเพิ่มปริมาณ Primer 1111F, Primer 1111R และ ยีนเรืองแสง *mcherry* โดยใช้วิธี PCR

เตรียมสารผสม Mastermix ปริมาตรรวม 69 µl ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml โดยใช้สารละลาย 10 µM Primer 1111F และ สารละลาย 10 µM Primer 1111R อย่างละ 3.75 µl, สารละลาย 5X PCR Buffer ปริมาตร 15 µl, สารละลาย 2 mM dNTP ปริมาตร 7.5 µl, dH_2O ปริมาตร 38.25 µl และเติมสารละลายเอนไซม์ Q5 ปริมาตร 0.75 µl ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Enzyme) เป็นลำดับสุดท้ายและควรเก็บเอนไซม์ไว้ในที่เย็นเสมอ สารละลายแต่ละชนิดที่นำมาใช้เป็นสารผสม Mastermix ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยการเคาะหลอดแล้วปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยเครื่อง Spin Down Centrifuge แบ่งสารผสม Mastermix ปริมาตร 23 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl ที่มีสารละลาย pGEMT-*mcherry* ปริมาตร 2 µl จำนวน 3 หลอด นำหลอด Microtubes ที่มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และพลาสมิด pGEMT-*mcherry* บ่มใน Thermal Cycler เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเรืองแสง *mcherry* ตั้งโปรแกรมการทำงานและเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยให้ขั้นที่ 1 Initial Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบขั้นที่ 2 Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นที่ 3 Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 4 Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบขั้นที่ 5 Final Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และขั้นที่ 6 Cool Down และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 16 °C ลำดับเบสของ Primer 1111F (5'-AAAACTGCAGGGGGAATTCTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACGGAAACAGCTAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3') ลำดับเบสของ Primer1111R (3'-CCTGCTCGACATGTTCATTCTTTTGCTTTTTTGGCGGAACGTCCCGCCAAAACCTAGGAAAA-5')

3.5.2 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis

เตรียม 1% Agarose Gel โดยใช้ผง Agarose Gel 0.1 g ผสมกับสารละลาย 1X TBE Buffer ปริมาตร 10 ml ทำให้วุ้นละลายในไมโครเวฟ รอให้อุ่นจากนั้นเติมสารละลายสี Neo Green ปริมาตร 0.5 µl เทลงถาดที่ใช้สำหรับเตรียมวุ้น ใส่หวี (Comb) เข้าไปในถาดเพื่อให้เกิดหลุม (Wells) สำหรับหยดสารละลาย PCR Product จากขั้นตอนที่ 3.5.1 และดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (1 kb DNA Marker Ladder) เก็บถาดไว้ให้พ้นแสงทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้วุ้นแข็งตัวดึงหวีออกจากถาดนำถาดที่เตรียมวุ้นวางลงใน Chamber ของชุด Agarose Gel Electrophoresis ให้ด้านที่มีหลุมอยู่ด้านขั้วลบ และเทสารละลาย 1X TBE Buffer ให้ท่วมวุ้นประมาณ 2-5 mm หยดสารละลาย 1 kb DNA Marker Ladder ปริมาตร 2 µl ในหลุมแรก ซึ่งสารละลายดังกล่าวทำหน้าที่เป็น DNA Marker เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอที่สนใจ ได้แก่ สารละลาย PCR Product จากขั้นตอนที่ 3.5.1 ปริมาตร 1 µl สารละลาย 1X TBE Buffer ปริมาตร 4 µl และสารละลายสี Loading Dye ปริมาตร 1 µl

3.5.3 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification)

ดูดสารละลาย PCR Product จากหลอด Microtubes ขนาด 200 µl 3 หลอด หลอดละ 24 µl รวมกัน 72 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด Gel/PCR Extraction Kit ของ Favorgen เติมสารละลาย FADF Buffer 5 เท่าของสารละลาย PCR Product (360 µl) นำไป Vortex ด้วยเครื่อง Vortex Mixer ประกอบ Collection Tube เข้ากับ FADF Column ย้ายหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml ไปไว้ใน FADF Column หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง เติมสารละลาย Wash Buffer 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้งนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายหลอด FADF Column ไปไว้ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติมสารละลาย Elution Buffer 35 µl ใน FADF Column ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที ต่ออีก 2 นาที

3.5.4 วัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop

ดูดสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 3.5.3 ปริมาตร 1.0 µl หยดลงในแท่นวัด เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอและอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 nm และ 260 ต่อ 230 nm เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยมีน้ำกลั่นเป็น Blank

3.5.5 การตัดพลาสมิด pBBR1MCS-5 และยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

เตรียมสารละลายที่ใช้ตัดพลาสมิด pBBR1MCS5 ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl โดยใช้สารละลาย 39 ng/µl pBBR1MCS5 ปริมาตร 25 µl สารละลาย 10X 3.1 Buffer ปริมาตร 3 µl และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Pst*I อย่างละ 1 µl เตรียมสารละลายที่ใช้ตัดยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl โดยใช้สารละลาย 217 ng/µl *Ptac*::*mcherry*::terminator ปริมาตร 10 µl สารละลาย 10X 3.1 Buffer ปริมาตร 1.5 µl เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Pst*I อย่างละ 1 µl และน้ำปริมาตร 1.5 µl นำหลอด Microtubes ขนาด 200 µl ทั้งสองบ่มใน Thermal Cycler ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.6 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis

เตรียม 1% Agarose Gel โดยใช้ผง Agarose Gel 0.1 g ผสมกับสารละลาย 1X TBE Buffer ปริมาตร 10 ml ทำให้วุ้นละลายในไมโครเวฟ รอให้อุ่นจากนั้นเติมสารละลายสี Neo Green ปริมาตร 0.5 µl เทลงถาดที่ใช้สำหรับเตรียมวุ้น ใส่หวีเข้าไปในถาดเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยดสารละลาย *Ptac*::*mcherry*::terminator และสารละลายพลาสมิด pBBR1MCS-5 จากขั้นตอนที่ 3.5.5 และดีเอ็นเอที่ทราบขนาด เก็บถาดไว้ให้พ้นแสงทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้วุ้นแข็งตัว ดึงหวีออกจากถาดนำถาดที่เตรียมวุ้นวางลงใน Chamber ของชุด Agarose Gel Electrophoresis ให้ด้านที่มีหลุมอยู่ด้านขั้วลบ และเทสารละลาย 1X TBE Buffer ให้ท่วมวุ้นประมาณ 2-5 mm หยดสารละลาย 1 kb DNA Marker Ladder ปริมาตร 2 µl ในหลุมแรก ซึ่งสารละลายดังกล่าวทำหน้าที่เป็น DNA Marker เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอที่สนใจ ได้แก่ สารละลาย 217 ng/µl *Ptac*::*mcherry*::terminator จากขั้นตอนที่ 3.5.5 ปริมาตร 9 µl ในหลุมที่ 2 และ 3 สารละลาย 39 ng/µl pBBR1MCS-5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากขั้นตอนที่ 3.5.5 ปริมาตร 10 µl ในหลุมที่ 4, 5, 6 สารละลาย 39 ng/µl pBBR1MCS-5 ปริมาตร 2 µl, สารละลาย 1X TBE Buffer ปริมาตร 3 µl และสารละลาย Loading Dye ปริมาตร 1 µl ในหลุมสุดท้ายเพื่อยืนยันว่าพลาสมิด pBBR1MCS-5 ผ่านการตัดแล้วสำเร็จจากขั้นตอนที่ 3.5.5

3.5.7 การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล (Gel Extraction)

ตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอของยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator และพลาสมิด pBBR1MCS-5 ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.6 ด้วยมีดสะอาดใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml อย่างละหลอดนำเจลที่ได้มาสกัดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Gel/PCR Extraction Kit ของ Favorgen เติมสารละลาย FADF Buffer ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยการกลับหลอดไปมา 2 นาทีจนเจลละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายดีเอ็นเอทั้งสองหลอดใน Microtubes ลงใน FADF Column จากการประกอบ Collection Tube เข้ากับ FADF Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง เติมสารละลาย Wash Buffer นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้งนำไป Centrifuge ต่ออีก 3 นาที ย้าย FADF Column ไปไว้ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่เติมสารละลาย Elution Buffer ปริมาตร 25 µl ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที นำไปวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณของพลาสมิด pBBR1MCS-5 และยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator โดยใช้วิธีการเดียวกันกับขั้นตอนที่ 3.5.4 แต่ใช้สารละลายจากขั้นตอนที่ 3.5.7

3.5.8 การเชื่อม (Ligation) พลาสมิด pBBR1MCS-5 กับยีน *Ptac::mcherry::*terminator เข้าด้วยกัน

ดูดสารละลาย 5.4 ng/µl pBBR1MCS-5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปริมาตร 9.3 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl ที่มีสารละลาย 32.9 ng/µl *Ptac::mcherry::*terminator ปริมาตร 7.7 µl เติมสารละลาย 1X DNA Ligase Buffer ปริมาตร 2 µl และสารละลาย T4 Ligase ปริมาตร 1 µl นำหลอด Microtubes บ่มใน Thermal Cycler ที่อุณหภูมิ 16 °C ข้ามคืน ได้พลาสมิด pKB2 จากการเชื่อมพลาสมิด pBBR1MCS-5 และยีน *Ptac::mcherry::*terminator เข้าด้วยกัน

3.5.9 การนำพลาสมิด pKB2 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) *E. coli*

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอภายนอกเข้าสู่ในเซลล์ (Competent Cells) จากอุณหภูมิ -80 °C มาแช่ในน้ำแข็ง ดูดสารละลายพลาสมิด pKB2 จากขั้นตอนที่ 3.5.8 ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ปริมาตร 200 µl ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันเบาๆ แช่ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำหลอด Microtubes ออกมาไว้ใน Water Bath อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 วินาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเหลว LB Broth ปริมาตร 800 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่อง Incubator Shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแยก Pellet ดูดส่วน Supernatant ปริมาตร 950 µl ทิ้งทำให้สารละลายที่เหลืออยู่เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ Autopipette ดูดขึ้นลงเพื่อกระจายเชื้อ (Resuspension) เบาๆ ดูดสารละลายที่เหลือ ปริมาตร 50 µl ลงในอาหารแข็ง LB Agar ปริมาตร 25 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 10 mg/l, สารละลาย 25 mg/ml X-Gal ปริมาตร 40 µl และสารละลาย 20 mg/ml IPTG ปริมาตร 40 µl เกลี่ยสารละลายให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งโดยใช้เทคนิค Spread Plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.5.10 การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pKB2

เลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ปริมาตร 100 µl ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin และมีสีขาว จากขั้นตอนที่ 3.5.9 จำนวน 24 โคโลนี ผสมกับน้ำกลั่นโดยใช้ 1 โคโลนี ต่อน้ำกลั่น 1 หลอดหลอดละ 30 µl เตรียมสารผสม Mastermix ปริมาตรรวม 120 µl ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml โดยใช้สารละลาย 2 µM Primer M13F (5' –TCACACAGGAAACAGC TATGAC – 3') และสารละลาย 2 µM Primer M13R (3' –CAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC – 5') อย่างละ 12 µl, สารละลาย 5X Buffer ปริมาตร 24 µl, สารละลาย 2 mM dNTP ปริมาตร 24 µl, น้ำปริมาตร 27.6 µl, สารละลาย $MgCl_2$ ปริมาตร 19.2 µl, สารละลายเอนไซม์ *Taq* Polymerase ปริมาตร 1.2 µl แบ่งสารผสม Mastermix ปริมาตร 5 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl ที่มีสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pKB2 ปริมาตร 5 µl จำนวน 24 หลอด ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยการเคาะหลอดแล้วนำไป Centrifuge ต่อ นำหลอด Microtubes ที่มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pKB2 บ่มใน Thermal Cycler เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pKB2 ตั้งโปรแกรมการทำงานและเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยให้ขั้นที่ 1 Initial Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นที่ 3 Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 4 Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ

