จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การโคลนและลักษณะสมบัติของยีนกลุ่ม *rhl* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมโนแรมโนลิพิดทางชีวภาพของ *Pseudomonas aeruginosa* A41

โดย

รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน
ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
นางสาวขนิษฐา วงษ์นิกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรกฎาคม 2549

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2548 (ครั้งที่ 3) เรื่องการโคลนและลักษณะสมบัติของยีนกลุ่ม *rhl* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมโนแรมโนลิพิดทางชีวภาพของ *Pseudomonas aeruginosa* A41 โดยมีระยะเวลาของโครงการ 1 ปี คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณ กองทุนรัชดาฯ ที่ได้ให้ความสนับสนุนงานวิจัยไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2549

เลขหมู่ ดส ดท15
เลขทะเบียน 013272
วัน, เดือน, ปี ๑๓.๑.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การโคลนและลักษณะสมบัติของยีนกลุ่ม *rhl* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมโนแรมโนลิพิดทางชีวภาพของ *Pseudomonas aeruginosa* A41

ชื่อผู้วิจัย จิราภรณ์ ธนียวัน กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และ ขนิษฐา วงษ์นิกร

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กรกฎาคม 2549

บทคัดย่อ

Pseudomonas sp. A41 ที่แยกจากน้ำทะเลอ่าวไทย มีความสามารถในการผลิตแรมโนลิพิด จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถจำแนกสายพันธุ์ A41 เป็น *Pseudomonas aeruginosa* แยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* A41 โดยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันจีโนมิกดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* หรือ *rhlA* โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกเข้าในพลาสมิดเวกเตอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 4,965 bp พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ที่สมบูรณ์จำนวน 4 แห่ง และไม่สมบูรณ์ 1 แห่ง กรอบอ่านรหัสเปิดทั้งหมดมีทิศทางในการถอดรหัสไปในทางเดียวกันตามลำดับดังต่อไปนี้ ORF1 (*dcd*) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ deoxycytidine triphosphate deaminase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 100% ORF2 (*rhlA*) ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ rhamnosyltransferase 1 chain A ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 เท่ากับ 100% ORF3 (*rhlB*) ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ rhamnosyltransferase 1 chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 100% ORF4 (*rhlR*) ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ transcriptional regulator RhlR ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 เท่ากับ 100% ORF5 (*rhlI*) ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ autoinducer synthetase protein RhlI ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 เท่ากับ 94% นอกจากนี้ยังพบบริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณจับเกาะของไรโบโซม และบริเวณอนุรักษ์ *las* box ซึ่งเป็นบริเวณจับเกาะของ regulatory protein เหนือกรอบอ่านรหัสเปิด ORF2 ORF4 และ ORF5

Project Title	Cloning and characterization of *rhl* genes involving mono-rhamnolipid biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa* A41
Name of the Investigators	Jiraporn Thaniyavarn, Kobchai Pattaragulwanit and Kanitta Wongnikorn
Year	July 2006

Abstract

Pseudomonas sp. A41 isolated from Gulf of Thailand's sea water is capable of producing rhamnolipid. Morphological and biochemical characteristics together with 16S rDNA nucleotide sequence enable to classify strain A41 as *Pseudomonas aeruginosa*. Genes involving rhamnolipid biosynthesis were isolated from *Pseudomonas aeruginosa* A41 by southern hybridization of genomic DNA with *rhlR*- or *rhlA*-probe. Positive DNA fragments were cloned into plasmid vectors and nucleotide sequences of insert DNA were determined. From total nucleotide sequence of 4,965 bp, four complete and one incomplete open reading frames (ORFs) were revealed. All ORFs are in the same orientation as following; ORF1 is an incomplete ORF with 100% homology to deoxycytidine triphosphate deaminase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; ORF2 (*rhlA*) shows 100% homology to rhamnosyltransferase 1 chain A of *Pseudomonas aeruginosa* PG201; ORF3 (*rhlB*) shows 100% homology to rhamnosyltransferase 1 chain B of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; ORF4 (*rhlR*) shows 100% homology to transcriptional regulator RhlR of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PG201 and ORF5 (*rhlI*) shows 94% homology to autoinducer synthetase protein RhlI of *Pseudomonas aeruginosa* PG201. Moreover, the putative promoters, Shine-Dalgarno (SD) sequences and conserve regions of *las* box were found upstream of ORF2 ORF4 and ORF5.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ii

บทคัดย่อภาษาไทย iii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iv

สารบัญ v

รายการตารางประกอบ.....vi

รายการภาพประกอบ vii

รายการสัญลักษณ์.....xi

บทที่

1. บทนำ 1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย 21
4. ผลการวิจัย..... 51
5. การอภิปรายผล.....101
6. ข้อสรุป.....108
7. ข้อเสนอแนะ.....112

เอกสารอ้างอิง 114

ภาคผนวก 126

ภาคผนวก ก 127

ภาคผนวก ข 128

ภาคผนวก ค 136

ภาคผนวก ง 146

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ 11
3.1 แบคทีเรีย 24
3.2 พลาสมิด 25
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์..... 26
3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA ของ *Pseudomonas* sp. A41 30
3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlA* 33
3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlR* .34
3.7 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว 36
3.8 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลาก 37
4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA ของ *Pseudomonas* sp. A41.....52
4.2 ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิง.....99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิว 7
2.2 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle concentration (CMC) 8
2.3 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B จาก *Pseudomonas aeruginosa* 13
2.4 กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิด R1 และ R2 ซึ่งผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* 14
2.5 กลไกการควบคุมและการผลิตแรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* 17
3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆ ของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยวิธี Capillary transfer 40
3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน 41
4.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR
ก) ลูกศรแสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R
ข) ลูกศรแสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R 54
4.2 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* 56
4.3 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 1.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR*
ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม E2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* 57
4.4 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 0.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR*
ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A9 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* 58

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.5 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pBR123 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก 60

4.6 ก) แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 ข) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pBR123 ค) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBBG8 ง) พลาสมิด pBP1 ได้มาจากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pBR123 จ) แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pBR157 61

4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 มีขนาด 1531 bp ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์ T3 T7 และ RF1 กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 ใช้ไพร์เมอร์ T7 กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBBG8 และใช้ไพร์เมอร์ SP6 กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBP1 63

4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 513 bp ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 โดยใช้ universal primer T3 และ T7 65

4.9 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR*..67

4.10 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *Xho*I-*Bgl*II ของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด1.0 กิโลเบส ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม B2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* 68

4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR157 โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhlR* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 533 bp 69

4.12 สรุปรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR530 และ pBR123 70

4.13 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pBR530 และ pBR123 ขนาด 2,033 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* 74

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.14 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* 75

4.15 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 1.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D7 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* 76

4.16 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pGA396 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก 78

4.17 ก) แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pGA396 ข) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pN9 ที่ได้จากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pGA396 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 79

4.18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ขนาด 1562 bp ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์ M13 forward SP6 และ N912R กับพลาสมิด pGA396 และไพร์เมอร์ SP6 กับ พลาสมิด pN9 80

4.19 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pGA396 ขนาด 1,562 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* 83

4.20 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA*.....85

4.21 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 2.0 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A11 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* 86

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.22 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน
เอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก.....87
4.23 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pKB261 88
4.24 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pGA396 pKB261 pBR530 และ pBR123
รวมกันมีขนาด 4,965 bp.....90
4.25 consensus sequence ของโปรโมเตอร์ ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดง
เปอร์เซ็นต์การพบเบส.....96
4.26 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pGA396 pKB261
pBR530 และ pBR123 ขนาด 4,965 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF)
ดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* และ *rhlR*.....100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
µg	=	ไมโครกรัม
µM	=	ไมโครโมลาร์
µl	=	ไมโครลิตร
bp	=	คู่เบส
CMC	=	ค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
pg	=	พิโครกรัม
U	=	ยูนิต (หน่วยของเอนไซม์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียราและยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้นและมีการนำมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ อีกทั้ง สามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Daniel และคณะ, 1998) โครงสร้างหลักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นแอมฟิพาติก ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ชอบไขมันและส่วนที่ชอบน้ำ Desai และ Banat (1997) ได้แบ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกเป็น 6 ชนิดตามโครงสร้างทางเคมีได้แก่ ไกลโคลิพิด ไลโพเพพไทด์และไลโพโปรตีน กรดไขมันและไขมันที่เป็นกลาง ฟอสฟอลิพิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค แรมโนลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997; Lang และ Wullbrandt, 1999) แรมโนลิพิดบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวให้อยู่ระหว่าง 25-30 mN/m พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิพิด ที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson เป็นกลุ่มแรกที่รายงานว่ามีการผลิตแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* โครงสร้างของ แรมโนลิพิดแบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามรายงานของ Lang และ Wullbrandt (1999) ซึ่งแต่ละกลุ่มแตกต่างกันตามจำนวนของน้ำตาลแรมโนสและกรดบีตา-ไฮดรอกซีดีคาร์โนอิก นอกจากแรมโนลิพิดจะมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวแล้ว Abalos และคณะ (2001) ได้รายงานว่าสารผสมแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* มีความสามารถในการต้านจุลชีพคือ แบคทีเรียและราได้

กระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 เกิดจากการส่งผ่านแรมโนซิลอย่างจำเพาะสองครั้งอย่างเป็นลำดับด้วยเอนไซม์แรมโนซิลทรานสเฟอเรส 2 ชนิด คือ rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) และ rhamnosyltransferase 2 (Rt 2) ตามลำดับ โดยใช้ thymidine-diphospho-L-rhamnose (TDP-L-rhamnose) เป็นตัวให้ และ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate หรือ mono-rhamnolipid เป็นตัวรับแรมโนซิล (Burger และคณะ, 1963) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 อยู่ใน *rhl* operon โดย *rhlA* และ *rhlB* ประมวลรหัส

rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) นอกจากนี้ยังมียีนที่ควบคุมการแสดงออกของ *rhlA* และ *rhlB* อีกคือ *rhlR* ที่ประมวลรหัสของโปรตีน RhlR ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของ *rhlA* และ *rhlB* (Ochsner และ คณะ ,1994b) และ RhlI เป็นเอนไซม์ autoinducer synthetase ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ autoinducer (Ochsner และ Reiser, 1995) autoinducer หรือ *N*-acylated homoserine lactones (HSLs) เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กใช้ในการส่งสัญญาณในการวัดความหนาแน่นประชากรของเซลล์แบคทีเรียเพื่อพร้อมปรับกลไกการทำงานให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่เปลี่ยนไปได้ (Fuqua และคณะ, 1994) เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียสูงขึ้น autoinducer เหล่านี้จะถูกปล่อยและไปกระตุ้นอย่างจำเพาะกับ transcription regulator ให้สามารถทำงานได้ (Fuqua และคณะ, 1996; Fuqua และ Greenberg, 1998; Salmond และ คณะ, 1995) โปรตีน RhlR เป็น transcriptional activator ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ต้องถูกกระตุ้นด้วย autoinducer ที่สร้างโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยโปรตีน RhlI Ochsner และ Reiser (1995) พบว่าในสายพันธุ์กลายที่ขาด *rhlI* ไม่สามารถสร้างแรมโนลิพิดเพราะการกระตุ้นการสร้างแรมโนลิพิดเริ่มจากการสังเคราะห์ *N*-acylated homoserine lactone

ปัจจุบันเนื่องจากทราบข้อมูลระดับอณูพันธุศาสตร์และกลไกการควบคุมการผลิตแรมโนลิพิดแล้ว ยังมีผู้สนใจปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดังกล่าวให้มีความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิดเพิ่มมากขึ้น โดยนำ *rhlAB* ต่อเชื่อมกับโปรโมเตอร์ *tac* ได้เป็นพลาสมิด pUO98 และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ เพื่อดูความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิด พบว่า *Pseudomonas putida* KT2442 ซึ่งปกติไม่มีความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิดเมื่อได้รับพลาสมิด pUO98 สามารถผลิตโมโนแรมโนลิพิดได้ (Ochsner และคณะ, 1995)

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในบริเวณอ่าวไทย จ. สมุทรสงคราม โดย อารีย์ กังฉิน ในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ถ้าใช้น้ำมันปาล์มจะทำให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น สารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 29 mN/m และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์ทางเคมีด้วย LC-MS และ IR-spectrum สามารถพิสูจน์ได้ว่าสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพที่ผลิตได้เป็นแรมโนลิพิด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษา *rhlA* และ *rhlR* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

ใน *Pseudomonas* sp. A41 โดย *rhlA* เป็นยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน RhlA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 และ *rhlR* เป็นยีนที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของ *rhlAB* เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อใช้ในการปรับปรุงเกี่ยวกับการผลิตแรมโนลิพิดให้มีผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

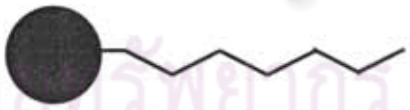
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ถูกใช้อย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวันทั้งใน อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีอยู่มากมายหลายชนิดก็จริง แต่ก็ยังคงมีการพัฒนาเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม (Cameotra และ Makkar, 1998) ในปี 1997 อุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีมูลค่ามากกว่า 9 พันล้านเหรียญอเมริกาต่อปี (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้น มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก และกระบวนการในการผลิตยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้มีการออกกฎหมายให้ใช้สารลดแรงตึงผิวที่เข้าได้กับสิ่งแวดล้อม (Maier และ Soberon-Chavez, 2000) ต่อมามีคนหันไปสนใจสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมันสามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและมาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Ishigami, 1997; Daniel และคณะ, 1998; Makkar และ Cameotra, 1999a, 1999b) ตลาดค้าขายสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใหญ่ที่สุดคือการใช้สารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมน้ำมัน เพื่อลดความหนืดของน้ำมันทำให้ง่ายในการการขนส่งและลำเลียงน้ำมันผ่านทางท่อส่งน้ำมัน (Bertrand และคณะ, 1994) Finnerty และ Singer (1985) ได้ศึกษาว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งชื่อว่า H13A สามารถลดความหนืดของน้ำมันได้ถึง 50% Emulsan ก็มีความสามารถในการลดความหนืดได้เช่นเดียวกัน (Hayes และคณะ, 1986) ตลาดที่รองลงมาคือ การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวช่วยผสมให้สารพอลิเมอร์เข้ากันในอุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ และเซรามิก (Banat และคณะ, 2000) ในด้านการแพทย์ แรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* (Itoh และคณะ, 1971) ไลโพเพพไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* (Sandrin และคณะ, 1990; Leenhouts และคณะ, 1995; Vollenbroich และคณะ, 1997) mannosylerythritol lipids จาก *Candida antarctica* (Kitamoto และคณะ, 1993) และ ไซคลิก ไลโพเพพไทด์ (cyclic lipopeptides; CLPs) ผลิตจาก *Pseudomonas* spp. (Nielsen และคณะ, 2002) มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ทางด้านการเกษตรมีการนำแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* ไปใช้แทนยาฆ่าราคือ *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophora capsici* ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในแตงกวาและพริกไทย (Stanghellini และคณะ, 1996) ทางด้านเครื่องสำอาง Brown (1991) ได้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติเป็นตัวให้ความชุ่มชื้นและสามารถเข้าได้ดีกับผิว โซโฟโรลิพิด

(sophorolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. bombicola* KSM-36 และ *C. apicola* ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโซโฟโรลิพิด 1 โมล กับโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว (Banat และคณะ, 2000) ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารจะใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่น เลซิติน (Lecithin) เป็นตัวช่วยให้อาหารเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (Bloomberg, 1991; Banat และคณะ, 2000) เป็นต้น

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่ คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอนเช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิฟาติก



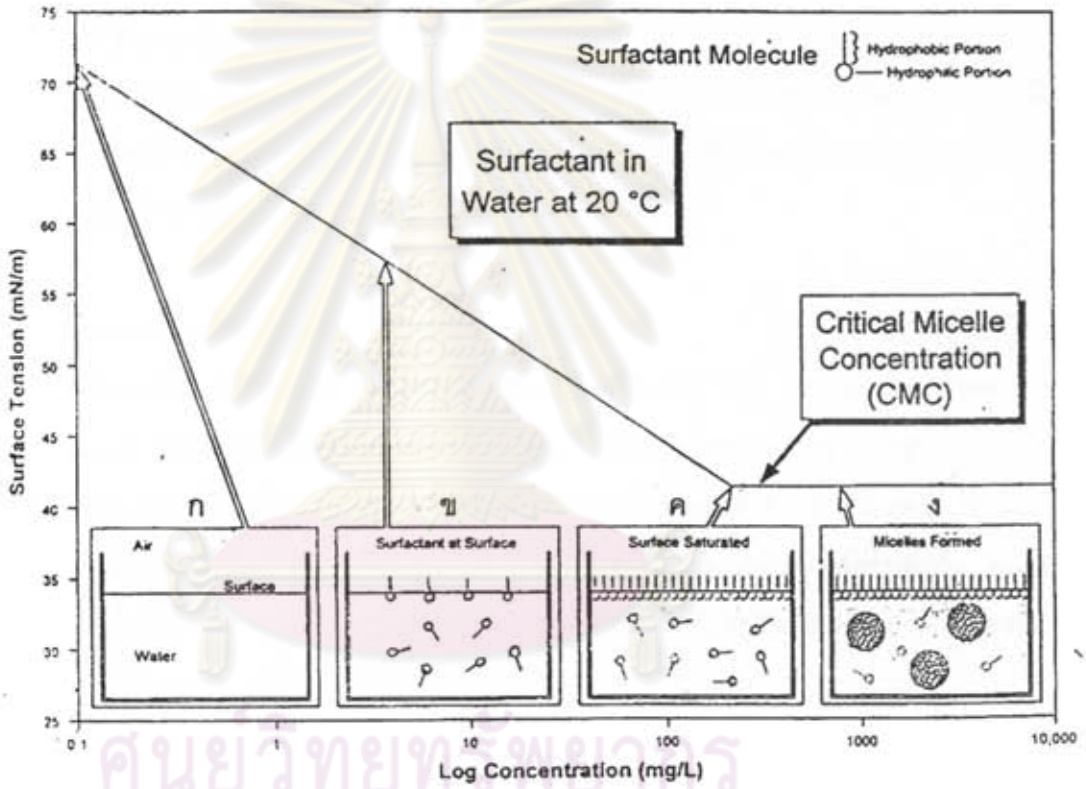
ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion)

รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำจะทำให้ละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณผิวรอยต่อระหว่างน้ำกับอากาศ การที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปอยู่ที่ผิวรอยต่อนี้จะทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นได้ และโดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะลด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 30 ± 5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วหรือไม่มีขั้ว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นก็จะไปลดค่าแรงตึงผิวของของสารละลายจนถึงความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะคงที่ไม่ลดลงไปอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปอีกเท่าใดก็ตามดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC) **ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่ผิวน้ำ ค)** Critical Micelle Concentration (CMC) **เป็นจุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ และ ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้วค่าแรงตึงผิวมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกไม่ว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม** (Gilman, 1993)

เรียกค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์นี้ว่า Critical Micelle Concentration (CMC) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ ซึ่งใช้เป็นตัววัดถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ (Desai และ Banat, 1997; Volkering และคณะ, 1998)

ค่าแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. **ค่าแรงตึงผิว** (surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m (Kosaric, 1993)

2. **ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน** (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันเฮกซาเด็กเคน หรือ น้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเด็กเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. **การเกิดอิมัลชัน** (emulsification)

คือความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ (อิมัลชันชนิด oil in water) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำด้วยการวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ คือการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ในระยะเวลาที่นานออกไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. **ไกลโคลิพิด** (glycolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็กโตส โซโฟโรส แรมโนส และ กาแล็กโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น aliphatic acid และ hydroxyl-aliphatic โดยอาจเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิดได้แก่ โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) แรมโนลิพิด (rhamnolipid) เททระเอซิลกลูโคส (tetraacylglucose) ไทรเอซิลกลูโคส (triacylglucose) (Rosenberg และ Ron, 1999)

2. **ไลโพเพพไทด์** (lipopeptide) **และไลโพโปรตีน** (lipoprotein) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือ ซับทิไลซิน (subtilysin) พอลิมิกซิน (polymyxins) และไลเคไนซิน (lichenysin) จาก *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus licheniformis* (Rosenberg, 1993)

3. **กรดไขมันและไขมัน** (Fatty acid and Neutral lipid) โดยสามารถพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิดและมักปล่อยออกนอกเซลล์เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไทรกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของกรดไขมันและไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิว เช่น รูบิเวททิน อาร์1 (rubiwettin R1) ซึ่งเป็นลิพิดที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. **ฟอสฟอลิพิด** (phospholipid) เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ทำให้วัดค่าแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสฟอลิพิดประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน ตัวอย่างฟอสฟอลิพิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ฟอสฟาทิดิลไอโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล (phosphatidyglycerol) และกรดฟอสฟาทิดิก (phophatidic acid) จาก *Thiobacillus thiooxidans* (Cooper และ Zajic, 1980)

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC (g/l)	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipid				
Rhamnolipid	*P. aeruginosa*	29	0.1-10	0.25
	Pseudomonas sp.	25-30	4	1
Trehalolipid	*R. erythropolis*	32-36	20	14-17
	N. erythopolis	30	0.3	3.5
	Mycobacterium sp.	38		1.5
Sophorolipid	*T. bombicola*	33		1.8
	T. apicola	30		0.9
Cellobiolipid	*U. Zeac, U. maydis*			
Lipopeptide and lipoprotein				
Peptide-lipid	*B. licheniformis*	27	12-20	0.1-0.3
Serrawettin	*S. marcescens*	28-33		
Viscosin	*P. fluorescens*	26.5	150	
Surfactin	*B. subtilis*	27-32	23-160	1
Fatty acid, neutral lipid and phospholipid				
Fatty acid	*C. lepus*	30	150	2
Neutral lipid	*N. erythropolis*	32		3
Phospholipid	*T. thiooxidans*			
Polymeric surfactant				
Emulsan	*A. calcoaceticus*			
Biodispersan	*A. calcoaecticus*			
Particulate biosurfactant				
Vesicle and fimbria	*A. calcoaceticus*			

5. **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์** (polymeric biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่น อิมัลแซน (emulsan) ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter calcoacetius* RAG-1 ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) ผลิตจาก *Acinetobacter calcoacetius* A2 ไลโพแซน (liposan) ผลิตจาก *Candida lipolytica* อะลาแซน (alasan) ผลิตโดย *Acinetocacter radioresistens* KA53 (Desai และ Banat, 1997)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

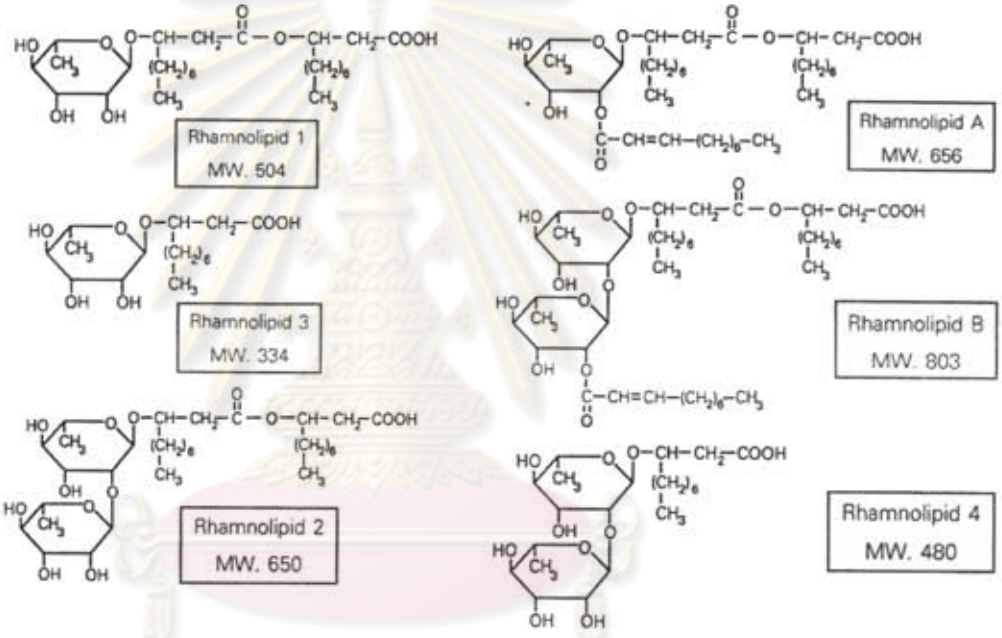
6. **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค** (particulate biosurfactant) เป็นส่วนของ extracellular membrane vesicles มารวมตัวเป็น microemulsion ซึ่งมีส่วนช่วยในการนำพวกแอลเคนเข้าสู่เซลล์ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาคที่ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. H01-N ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร และประกอบด้วยโปรตีน ฟอสฟอลิพิด และ ไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ (Desai และ Banat, 1997)

ชนิดและกระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

แรมโนลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997, Lang และ Wullbrandt, 1999) ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส และ β-hydroxydecanoic acid พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิพิดที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson เป็นกลุ่มแรกที่รายงานว่ามีการผลิตแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งพิสูจน์ได้ว่ามี β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate ต่อกับน้ำตาลแรมโนส 2 โมเลกุลด้วยพันธะ glycosidic โดยวิเคราะห์แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เลี้ยงใน 3% กลีเซอรอลแล้วทำให้บริสุทธิ์ ถึงกระนั้นการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแรมโนสทั้ง 2 โมเลกุลยังไม่กระจ่าง ในปี 1965 Edward และ Hayashi สามารถบอกถึงโครงสร้างของแรมโนลิพิดอย่างละเอียดโดยกล่าวว่าหลังจากเกิดออกซิเดชันและเมธิลเลชัน พบ 1,2-linkage คือ rhamnolipid 2 ในรูปที่ 2.3 Hisatsuka และคณะ (1971) พบว่า rhamnolipid 2 เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในการผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* S_7B_1 ที่เลี้ยงใน n-hexadecane และ n-paraffins (C_{14}-C_{18}) (Lang และ Wullbrandt, 1999) พบแรมโนลิพิดชนิดใหม่ คือ L-α-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate (rhamnolipid 1 ในรูปที่ 2.3) ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 ที่เลี้ยงใน 10% แอลเคน (Itoh และคณะ,1971) และในปี 1976 Yamagushi และคณะพบ rhamnolipid A และ B ซึ่งเกิดจาก acylation ของ α-decanoic acid ตามรูปที่ 2.3 จากรายงานของ Hirayama และ Kato ในปี 1982 พบทั้ง R1 และ R2 ในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 158 ในอาหาร Difco trypticase soya และในปี 1985 Syldatk และคณะพบว่ามีแรมโนลิพิดที่คล้าย R1 และ R2 แต่มี β-

hydroxydecanoyl เพียงหน่วยเดียว (R3 และ R4 ในรูปที่ 2.3) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ก่อโรค (Rendell และคณะ, 1990) และความยาวของโซ่คาร์บอนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อโครงสร้างของแรมโนลิพิด (Lang และ Wullbrandt, 1999)

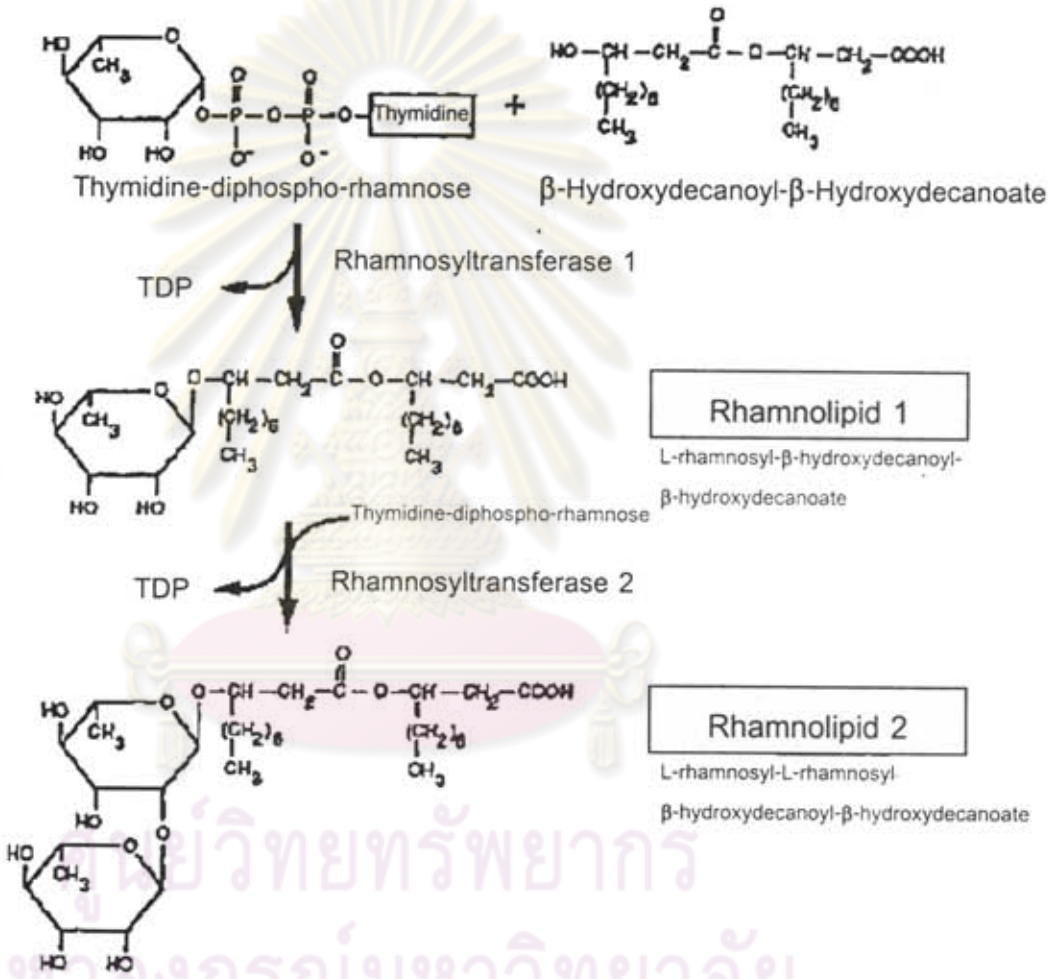
โครงสร้างของแรมโนลิพิดแบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามรายงานของ Lang และ Wullbrandt (1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งแต่ละกลุ่มแตกต่างกันตามจำนวนของน้ำตาลแรมโนส และกรดบีต้า-ไฮดรอกซีดีคาร์โนอิก



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B จาก *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

การศึกษาการสังเคราะห์แรมโนลิพิดครั้งแรกจากแรมโนลิพิดที่สร้างขึ้นในระยะพักเซลล์ (resting cells) หรือระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยแรมโนลิพิดที่ผลิตขึ้นจะปล่อยออกนอกเซลล์ (Hauser และ Karnovsky, 1957; 1958) และด้วยการสกัดเอนไซม์และใช้กัมมันตภาพรังสีติดตามสาร precursor ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ทำให้ Burger และคณะ (1963) สามารถเสนอกระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 โดยพบ rhamnosyltransfer สองครั้งอย่างเป็นลำดับด้วยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2 ชนิด พบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่ผนังเซลล์

และภายในเซลล์ ในปี 1996 Ochsner และคณะวิจัยใน *Pseudomonas aeruginosa* PG201 พบว่าแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเกิดขึ้นโดยกระบวนการ rhamnosyl-transfer สองครั้งอย่างเป็นลำดับ ด้วยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2 ชนิด เช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.4 **กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิด** R1 **และ** R2 **ซึ่งผลิตจาก** *Pseudomonas aeruginosa* (Lang **และ** Wullbrandt, 1999)

ปฏิกิริยา rhamnosyl-transfer หรือปฏิกิริยาการส่งแรมโนสอย่างเป็นลำดับ 2 ขั้นตอน แต่ละปฏิกิริยาถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะคือ rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rhamnosyltransferase 2 (Rt 2) ตามลำดับ โดย Rt 1 มีความจำเพาะกับ thymidine-diphospho-L-rhamnose (TDP-L-rhamnose) และ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxy decanoate ส่วน Rt 2 มีความจำเพาะกับ TDP-L-rhamnose และแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 เริ่มจาก TDP-L-rhamnose ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้กลุ่ม rhamnosyl แก่ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate ปฏิกิริยานี้ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Rt 1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ต่อมาแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ที่เกิดขึ้นรับกลุ่ม rhamnosyl จาก TDP-L-rhamnose กลายเป็นแรมโนลิพิดชนิดที่ 2 เอนไซม์จำเพาะที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาคือ Rt 2 (Burger และคณะ, 1963)

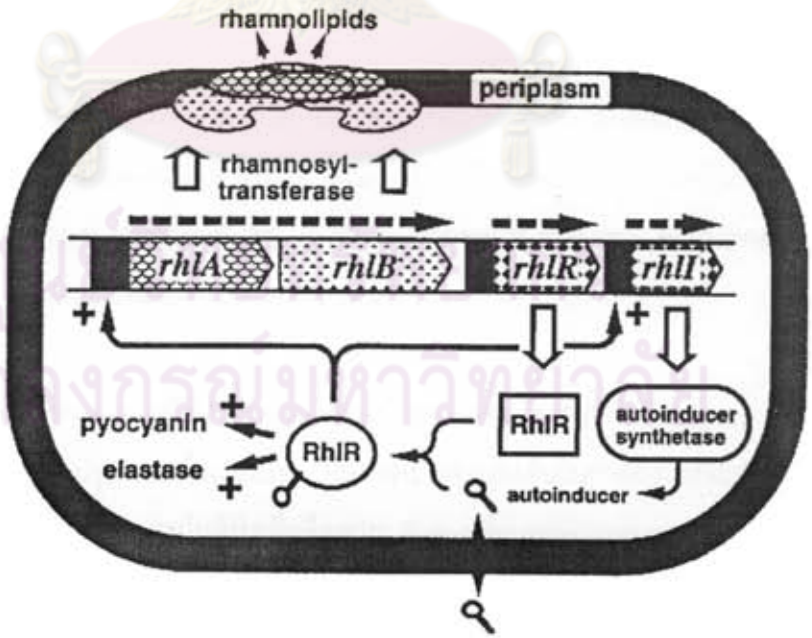
ยีนและกลไกการควบคุมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

ยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แรมโนลิพิดส่วนใหญ่มาจากการศึกษาใน *Pseudomonas aeruginosa* PG201 และสายพันธุ์กลาย (Ochsner และคณะ, 1994a; 1994b; 1995; Ochsner และ Reiser, 1995) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 (mono-rhamnolipid) คือ *rhlA* และ *rhlB* อยู่ภายใน *rhl* operon ประมวลรหัส rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสองชนิด คือ RhlA และ RhlB ยีน *rhlA* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 885 bp ระบุรหัส โปรตีน RhlA มีขนาด 32.5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน ตั้งอยู่ในเพอริพลาสซึม มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แรมโนลิพิดโดยทำให้โปรตีน RhlB มีความเสถียรและคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane โปรตีน RhlB ระบุรหัสโดย *rhlB* มีขนาด 1278 bp เรียงตัวต่อจาก *rhlA* ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันอยู่ภายใน *rhl* operon โปรตีน RhlB ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน อยู่ภายในเมมเบรนและวางตัวข้ามเมมเบรนโดยมีส่วนเปิดออกทั้งสองด้านของเมมเบรน (putative membrane-spanning domain) ทำหน้าที่เป็น catalytic subunit ของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 โปรตีนดังกล่าวมีขนาด 47.0 กิโลดาลตัน (Ochsner และคณะ, 1994a) ยีนที่เกี่ยวข้อง กับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 2 (di-rhamnolipid) คือ *rhlC* ระบุรหัสโปรตีน RhlC Rahim และคณะ (2001) หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rhlC* โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนที่คาดว่ามี *rhlC* จาก *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *rhlC* ที่พบมีขนาด 975 bp ระบุรหัสโปรตีน RhlC ขนาด 35.9 กิโลดาลตัน