ขั้นที่ 5 Final Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และขั้นที่ 6 Cool Down และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 16 °C ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis และเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pKB2 จากแถบดีเอ็นไปตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop

3.5.11 การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pKB2 โดยแบ่งเชื้อปริมาตร 10 µl จากหลอดที่มีสารละลายเชื้อในน้ำกลั่นขั้นตอนที่ 3.5.10 ใส่หลอดอาหารเหลว LB Broth ปริมาตร 5 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 10 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เตรียม Stock เชื้อแบคทีเรียโดยแบ่งสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pKB2 ปริมาตร 600 µl ผสมกับสารละลาย 50% Glycerol ปริมาตร 600 µl ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml ตกตะกอนเชื้อส่วนที่เหลือเพื่อสกัดพลาสมิด pKB2 โดยการแบ่งสารละลายผสมดังกล่าวปริมาตร 1,000 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วน Supernatant ทิ้ง ดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรียใส่อีกครั้งปริมาตร 1,000 µl และดูดส่วน Supernatant ทิ้ง

สกัดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Plasmid Extraction Mini Kit ของ Favorgen เติมสารละลาย FAPD1 ที่มี RNaseA ปริมาตร 200 µl เติมสารละลาย FAPD2 ปริมาตร 200 µl บ่มไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย FAPD3 ปริมาตร 300 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ประกอบ FADF Column ใน Collection Tube ย้ายสารละลายทั้งหมดในหลอด Microtubes ไปไว้ใน FADF Column จากนั้นเทส่วนใสที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้งเติมสารละลาย W1 Buffer ปริมาตร 400 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เติมสารละลาย Wash Buffer ปริมาตร 700 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง ปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที 30 วินาที ย้ายหลอด FADF Column ไปไว้ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml เติมสารละลาย Elution Buffer ปริมาตร 30 µl จับเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบทิศทางของยีน *Ptac*::*mcherry*::terminator ภายในโมเลกุลของพลาสมิดจากการเชื่อมกันของ Primer M13F กับ Primer *mcherry* RT-R และ Primer M13R กับ Primer *mcherry* RT-F โดยใช้วิธี Gel Electrophoresis ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง 4 ตัวอย่างกับบริษัท Bioneer, South Korea เพื่อหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 ที่สร้างขึ้นด้วยโปรแกรม A Plasmid Editor (APE)

3.5.12 ทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 บนเพลทที่มีอาหารแข็ง NA สายพันธุ์ละ 1 เพลท โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน จนได้โคโลนีเดี่ยว (Single Colony) เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ขึ้นบนอาหารแข็ง NA ลงบนอาหารแข็ง LB Agar สายพันธุ์ละ 1 เพลท โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย

Normal Saline 0.85% สายพันธุ์ละ 1 หลอดให้มีความขุ่นของสารละลายเท่ากับหลอดทดลองที่มีสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จากการผสมกันของสารละลาย Sulfuric Acid 9.95 ml กับ Barium Chloride 0.05 ml หยดสารละลาย Normal Saline 0.85% ปริมาตร 100 µl ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ลงในเพลทอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0, 15, 25, 35, และ 45 µg/ml เกลี่ยสารละลาย Normal Saline ที่มีเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้ว (Spread Plate) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

3.5.13 การเตรียม Competent Cells โดยใช้วิธี Conventional Method

เตรียม Competent Cells ของ *B. glumae* ตามวิธีการของ (Hiromasa *et al.*, 2013) เลี้ยงแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง NA สายพันธุ์ละ 1 เพลท โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ลงในอาหารเหลว LB Broth ปริมาตร 20 ml ในหลอด Centrifuge Tube ขนาด 50 ml สายพันธุ์ละ 1 หลอด เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28°C จนกระทั่งสารแขวนลอยของเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เท่ากับ 0.8 เปิดฝาหลอดอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวอยู่ในตู้ Laminar Air Flow Cabinet เป็นเวลา 30 วินาทีเมื่อครบเวลาปิดฝาและบ่มต่อที่สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำหลอดอาหารที่มีเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 10% Glycerol ปริมาตร 20 ml ใช้ Autopipette กระจายเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เติม 10% Glycerol ปริมาตร 20 ml อีกครั้งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้งเติม 10% Glycerol ปริมาตร 200 µl ใช้ไมโครปิเปตกระจายเชื้อแบ่งใส่หลอด Microtubes ขนาด 200 µl ปริมาตร 50 µl จำนวน 4 หลอด เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -80°C ทำเหมือนกันกับแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

3.5.14 การเตรียม Competent Cells โดยใช้วิธี High Competency Method

เตรียม Competent Cells ของ *B. glumae* โดยใช้วิธี High Competency Method (Hiromasa *et al.*, 2013) เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์จากเพลทอาหาร NA สายพันธุ์ละ 1 เพลท เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.5.14 ลงในอาหารเหลว LB Broth ปริมาตร 5 ml สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดูดสารละลายเชื้อออกปริมาตร 4 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออกแล้วเติม 300 mM Sucrose ปริมาตร 1 ml ใช้ไมโครปิเปตกระจายเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที 2 รอบ เติม 300 mM Sucrose ปริมาตร 200 µl กระจายเชื้อด้วยไมโครปิเปตอีกครั้ง เสร็จแล้วแบ่งใส่หลอด Microtubes ขนาด 200 µl จำนวน 2 หลอด หลอดละ 100 µl ทำเหมือนกันกับแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

3.5.15 การนำพลาสมิด pKB2 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) *B. glumae*

นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Electroporation ตามวิธีการของ (Hiromasa *et al.*, 2013) ดูดสารละลายพลาสมิด pKB2 ความเข้มข้น 84 ng/µl ปริมาตร 1 µl ลงในสารละลาย Competent Cells ที่เตรียมโดยใช้วิธี Conventional Method และ High Competency Method ของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน Electroporation Cuvette ที่แช่ในถังน้ำแข็งนำคิวเวทใส่ลงในเครื่อง MicroPulser/Gene Pulser Cuvettes, 0.2 cm gap (Bio-Rad Laboratories, USA) ใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 2.5 kV เมื่อเครื่องหยุดทำงานให้รีบนำหลอดออกมาแล้ว เติมอาหารเหลว LB Broth ปริมาตร 1 ml กระจายเชื้อด้วยไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml นำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที ดูดส่วนใสออกปริมาตร 650 µl กระจายเชื้อด้วยไมโครปิเปตสารละลายเชื้อที่เหลือแบ่งลงอาหารแข็ง LB Agar ปริมาตร 25 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 25 µg/ml สายพันธุ์ละ 2 เพลท เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค Spread Plate และแบ่งสารละลายเชื้ออีกส่วนหนึ่งลงในอาหารแข็ง NA เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (Control)

3.5.16 การทดสอบผลการ Transformation

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองที่ 3.5.15 ลงในหลอดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 30 µl เตรียมสารผสม Mastermix ปริมาตรรวม 160 µl ในหลอด Microtubes ขนาด 1.5 ml โดยใช้สารละลาย 2 µM Primer M13F และสารละลาย 2 µM Primer M13R อย่างละ 16 µl, สารละลาย 5X Reaction Buffer ปริมาตร 64 µl, สารละลาย 2 mM dNTP ปริมาตร 32 µl, dH_2O ปริมาตร 30.72 µl และเติมสารละลายเอนไซม์ KAPA 2G Fast Hot Start (KAPA Biosystems, USA) ปริมาตร 1.28 µl สารละลายแต่ละชนิดที่นำมาใช้เป็นสารผสม Mastermix ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยการเคาะหลอดและนำไป Centrifuge ต่อแบ่งสารผสม Mastermix ปริมาตร 5 µl ใส่ในหลอด Microtubes ขนาด 200 µl ที่มีสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิด pKB2 ปริมาตร 5 µl นำหลอด Microtubes ที่มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และสารละลายแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิด pKB2 บ่มใน Thermal Cycler เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry::*terminator ในแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสองสายพันธุ์ ตั้งโปรแกรมการทำงานและเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยให้ขั้นที่ 1 Initial Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 Denature อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นที่ 3 Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 4 Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ ขั้นที่ 5 Final Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และขั้นที่ 6 Cool Down และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 16 °C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis

3.5.17 การทดสอบความคงตัวของพลาสมิด

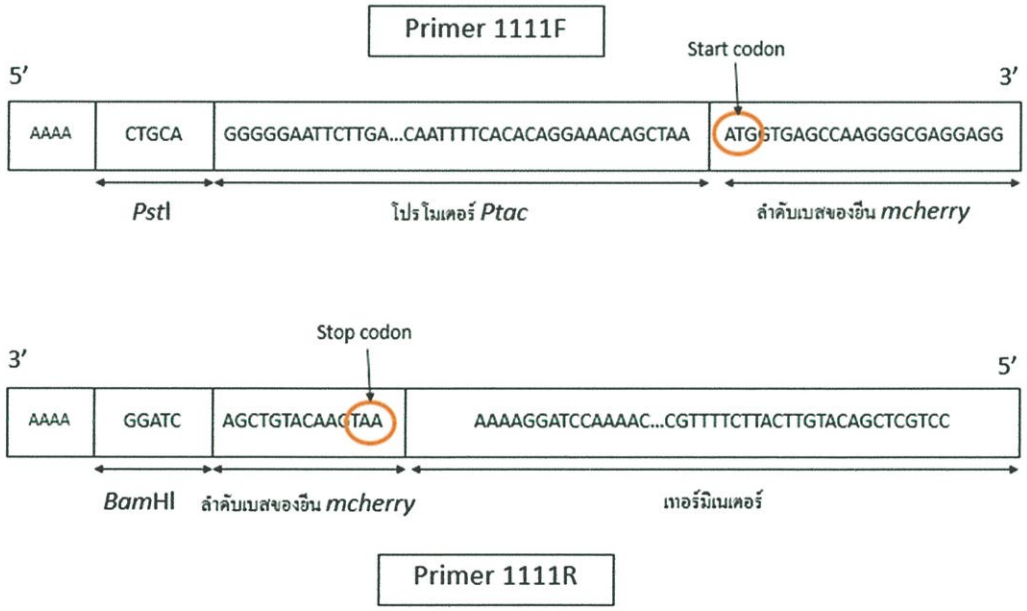
ลงเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่มีพลาสมิด pKB2 ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารแข็ง LB Agar เพลทละ 1 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน จนมีโคโลนีสีม่วงจากการเรืองแสงของยีน *mcherry* ขึ้นบนจานอาหาร เขี่ยโคโลนีดังกล่าวบ่มในอาหารแข็ง LB Agar เพลทใหม่โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบ 10 ครั้ง เป็นเวลา 20 วัน สังเกตการเรืองแสงของโปรตีน *mcherry* จากโคโลนีสีม่วงภายใต้แสงสีฟ้า (Blue Light Transilluminator)

บทที่ 4

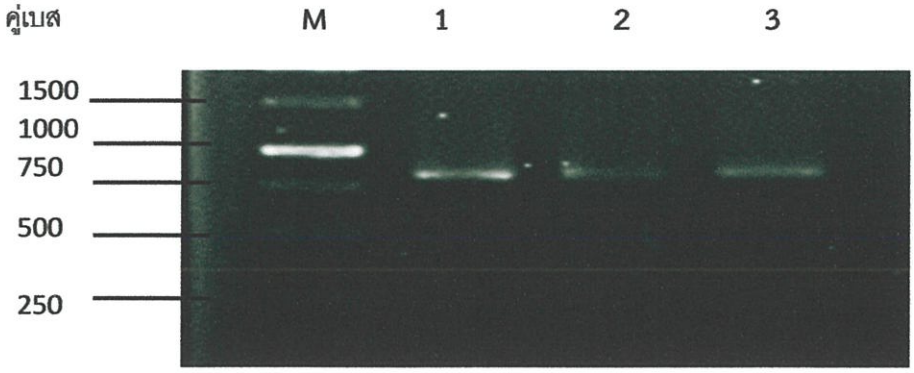
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสร้างพลาสมิด pKB2