ประกอบด้วย 325 ลำดับกรดอะมิโน อยู่ภายในเมมเบรนทำหน้าที่กระตุ้นการเติม TDP-L-rhamnose ให้กับแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ได้เป็นแรมโนลิพิดชนิดที่ 2

การผลิตแรมโนลิพิดทั้งแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ของ *P. aeruginosa* จะเกิดขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นภายใต้ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจน หรือเหล็กจำกัด (Ochsner และคณะ, 1995; Ochsner และ Reiser, 1995) การผลิตแรมโนลิพิดจะถูกควบคุมโดยกลไกที่เรียกว่า quorum sensing (QS) ซึ่งใน *P. aeruginosa* มีด้วยกัน 2 ระบบคือ *las* และ *rhl* เป็นระบบที่ควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ (Fuqua และคณะ, 1996) ระบบ *las* system ประกอบไปด้วย LasR และ LasI ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัส และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ autoinducer PAI-1 [*N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone หรือ (3O-C_{12}-HSL)] ตามลำดับ (Fuqua และคณะ, 2001; Gambello และ Iglewski, 1991; Passador และคณะ, 1993; Pearson และคณะ, 1994;) ระบบนี้จะกระตุ้นการแสดงออกของ *lasI, lasB, lasA, apr* และ *toxA* (Gambello และคณะ, 1993; Passador และคณะ, 1993; Seed และคณะ, 1995; Toder และคณะ, 1991) ส่วนระบบ *rhl* system ประกอบด้วย RhlR และ RhlI ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัส และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ autoinducer PAI-2 [*N*-butanoyl-L-homoserine lactone หรือ (C_4-HSL) โดยทั่วไปจะเรียก factor 2] (Fuqua และคณะ, 2001; Ochsner และคณะ, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995; Pearson และคณะ, 1995) ระบบนี้จะกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlI rhlAB* และ *rhlC* (Latifi และคณะ, 1996; Ochsner และคณะ, 1994a, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995; Rahim และคณะ, 2001) autoinducer หรือ *N*-acylated homoserine lactone (HSL) เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กใช้ในการส่งสัญญาณในการวัดความหนาแน่นประชากรของเซลล์แบคทีเรียเพื่อพร้อมปรับกลไกการทำงานให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่เปลี่ยนไปได้ (Fuqua และคณะ, 1994) เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียสูงขึ้น autoinducer เหล่านี้จะถูกปล่อยและไปกระตุ้นอย่างจำเพาะกับ transcriptional regulator ให้สามารถทำงานได้ (Fuqua และคณะ, 1996; Fuqua และ Greenberg, 1998; Salmond และคณะ, 1995) Fuqua และคณะ (1996) ได้อธิบายถึงการทำงานของระบบ quorum sensing ว่าเริ่มจาก autoinducer ซึ่งปกติจะผลิตขึ้นในปริมาณน้อย เมื่อเซลล์เจริญเติบโตและมีหนาแน่นมากขึ้นความเข้มข้นของ autoinducer ก็จะเพิ่มขึ้นจนถึงค่าความเข้มข้นหนึ่งจึงจะไปเข้าจับและกระตุ้นโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง (LasR หรือ RhlR) ได้เป็น autoinducer-protein complex ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุม

โปรตีน RhlR ขนาด 28 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน ทำหน้าที่เป็น transcriptional activator กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของ *rhlAB* (Ochsner และคณะ, 1994a, b) และ *rhlC* (Rahim และคณะ, 2001) ยีนที่ประมวลรหัสของโปรตีนดังกล่าวคือ *rhlR* มีขนาด 723 bp ซึ่งอยู่ downstream ของ *rhlB* สายพันธุ์กลายของ *P. aeruginosa* PG201 ที่ขาดยีนดังกล่าวจะไม่สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ (Ochner และคณะ ,1994b) แต่โปรตีน RhlR ไม่สามารถทำงานได้ด้วยตัวเองต้องเข้าจับกับโปรตีน C_4-HSL ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่งได้เป็น RhlR-C_4-HSL complex จึงจะสามารถกระตุ้นการถอดรหัสได้ (Ochsner และ Reiser, 1995) ยีน *rhlI* ประมวล รหัสของโปรตีน RhlI หรือที่เรียกว่า autoinducer synthetase ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ autoinducer PAI-2 *rhlI* เรียงตัวต่อจาก *rhlR* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 606 bp (Ochsner และ Reiser, 1995) ในสายพันธุ์กลายที่ขาด *rhlI* ไม่สามารถสร้างแรมโนลิพิดเพราะการกระตุ้นการสร้างแรมโนลิพิดเริ่มจากการสังเคราะห์ *N*-acylated homoserine lactones ดังนั้นยีน *rhlAB* และ *rhlC* จะถอดรหัสได้ต้องขึ้นอยู่กับ *rhlR* และ *rhlI* (Ochsner และคณะ, 1994a; Ochsner และ Reiser, 1995; Pearson และคณะ, 1997; Rahim และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.5 **กลไกการควบคุมและการผลิตแรมโนลิพิดใน** *P. aeruginosa* (Ochsner **และ** Reiser, 1995)

จากรูปที่ 2.5 RhlR ซึ่งเป็น regulatory protein ต้องถูกกระตุ้นโดย autoinducer PAI-2 ก่อน ซึ่งสังเคราะห์จาก RhlI autoinducer synthetase ได้เป็น RhlR-PAI-2 complex หรือ RhlR-C_4-HSL complex เข้ากระตุ้นอย่างจำเพาะที่บริเวณ *las* box ซึ่งตั้งอยู่เหนือยีน *rhlAB* ทำให้เกิดการถอดรหัสของ *rhlAB* ได้เป็น rhamnosyltransferase และเกิดการผลิตแรมโนลิพิดตามมา (Pearson และคณะ, 1997) นอกจากนี้โปรตีน RhlR ที่ถูกกระตุ้นแล้วยังสามารถควบคุมการผลิตสารอื่นได้อีกคือ elastase และ pyocyanin เรียกโปรตีน RhlR ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสได้มากกว่าหนึ่งนี้ว่าเป็น pleiotropic regulator (Ochsner และคณะ, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995)

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้แรมโนลิพิด

เนื่องจากโครงสร้างของแรมโนลิพิดเป็นโมเลกุลแบบแอมฟิฟาติก สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำและลดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของของเหลวที่มีเฟสต่างกันได้ (Beal และ Betts, 2000) ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ดังนี้

1. **ด้านการเกษตรใช้เป็น** antiphytopathogen **ที่เป็นพวกรา** โดยจะมีผลกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เช่น *Pythium aphanidermatum* ในระยะ zoospore (Stanghellini และคณะ, 1996) แรมโนลิพิด ทั้งชนิดที่มีแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเป็นอย่างดีในพวก Zoosporic plant pathogen เช่น *Pythium aphanidermatum* , *Phytophthora capsici* และ *Plasmopara lactucae-radicis* ตามลำดับ

2. **ด้านอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลแรมโนส** (L-rhamnose) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นและรส และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิด น้ำตาลแรมโนสจากแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* จะเตรียมได้ง่ายกว่าวิธีอื่นโดยขบวนการ hydrolysis ทั้งนี้เพราะแรมโนลิพิดผลิตออกนอกเซลล์ใน late log phase และ stationary phase ทำให้ง่ายในการแยกออกจากเซลล์ (Linhardt และคณะ, 1989)

3. **ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวนมากได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยใช้เป็น emulsifier solubilizer สารทำให้เปียก และใช้เป็นสารทำ

ความสะอาด เนื่องจากไม่ระคายเคืองและเข้ากันได้กับผิว (Kleckner และ Kosaric, 1993) การใช้แรมโนลิพิดทำ liposome (Ishigami และคณะ, 1988a) และใช้เป็น emulsifier (Ishigami และคณะ, 1988b) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

4. **ด้านสิ่งแวดล้อม** ปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งน้ำและดินยิ่งทวีเพิ่มมากขึ้น สารเคมีเหล่านี้ล้วนแล้วเกิดจากอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม กระดาษ และสารเคมี เป็นต้น การปล่อยของเสียหรือของเหลือจากกระบวนการผลิต ออกจากโรงงาน (Kosaric, 2001) ในปี 1994 สภาการวิจัยแห่งชาติ (National Research Council) ได้รายงานว่าในสหรัฐเอมริกามีพื้นที่ประมาณ 300,000 แห่ง ที่ปนเปื้อนไปด้วยสารเคมี การจะขจัดสิ่งปนเปื้อนออกไปนั้นต้องใช้เงินถึง 1 ล้านล้านล้านเหรียญสหรัฐ การบำบัดเพื่อลดปริมาณสารปนเปื้อนให้ออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างจำเพาะเจาะจงและได้ผล อาจทำได้โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวและมีการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารได้ดีขึ้นใส่ลงในดินที่ปนเปื้อน เมื่อจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถปรับตัวและมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะนั้นก็จะสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวต่อ ไปได้

ถึงแม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีคุณประโยชน์และมีหลายชนิดให้เลือกใช้ อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีน้อยอยู่ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีราคาแพงเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Kosaric และคณะ 1984 ได้แนะนำว่าปัจจัยที่มีผลทำให้ลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้นั้นคือ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ การพัฒนากระบวนการผลิตซึ่งรวมไปถึงการเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูก และวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเพิ่มผลผลิตโดยการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดั้งเดิมให้มีความสามารถในการผลิตเพิ่มมากขึ้นโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยก็เป็นอีกหนทางหนึ่งที่น่าสนใจ (Kaweshima และคณะ, 1983; Mulligan และคณะ, 1989; Ohno และคณะ, 1995; Shabtai และ Gntnick, 1986) Ochsner และคณะ (1995) นำ *rhlAB* ต่อเชื่อมกับโปรโมเตอร์ *tac* ได้เป็นพลาสมิด pUO98 และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ เพื่อดูความสามารถในการผลิตแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 พบว่า *Pseudomonas putida* KT2442 ซึ่งปกติไม่มีความสามารถในการผลิตแรมโนลิพิด ชนิดที่ 1 เมื่อได้รับพลาสมิด pUO98 จึงสามารถผลิตโมโนแรมโนลิพิดได้ในขณะที่ไม่มีการผลิต แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ใน *Escherichia coli* ในปี 2004

Tahzibi และคณะทำการกลายพันธุ์แบบสุ่ม *P. aeruginosa* MM1011 ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ได้เป็นสายพันธุ์กลาย *P. aeruginosa* PTCC1637 ที่ผลิตแรมโนลิพิดได้มากกว่าเดิม 10 เท่า

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำในบริเวณอ่าวไทย จ. สมุทรสงคราม โดย อารีย์ กังฉิน ในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 29 mN/m เมื่อมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและ วิเคราะห์ทางเคมีด้วย LC-MS และ IR-spectrum สามารถกล่าวได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นแรมโนลิพิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษา *rhlA* หรือ *rhlR* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas* sp. A41 โดย *rhlA* เป็นยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน RhlA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 และ *rhlR* เป็นยีนที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของ *rhlAB* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงทางพันธุกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
4. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
   - Personal gel-electrophoresis apparatus รุ่น GelMate® 2000 ของบริษัท TOYOBO, Japan.
   - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
5. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab™ Thermo-Block SL TDB-120 ของบริษัท Seoul in Bioscience, Korea.
7. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
8. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
10. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polariod, USA.
    - แผ่นกรองแสงสีแดง
    - ฟิล์มโพลารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
11. ชุดคอมพิวเตอร์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น UNIVERSAL HOOD ใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
2. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane),($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma,USA.
3. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
4. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
5. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [$C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
6. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
7. เรสทริกชันเอนไซม์ทุกชนิดของบริษัท Promega, USA.
8. 1 kb DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
9. 100 bp DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
10. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
11. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.
12. T4 DNA ligase ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
13. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
14. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
15. Proteinase K ของบริษัท Qiagen, Germany.
16. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
17. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
18. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
19. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick® Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN,USA.
20. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.
21. ถุงไดแอลิซิส Cellu • Sep T3 ของบริษัท Membrane Filtration Products, USA.

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	ϕ80d*lacZ*△M15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, △(*lacZYA-argF*) U169	Hanahan, 1983
Pseudomonas sp. A41	สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด (rhamnolipid)	อารีย์ กังฉิน, 2542

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pBluescript KS(+/-) (2961 bp)	Ap^r, αlac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-3Zf(+/-) (3199 bp)	Ap^r, αlac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pBR123 (4500 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Xho*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pBR530 (3500 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Xho*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 0.5 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pBBG8 (4000 bp)	Ap^r, pBR123 ที่ตัดชิ้นส่วน *Bam*HI-*Bgl*II ขนาดประมาณ 0.5 kb ออก	สร้างในการทดลองนี้
pBP1 (4400 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Pst*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด ประมาณ 1.2 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pBR157 (4000 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Xho*I-*Bgl*II จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1 kb ใน พลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pGA396 (4700 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Pst*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pN9 (4000 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Bam*HI จาก pGA396 ขนาดประมาณ 0.9 kb ใน พลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (64°ซ)	บริษัท Promega, USA
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (56°ซ)	บริษัท Promega, USA
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50°ซ)	บริษัท Promega, USA
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (52°ซ)	บริษัท Promega, USA
RA-F	5'-ATGCGGCGCGAAAGTCT-3' (54°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RA-R	5'-GGTTGCTTCAGCAGGTG-3' (54°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RR-F	5'-ATGAGGAATGACGGAGG-3' (52°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RR-R	5'-GGCAGCCAGCGTCTTGT-3' (56°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
N912r	5'-GAGACCAGGTGATTGAC-3' (52°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
27f	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (48°ซ)	Widada และคณะ (2002)
350f	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' (50°ซ)	Mueller และคณะ (1997)
1240r	5'-CCATTGTAGCACGTGT-3' (48°ซ)	Achenbach และคณะ (2001)
1492r	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (62°ซ)	Widada และคณะ (2002)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. 5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1) ทุกสายพันธุ์ *Escherichia coli* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Am) ใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปซนิดเซลลูโลสอะซีเตทรูกว้างขนาด 0.45 ไมโครเมตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ

3.5.2) เลี้ยง *Pseudomonas* sp. A41 เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับ *Escherichia coli* แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ

3.5.3) เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* sp. A41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การพิสูจน์ลักษณะ *Pseudomonas* sp. A41 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

3.6.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp A41 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3.6.1.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์นำไป ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10%SDS (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข25) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข 17) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข20) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซ

โพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.6.1.2) การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

3.6.2) **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คือ forward primer 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ reverse primer 1492r (5'-ACGGCTACCTTGTT ACGACTT-3') นอกจากนี้ในตารางที่ 3.4 จะแสดงส่วนผสมสารในปฏิกิริยา ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA ของ *Pseudomonas* sp. A41

ตารางที่ 3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA **ของ** *Pseudomonas* sp. A41

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ 27f	50 µM	1	1.0 µM
ไพร์เมอร์ 1492r	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 µM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 µg/µl	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	46°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลาย

ดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข22) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอีเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส GelMate 2000 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.6.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.6.2) มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจาก อะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลายดังกล่าวใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใสเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพร์เมอร์ดังนี้คือ forward primer 27f, forward primer 350f, reverse primer 1240r และ reverse primer 1492r นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN

3.7 การเพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.7.1) การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ *rhlA* หรือ *rhlR*

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้งแบบ forward primer และ reverse primer คือ RA-F และ RA-R หรือ RR-F และ RR-R สำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับ โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของ *rhlA* หรือ *rhlR* จาก *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ , 1994a, b) สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

3.7.2) การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การสกัด การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) ซึ่งอธิบายไว้ในข้อ 3.6.1) โดยสุดท้ายให้ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.7.3) **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ PCR ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ในข้อ 3.7.1 โดยความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 3.5 หรือ 3.6 สำหรับการเพิ่มจำนวน *rhA* หรือ *rhlR* ตามลำดับดังนี้

ตารางที่ 3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlA*

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ RA-F	50 µM	1	1.0 µM
ไพร์เมอร์ RA-R	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 µM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 µg/µl	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	54°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlR*

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	2	1.0 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ RR-F	50 µM	1	1.0 µM
ไพร์เมอร์ RR-R	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 µM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 µg	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุ		33.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	52°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.7.4) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.7.3) ทั้งที่ได้จากการเพิ่มจำนวน *rhlA* และ *rhlR* มาตรวจสอบชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 หรือ 700 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับออกจากอะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังที่อธิบายแล้วในข้อ 3.6.3)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9

3.8 การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

3.8.1) การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

- 3.8.1.1) การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR*

จากการทำ PCR เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่มาจาก *rhlA* หรือ *rhlR* ต้องใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ตามข้อ 3.7.3) จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังกล่าว ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 หรือ 700 bp สำหรับ *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับ ออกจากอะกาโรสเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตที่อธิบายไว้ในข้อ 3.6.3)

3.8.1.2) การติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.1.1) ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว

หลอดที่ทำการเจือจาง	ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ต่อ DNA dilution buffer (µl)
1. 1 : 100	1/99
2. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 3.3	15/35
3. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 10	5/45
4. หลอดที่ 2 เจือจาง 1 : 10	5/45
5. หลอดที่ 3 เจือจาง 1 : 10	5/45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอดที่ 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกันกับวิธีการข้างต้น แล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวางเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอให้สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลาก

หลอดที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Blocking solution	2
2	Antibody solution (1 : 5,000 ใน Blocking solution)	3
1	Blocking solution	1
3	Maleic acid buffer	1
4	Detection buffer	1
5	Color-substrate solution	5-30

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มืดจนเกิดจุดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์สีม่วงน้ำเงิน เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้ทำการล้างแถบทดสอบด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้แห้งเทียบสีที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีความเข้มข้นดังนี้ 50, 15, 5, 1.5, 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.2) การเตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 สำหรับการไฮบริไดซ์