ยีน *mcherry* อยู่ภายในพลาสมิด pGEMT ภายใต้การควบคุมการแสดงของโปรโมเตอร์ *PJ2300* เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 1111F ที่ถูกออกแบบให้มีโปรโมเตอร์ *Ptac*, ลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ เบส AAAA กับ 1111R ที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI , เบส AAAA และ เทอร์มิเนเตอร์ (รูปที่ 4.1) ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ *Ptac* และ เทอร์มิเนเตอร์ อ้างอิงจากงานวิจัยของ Ellen *et al.* (2010) ผลการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator มีขนาดประมาณ 828 คู่เบส สอดคล้องกับขนาดที่คาดไว้ซึ่งประกอบด้วย โปรโมเตอร์ *Ptac* ขนาด 83 คู่เบส ยีน *mcherry* ขนาด 711 คู่เบส และ เทอร์มิเนเตอร์ ขนาด 34 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.2

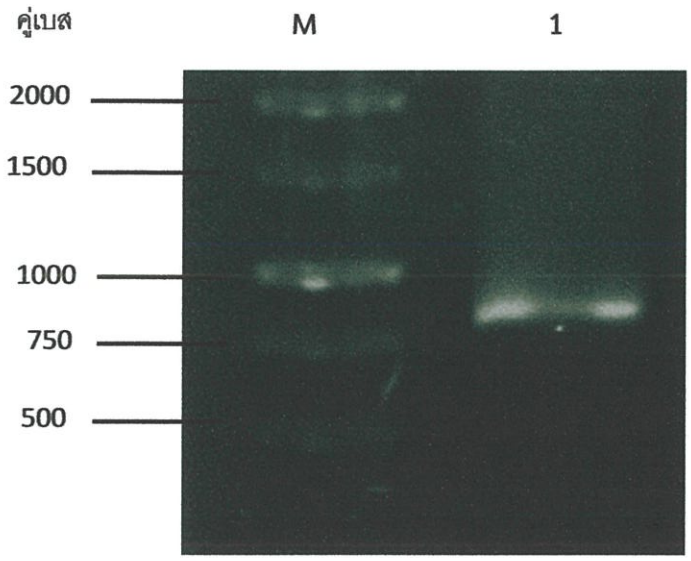


รูปที่ 4.1 แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์ 1111F และ 1111R

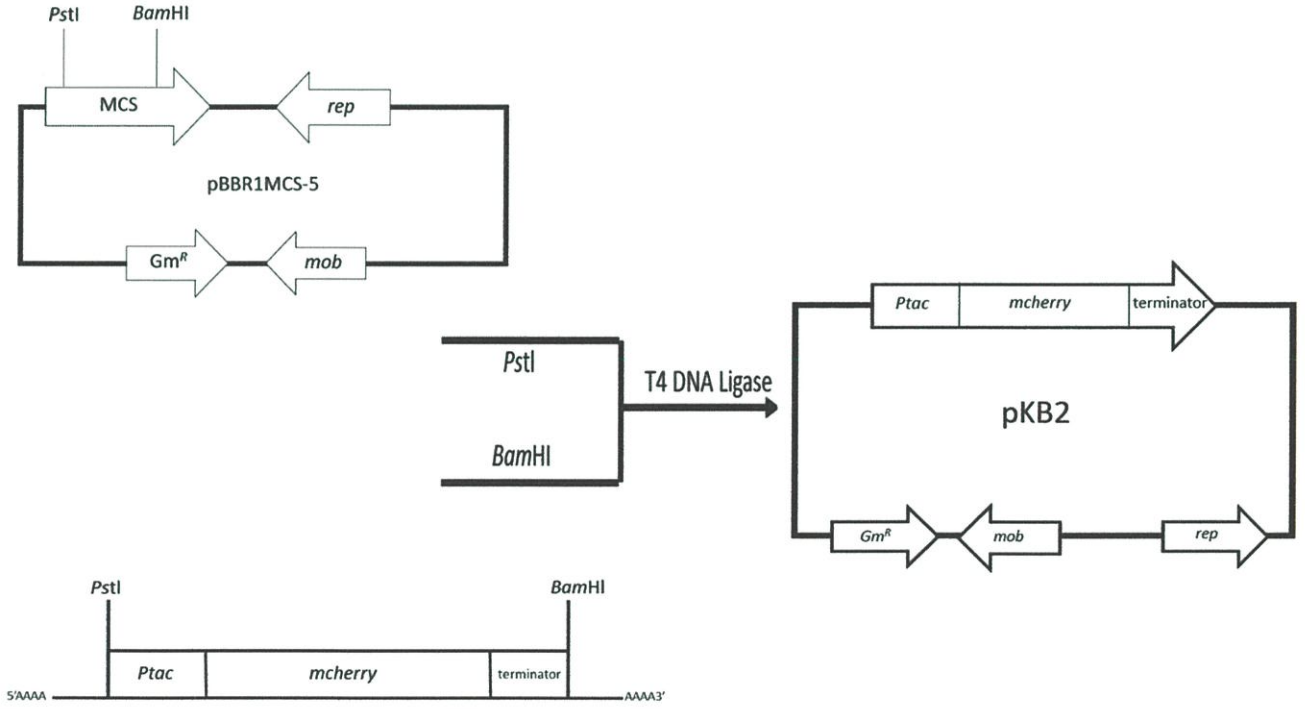


รูปที่ 4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *mcherry* โดยใช้ไพรเมอร์ 1111F และ 1111R (M : 1 kb DNA Ladder, 1-3 : ชิ้นส่วนยีน *mcherry*)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และพลาสมิด pBBR1MCS-5 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Bam*HI แล้วนำมาตรวจสอบผลโดยวิธี Gel Electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 4.3 โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน *mcherry* มีขนาดเท่ากับ 828 คู่เบส ในขณะที่พลาสมิด pBBR1MCS-5 ที่ถูกตัดโดยสมบูรณ์เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเมื่อเทียบกับพลาสมิดที่ยังไม่ได้ตัดซึ่งแสดงผลเป็นแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ทั้งนี้เนื่องมาจากพลาสมิดทั่วไปมีรูปร่างได้ทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ วงกลมบิดเป็นเกลียว (Supercoiled) วงปลายเปิด (Nicked) และ เส้นตรง (Linear) ส่วนพลาสมิดที่ถูกตัดอย่างสมบูรณ์จะมีรูปร่างเป็นเส้นตรง โดยแบบวงกลมบิดเป็นเกลียวจะเคลื่อนที่บนแผ่นเจลอะกาโรสได้เร็วที่สุด รองลงมาคือ แบบวงปลายเปิด และ เส้นตรง ตามลำดับ (อนุรักษ์ และสุพัตรา 2556) ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry::*terminator และพลาสมิด pBBR1MCS-5 ที่ถูกตัดถูกนำมาเชื่อมเข้ากันโดยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ได้เป็นพลาสมิด pKB2 ดังแสดงในรูปแผนภาพที่ 4.4



รูปที่ 4.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Bam*HI (M : 1 kb DNA Ladder, 1 : ชิ้นส่วน *Ptac*::*mcherry*::terminator)



รูปที่ 4.4 แผนภาพแสดงการสร้างพลาสมิด pKB2

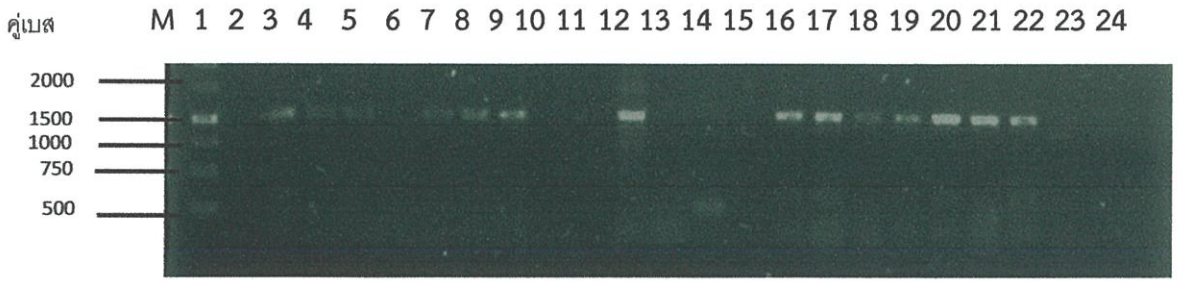
ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator กับพลาสมิด pBBR1MCS-5 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเครื่อง Nanodrop ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นดีเอ็นเอมีหลักการว่าสารละลายของ Double Stranded DNA 50 ng/µl มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) เท่ากับ 1 ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสง A_{260}/ A_{280} เมื่อ A_{280} คือค่าดูดกลืนแสงของโปรตีน ถ้าค่า A_{260}/ A_{280} อยู่ระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ถ้าค่า A_{260}/ A_{280} < 1.65 แสดงว่าปนเปื้อนด้วยโปรตีนหรือฟีนอลถ้าค่า A_{260}/ A_{280} > 1.85 แสดงว่าปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของสารได้แก่ ฟีนอล หรือ คาร์โบไฮเดรต จากค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{230} เมื่อ A_{230} คือค่าการดูดกลืนแสงของคาร์โบไฮเดรตและฟีนอล อ้างอิงจากบริษัท Thermo Scientific โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรอยู่ในช่วง 2.0-2.2 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของพลาสมิด pBBR1MCS-5 มีค่าน้อยกว่าดีเอ็นเอ*Ptac::mcherry*::terminator เนื่องจากพลาสมิด pBBR1MCS-5 เป็นชนิด Low Copy Number (Aayushi and Preeti 2013) ในขณะที่พลาสมิดมีความบริสุทธิ์มากกว่าดีเอ็นเอ เพราะค่า $A_{260/280}$ เท่ากับ 1.74 อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามทฤษฎีและจากค่า $A_{260/230}$ บ่งบอกว่าดีเอ็นเอทั้งสองชนิดมีสารปนเปื้อน

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator และพลาสมิด pBBRIMCS-5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ดีเอ็นเอ	ความเข้มข้น (ng/µl)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
pBBR1MCS-5	5.4	1.74	0.58
Ptac::mcherry::terminator	32.9	1.88	1.21

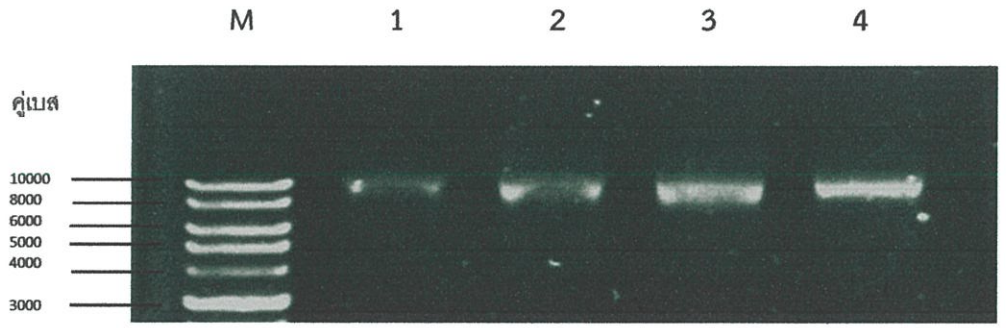
4.2 การถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายพลาสมิด pKB2 เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธี Heat Shock เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 10 mg/L ร่วมกับสาร IPTG และ X-gal เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *lacz* จากผลการทดลองมีโคโลนีสีขาวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 24 โคโลนี คัดเลือกโคโลนีดังกล่าวมาเพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มียีน *Ptac::mcherry*::terminator แทรกอยู่โดยการทำ PCR และใช้ไพรเมอร์ M13F กับ M13R เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยา PCR จาก 24 ตัวอย่างพบว่ามีเพียง 14 ตัวอย่างที่มีขนาดสั้นกว่า 1,000 คู่เบสเล็กน้อย ได้แก่ ตัวอย่างที่ 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 17,18, 19, 20 และ 21 ชิ้นดีเอ็นนี้เอสอดคล้องกับขนาดที่คาดไว้คือ 874 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry*::terminator ขนาด 828 คู่เบส, ลำดับเบสตั้งแต่บริเวณ 5`ของไพรเมอร์ M13F ถึง 5` โปรโมเตอร์ *Ptac* ขนาด 22 คู่เบส และ ลำดับเบสตั้งแต่บริเวณ 3` ของไพรเมอร์ M13R ถึง 3` ของเทอร์มิเนเตอร์ ขนาด 24 คู่เบส



รูปที่ 4.5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator จากการถ่ายฝากในแบคทีเรีย *E. coli*
(M : 1 kb DNA Ladder, 1-24 : ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator)

การทดลองต่อมาสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย จากรูปที่ 4.5 ได้แก่โคโลนีจากตัวอย่างที่ 3, 4, 8 และ 18 เพื่อนำตัวอย่างเหล่านี้มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิด pKB2 ขนาด 5,590 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนของ โปรโมเตอร์ *Ptac* ยีน *mcherry* และ เทอร์มิเนเตอร์ ขนาด 828 คู่เบส โครงหลักของพลาสมิด pBBR1MCS-5 ขนาด 4,762 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่าตัวอย่างที่ 18 มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือหมายเลข 4, 8 และ 3 ตามลำดับ ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมีค่าอัตราส่วน A_{260}/ A_{280} เกินช่วง 1.65-1.85 และมีค่าอัตราส่วน A_{260}/ A_{230} น้อยกว่าเกณฑ์คือ 2.0-2.2 แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนในตัวอย่างพิจารณาจากค่าอัตราส่วน A_{260}/ A_{280} ดังข้อมูลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

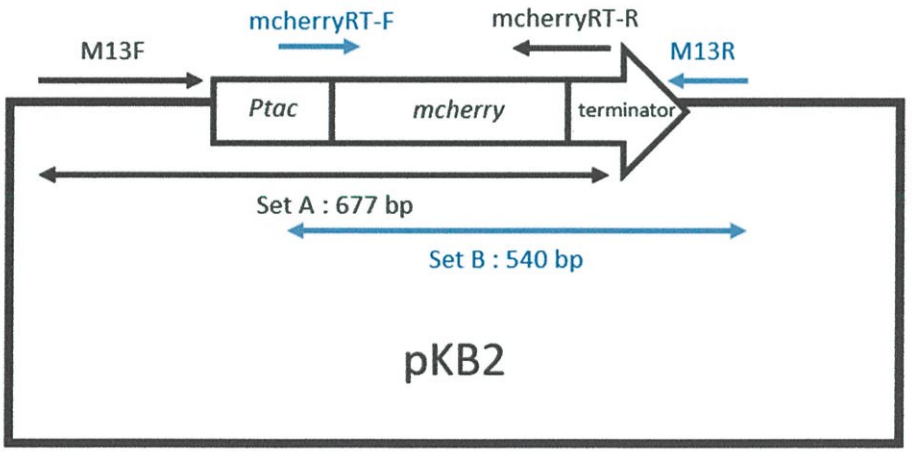


รูปที่ 4.6 ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดจากการถ่ายฝากยีนในแบคทีเรีย *E. coli*
(M : 1 kb DNA Ladder, 1-4 : พลาสมิด pKB2 จากตัวอย่างที่ 3, 4, 8 และ 18)

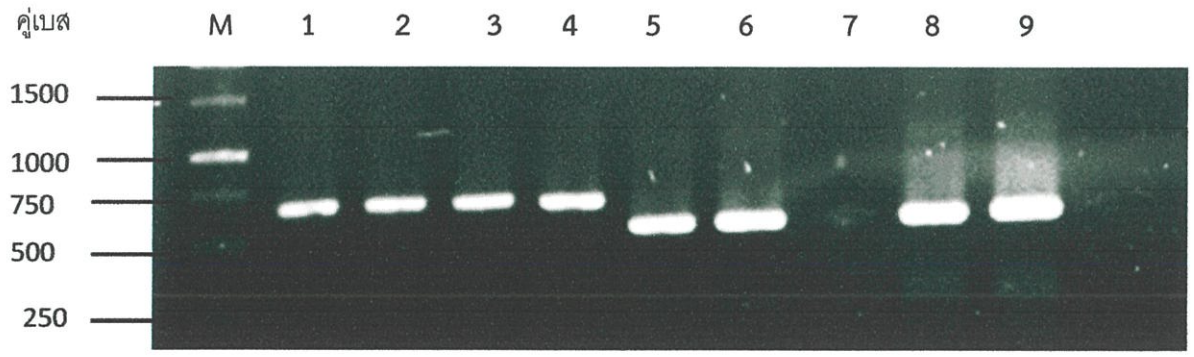
ตารางที่ 4.2 แสดงความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด pKB2 ที่ถูกชะด้วย Elution Buffer ปริมาตร 30 µl

หมายเลขตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
3	68.4	2.03	1.59
4	75.8	2.02	1.54
8	70	1.95	1.29
18	76	2.04	1.50

การทดลองมีการควบคุมให้ดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator เข้าไปแทรกในพลาสมิดในทิศทางที่ต้องการโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการตัดโมเลกุลพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ทำให้ปลายแต่ละด้านของโมเลกุลดีเอ็นเอสามารถเชื่อมต่อกันได้เพียงทิศทางเดียว แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการตรวจสอบยืนยันว่าพลาสมิด pKB2 มีลักษณะที่ถูกต้องโดยการทำ PCR ดังแสดงในรูปที่ 4.7 แบ่ง Primer ออกเป็น 2 ชุด ชุด A ประกอบด้วย M13F และ *mcherry*RT-R ให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 677 คู่เบส ชุด B ประกอบด้วย M13R และ *mcherry*RT-F ให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 540 คู่เบส ผลการตรวจสอบทิศทางของ *Ptac*::*mcherry*::terminator ในพลาสมิด pKB2 จากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 3, 4, 8 และ 18 ด้วยปฏิกิริยา PCR กับ Primer ชุด A และ B ให้ขนาดสอดคล้องกับชิ้นดีเอ็นเอที่คาดไว้ตามที่แสดงในรูปที่ 4.8



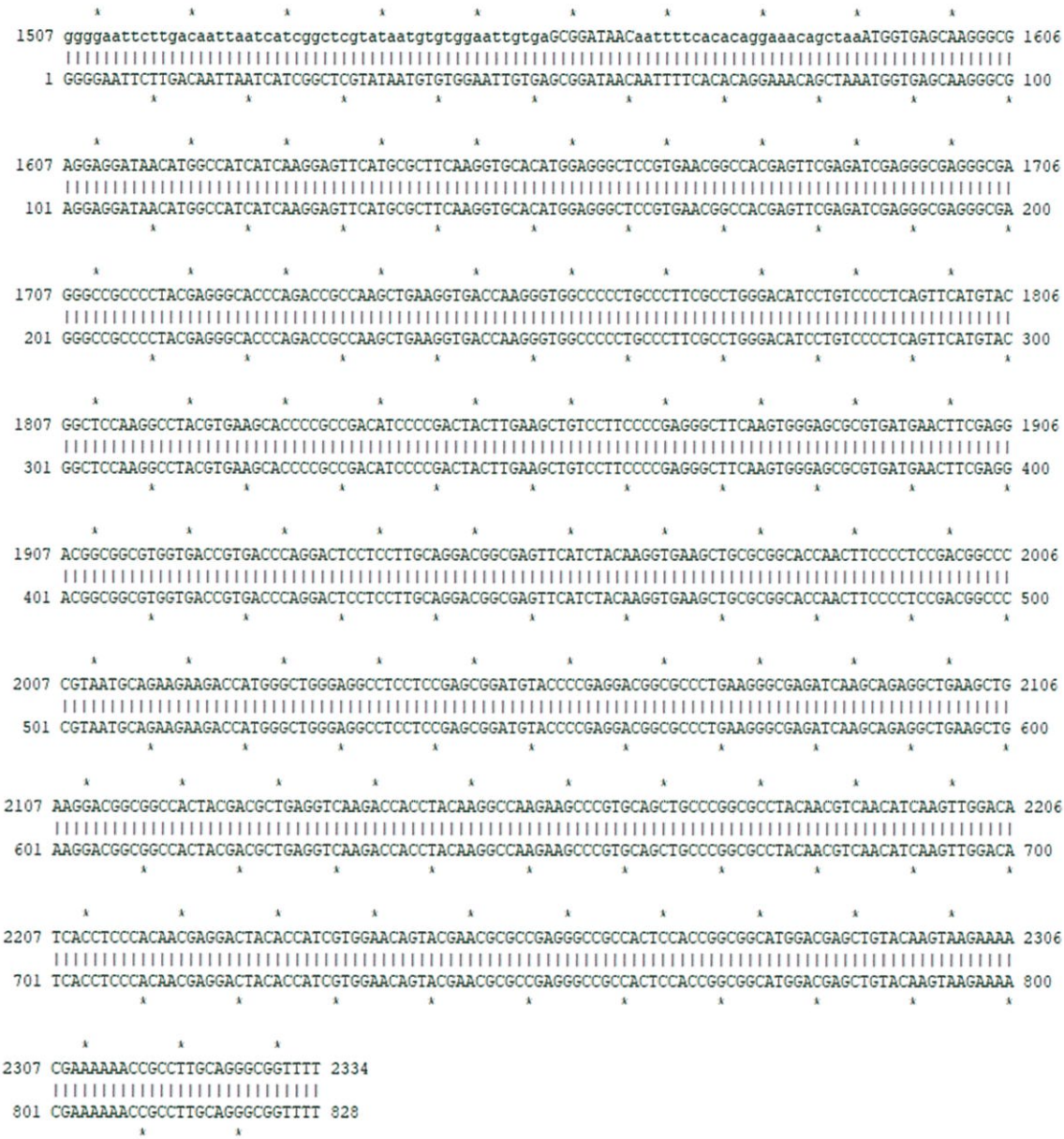
รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ M13F, M13R, *mcherry*RT-R และ *mcherry*RT-F บนพลาสมิด pKB2