การเตรียมไนลอนเมมเบรนสำหรับการไฮบริไดซ์เพื่อติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 มีขั้นตอนเหมือนกันดังนี้

3.8.2.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

สกัดและหาความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) ดังอธิบายในข้อที่ 3.6.1)

3.8.2.2) การตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	0.5-10	ไมโครกรัม
10 X บัฟเฟอร์	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	3-5	ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ	

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

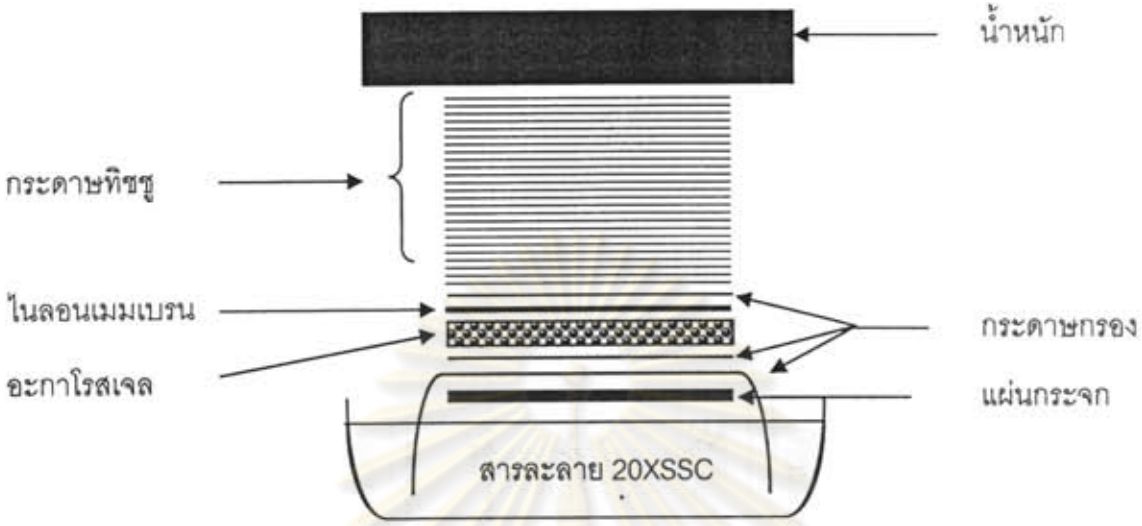
3.8.2.3) การย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

นำดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดแล้วจากข้อ 3.8.2.2) มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR* เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นทำการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน เริ่มจากล้างชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ในกล่องพลาสติกโดยให้

เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน เริ่มจากล้างชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ในกล่องพลาสติกโดยให้สารละลายท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หรือเติมให้ท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข7) เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยการวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้กำหนดขนาด A คือขนาดเท่ากับขนาดของแผ่นอะกาโรสเจล ขนาด B คือขนาดความกว้างเท่ากับด้านกว้างของอะกาโรสเจลแต่ความยาวจะยาวกว่าด้านยาวของอะกาโรสเจล ตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาด A จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด A จำนวน 2 แผ่น และขนาด B จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษทิชชูให้มีขนาด A เพื่อใช้เป็น paper towel สูงประมาณ 5 เซนติเมตร การจัดวางชั้นต่างๆ ของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเติม 20 X SSC (ภาคผนวก ข8) ซึ่งเป็น transfer buffer ลงในกล่องพลาสติกปริมาตรพอประมาณ นำกระดาษกรองขนาด B ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC วางพาดบนแผ่นกระจกโดยให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแช่ในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นสะพานให้ 20XSSC เคลื่อนที่ขึ้นมา จากนั้นวางกระดาษกรองขนาด A ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ซ้อนขึ้นด้านบน แล้วนำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงด้านบนในลักษณะที่คว่ำหน้าเจลลงด้านล่าง วางไนลอนเมมเบรนที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ลงบนเจล ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในแต่ละชั้น จากนั้นจึงวางกระดาษกรองขนาด A แล้ววางชั้นของกระดาษทิชชูและน้ำหนักกดด้านบน ตามลำดับ ทำการยึดชั้นต่างๆ ให้มั่นคงด้วยกระดาษกาว และระวังไม่ให้ชั้นทิชชูแตะโดนอะกาโรสเจล หรือกระดาษกรองด้านล่าง ตั้งทิ้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ขึ้นมาเป็นเวลาข้ามคืน

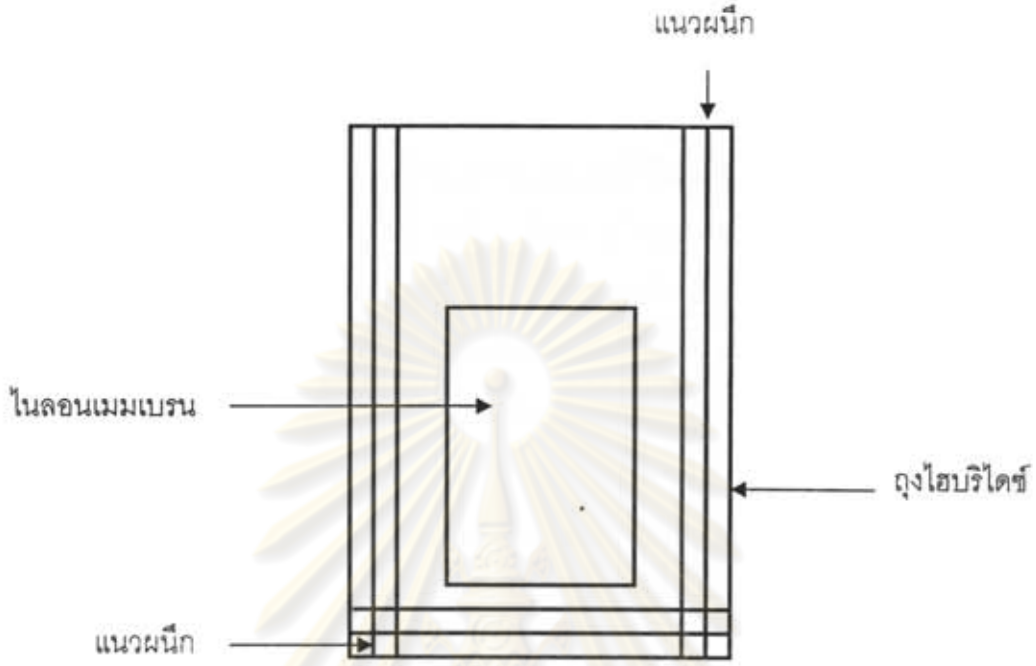


รูปที่ 3.1 **แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆ ของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยวิธี** Capillary transfer

ภายหลังจากการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ยกชั้นกระดาษที่อยู่เหนือไนลอนเมมเบรนออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่งเพื่อเป็นการระบุด้านของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาใส่กล่องล้างด้วย 2XSSC (ภาคผนวก ข9) โดยการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งและทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรน ด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.8.3) **ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* **หรือ** *rhlR*

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยเครื่องผนึกที่ใช้ความร้อนดังรูปที่ 3.2 เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข12) ซึ่งทำการอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42°ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นผนึกปิดให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* สำหรับการไฮบริไดซ์โดยนำดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมลงในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้งแล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นทำการผนึกด้านข้างถุงเหมือนเดิม เทสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไล่ฟองอากาศออกให้หมดแล้วปิดผนึกด้านบน 2 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอ ติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก

2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องทำการแยกสายดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริไดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออก โดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับไนลอนเมมเบรนด้วย สารละลาย 2XSSC /0.1%SDS (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข11) ที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข12) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอน เมมเบรน เขย่าเบาๆเป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซับสเตรท NBT/BCIP (ภาคผนวก ข12) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ถุงพลาสติกแล้วผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทซับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับซับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

3.9 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* หรือ *rhlR*

3.9.1) การสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR*

ตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*/*Eco*RI และ *Bam*HI สำหรับการโคลน *rhlA* หรือตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI*/*XhoI* สำหรับการโคลน *rhlR* ตามวิธีในข้อ 3.8.2.2) นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส ตัด อะกาโรสเจลให้ครอบคลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* โดยเทียบผลจากการไฮบริไดเซชั่นในข้อ 3.8.3) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution โดยล้างถุงไดแอลิซิสที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ข30) ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปิดปลายด้านหนึ่งของถุงโดยใช้ตัวหนีบ (clamp) นำอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแยกใส่ลงในถุงไดแอลิซิส เติมบัฟเฟอร์ 1XTAE ที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่เกิน 400 ไมโครลิตร ไล่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมดแล้วปิดปลายอีกด้านที่เหลือ จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสชิ้นเจลในบัฟเฟอร์ 1XTAE ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกจากเจลมาอยู่ที่สารละลาย จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าและทำอิเล็กโทรโฟเรซิสซ้ำใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับถุงไดแอลิซิสหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย นำสารละลายที่ได้ใส่หลอดไมโครฟิวจ์แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษอะกาโรสเจลที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 1XTAE สู่หลอด ไมโครฟิวจ์ใหม่ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอล โดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข24) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมเอธานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหย

เอธานอลให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอกลับในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.9.2) การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการโคลน

3.9.2.1) การสกัด การตัด และการทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์

สกัดพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) หรือ พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (Stratagene) จาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิดดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิด อยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°ซ

ตัดพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI/EcoRI* สำหรับการโคลน *rhlA* หรือตัดพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI/XhoI* สำหรับการโคลน *rhlR* ตามวิธีในข้อ 3.8.2.2) แล้วนำพลาสมิดที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวในข้อ 3.9.1) ละลายพลาสมิดที่ได้ในน้ำปลอดประจุด้วยปริมาตรที่เหมาะสม

ส่วนพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* ต้องเตรียมพลาสมิดดังกล่าวใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ก่อนจึงนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟส ตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายเวกเตอร์ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ นำพลาสมิดที่ตัดอย่างสมบูรณ์ดังกล่าวมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนพลาสมิดแล้วละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม (น้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)

3.9.2.2) การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์

กำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นปลายเปิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้ว โดยใช้แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากการเจือจางแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสจากหลอดตั้งต้นความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ด้วยการใช้ส่วนผสมของการเจือจางดังนี้

แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส 1 หน่วยต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
10Xบัฟเฟอร์	10	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	89	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	100	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน (ควรทำการเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งหรือเก็บรักษาไว้ใช้ได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-)/ *Bam*HI 1-5 ไมโครกรัม	40	ไมโครลิตร
10Xบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตรเท่าเดิมลงไปอีกครั้ง แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนี้ทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนด้วยเอธานอลตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.9.1) สุดท้ายละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้และน้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้น)

3.9.3) **ไลเกชัน** (ligation) **ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์**

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.9.1) เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันในข้อ 3.9.2) ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วน ผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.1) ประมาณ 300 นาโนกรัม	3 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันประมาณ 50-200 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
10Xไลเกชันบัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	4 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถจะแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.9.4) **การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ** 3.8.3 **เข้าสู่** *Escherichia coli* DH5α **และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มี** *rhlA* **หรือ** *rhlR*

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถจะแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.9.4) การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.8.3 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มี *rhlA* หรือ *rhlR*

3.9.4.1) เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (competent cell)

คอมพีเทนท์เซลล์ทำด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

เตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและเย็น ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้น

เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนท์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.9.4.2) ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.9.3) เข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.9.3) ทั้งหมดลงในคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.9.4.3) การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.9.4.2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข27) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตรไว้แล้ว หลังจากเกลี่ยเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน *rhlA* หรือ *rhlR* โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข21) ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข21) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมา ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเอธานอลสัมบูรณ์ทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัด ปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยแห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) โดยตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งโคลนให้ชัดเจน ระหว่างนั้นแช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ต้มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนออกจากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาหยดลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5 ไมโครลิตร

โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR* เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด เวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลน เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) เมื่อหยดตัวอย่างครบและแห้งแล้วนำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรนแล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* จากข้อ 3.8.1) ด้วยวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8.3) เมื่อได้กลุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามแล้วนำกลุ่มโคลนมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วนำไปทำ Dot blot hybridization ซ้ำอีกครั้ง เพื่อหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่จดจำบริเวณที่โคลน (cloning site) และเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิดเพื่อนำข้อมูลไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhlA* หรือ *rhlR* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhlA* หรือ *rhlR* ส่วนหนึ่งได้มาจากการสับโคลนและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์คือไพร์เมอร์ T3 T7 SP6 และ M13 Forward ในการหาลำดับนิวคลีไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด ส่วนที่เหลือได้จากการทำ primer working ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ RR-F N912r 1BF และ 2BR ไพร์เมอร์ที่ใช้ดังกล่าวสังเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.9.4.3) ที่สกัดจาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้ดังกล่าวส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ(BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 การพิสูจน์ลักษณะ *Pseudomonas* sp. A41 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA

อารีย์ กังฉิน (2542) แยกแบคทีเรียจากน้ำในบริเวณอ่าวไทย จ. สมุทรสงคราม ที่มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ได้เป็น 29 mN/m ในภาวะที่ให้แหล่งไนโตรเจนจำกัด นำแบคทีเรียดังกล่าวที่ได้ไปจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และตั้งชื่อว่า *Pseudomonas* sp. A41

ได้ทำการจำแนกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. A41 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomol DNA) ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการทดลองในข้อ 3.6 พบว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ ไพร์เมอร์ 27f และ 1492r จะให้ผลิตภัณฑ์จาก 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบสเมื่อเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA ladder) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไพร์เมอร์ 27f 350f 1240r และ 1492r ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนคือ 1430 bp นำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastN เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ใน GenBank พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. A41 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัล อาร์เอ็นเอของสายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนี้

ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA ของ *Pseudomonas* sp. A41

ลำดับ	สายพันธุ์จุลินทรีย์	% ความเหมือน	Accession number	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ OLB-1	100%	AJ387904	Wintzingerode และคณะ, 2000
2	*P. aeruginosa* สายพันธุ์ AL98	100%	AJ249451	Linos และคณะ, 2000
3	*P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1	100%	AE004844	Stover และคณะ, 2000
4	*P. aeruginosa* สายพันธุ์ AU1971B	100%	AY486355	Spilker และคณะ, 2004
5	*P. aeruginosa* สายพันธุ์ T1	100%	AB119535	Hasanuzzaman และคณะ,2004
6	*P. aeruginosa* สายพันธุ์ BHP7-6	100%	AY162139	Bodour และคณะ, 2003

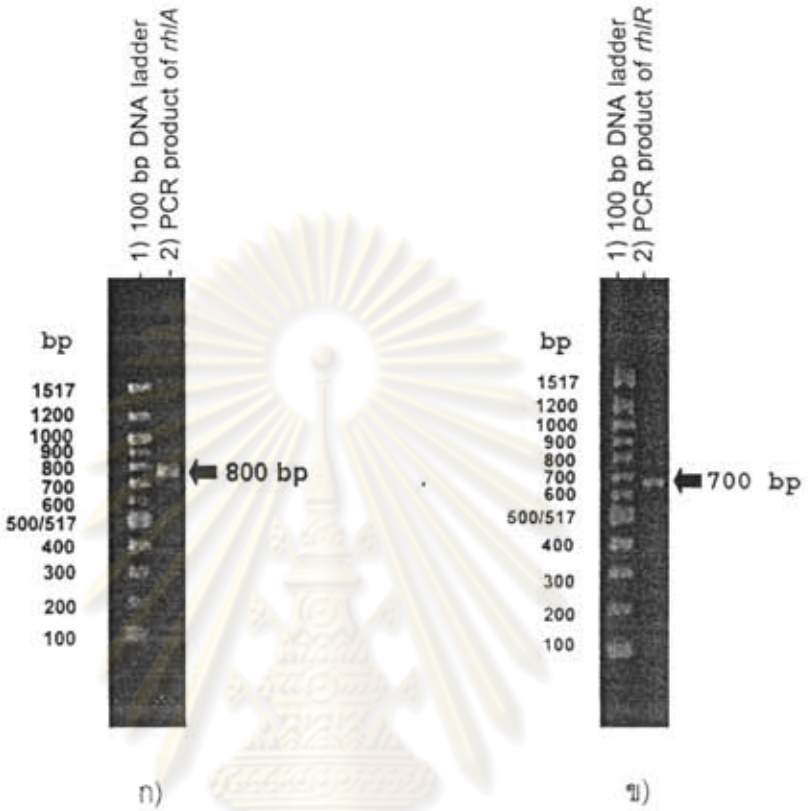
4.2 การเพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.2.1) การเพิ่มจำนวน *rhlA*

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *rhlA* ของ *Pseudomonas* sp. A41 ใช้ไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R ไพร์เมอร์ดังกล่าวออกแบบจากการหาลำดับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *rhlA* จากแบคทีเรียที่สร้างแรมโนลิพิด 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ , 1994a) โดยใช้โปรแกรม Blast ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค1 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R มีขนาดประมาณ 800 bp เป็นไปตามที่คาดหมายดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ RA-F ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 405 bp นำไปเปรียบเทียบความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบว่าลำดับมีความเหมือนกับ rhamnosyltransferase 1 unit A (Rhl-A) ที่ระบุรหัสโดย *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ100% ดังแสดงในภาคผนวก ค3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 **อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์** PCR

ก) ลูกศรแสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R

ข) ลูกศรแสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2) **การเพิ่มจำนวน** *rhlR*

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *rhlR* ของ *Pseudomonas* sp. A41 ใช้ไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R ไพร์เมอร์ดังกล่าวออกแบบจากการหาลำดับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *rhlR* จากแบคทีเรียที่สร้างแรมโนลิพิด 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ , 1994b) โดยใช้โปรแกรม Blast ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