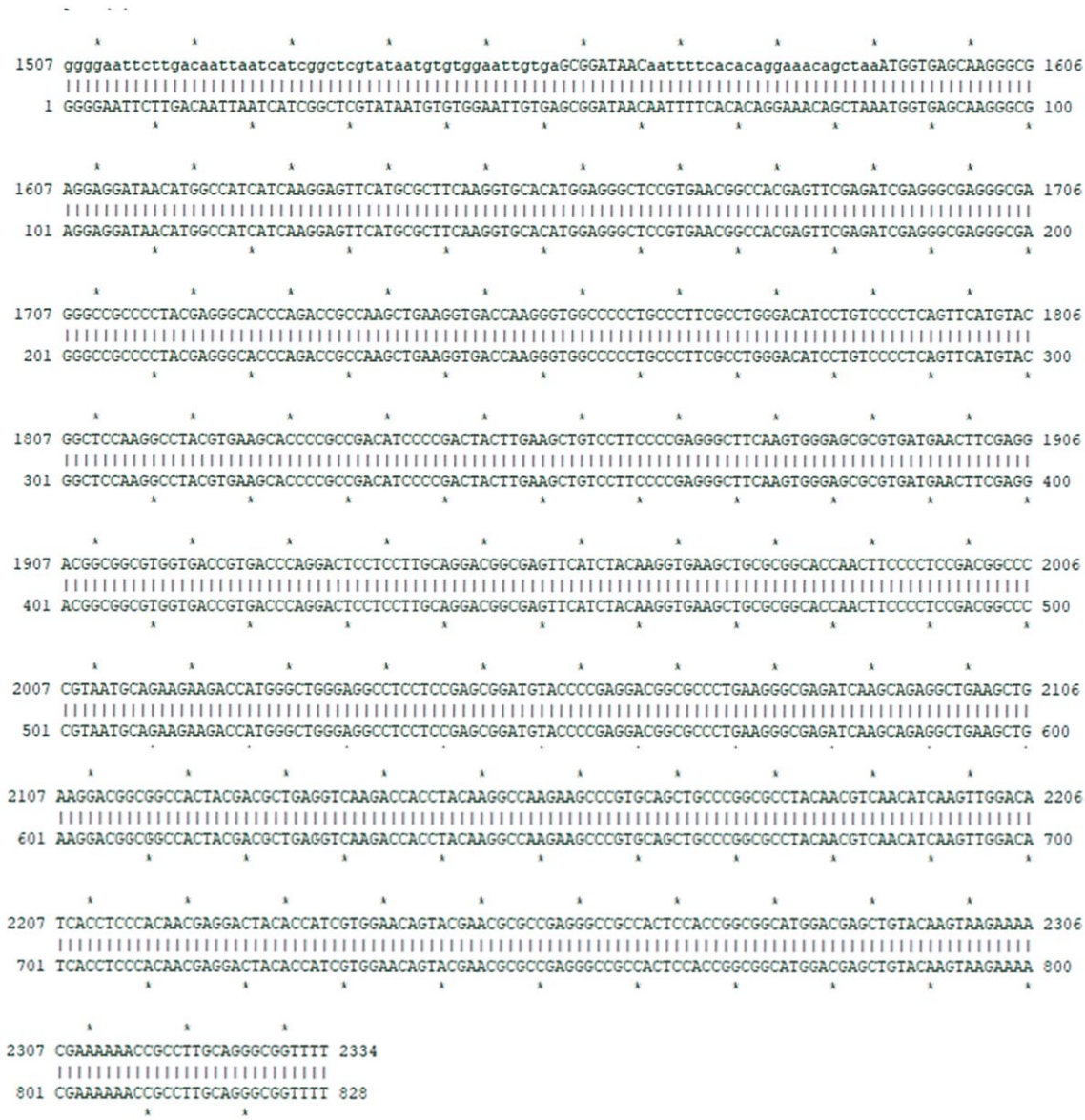
รูปที่ 4.8 การตรวจสอบทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ในพลาสมิด pKB2 ที่สกัดจากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 3, 4, 8 และ 18 (M: 1 kb DNA Ladder,1-4 : ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 677 คู่เบส, 5-9 : ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส)

4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส

พลาสมิด pKB2 ที่สกัดออกมาจากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 4 และ 18 ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อยืนยันว่าภายในพลาสมิดมีชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ลำดับเบสถูกต้องทุกตัว เมื่อได้รับลำดับเบสแล้วนำมาเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่สกัดมาจากแบคทีเรียกับลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 ที่ออกแบบมาจากโปรแกรม APE จากผลการตรวจสอบพบว่าลำดับเบสของตัวอย่างหมายเลข 4 และ หมายเลข 18 เหมือนกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบนโปรแกรมทั้งหมด 828 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *E. coli* ได้รับพลาสมิด pKB2 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ลำดับเบสถูกต้องทุกตัว ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10



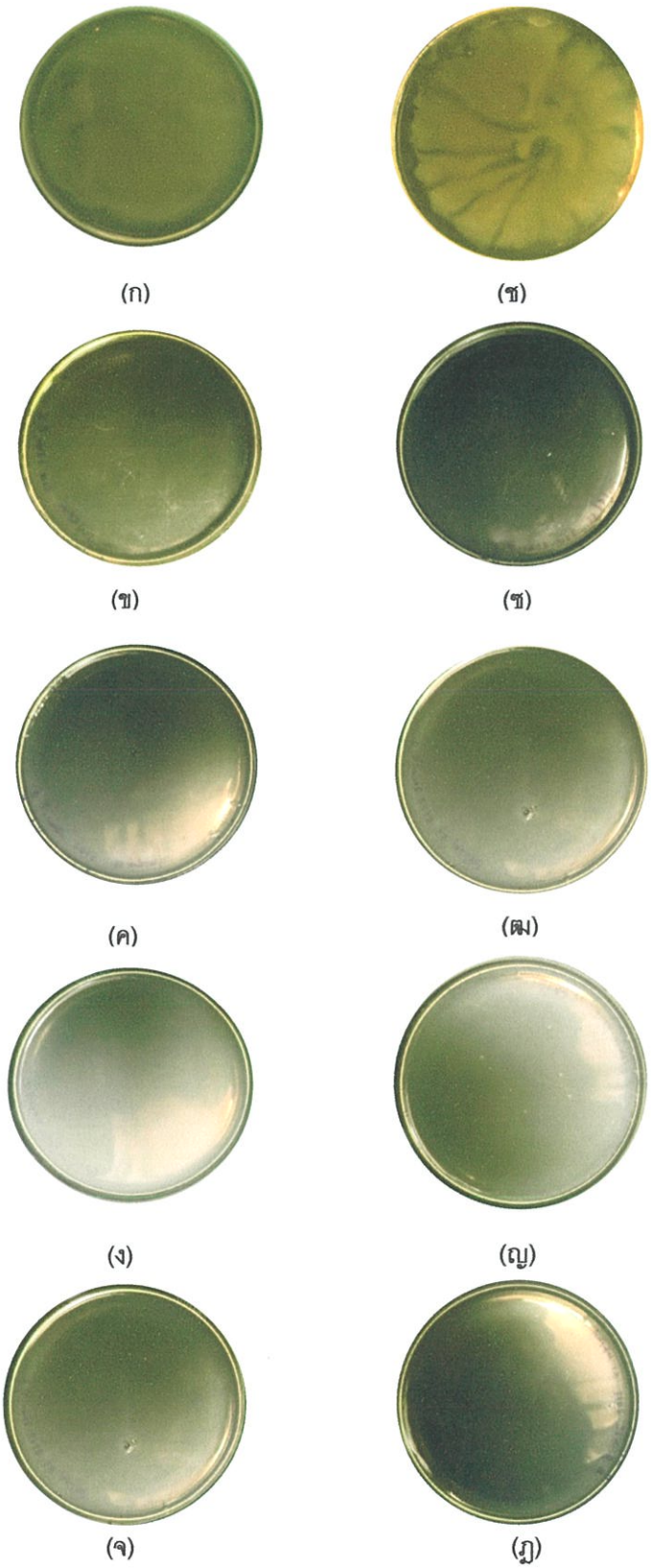
รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 จากการตัดต่อด้วยโปรแกรม APE (เส้นบน) กับลำดับเบสของ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่วิเคราะห์ได้จากพลาสมิด pKB2 สกัดได้จากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 4



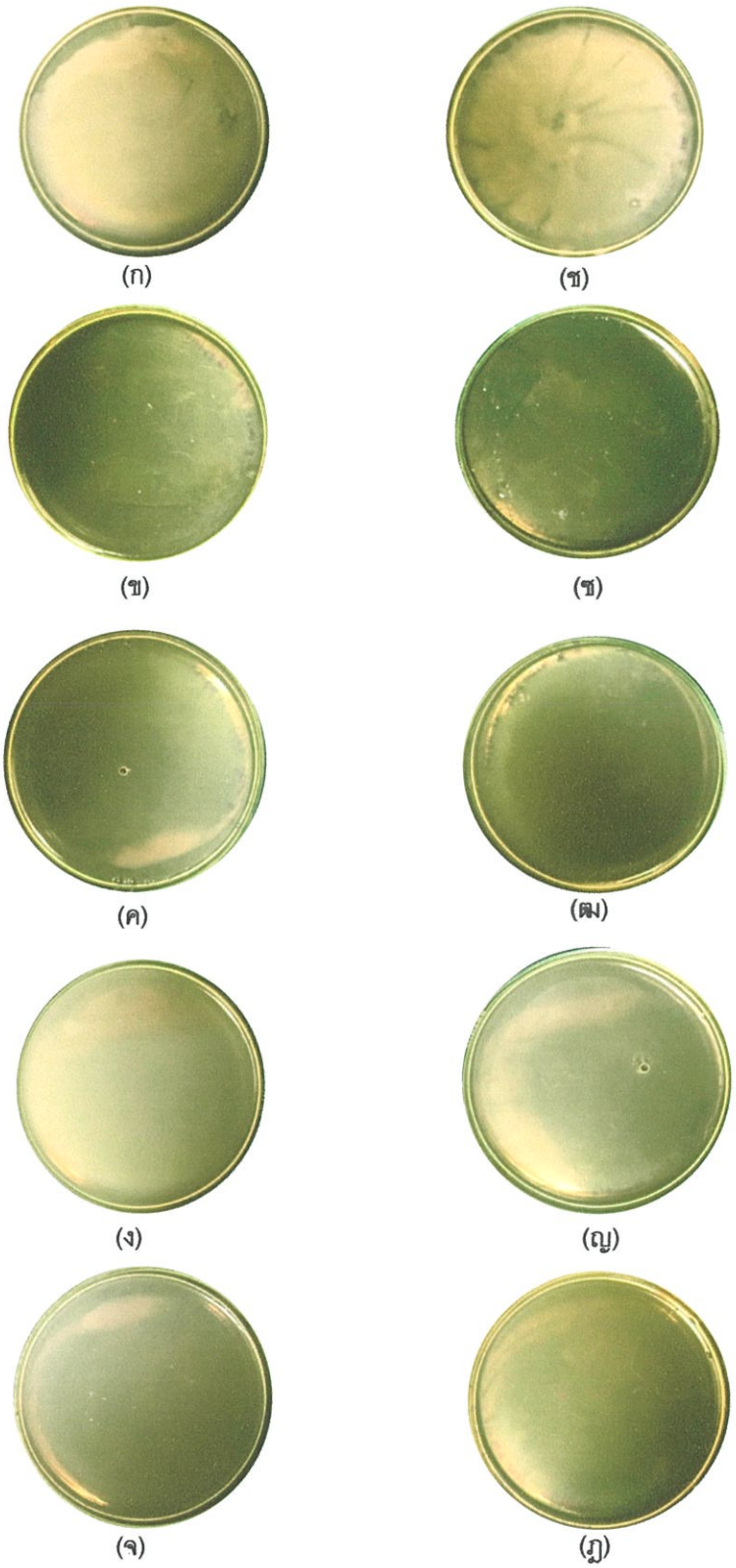
รูปที่ 4.10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของพลาสมิด pKB2 จากการตัดต่อด้วยโปรแกรม APE (เส้นบน) กับลำดับเบสของ *Ptac*::*mcherry*::terminator ที่วิเคราะห์ได้จากพลาสมิด pKB2 สกัดได้จากแบคทีเรีย *E. coli* หมายเลข 18

4.4 การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin

มีการทดลองถ่ายยีนโดยวิธี Electroporation เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KB Agar ที่มีใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 25 µg/ml เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด (Hiromasa and Ryohei 2013) ในการศึกษานี้แบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 ถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยเพาะเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในสารละลาย 0.85 % Normal Saline ปริมาตร 100 µl ลงบนอาหาร LB Agar ที่มียา Gentamicin ความเข้มข้น 0, 15, 25, 35 และ 45 µg/ml ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นใดเลย เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11) แต่พบการเจริญของแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวในทุกความเข้มข้น เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.12)



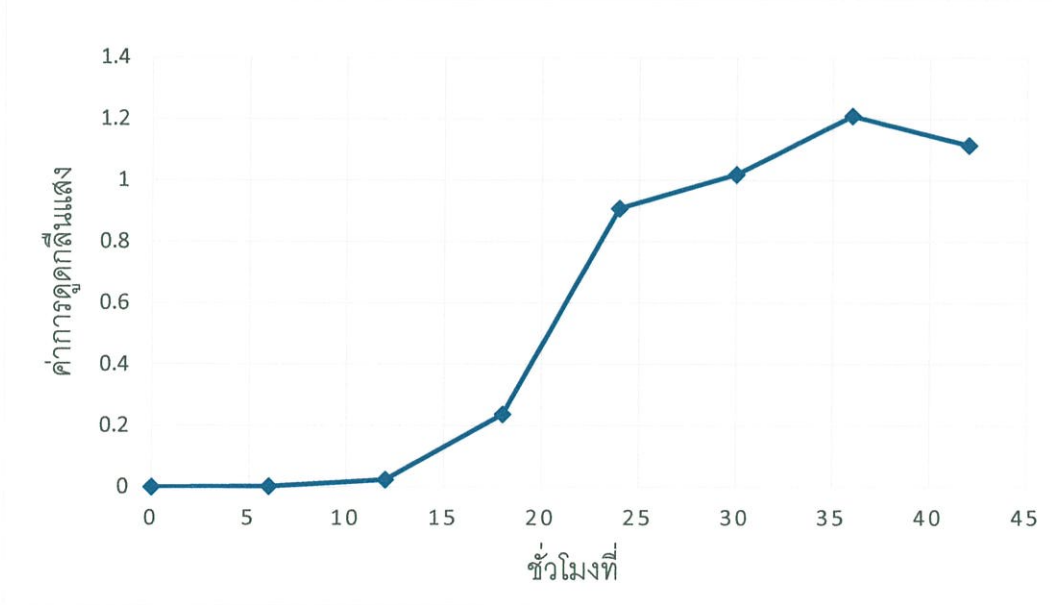
รูปที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก-จ) และ สายพันธุ์ 2018 (ช-ฎ) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0 µg/ml (ก, ช), 15 µg/ml (ข, ซ), 25 µg/ml (ค, ฌ), 35 µg/ml (ง, ญ), 45 µg/ml (จ, ฎ) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



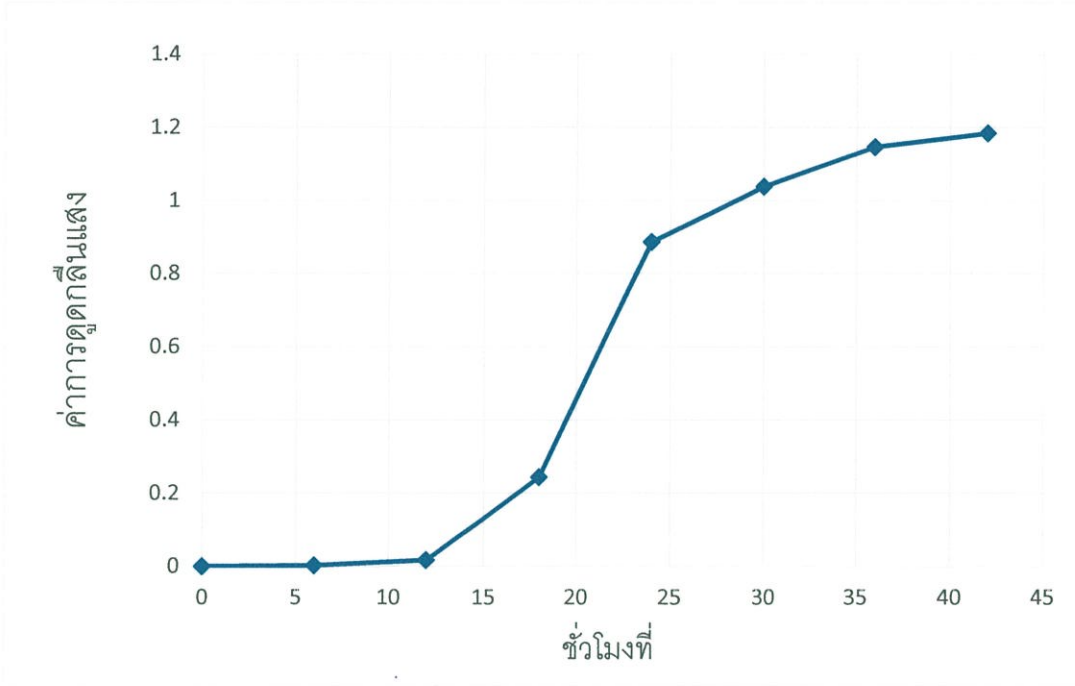
รูปที่ 4.12 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก-จ) และ สายพันธุ์ 2018 (ช-ฎ) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0 µg/ml (ก, ช), 15 µg/ml (ข, ซ), 25 µg/ml (ค, ฌ), 35 µg/ml (ง, ญ), 45 µg/ml (จ, ฎ) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง

4.5 การเตรียม Competent cells ของแบคทีเรีย *B. glumae*

วิธีการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านให้เป็น Competent Cells ใช้วิธี High Competency Method (Hiromasa and Ryohei 2013) เนื่องจากการเตรียมเซลล์แบบวิธี Conventional Method ต้องทำภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยมีการศึกษามาแล้วว่าอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์และอุณหภูมิต่ำส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะตาย ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Competent Cells คือในช่วง 24-28 ºC (Qiang *et al.*, 2016) ซึ่งวิธี High Competency Method เตรียมเซลล์ ณ อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้มีการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียในช่วงเวลาต่างกันดังนี้ เขย่าเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* ทั้งสายพันธุ์ 2015 และ 2018 ในตู้เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 28 °C บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 6 ชั่วโมง ได้กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 4.13) สายพันธุ์ 2015 จากกราฟตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 36 คือระยะที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Log Phase) เช่นเดียวกับสายพันธุ์ 2018 (รูปที่ 4.14) ในขณะที่ระยะ Stationary Phase ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถระบุได้เพราะจำนวนชั่วโมงที่เก็บวัดตัวอย่างไม่มากพอ จากกราฟจึงนำระยะเวลาที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง Log Phase มาใช้เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อเตรียม Competent Cells เนื่องจากระยะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเจ้าบ้านมีผลต่อประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย ช่วง Log Phase จะทำให้ประสิทธิภาพในการรับดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์สูงสุด เพราะเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ดีเมื่อพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ก็สามารถซ่อมแซมผนังเซลล์และเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพส่วนระยะ Stationary Phase แบคทีเรียแก่เกินไปเมื่อถูกสารเคมีอาจทำให้แบคทีเรียตายง่าย ประสิทธิภาพต่ำ (มณีวรรณ, 2553)



รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 ในอาหาร LB Broth ที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 42 ชั่วโมง โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2018 ในอาหาร LB Broth ที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 42 ชั่วโมง โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียหลังจากถูกเตรียมให้เป็น Competent Cells โดยปิเปตสารละลายแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ปริมาตร 100 µl ลงบนอาหาร Nutrient Agar บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองรูปที่ 4.15 พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียเจริญหนาแน่นแพร่กระจายทั่วเพลททั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าหลังจากถูกเตรียมเป็น Competent Cells แล้วแบคทีเรียยังคงมีชีวิตรอด

(ก) (ข)

รูปที่ 4.15 การเจริญของเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหาร Nutrient Agar หลังจากถูกเตรียมเป็น Competent Cells ด้วยวิธี High Competency Method

4.6 การถ่ายพลาสมิด pKB2 เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae*

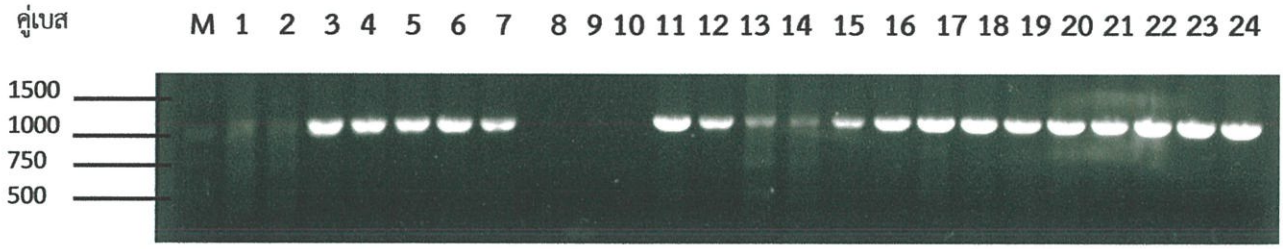
นำพลาสมิด pKB2 เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* โดยวิธี Electroporation ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2.5 kV ซึ่งการใช้กระแสไฟฟ้าถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการทางเคมีโดยประมาณว่าการใช้พลาสมิดจำนวน 1 µg สามารถทำให้เซลล์เจ้าบ้านรับเอาดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ได้ถึง 5×10^{10} เซลล์ (มณีวรรณ, 2553) จากรูปที่ 4.15 และ 4.16 แสดงให้เห็นว่าการเตรียมเซลล์ด้วยวิธี High Competency Method ทำให้เซลล์ส่วนใหญ่ยังคงสามารถรอดชีวิตและแบคทีเรีย *B. glumae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้รับพลาสมิด pKB2 เข้าสู่เซลล์เพราะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 25 µg/ml

ผลการทดลองถ่ายพลาสมิดเข้าเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* โดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้และเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่ยังคงมีชีวิตรอดนี้สอดคล้องกับงานวิจัยโดย Hongsup *et al.* (2011) ศึกษาสภาวะเครียดที่มีผลต่อการถ่ายพลาสมิดได้แก่ ค่า pH, แรงดันออสโมติก, ความเย็น และ ความร้อน พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงโดยวิธี Heat Shock เป็นสภาวะเครียดที่ทำให้แบคทีเรียตายหลังจากถ่ายพลาสมิดภายในเวลา 1 ชั่วโมง เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลต่อยีน *usp1* และ *usp2* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน Usps (Universal Stress Protein) ใน *B. glumae* เมื่อยีนทั้งคู่ถูก Mutants ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็วเปรียบเทียบกับ Wild-type ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *B. glumae* คือวิธี Electroporation

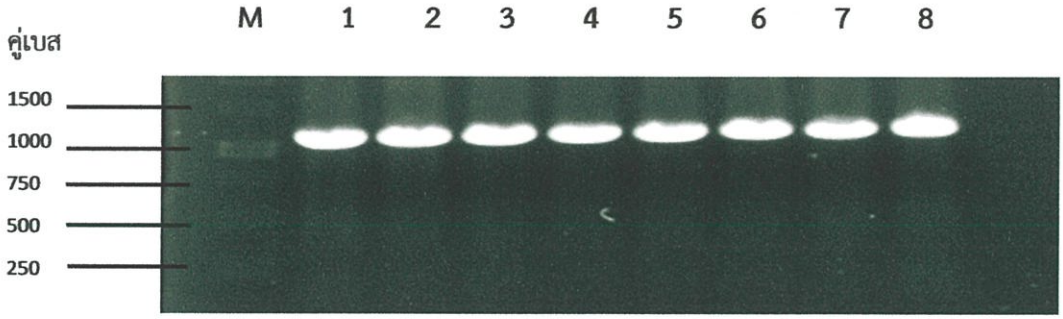
(ก) (ข)

รูปที่ 4.16 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) และ สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 25 µg/ml

ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 25 µg/ml เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรีย *B. glumae* ได้รับพลาสมิด pKB2 เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน สังเกตเห็นโคโลนีที่ขึ้นมีสีม่วงและสีขาว เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 30 µl สายพันธุ์ละ 16 หลอดและเพิ่มจำนวนดีเอ็นจากเทคนิค PCR โดยใช้ Primer M13F และ M13R จากรูปที่ 4.17 ตัวอย่างหมายเลข 1-7, 11-24 และ รูปที่ 4.18 แถบดีเอ็นเอที่ 1-8 ให้ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ยกเว้นแถบที่ 8, 9 และ 10 ของ *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพราะเลือกมาจากโคโลนีสีขาวที่อาจไม่ได้รับพลาสมิดแต่ไม่มียีน *Ptac*::*mcherry*::terminator แสดงให้เห็นว่าโคโลนีสีม่วงเป็น *B. glumae* ที่ได้รับพลาสมิดและมียีน *Ptac*::*mcherry*::terminator แทรกอยู่