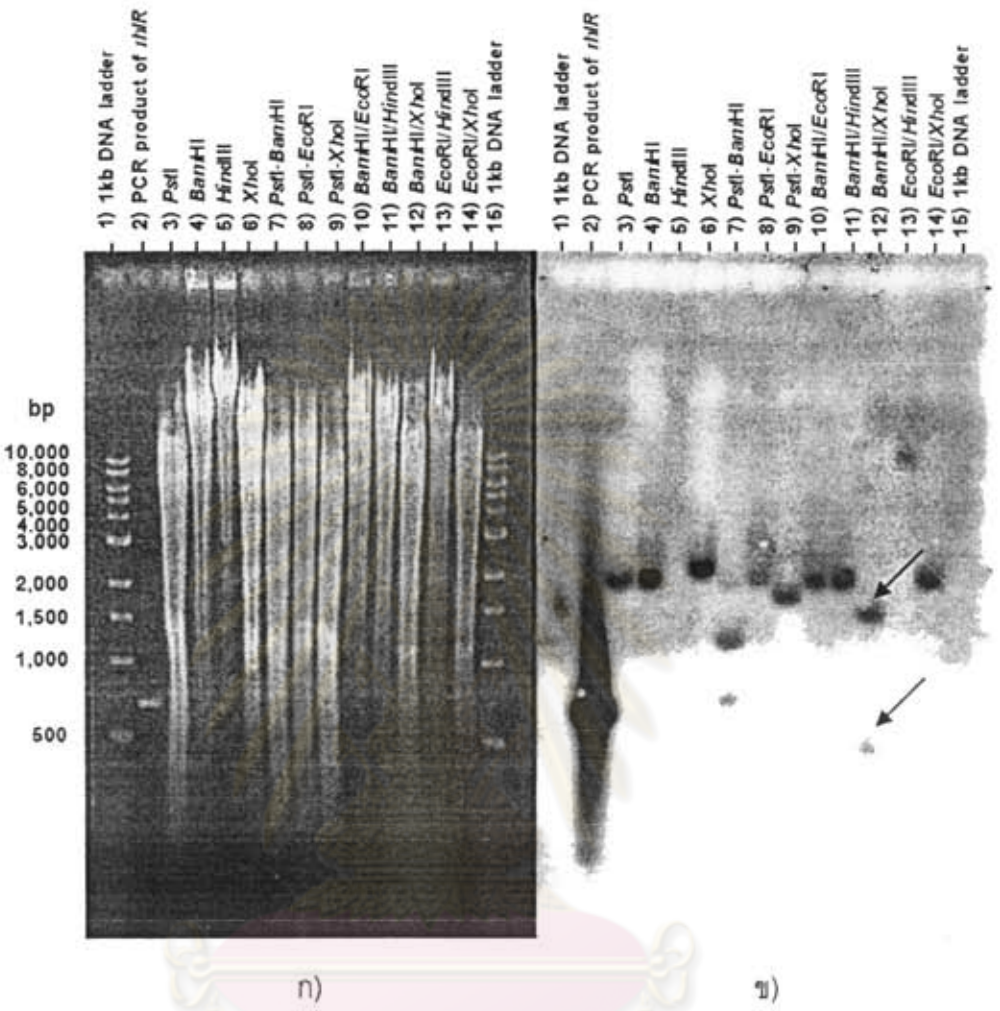
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R มีขนาดประมาณ 700 bp เป็นไปตามที่คาดหมายดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 200 bp นำไปเปรียบเทียบความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบว่ามีความคล้ายกับ RhlR ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัสของ *rhlAB* ระบุรหัสโดย *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ100% ดังแสดงในภาคผนวก ค4

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R หรือ RR-F และ RR-R ดังกล่าวซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุรหัส rhamnosyltransferase 1 unit A ที่ระบุรหัสโดย *rhlA* หรือ RhlR ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัสของ *rhlAB* ระบุรหัสโดย *rhlR* ตามลำดับ จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* บนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยการติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี random labeling ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 และตั้งชื่อว่า *rhlA*-probe หรือ *rhlR*-probe ตามลำดับ

4.3 การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ก) ทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* ผลไฮบริไดเซชันได้แสดงในรูปที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

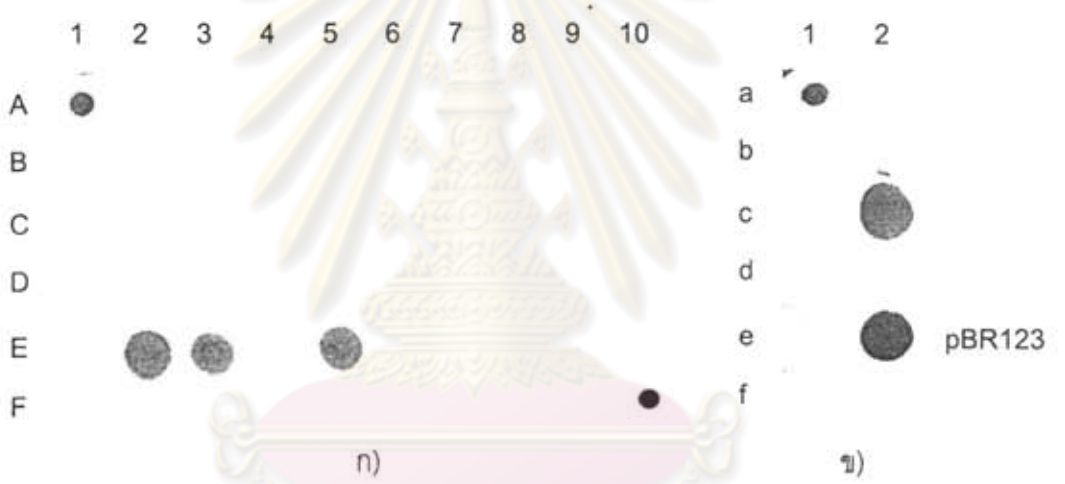


รูปที่ 4.2 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 **ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR*

4.4 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlR*

จากผลการทดลองข้อ 4.3 ทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlR* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *Bam*HI-*Xho*I ซึ่งตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 โดยให้สัญญาณขนาด 1.5 และ 0.5 กิโลเบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α

การคัดเลือกโคลนที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 หรือ 0.5 กิโลเบส ซึ่งมี *rhlR* อยู่ โดยวิธี Blue/White selection คัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์และต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอม-บิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.9.4.3) ผลสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ของโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 หรือ 0.5 กิโลเบส ซึ่งมียีน *rhlR* อยู่ เป็นไปตามรูปที่ 4.3 หรือ 4.4 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ก) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ขนาด1.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR* ข) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม** E2 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR*

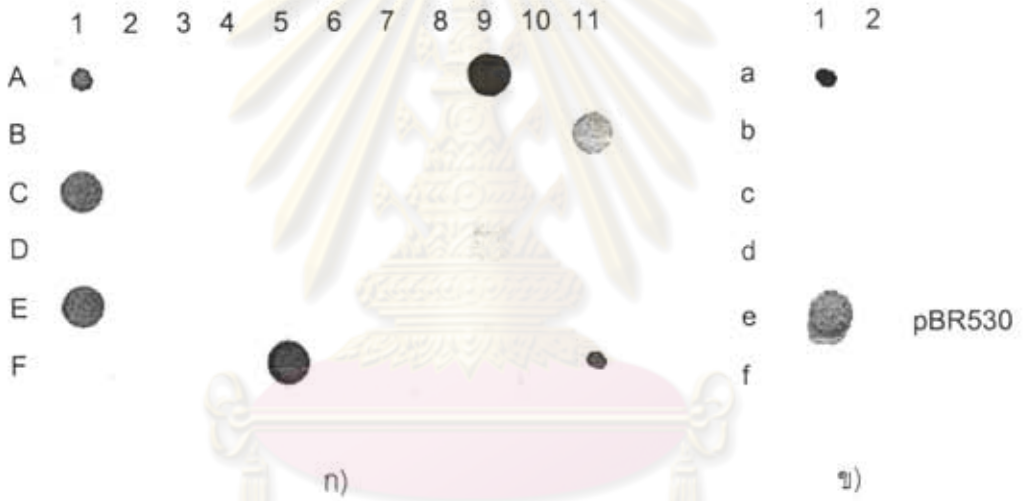
ช่องที่ A1 F10 และ a1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rhlR* (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 F9 และ a2 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-F8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม

ช่องที่ b1-f2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม E2

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.3 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่มคือ ตัวอย่างกลุ่ม C2 E2 E3 และ E5 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม E2 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ c2 และ e2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน e2 มาศึกษา และตั้งชื่อ พลาสมิดนี้ว่า pBR123 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ข)



รูปที่ 4.4 ก) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ขนาด** 0.5 **กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR* ข) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม** A9 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR*

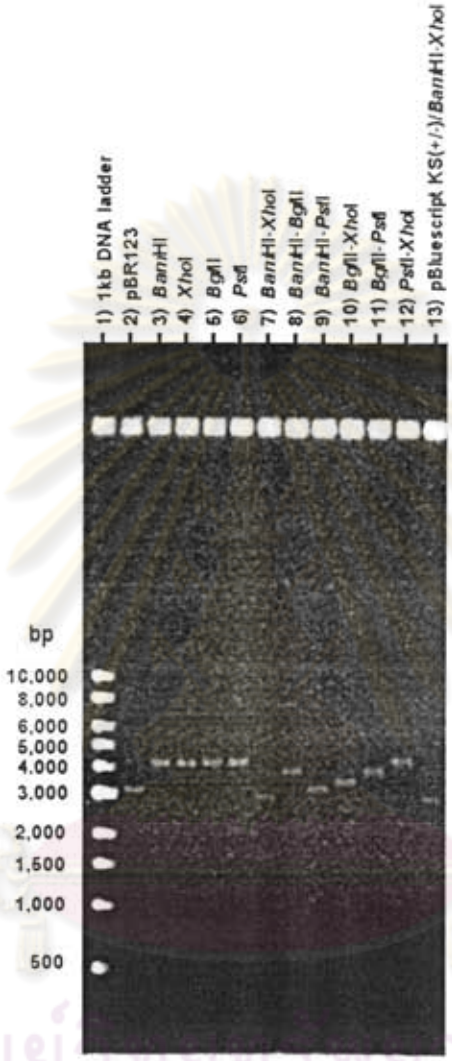
ช่องที่ A1 F11 และ a1	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rhlR* (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 F10 และ a2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-F9 และ b1-f2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม
ช่องที่ b1-f2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.4 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.5 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 6 กลุ่มคือ ตัวอย่างกลุ่ม A9 B11 C1 D9 E1 และ F5 ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม A9 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ e1 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจึงเลือกโคลน e1 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pBR530 ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ข)

ทำการตัดพลาสมิด pBR123 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.5 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.6 ส่วนพลาสมิด pBR530 มีชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกขนาดเล็กดังนั้นไม่จำเป็นต้องหาการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอก็สามารถนำไปหาลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

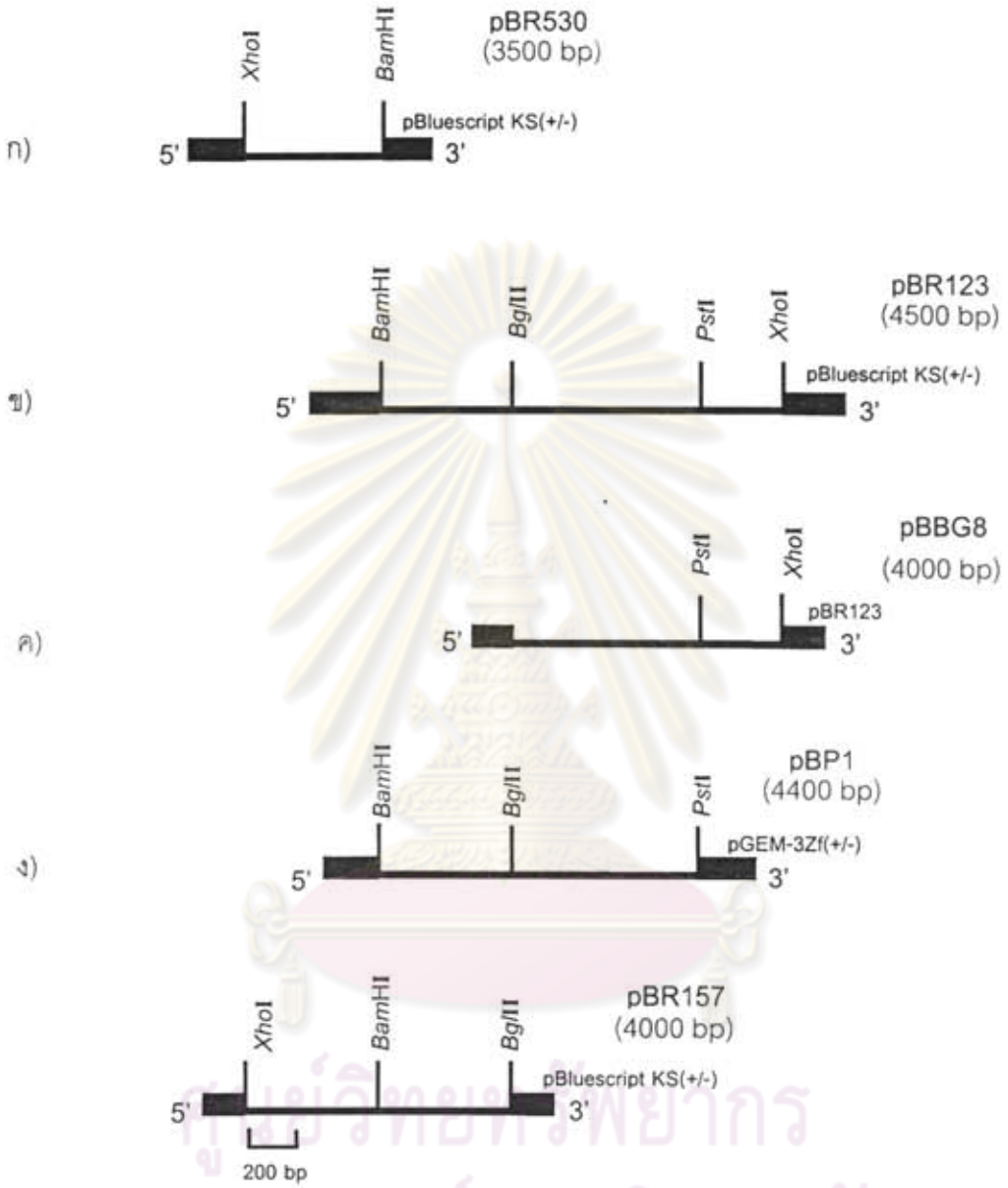
รูปที่ 4.5 **ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด** pBR123 **ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก**

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pBR123

ช่องวิ่งที่ 3-12 พลาสมิด pBR123 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องวิ่งที่ 13 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Xho*I



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

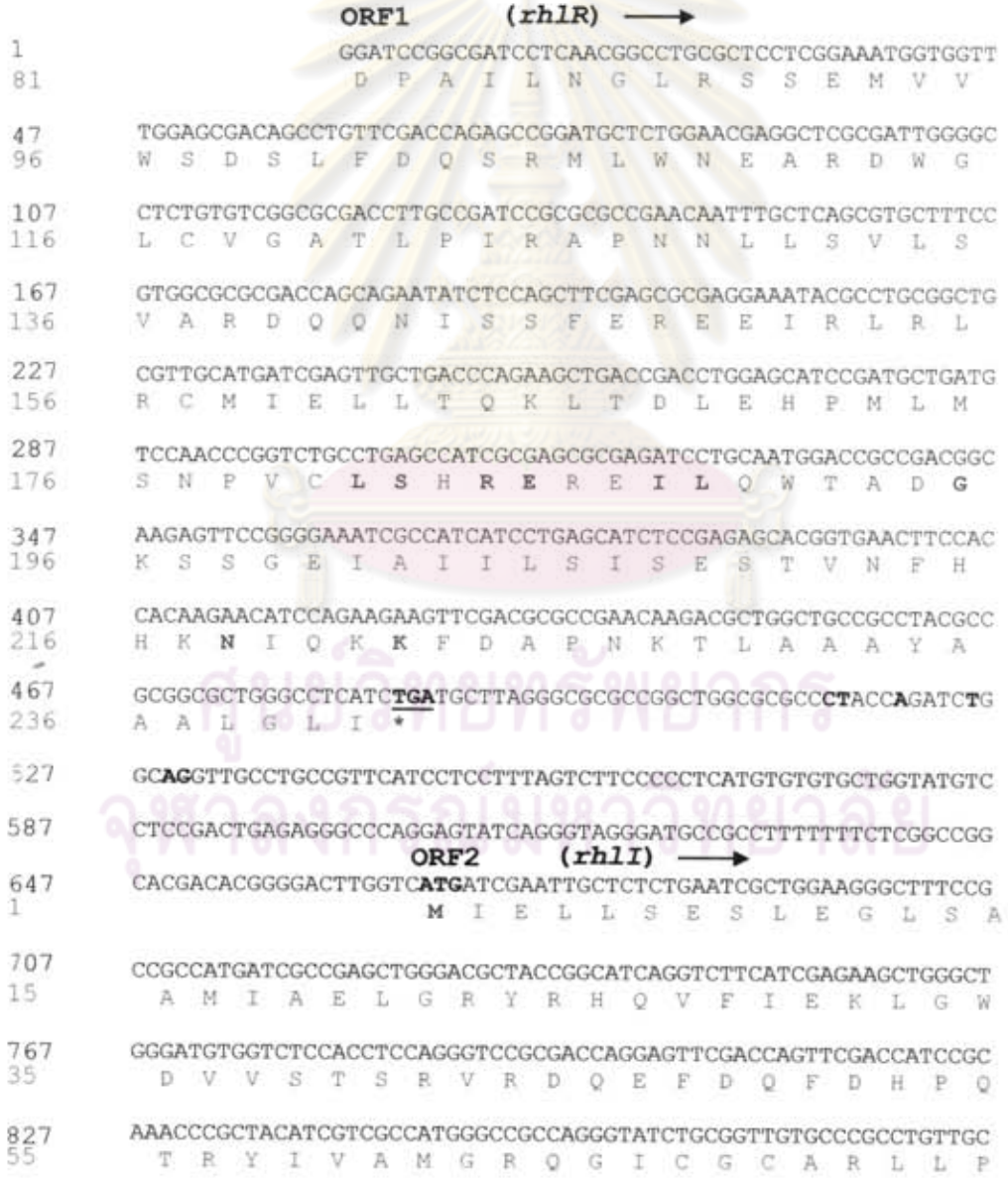
รูปที่ 4.6 ก) **แผนที่เรสทริกชัน** (restriction map) **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBR530 ข) **รีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBR123 ค) **รีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBBG8 ง) **รีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBP1 **ได้จากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด** pBR123 จ) **แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด** pBR157

จากการทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 จะสามารถวาดจุดตัดของเรสทริกชันเอนไซม์บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ข) ซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการสับโคลนได้คือ ใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Bgl*II ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 จากนั้นนำมาเชื่อมปลายเวกเตอร์เข้าด้วยกันแล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่โคลนได้นี้ว่า pBBG8 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ค) นอกจากนี้ยังทำการสับโคลนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBP1 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ง) ทำโดยตัดชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I-*Xho*I ออกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I-*Xho*I ที่ตัดได้ดังกล่าวแยกโคลนเข้า pGEM-3Zf(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α เมื่อได้สับโคลนที่ต้องการทั้งสองแล้วนั่นคือ pBBG8 และ pBP1 แล้วจึงนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และ universal primer ดังอธิบายในข้อ 4.5

4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pBR123 และ pBR530

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 มีขนาด 1531 bp ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์ T3 T7 และ RF1 กับ pBR123 ใช้ ไพร์เมอร์ T7 กับ pBBG8 และใช้ไพร์เมอร์ SP6 กับ pBP1 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.7 ซึ่งเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรด อะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reding Frame, ORF) จำนวน 2 กรอบมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสเปิดแรกประกอบด้วย 161 ลำดับกรดอะมิโน พบรหัสหยุด (stop codon) แต่ไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) จึงทำให้กรอบอ่านรหัสนี้ไม่สมบูรณ์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งถอดรหัสกรดอะมิโนคล้ายกับ transcriptional regulator RhlR ในลำดับกรดอะมิโนตัวที่ 81-229 เท่ากับ 100% ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ,

2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด โปรตีนดังกล่าวถอดรหัสมาจาก *rhlR* กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 อยู่ถัดจากกรอบอ่านรหัสแรกไปทางปลาย 3' ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับ autoinducer synthetase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และ Reiser, 1995) เท่ากับ 94% เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ autoinducer เพื่อไปกระตุ้นให้ regulatory protein ทำงานซึ่งถอดรหัสมาจาก *rhlI*



(มีต่อหน้าถัดไป)

```
887     CGACGACCGACGCCTACCTGCTCAAGGAAGTCTTCGCCTACCTGTGCAGCGAAACCCCGC
75        T  T  D  A  Y  L  L  K  E  V  F  A  Y  L  C  S  E  T  P  P

947     CCAGCGATCCGTCGGTCTGGGAGCTTTCGCGTTACGCCGCCAGCGCGGCGGACGATCCGC
95        S  D  P  S  V  W  E  L  S  R  Y  A  A  S  A  A  D  D  P  Q

1007    AACTGGCGATGAAGATATTCTGGTCCAGCCTGCAATGCGCCTGGTACCTGGGCGCCAGTT
115       L  A  M  K  I  F  W  S  S  L  Q  C  A  W  Y  L  G  A  S  S

1067    CGGTGGTGGCGGTGACCACCACGGCCATGGAGCGCTATTTCGTTCGCAACGGCGTGATCC
135       V  V  A  V  T  T  T  A  M  E  R  Y  F  V  R  N  G  V  I  L

1127    TCCAGCGCCTCGGCCCGCCGCAGAAGGTCAAGGGCGAGACGCTGGTCGCGATCAGCTTCC
155       Q  R  L  G  P  P  Q  K  V  K  G  E  T  L  V  A  I  S  F  P

1187    CGGCCTACCAGGAGCGCGGCCTGGAGATGCTGCTGCGCTACCACCCGGAATGGCTGCAGG
175       A  Y  Q  E  R  G  L  E  M  L  L  R  Y  H  P  E  W  L  Q  G

1247    GCGTACCGCTGTCGATGGCGGTGTGAGGTCGTCAGCCGTTTCGCGCACTTTTTTCCGCTT
195       V  P  L  S  M  A  V  *

1307    CTCCTGCCGCATGCTCGGCCCGCGCCCCGGCGTCATCGGGCGTTCCCCTGCATTCCGGGA

1367    TTTGGCCGCGGCTGCCGACTTGCGTAGTCTCTCTGCGGTCCGCCATCCCGAGGAGTCGCC

1427    ATGCCGAAGTCATTCCGCCATCTCGTCCAGGCCCTGGCCTGCCTTGCGCTGCTGGCCAGC

1487    GCCAGCCTCCAGGCGCAGGAGAGCCGCCTCGACCGCATCCTCGAG 3'
```

รูปที่ 4.7 **ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBR123 **มีขนาด** 1531 bp **ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์** T3 T7 **และ** RF1 **กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBR123 **ใช้ไพร์เมอร์** T7 **กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBBG8 **และใช้ไพร์เมอร์** SP6 **กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pBP1

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530โดยใช้ universal primer T3 และ T7 ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 513 bp ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.8 และเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบกรอบอ่านรหัสเปิด 2 กรอบที่ไม่สมบูรณ์มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสเปิดแรกไม่สมบูรณ์เพราะไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) ประกอบด้วย 47 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 380-426 ของ rhamnosyltransferase 1 chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ,2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ

100% ซึ่งถอดรหัสจาก *rhlB* ถัดไปทางปลาย 3' จะพบกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 ไม่สมบูรณ์เช่นกันเพราะไม่พบรหัสหยุด (stop codon) ประกอบด้วย 81 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 1-81 ของ transcriptional regulator RhlR ที่ถอดรหัสมาจาก *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100%

รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 513 bp ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 โดยใช้ universal primer T3 และ T7

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความคล้ายของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 และ pBR530 กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank พบว่าปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 คล้ายกับกรดอะมิโน transcriptional regulator RhlR ตัวที่ 1-81 ส่วนปลาย 5' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 พบว่าคล้ายกับ

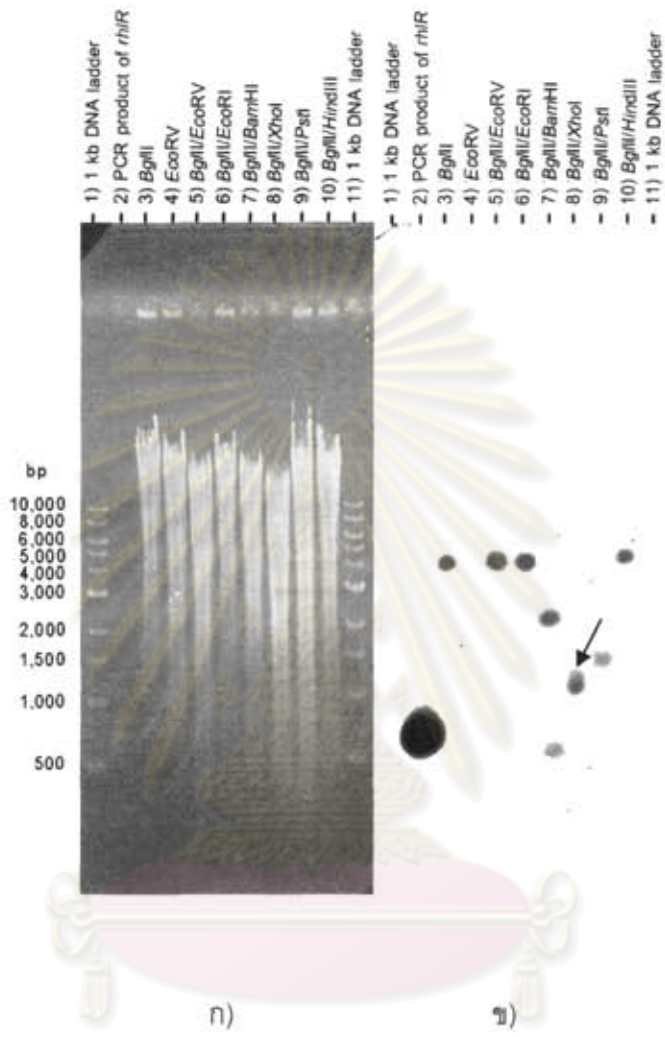
กรดอะมิโน transcriptional regulator RhlR ตัวที่ 81-229 แสดงให้เห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองน่าจะต่อกันโดยชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 น่าจะเรียงตัวอยู่หน้าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นแทรกสอดทั้งสองเชื่อมต่อกันจึงต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมบริเวณเชื่อมต่อดังกล่าว

4.6 การค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhlR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมบริเวณเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 และ pBR530 ได้นั้นต้องค้นหาและโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhlR* ซึ่งมีส่วนเชื่อมต่อดังกล่าวอยู่ภายในให้ได้ก่อนจึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.9 ก) ผลไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* เป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.9 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhlR* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R จะให้สัญญาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* (*rhlR*-probe)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 ก) **อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhlR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

จากผลการทดลองข้อ 4.6 ทำให้ทราบขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhlR* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *Xho*I-*Bgl*II ซึ่งตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 ที่ให้สัญญาณขนาด 1.0 กิโลเบส ให้ผลสอดคล้องกับแผนที่แสดงการจัดเรียงตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 และ pBR123 (รูปที่ 4.6) เมื่อเรียงต่อ

กัน จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังกล่าวด้วยวิธี Blue/ White selection และนำพลาสมิดของโคลนที่ได้ดังกล่าวมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* (*rhlR*-probe) ตามวิธีการในข้อ 3.9.4.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.10 ก)

รูปที่ 4.10 ก) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ** *XhoI-BglII* **ของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ขนาด** 1.0 **กิโลเบส ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR* ข) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม** B2 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR*

ช่องที่ A1 G6 และ a1	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rhlR* (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 G5 และ a2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3- G4	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม
ช่องที่ b1-f2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม B2

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.10 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ *XhoI-BglII*ขนาด 1.0 กิโลเบส ที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่มคือ ตัวอย่างกลุ่ม B2 B5 C5 และ E3 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม B2 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลนมาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหาร

เลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ b2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชันแสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน b2 มาศึกษาและตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pBR157 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ข) จากนั้นนำไปสกัดเอารีคอม-บิแนนท์พลาสมิดและหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhlR* ซึ่งออกแบบและใช้ในการสร้างตัวติดตามยีน *rhlR* ในการทดลองนี้

4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ *Xho*I-*Bgl*II ที่มีชิ้นส่วนของยีน *rhlR*

เนื่องจากต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งอยู่ก่อนและหลังบริเวณจดจำของ เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งอยู่บนยีน *rhlR* เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 เรียงต่อจาก pBR530 จริง ดังนั้นจึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR157 โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhlR* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 533 bp ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 4.11 ถอดรหัสได้คล้ายกับกรดอะมิโนที่ 11-187 ของ transcriptional regulator RhlR ที่ระบุรหัสโดย *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% ตามคาดหมาย และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวยังคลุมส่วนเชื่อมต่อระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 กับ pBR530 ทำให้ทราบว่าชิ้นดีเอ็นสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 เรียงตัวอยู่หน้าชิ้นดีเอ็นสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 จริง โดยเชื่อมกันด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ตามรูปที่ 4.11 ซึ่งแสดงการวางตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR530 ต่อกับ pBR123

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ORF1 (*rhlR*) →

```
1                                                    TGGGACGGTTTGCGT
11                                                   W  D  G  L  R

16      AGCGAGATGCAGCCGATCCACGACAGCCAGGGCGTGTTCGCCGTCCTGGAAAAGGAAGTG
16      S  E  M  Q  P  I  H  D  S  Q  G  V  F  A  V  L  E  K  E  V

76      CGGCGCCTGGGCTTCGATTACTACGCCTATGGCGTGCGCCATACGATTCCCTTCACCCGG
36      R  R  L  G  F  D  Y  Y  A  Y  G  V  R  H  T  I  P  F  T  R

136     CCGAAGACCGAGGTCCATGGCACCTATCCCAAGGCCTGGCTGGAGCGATACCAGATGCAG
56      P  K  T  E  V  H  G  T  Y  P  K  A  W  L  E  R  Y  Q  M  Q
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
196     AACTACGGGGCCGTGGATCCGGCGATCCTCAACGGCCTGCGCTCCTCGGAAATGGTGGTT
76      N  Y  G  A  V  D  P  A  I  L  N  G  L  R  S  S  E  M  V  V

256     TGGAGCGACAGCCTGTTCGACCAGAGCCGGATGCTCTGGAACGAGGCTCGCGATTGGGGC
96      W  S  D  S  L  F  D  Q  S  R  M  L  W  N  E  A  R  D  W  G

316     CTCTGTGTCGGCGCGACCTTGCCGATCCGCGCGCCGAACAATTTGCTCAGCGTGCTTTCC
116     L  C  V  G  A  T  L  P  I  R  A  P  N  N  L  L  S  V  L  S

376     GTGGCGCGCGACCAGCAGAATATCTCCAGCTTCGAGCGCGAGGAAATACGCCTGCGGCTG
136     V  A  R  D  Q  Q  N  I  S  S  F  E  R  E  E  I  R  L  R  L

436     CGTTGCATGATCGAGTTGCTGACCCAGAAGCTGACCGACCTGGAGCATCCGATGCTGATG
156     R  C  M  I  E  L  L  T  Q  K  L  T  D  L  E  H  P  M  L  M

496     TCCAACCCGGTCTGCCTGAGCCATCGCGAGCGCGAGAT
176     S  N  P  V  C  L  S  H  R  E  R  E
```

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR157 โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhlR* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 533 bp

ดังนั้นเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR530 และ pBR123 มาต่อเชื่อมกันจะได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2,038 bp ซึ่งได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.12

```
                                                        ORF1 (rhlB) →
1                                                       CTCGAGGACCCGG
380                                                     L  E  D  P  A

14      CCATGGCGGCGGCCTGTCGGCGTTTCATGGAATTGTCACAACCGCACAGTATCGCTTGCG
385       M  A  A  A  C  R  R  F  M  E  L  S  Q  P  H  S  I  A  C  G

74      GTAAAGCGGCCCAGGTGGTCGAACGTTGTCATAGGGAGGGGGATGCGCGATGGCTGAAGG
405       K  A  A  Q  V  V  E  R  C  H  R  E  G  D  A  R  W  L  K  A

134     CTGCGTCCTGAACGGTGCTGGCATAACAGATAGGGTTGCCATGATTTTGCCGTATCGGCA
425       A  S  *

194     AGGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGTGATGCATTTTATCGA

                        ORF2    (rhlR) ⟶
254     TCAGGGCTTACTGCAATGAGGAATGACGGAGGCTTTTTGCTGTGGTGGGACGGTTTGCGT
1                       M  R  N  D  G  G  A  L  L  W  W  D  G  L  R

314     AGCGAGATGCAGCCGATCCACGACAGCCAGGGCGTGTTCGCCGTCCTGGAAAAGGAAGTG
16      S  E  M  Q  P  I  H  D  S  Q  G  V  F  A  V  L  E  K  E  V

374     CGGCGCCTGGGCTTCGATTACTACGCCTATGGCGTGCGCCATACGATTCCCTTCACCCGG
36      R  R  L  G  F  D  Y  Y  A  Y  G  V  R  H  T  I  P  F  T  R

434     CCGAAGACCGAGGTCCATGGCACCTATCCCAAGGCCTGGCTGGAGCGATACCAGATGCAG
56      P  K  T  E  V  H  G  T  Y  P  K  A  W  L  E  R  Y  Q  M  Q
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
494     AACTACGGGGCCGTGGATCCGGCGATCCTCAACGGCCTGCGCTCCTCGGAAATGGTGGTT
76      N  Y  G  A  V  D  P  A  I  L  N  G  L  R  S  S  E  M  V  V

554     TGGAGCGACAGCCTGTTCGACCAGAGCCGGATGCTCTGGAACGAGGCTCGCGATTGGGGC
96      W  S  D  S  L  F  D  Q  S  R  M  L  W  N  E  A  R  D  W  G

614     CTCTGTGTCGGCGCGACCTTGCCGATCCGCGCGCCGAACAATTTGCTCAGCGTGCTTTCC
116     L  C  V  G  A  T  L  P  I  R  A  P  N  N  L  L  S  V  L  S

674     GTGGCGCGCGACCAGCAGAATATCTCCAGCTTCGAGCGCGAGGAAATACGCCTGCGGCTG
136     V  A  R  D  Q  Q  N  I  S  S  F  E  R  E  E  I  R  L  R  L

734     CGTTGCATGATCGAGTTGCTGACCCAGAAGCTGACCGACCTGGAGCATCCGATGCTGATG
156     R  C  M  I  E  L  L  T  Q  K  L  T  D  L  E  H  P  M  L  M

794     TCCAACCCGGTCTGCCTGAGCCATCGCGAGCGCGAGATCCTGCAATGGACCGCCGACGGC
176     S  N  P  V  C  L  S  H  R  E  R  E  I  L  Q  W  T  A  D  G

854     AAGAGTTCCGGGGAAATCGCCATCATCCTGAGCATCTCCGAGAGCACGGTGAACTTCCAC
196     K  S  S  G  E  I  A  I  I  L  S  I  S  E  S  T  V  N  F  H

914     CACAAGAACATCCAGAAGAAGTTCGACGCGCCGAACAAGACGCTGGCTGCCGCCTACGCC
216     H  K  N  I  Q  K  K  F  D  A  P  N  K  T  L  A  A  A  Y  A

974     GCGGCGCTGGGCCTCATCTGATGCTTAGGGCGCGCCGGCTGGCGCGCCCTACCAGATCTG
236     A  A  L  G  L  I  *

1034    GCAGGTTGCCTGCCGTTCATCCTCCTTTAGTCTTCCCCCTCATGTGTGTGCTGGTATGTC

1094    CTCCGACTGAGAGGGCCCAGGAGTATCAGGGTAGGGATGCCGCCTTTTTTTCTCGGCCGG

                          ORF3      (rhlI) ──►
1154    CACGACACGGGGACTTGGTCATGATCGAATTGCTCTCTGAATCGCTGGAAGGGCTTTCCG
1                           M  I  E  L  L  S  E  S  L  E  G  L  S  A

1214    CCGCCATGATCGCCGAGCTGGGACGCTACCGGCATCAGGTCTTCATCGAGAAGCTGGGCT
15        A  M  I  A  E  L  G  R  Y  R  H  Q  V  F  I  E  K  L  G  W

1274    GGGATGTGGTCTCCACCTCCAGGGTCCGCGACCAGGAGTTCGACCAGTTCGACCATCCGC
35        D  V  V  S  T  S  R  V  R  D  Q  E  F  D  Q  F  D  H  P  Q

1334    AAACCCGCTACATCGTCGCCATGGGCCGCCAGGGTATCTGCGGTTGTGCCCGCCTGTTGC
55        T  R  Y  I  V  A  M  G  R  Q  G  I  C  G  C  A  R  L  L  P

1394    CGACGACCGACGCCTACCTGCTCAAGGAAGTCTTCGCCTACCTGTGCAGCGAAACCCCGC
75      T  T  D  A  Y  L  L  K  E  V  F  A  Y  L  C  S  E  T  P  P

1454    CCAGCGATCCGTCGGTCTGGGAGCTTTCGCGTTACGCCGCCAGCGCGGCGGACGATCCGC
95        S  D  P  S  V  W  E  L  S  R  Y  A  A  S  A  A  D  D  P  Q

1514    AACTGGCGATGAAGATATTCTGGTCCAGCCTGCAATGCGCCTGGTACCTGGGCGCCAGTT
115       L  A  M  K  I  F  W  S  S  L  Q  C  A  W  Y  L  G  A  S  S

1574    CGGTGGTGGCGGTGACCACCACGGCCATGGAGCGCTATTTCGTTCGCAACGGCGTGATCC
135       V  V  A  V  T  T  T  A  M  E  R  Y  F  V  R  N  G  V  I  L

1634    TCCAGCGCCTCGGCCCGCCGCAGAAGGTCAAGGGCGAGACGCTGGTCGCGATCAGCTTCC
155       Q  R  L  G  P  P  Q  K  V  K  G  E  T  L  V  A  I  S  F  P

1694    CGGCCTACCAGGAGCGCGGCCTGGAGATGCTGCTGCGCTACCACCCGGAATGGCTGCAGG
175       A  Y  Q  E  R  G  L  E  M  L  L  R  Y  H  P  E  W  L  Q  G
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
1754    GCGTACCGCTGTCGATGGCGGTGTGAGGTCGTCAGCCGTTTCGCGCACTTTTTTCCGCTT
195       V  P  L  S  M  A  V  *

1814    CTCCTGCCGCATGCTCGGCCCGCGCCCCGGCGTCATCGGGCGTTCCCCTGCATTCCGGGA

1874    TTTGGCCGCGGCTGCCGACTTGCGTAGTCTCTCTGCGGTCCGCCATCCCGAGGAGTCGCC

1934    ATGCCGAAGTCATTCCGCCATCTCGTCCAGGCCCTGGCCTGCCTTGCGCTGCTGGCCAGC

1994    GCCAGCCTCCAGGCGCAGGAGAGCCGCCTCGACCGCATCCTCGAG 3'
```