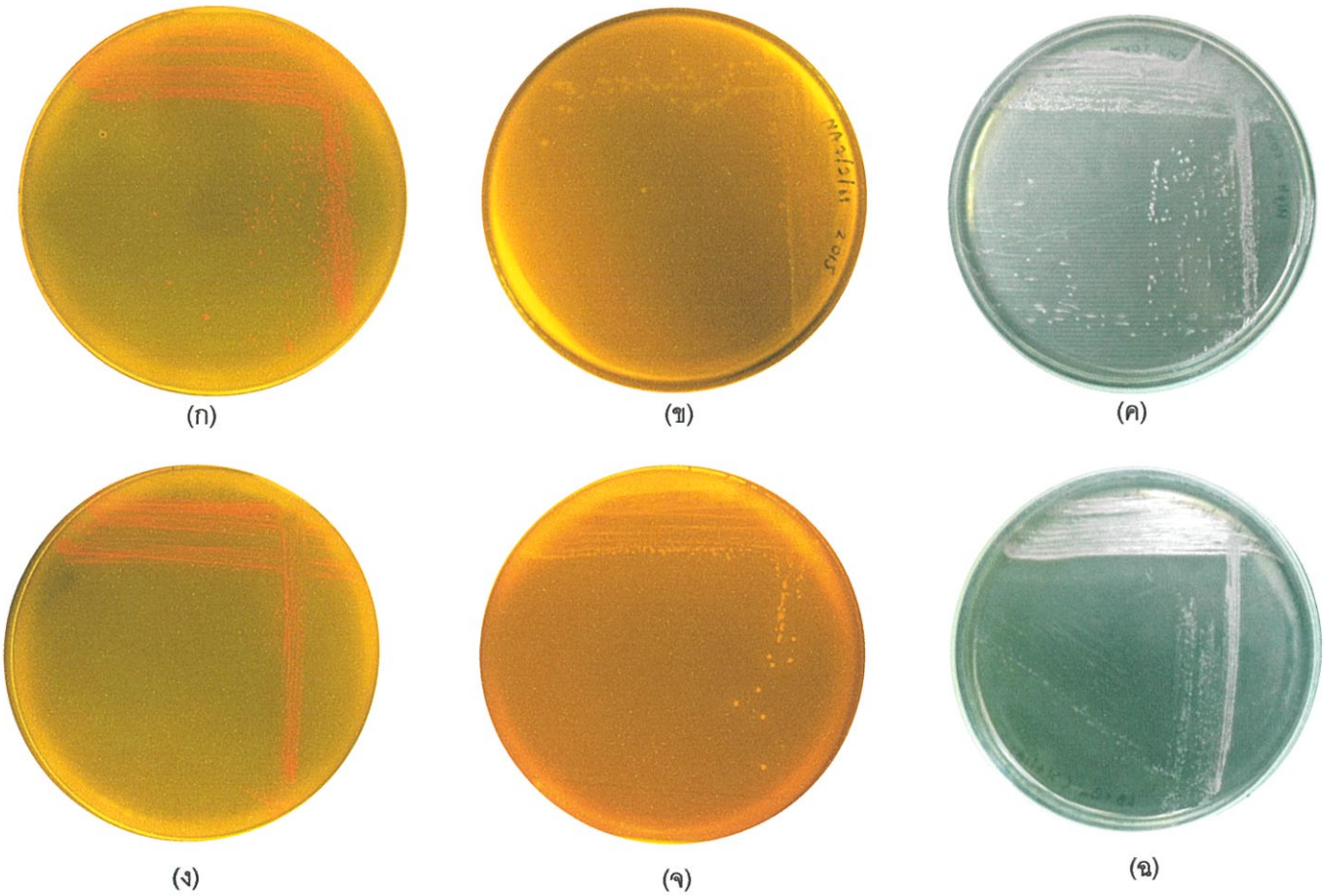
รูปที่ 4.17 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator จากการทำ PCR ใน *B. glumae* ที่ผ่านการถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 (M : 1 kb DNA Ladder, 1-16 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 17-24 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018)



รูปที่ 4.18 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator จากการทำ PCR ใน *B. glumae* ที่ผ่านการถ่ายฝากพลาสมิด pKB2 (M : 1 kb DNA Ladder, 1-8 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018)

4.7 การคงตัวของพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae*

การนำพลาสมิด pKB2 ไปประยุกต์ใช้เพื่อติดตามแบคทีเรีย *B. glumae* ในต้นข้าวจำเป็นต้องมีการทดสอบความเสถียรของพลาสมิด เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาที่พลาสมิดสามารถคงอยู่ได้ภายในเซลล์แบคทีเรีย มีการรายงานความเสถียรของพลาสมิด pBBR1MCS-5 ที่มียีน *mcherry* คงอยู่ในเซลล์แบคทีเรียได้ประมาณ 30 รุ่น นาน 60 วัน (Ellen *et al.*, 2010) โดยการทดลอง Subculture เชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร LB broth ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะโดยแต่ละวันเชื้อแบคทีเรียถูกเจือจางลง 100 เท่า จากนั้น Cross Streak ลงบนอาหาร LB Agar ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะและวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *mcherry* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Leica MZFLIII สเตอริโอฟลูออเรสเซนต์ การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการ Subculture เช่นกัน โดย Cross Streak เชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ใหม่ ทุก ๆ 2 วัน จำนวน 10 ครั้งและตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mcherry* ภายใต้แสงสีฟ้า ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรและด้วยตาเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 4.19 จนกระทั่งครั้งที่ 10 โคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pKB2 ยังคงเรืองแสงเปรียบเทียบกับโคโลนีของแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิด เมื่อตรวจสอบด้วยแสงสีฟ้าและตาเปล่าตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pKB2 สามารถคงอยู่ได้ในเซลล์แบคทีเรียเป็นระยะเวลานานถึง 20 วัน



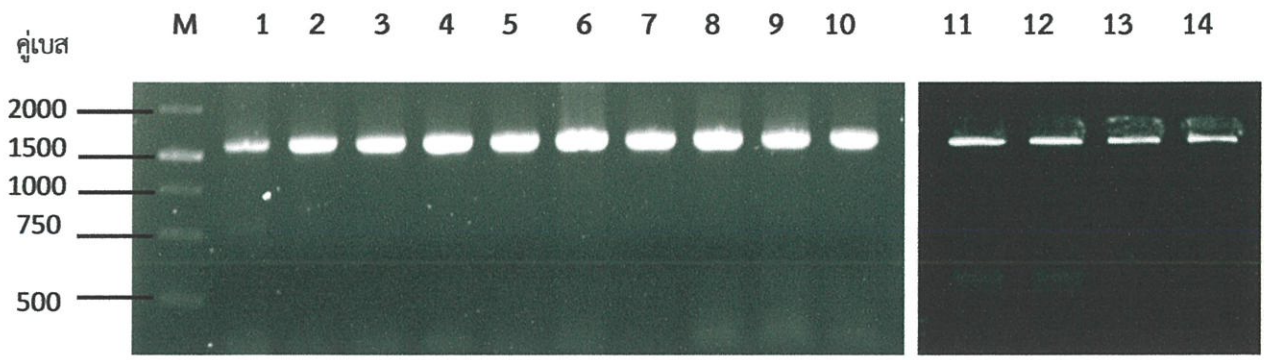
รูปที่ 4.19 การเรืองแสงของยีน *mcherry* ในแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 ที่ได้รับพลาสมิด (ก) และไม่ได้รับพลาสมิด (ข), สายพันธุ์ 2018 ที่ได้รับพลาสมิด (ง) และไม่ได้รับพลาสมิด (จ) ภายใต้แสงสีฟ้า การสังเกตด้วยตาเปล่าสายพันธุ์ 2015 (ค) และ สายพันธุ์ 2018 (ฉ)

นอกจากการทดสอบความคงตัวของพลาสมิดจากการ Subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะแล้วตรวจสอบยืนยันว่าพลาสมิดที่คงตัวอยู่ในแบคทีเรียเป็นพลาสมิด pKB2 ที่ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ Gentamicin และ *Ptac::mcherry*::terminator สำหรับยีนต้านยาทดสอบโดย Cross Streak ลงบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 25 µg/ml พบว่าแบคทีเรียยังคงสามารถเจริญได้มีลักษณะโคโลนีเป็นสีม่วง ดังแสดงในรูปที่ 4.20 ชี้ให้เห็นว่ายีนต้านยาปฏิชีวนะ Gentamycin ยังคงอยู่ สำหรับยีน *mcherry* ใช้เทคนิค PCR โดย Primer M13F และ M13R จากผลการทดลองรูปที่ 5.11 พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ 2015 และ 2018 ที่สุ่มมาสามารถนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้แถบขนาดประมาณ 1,000 คู่เบสได้ทุกโคโลนี ผลการทดลองทั้ง 2 ส่วนนี้ สอดคล้องกับทดลองที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้ว่าพลาสมิด pKB2 สามารถคงตัวอยู่ภายได้ในเซลล์และยังมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamycin กับยีน *Ptac::mcherry*::terminator

การทดสอบความคงตัวของพลาสมิด pKB2 ทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่พลาสมิดสามารถดำรงอยู่ในเซลล์แบคทีเรียและนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือติดตามแบคทีเรียเพื่อศึกษาการเข้าครอบครองพื้นที่ในต้นข้าวได้ ในต้นข้าวเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่มียาปฏิชีวนะหากมีการบ่มเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลงไปแบคทีเรียต้องสามารถเจริญได้ เมื่อตัดชิ้นส่วนข้าวไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลหากพบการเรืองแสงของโปรตีน mcherry แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถเข้าไปอาศัยในต้นข้าว แต่หากไม่พบการเรืองแสงของโปรตีนดังกล่าวมีความเป็นไปได้ 2 กรณีคือ 1) แบคทีเรียไม่สามารถเข้าสู่ต้นข้าวได้ 2) แบคทีเรียเข้าสู่ต้นข้าวได้แต่พลาสมิดหายไป ดังนั้นหากมีการนำชิ้นส่วนข้าวที่บ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pKB2 ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล แต่ไม่มีการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลน่าจะมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียไม่สามารถเข้าสู่ต้นข้าวได้

(ก) (ข)

รูปที่ 4.20 การเจริญของแบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 (ก) และ สายพันธุ์ 2018 (ข) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin ความเข้มข้น 25 µg/ml



รูปที่ 4.21 ชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator จากการทำ PCR โดยใช้ Primer M13F และ M13R (M : 1 kb DNA Ladder, 1-5 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 6-10 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018, Negative Control; 11-12 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2015, 13-14 : *B. glumae* สายพันธุ์ 2018)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่ายีน *Ptac*::*mcherry*::terminator มีอยู่ในแบคทีเรียเพราะสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้จากการทำ PCR โดยใช้ Primer M13R และ M13F ซึ่งจำเพาะกับลำดับเบสบนพลาสมิด pKB2 ดังนั้นแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดดังกล่าวจะต้องไม่พบแถบดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator (Negative Control)