รูปที่ 4.12 สรุปรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR530 และ pBR123 ทั้งหมดขนาด 2,038 bp

พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากนั้นนำไปเทียบหาความคล้ายกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 3 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิงได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.2 และสามารถนำไปสร้างเป็นแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.13 จากรูปจะแสดงบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบและบริเวณที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม

กรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ที่พบมี 3 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) กรอบอ่านรหัสเปิดแรกไม่สมบูรณ์เพราะไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) ประกอบด้วย 47 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 380-426 ของ rhamnosyltransferase 1 chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ,2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ซึ่งถอดรหัสจาก *rhlB* ให้ชื่อ ORF1 ว่า *rhlB*

2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 723 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งแสดงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาและขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น กรดอะมิโนมีความคล้ายกับ transcriptional regulator RhlR ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) regulator protein ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% นอกจากนี้ยังคล้ายกับโปรตีนควบคุมอื่นอีกคือ VSMR ของ *P. aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

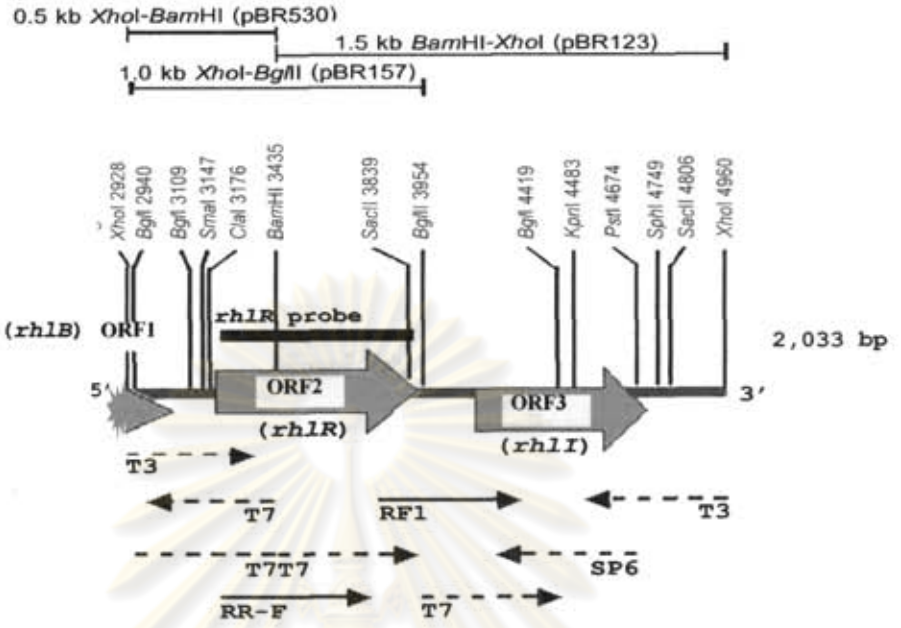
3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop *aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และtranscriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas clororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlR*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีขนาด 603

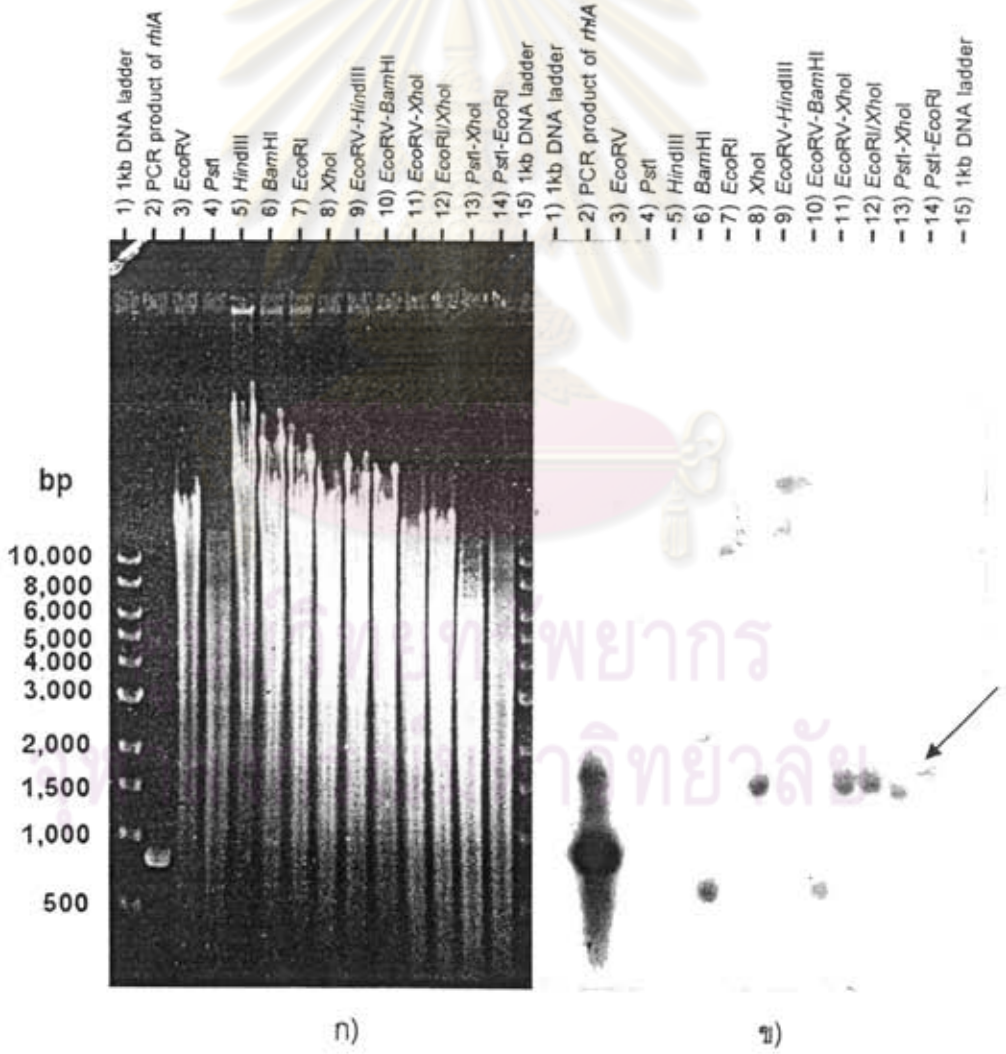


รูปที่ 4.13 **แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด** pBR530 **และ** pBR123 **ขนาด** 2,033 bp **แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด** (ORF) **ดีเอ็นเอติดตาม** *rhlR* **และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ต่างๆ ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ตัวต่างๆ ตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย —✸→ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบเอง(designed primer) และ – – → เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย แสดง ORF ที่ไม่สมบูรณ์**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.14 ก) ผลไฮบริไดเซชันเป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.14 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhlA* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R จะให้สัญญาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* (*rhlA*-probe)



รูปที่ 4.14 ก) **อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA***

4.10 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA*

จากผลการทดลองข้อ 4.9 ทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *Eco*RI-*Pst*I ซึ่งตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 ที่ให้สัญญาณขนาด 1.5 กิโลเบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอแยกโคลนเข้า pGEM-3Zf(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกโคลนที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำได้ด้วยวิธี Blue/ White selection เลือกเฉพาะโคลนที่มีโคโลนีสีขาว จากนั้นคัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.9.4.3) ผลสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ของโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งมียีน *rhlA* อยู่ เป็นไปตามรูปที่ 4.15

รูปที่ 4.15 ก) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ขนาด** 1.5 **กิโลเบสอยู่ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* ข) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม** D7 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA*

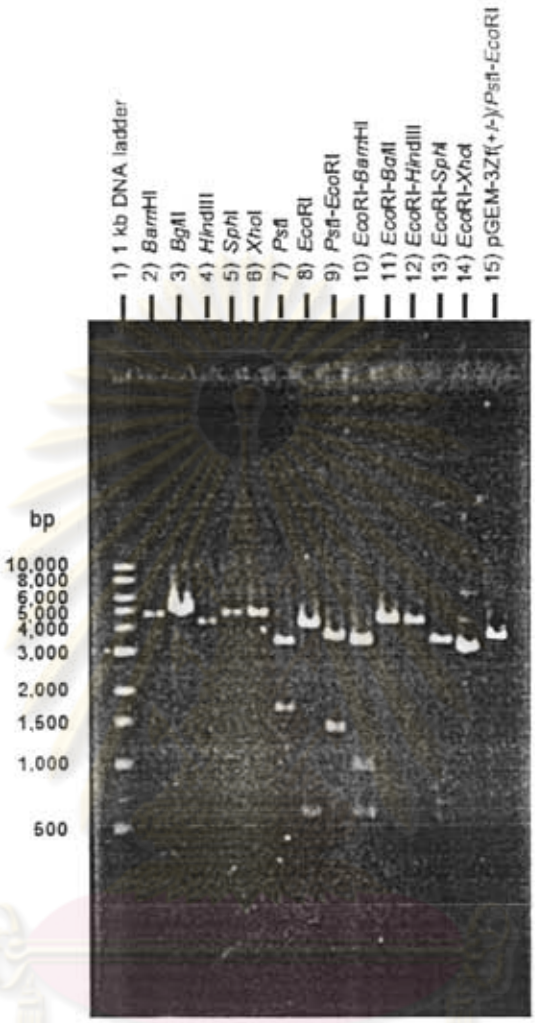
ช่องที่ A1 F12 และ a1	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rhlA* (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 F11 และ a2	พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-F10	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม
ช่องที่ a3-b6	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.15 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในตัวอย่างกลุ่ม D7 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D7 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลนมาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ b1 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน b1 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pGA396 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ข)

ทำการตัดพลาสมิด pGA396 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.16 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.17 เพื่อใช้ในการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pGA396 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



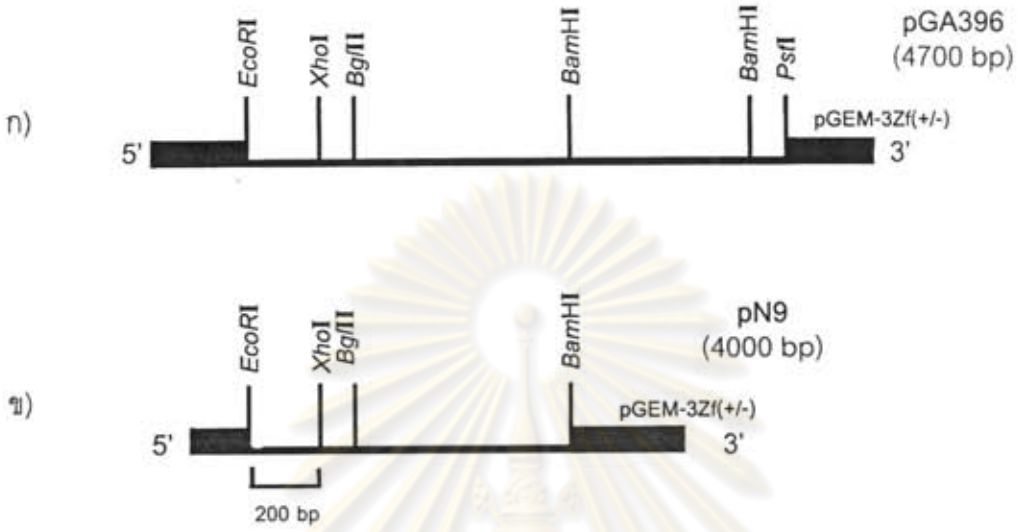
รูปที่ 4.16 **ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด** pGA396 **ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก**

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2-14 พลาสมิด pGA396 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องวิ่งที่ 15 พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I-*Eco*RI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 ก) **แผนที่เรสทริกชัน** (Restriction map) **ของพลาสมิด** pGA396 ข) **แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** pN9 **ที่ได้จากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด** pGA396 **เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์**

จากการทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 จะสามารถวาดจุดตัดของเรสทริกชันเอนไซม์บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ก) ซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการสับโคลนได้คือ ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอ *Eco*RI-*Bam*HI ที่ตัดได้ดังกล่าวแยกโคลนเข้า pGEM-3Zf(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α แล้วจึงนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และ universal primer ดังอธิบายในข้อ 4.11

4.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pGA396

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ขนาด 1562 bp (ภาคผนวก จ4) ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์ M13 forward SP6 และ N912R กับพลาสมิด pGA396 และไพร์เมอร์ SP6 กับพลาสมิด pN9 ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.18

```
          ORF1   (dcd) ──►
1     5'GAATTCAAGGTGTTCACCAACATCCATTCGGCGGTGGTCGATCCGAAGAACTTCGACGAG
52      E  F  K  V  F  T  N  I  H  S  A  V  V  D  P  K  N  F  D  E

61    AAAAGCTTCGTCGACATCAACAGCGACGTCTGCATCATCCCGCCGAACTCCTTCGCCCTG
72    K  S  F  V  D  I  N  S  D  V  C  I  I  P  P  N  S  F  A  L

121   GCGCGCACCGTCGAGTACTTCCGCATCCCGCGCGACGTCCTGACCATCTGCCTGGGCAAG
92    A  R  T  V  E  Y  F  R  I  P  R  D  V  L  T  I  C  L  G  K

181   AGCACCTACGCGCGTTGCGGCATCATCGTCAACGTCACCCCGCTGGAGCCGGAGTGGGAA
112   S  T  Y  A  R  C  G  I  I  V  N  V  T  P  L  E  P  E  W  E

241   GGCCATGTGACCCTCGAGTTCTCCAATACCACCAACCTGCCGGCGAAGATCTACGCCAAT
132   G  H  V  T  L  E  F  S  N  T  T  N  L  P  A  K  I  Y  A  N

301   GAAGGCGTGGCGCAGATGCTCTTCCTGCAATCCGACGAGGCCTGCGAAGTGTCCTATAAG
152   E  G  V  A  Q  M  L  F  L  Q  S  D  E  A  C  E  V  S  Y  K

361   GACCGTGGCGGCAAATACCAGGGTCAGCGCGGCGTGACCCTGCCAAAAGCCTGACGCCAG
172   D  R  G  G  K  Y  Q  G  Q  R  G  V  T  L  P  K  A  *

421   AGCGTTTCGACACCGGAAACCGGGCCTGGCGCCCGGTTTTTTCATGCCTTTTCCGCCAAC

481   CCCTCGCTGTTCCCCGCCGGCCGCTCTGGCACGCCTTATCGCGGGCGGGCAGGGGCTTAT

541   GCGCAGGCGGCCGCCCGTCCTGTGAAATCTGGCAGTTACCGTTAGCTTTCGAATTGGCTA

601   AAAAGTGTTCATCGGCTACGCGTGAACACGGACGCCAATCGTTTGCGCAGGCCGATCTGC

661   AAGACCCACACAAGCCCCTCGCCTGAAGGGGTACGCATCCGCCGTGGCTGGTCCGCGCGG

721   ATGGCCGCTGAGTTACTTGTCTGCCGTTCGAACAATAAGAACGAACTCTACGTAATGCCG
                                                          ORF2
781   GGATACCCGTGGCAGCGATAGCTGTTTGCCTGTTCGAAAATTTTTGGGAGGTGTGAAATG
1                                                           M
          (rhlA) ──►
841   CGGCGCGAAAGTCTGTTGGTATCGGTTTGCAAGGGCCTGCGGGTACATGTCGAGCGCGTT
2       R  R  E  S  L  L  V  S  V  C  K  G  L  R  V  H  V  E  R  V
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
901     GGGCAGGATCCCGGGCGCAGCACGGTGATGCTGGTCAACGGCGCGATGGCGACCACCGCC
22      G  Q  D  P  G  R  S  T  V  M  L  V  N  G  A  M  A  T  T  A

961     TCGTTCGCCCGGACCTGCAAGTGCCTGGCCGAACATTTCAACGTGGTGCTGTTCGACCTG
42      S  F  A  R  T  C  K  C  L  A  E  H  F  N  V  V  L  F  D  L

1021    CCCTTCGCCGGGCAGTCGCGTCAGCACAACCCGCAGCGCGGGTTGATCACCAAGGACGAC
62      P  F  A  G  Q  S  R  Q  H  N  P  Q  R  G  L  I  T  K  D  D

1081    GAGGTGGAAATCCTCCTGGCGCTGATCGAGCGCTTCGAGGTCAATCACCTGGTCTCCGCG
82      E  V  E  I  L  L  A  L  I  E  R  F  E  V  N  H  L  V  S  A

1141    TCGTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGCATCCGCAGC
102     S  W  G  G  I  S  T  L  L  A  L  S  R  N  P  R  G  I  R  S

1201    TCGGTGGTGATGGCATTCGCCCCTGGACTGAACCAGGCGATGCTCGACTACGTCGGGCGG
122     S  V  V  M  A  F  A  P  G  L  N  Q  A  M  L  D  Y  V  G  R

1261    GCGCAGGCGCTGATCGAGCTGGACGACAAGTCGGCGATCGGCCATCTGCTCAACGAGACC
142     A  Q  A  L  I  E  L  D  D  K  S  A  I  G  H  L  L  N  E  T

1321    GTCGGCAAATACCTGCCGCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCGCTG
162     V  G  K  Y  L  P  P  R  L  K  A  S  N  H  Q  H  M  A  S  L

1381    GCCACCGGCGAATACGAGCAGGCGCGCTTTCACATCGACCAGGTGCTGGCGCTCAACGAT
182     A  T  G  E  Y  E  Q  A  R  A  H  I  D  Q  V  L  A  L  N  D

1441    CGGGGCTACCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGC
202     R  G  Y  L  A  C  L  E  R  I  Q  S  H  V  H  F  I  N  G  S

1501    TGGGACGAATACACCACCGCCGAGGACGCCCGCCAGTTCCGCGACTACCTGCCGCACTGC
222     W  D  E  Y  T  T  A  E  D  A  R  Q  F  R  D  Y  L  P  H  C

1561    AG
```

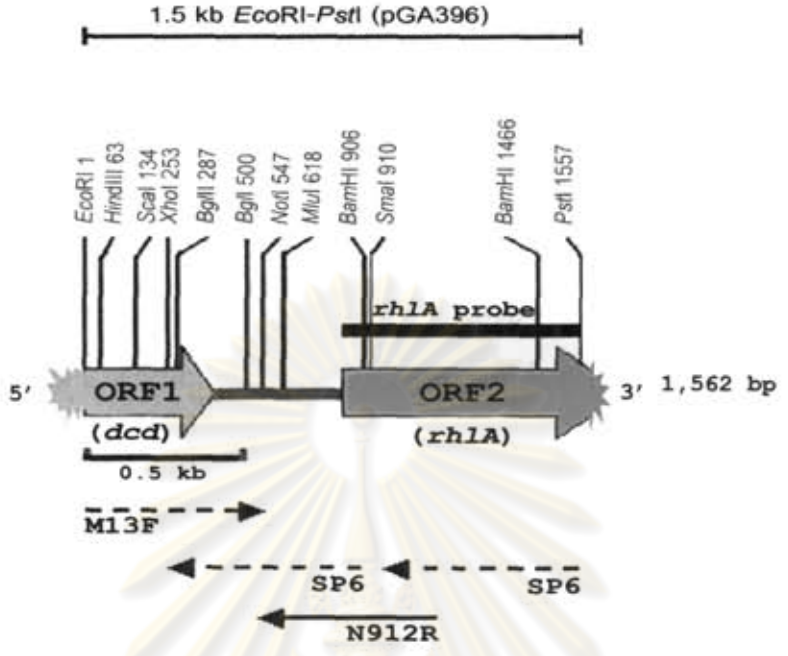
รูปที่ 4.18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ขนาด 1562 bp ซึ่งได้จากการใช้ไพร์เมอร์ M13 forward SP6 และ N912R กับพลาสมิด pGA396 และไพร์เมอร์ SP6 กับ พลาสมิด pN9

เมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด 2 กรอบที่ไม่สมบูรณ์ มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 411 bp แปลงได้เป็น 137 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับ deoxycytidine triphosphate (dCTP) deaminase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas putida* KT2440 (Nelson และคณะ, 2002)เท่ากับ 100% และ 94% ตามลำดับ ทำหน้าที่กระตุ้นการสังเคราะห์ dUTP จาก dCTP ในกระบวนการสังเคราะห์ dUMP เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง thymine nucleotide ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ให้ชื่อ ORF1 ว่า *dcd*

2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่พบรหัสหยุด ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) กรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้มีความคล้ายกับ rhamnosyltransferase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ซึ่งเป็นหนึ่งหน่วยของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 แต่กรอบอ่านรหัสเปิดที่ได้นี้ยังไม่ครบกรอบอ่านรหัสเปิดและยังไม่พบรหัสหยุด จึงต้องติดตามส่วนที่เหลือและโคลนยีน *rhlA* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดต่อไป ให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlA*

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและผลการเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank สามารถสรุปกรอบอ่านรหัสเปิดที่พบจากชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด pGA396 pBR530 และ pBR123 ได้ตามตารางที่ 4.2 ดังต่อไปนี้ ซึ่งยังพบว่ากรอบอ่านรหัสเปิดบางกรอบ คือ กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 ของ pGA396 และกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 ของ pBR530 และ pBR123 ยังไม่สมบูรณ์และเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดของ *Pseudomonas aeruginosa* A41 ส่วนกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 ของ ชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pGA396 นั้นถึงแม้ว่าข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สมบูรณ์แต่ไม่จำเป็นต้องศึกษาต่อเพราะเป็นกรอบอ่านรหัสที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดของ *Pseudomonas aeruginosa* A41



รูปที่ 4.19 **แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด** pGA396 **ขนาด** 1,562 bp **แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด** (ORF) **ดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* **และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ต่างๆ ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไพร์เมอร์ตัวต่างๆ ตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย ⟶ เป็นการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบเอง**(designed primer) **และ** - → **เป็นการ หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้** universal primer **เครื่องหมาย** ✸ **และ** ✸ **แสดง** ORF **ที่ไม่สมบูรณ์**

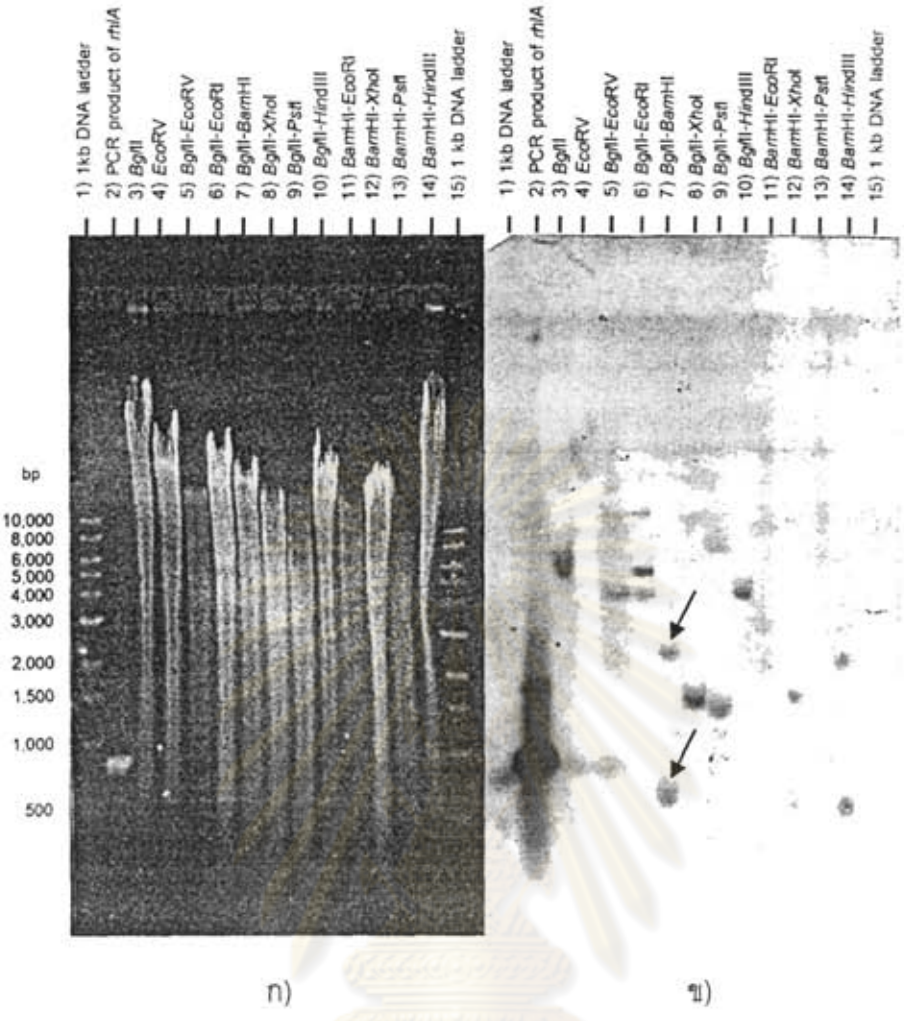
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.12 การโคลน *rhlA* ส่วนที่เหลือ

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 พบว่ากรอบอ่านรหัสเปิดที่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดถอดรหัสคล้าย rhamnosyl transferase 1 chain A แต่ไม่พบรหัสหยุดจึงทำให้กรอบอ่านรหัสดังกล่าวไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rhlA* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดจึงโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp.A41 ที่มีส่วน *rhlA* ที่เหลือ จากผลการค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันในข้อ 4.9 ตามรูปที่ 4.14 จะเห็นได้ว่าเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI จะตัดดีเอ็นเอให้สัญญาณ 3 สัญญาณ ซึ่งมีขนาด 5.5 2.0 และ 0.5 กิโลเบส จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ในรูปที่ 4.17 ทำให้ทราบเพิ่มเติมอีกว่าชิ้น *Bam*HI ขนาด 0.5 กิโลเบส นั้นอยู่กลางยีน *rhlA* ส่วนอีกสองชิ้นที่เหลือนั้นไม่ทราบว่าชิ้นใดอยู่บริเวณปลายยีน *rhlA* ดังนั้นจึงทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ตามที่แสดงในรูปที่ 4.20 เพื่อเปรียบเทียบหาชิ้นที่คาดว่ามีส่วนปลายของยีน *rhlA*

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.20 ก) ผลไฮบริไดเซชันเป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.20 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhlA* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R จะให้สัญญาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* (*rhlA*-probe)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

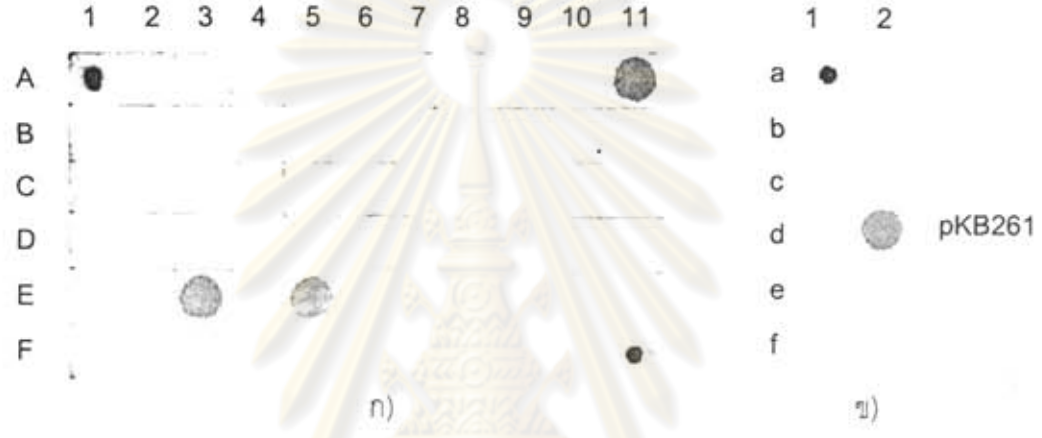


ก) ข)

รูปที่ 4.20 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 **ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA*

จากผลการค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มีส่วนปลายยีนของ *rhlA* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันตามรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II-*Bam*HI จะตัดดีเอ็นเอให้สัญญาณ 2 สัญญาณ ซึ่งมีขนาด 2.0 และ 0.5 กิโลเบส ไม่พบสัญญาณขนาด 5.0 กิโลเบส จะแสดงให้เห็นว่าเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II จะตัดภายในชิ้น *Bam*HI ขนาด 5.0 กิโลเบส ให้มีสัญญาณรวมกับชิ้น *Bam*HI ขนาด 0.5 กิโลเบส ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ในรูปที่ 4.17 ที่จะมีบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II อยู่เหนือบริเวณจดจำของ *Bam*HI ไปทางปลาย 5' เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II-*Bam*HI จะให้ดีเอ็นเอขนาด 0.5 เช่นกัน แสดงว่าชิ้น *Bam*HI ขนาด 5.0 กิโลเบสนี้น่าจะอยู่บริเวณเหนือยีน *rhlA* ดังนั้นเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมในการโคลนชิ้น *rhlA* ส่วนปลายยีนให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดคือ *Bam*HI ที่ให้สัญญาณขนาด 2.0 กิโลเบส

นำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกโคลนที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำได้ด้วยวิธี Blue/ White selection เลือกเฉพาะโคลนที่มีโคโลนีสีขาว จากนั้นคัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.9.4.3) ผลสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ของโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.0 กิโลเบส ซึ่งมีส่วนปลายยีน *rhlA* อยู่ เป็นไปตามรูปที่ 4.21

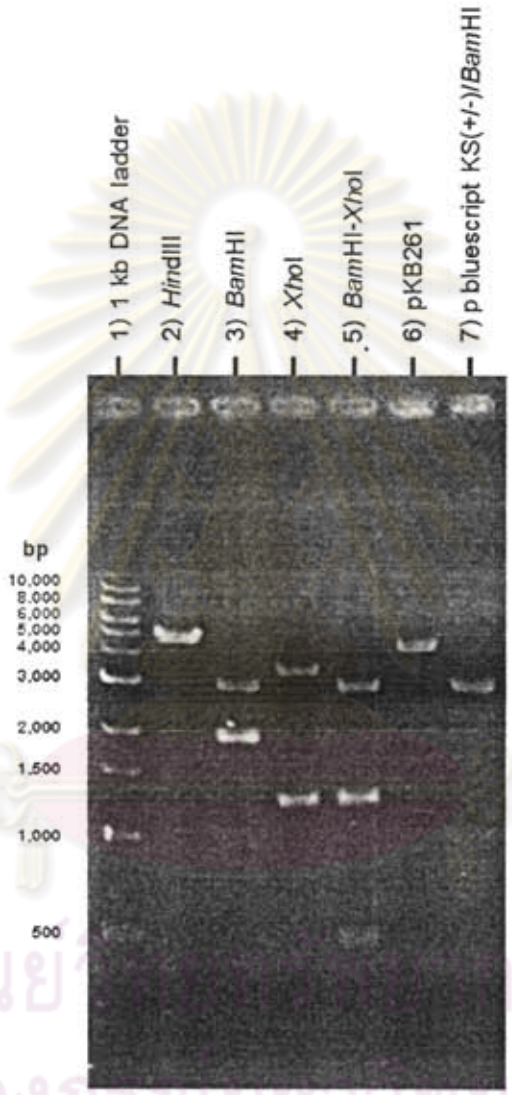


รูปที่ 4.21 ก) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ขนาด 2.0 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* ข) Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม** A11 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA*

ช่องที่ A1 F11 และ a1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rhlA* (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 F10 และ a2 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-F9 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม
ช่องที่ b1-f2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A11

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.21 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.0 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในตัวอย่างกลุ่ม A11 ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม A11 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ d2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

จึงเลือกโคลน d2 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pKB261 ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ข) ทำการตัดพลาสมิด pKB261 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.22 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.22 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2-6 พลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องวิ่งที่ 7 พลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.23 **แผนที่เรสทริกชัน** (Restriction map) **ของพลาสมิด** pKB261

4.13 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pKB261

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pKB261 ขนาด 1975 bp โดยใช้ไพร์เมอร์ T3 T7 BF1 และ BR2 ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.24 ตั้งแต่ลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ 1466-3440 ซึ่งเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast X version 2.2.9 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด 3 กรอบ มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสแรก ประกอบด้วย 85 ลำดับกรดอะมิโน พบรหัสหยุด แต่ไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) ดังนั้นกรอบอ่านรหัสนี้จึงไม่สมบูรณ์ ลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ rhamnosyltransferase chain A ที่กรดอะมิโนที่ 211-295 ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่สมบูรณ์ ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน คล้าย 100% กับ rhamnosyltransferase chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และกรอบอ่านรหัสเปิดสุดท้ายอยู่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) แต่ไม่พบรหัสหยุดจึงทำให้กรอบอ่านรหัสนี้ไม่สมบูรณ์ ประกอบด้วย 81 ลำดับ