การแสดงออกของยีน *mcherry* ภายใต้การควบคุมโดยโปรโมเตอร์ *Ptac* ในแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. glumae* มีความแตกต่างกัน ได้มีงานวิจัยอธิบายถึง โปรโมเตอร์ *Ptac* ว่าเป็นลูกผสมระหว่างโปรโมเตอร์ *trp* กับ *lac* โปรโมเตอร์ *Ptac* ในแบคทีเรีย *E. coli* สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานโดยสาร Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG) และยับยั้งด้วย *lac* repressor (Herman *et al.*, 1982) จากผลการทดลองไม่มีการแสดงออกของยีน *mcherry* ใน *E. coli* แต่มีการแสดงออกใน *B. glumae* ภายในสภาวะเดียวกันคือไม่มีสาร IPTG โคโลนีของ *B. glumae* เปลี่ยนเป็นสีม่วงและเรืองแสงเมื่อส่องภายใต้แสงสีฟ้า ในขณะที่โคโลนีของ *E. coli* ไม่มีการเปลี่ยนสี การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยเกี่ยวกับการถ่ายยีน *mcherry* ลงในแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas putida* และพบว่ามีการแสดงออกของยีนโดยไม่ต้องมีการเติมสาร IPTG (Ellen *et al.*, 2010) เนื่องจากใน *E. coli* มี *lac* repressor ทำหน้าที่จับกับบริเวณ Operator บน *lac* operon ส่งผลให้เอนไซม์ RNA Polymerase ไม่สามารถสังเคราะห์ mRNA แต่ในสภาวะที่มี IPTG สารนี้จับกับ *lac* repressor ได้ จึงไม่มีการจับที่บริเวณ Operator ทำให้เอนไซม์ RNA Polymerase เกิดการสังเคราะห์ mRNA ดังนั้นเป็นไปได้ว่าในแบคทีเรีย *B. glumae* ไม่มี *lac* repressor ที่คอยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ RNA Polymerase ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *mcherry* โดยไม่ต้องเติมสาร IPTG

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองถ่ายฝากยีน *mcherry* เข้าสู่แบคทีเรีย *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 พบว่าเกิดการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงเมื่อส่องดูภายใต้แสงสีฟ้า ยีน *Ptac::mcherry::terminator* สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยใช้ Primer 1111F และ 1111R ได้ขนาดดีเอ็นเอสอดคล้องกับขนาดที่คาดไว้คือ 828 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วย โปรโมเตอร์ *Ptac* 83 คู่เบส, บริเวณกำหนดการสร้างโปรตีน mcherry 711 คู่เบส และ เทอร์มิเนเตอร์ 34 คู่เบส ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Bam*HI ตัดชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิด pBBR1MCS-5 จากนั้นเชื่อมต่อทั้ง 2 ส่วนด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase เกิดเป็นพลาสมิด pKB2 ที่มีโครงหลักเป็นพลาสมิด pBBR1MCS-5 และมีชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator แทรกอยู่ การเพิ่มจำนวนพลาสมิดในแบคทีเรีย *E. coli* จากการทำ PCR โดยใช้ Primer M13F และ M13R พบว่ามีเพียง 14 ตัวอย่างจาก 24 ตัวอย่างที่ให้ขนาดดีเอ็นเอถูกต้องคือประมาณ 1,000 คู่เบส ประกอบด้วย *Ptac::mcherry::*terminator 828 คู่เบส, ลำดับเบสตั้งแต่บริเวณ 5`ของไพรเมอร์ M13F ถึง 5` โปรโมเตอร์ *Ptac* 22 คู่เบส และ ลำดับเบสตั้งแต่บริเวณ 3` ของไพรเมอร์ M13R ถึง 3` ของเทอร์มิเนเตอร์ 24 คู่เบส ทั้งนี้ทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac::mcherry::*terminator ภายในพลาสมิดถูกตรวจสอบด้วยการทำ PCR โดยใช้ชุด Primer 2 ชุดที่ให้ขนาดดีเอ็นเอแตกต่างกัน ได้แก่ ชุด A ประกอบด้วย M13F และ *mcherry*RT-R ให้ขนาดดีเอ็นเอ 677 คู่เบส ชุด B ประกอบด้วย M13R และ *mcherry*RT-F ให้ขนาดดีเอ็นเอ 540 คู่เบส จากผลการทดลองพบว่าทิศทางดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator ภายในพลาสมิดอยู่ในทิศทางที่ถูกต้อง เช่นเดียวกันกับลำดับเบสที่ผ่านการตรวจสอบเปรียบเทียบความเหมือนระหว่าง ลำดับเบสที่ออกแบบมาจากโปรแกรม APE กับลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดมาจากแบคทีเรีย *E. coli* ตัวอย่างที่ 4 และ18 พบว่าดีเอ็นเอทั้ง 2 เส้นสามารถเข้าคู่กันได้อย่างสมบูรณ์โดยมีการจับกันของเบสทั้งหมด 828 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *Ptac::mcherry::*terminator ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด การทดลองต่อมาได้ศึกษาความไวของยาปฏิชีวนะ Gentamicin ในการยับยั้งเชื้อ *B. glumae* สายพันธุ์ 2015 และ 2018 ทำให้ทราบว่าตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 15 µg/ml เป็นต้นไปแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ไม่มีพลาสมิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนการถ่ายยีนด้วยวิธี Electroporation ได้เลือกความเข้มข้นของยาที่ 25 µg/ml เป็นความเข้มข้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pKB2 ดังนั้นโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ

Gentamicin ความเข้มข้น 25 µg/ml คือ *B. glumae* ที่มีพลาสมิด pKB2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบว่ามีการแสดงออกดังนี้ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีม่วงเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เรืองแสงเมื่อสังเกตภายใต้แสงสีฟ้าและหลังจากทำ PCR ให้แถบดีเอ็นบนแผ่นอะกาโรสเจลขนาด 874 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียได้รับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์และเป็นพลาสมิด pKB2 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *Ptac*::*mcherry*::terminator แทรกอยู่ นอกจากนี้พลาสมิด pKB2 สามารถคงตัวอยู่ได้ภายในเซลล์แบคทีเรียโดยปราศจากการคัดเลือกโดยยาปฏิชีวนะนานถึง 20 วัน จากการทดลอง Subcuture ลงอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่จำนวน 10 ครั้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการนำ *B. glumae* ที่ได้รับพลาสมิด pKB2 เข้าสู่ต้นข้าวเพื่อใช้ในการติดตามแบคทีเรียและศึกษาการแสดงของยีน *mcherry* โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

2. ในการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Growth Curve) ควรทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

เอกสารอ้างอิง

มณีวรรณ สุขสมทิพย์. 2553. **การโคลนยีนเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มณฑล เลิศวรปรีชา, ญฏารัตน สุวรรณมณี. 2557. "KKU Sci." *ระบบควอรัมเซนซิง การสื่อสารของแบคทีเรีย : กลไกการควบคุมการก่อโรคในเชื้อ Pseudomanas aeruginosa Quorum Sensing, A Communication of Bacteria: Control Mechanism of Pathogenesis in Pseudomanas aeruginosa* . 42 : 1-12.

วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ, จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์, สุจินต์ ภัทรภูวด, และ วิชัย โฆสิตรัตน. 2017. "Agricultural Sci." *การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้ และเมล็ดด่างของข้าวโดยการวิเคราะห์ ลำดับเบสของกลุ่มยีน.* 48 : 297-311.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.

อนุรักษ์ และ สุพัตรา. 2556. **ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด มีน เซอร์วิส ซัพพลาย.

Cui Zhouqi, Zhu Bo, Xie Guanlin, Li Bin and Hung Shiwen. 2016. " Rice Science. " *Research Status and Prospect of Burkholderia glumae, the Pathogen Causing Bacterial Panicle Blight.* 23 : 111-118.

Dmitriy M. Chudakov, Mikhail V. Matz, Sergey Lukyanov, and Konstantin A. Lukyanov. 2010. " The American Physiological Society. " *Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues.* 90 : 0031-9333.

Ellen L. Lagendijk, Shamil Validov, Gerda E.M. Lamers, Sandra de Weert and Guido V. Bloemberg. 2010. "FEMS Microbiol Lett." *Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies.* 305 : 81-90.

Hongsup Kim,a Eunhye Goo,a Yongsung Kang,a Jinwoo Kim,b and Ingyu Hwanga. 2011. " Journal of Bacteriology. " *Regulation of Universal Stress Protein Genes by Quorum Sensing and RpoS in Burkholderia glumae.* 982-992.

Herman A. De Boer, Lisa J. Comstock and Mark Vasser. 1982. " Proc. NatL Acad. Sci. " *The tac promoter: A functional hybrid derived from the trp and lac promoters.* 80 : 21-25.

Hiromasa Saitoh and Ryohei Terauchi. 2013. " bio-protocol. " *Burkholderia glumae Competent Cells Preparation and Transformation.* 3 : 1-5.

Jong Hyun Ham, Rebecca A. Melanson and Milton C. Rush. 2011. " Molecular Plant Pathology." *Burkholderia glumae : next major pathogen of rice. ?* 12 : 329-339

Leland Hartwell, Lee Hood, Michael, Ann Reynolds and Lee Silver. 2554. **Genetic from Genes to Genomes**. New York : McGraw Hill.

Michael E. Kovach, Philip H. Elzer, D. Steven Hill, Gregory T. Robertson, Michael A. Farris, R. Martin RoopII and Kenneth M. Peterson. 1995. "Gene." *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes.* 166 : 175-176

QiangTu, JiaYin, Jun Fu, Jennifer Herrmann, Yuezhong Li, YulongYin, A. Francis Stewart, Rolf Müller and YoumingZhang. 2016. "Scientific Reports." *Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency.* 6 : 1-8

Wen Lua, Luqi Pana, Haijun Zhaob, Yulin Jiac, Yanli Wangd, Xiaoping Yua and Xueyan Wanga. 2014. "The crop journal." *Molecular detection of Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xanthomonas oryzae pv. oryzicola, and Burkholderia glumae in infected rice seeds and leaves.* 2 : 398-425

Aayushi Jain and Preeti Srivastava. 2013. "FEMS Microbiol Lett." *Broad host range plasmids.* 38 : 87-96

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA)

Sodium Chloride	0.5	g
Agar	1.5	g
Yeast Extracts	0.3	g
Peptone	0.5	g
Distilled Water	100.0	ml

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีทั้งหมดละลายเข้ากัน เทใส่ขวด ปิดฝาขวดโดยคลายเกลียวเล็กน้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แบ่งอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 เพลท เพลทละ 25 ml

2. Luria Bertani (LB) Agar

Sodium Chloride	0.5	g
Agar	1.5	g
Tryptone	1.0	g
Yeast Extracts	0.5	g
Distilled Water	100.0	ml

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีทั้งหมดละลายเข้ากัน เทใส่ขวด ปิดฝาขวดโดยคลายเกลียวเล็กน้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แบ่งอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 เพลท เพลทละ 25 ml

3. Luria Bertani (LB) Broth

Sodium Chloride	0.5	g
Tryptone	1.0	g
Yeast Extracts	0.5	g
Distilled Water	100.0	ml

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีทั้งหมดละลายเข้ากัน เทใส่ขวด ปิดฝาขวดโดยคลายเกลียวเล็กน้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. Normal Saline 0.85%

Sodium Chloride	0.85	g
Distilled Water	100.0	ml

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลอง

2. 5X TBE (Tris-Borate-EDTA)

Tris Base	54.0	g
Boric Acid	**27.5**	**g**
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	**20.0**	**ml**
Distilled Water	1,000.0	ml

ละลาย Tris Base ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย Magnetic Stirrer เติม Boric Acid ตามด้วย EDTA รอจนกระทั่งเห็นสารละลายเป็นสีใส ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสารละลายรวม 1,000 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 3 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว นราทิพย์ เกตุกล รหัสประจำตัว 57050836

นาย/นาง/นางสาว นลินรัตน์ พนิตรนวงศ์ รหัสประจำตัว 57050938

นาย/นาง/นางสาว ..... รหัสประจำตัว .....

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงในแบคทีเรีย Burkholderia glumae

.....

ชื่อภาษาอังกฤษ Transformation of the fluorescent-protein coding gene in

Burkholderia glumae

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.02 % หรือโปรแกรม Turnitin ..... %

ลงชื่อ นราทิพย์	ลงชื่อ นลินรัตน์	ลงชื่อ .....
(นางสาว นราทิพย์ เกตุกล)	(นางสาว นลินรัตน์ พนิตรนวงศ์)	( )
นักศึกษา	นักศึกษา	นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. ..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ	ลงชื่อ	ลงชื่อ .....
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม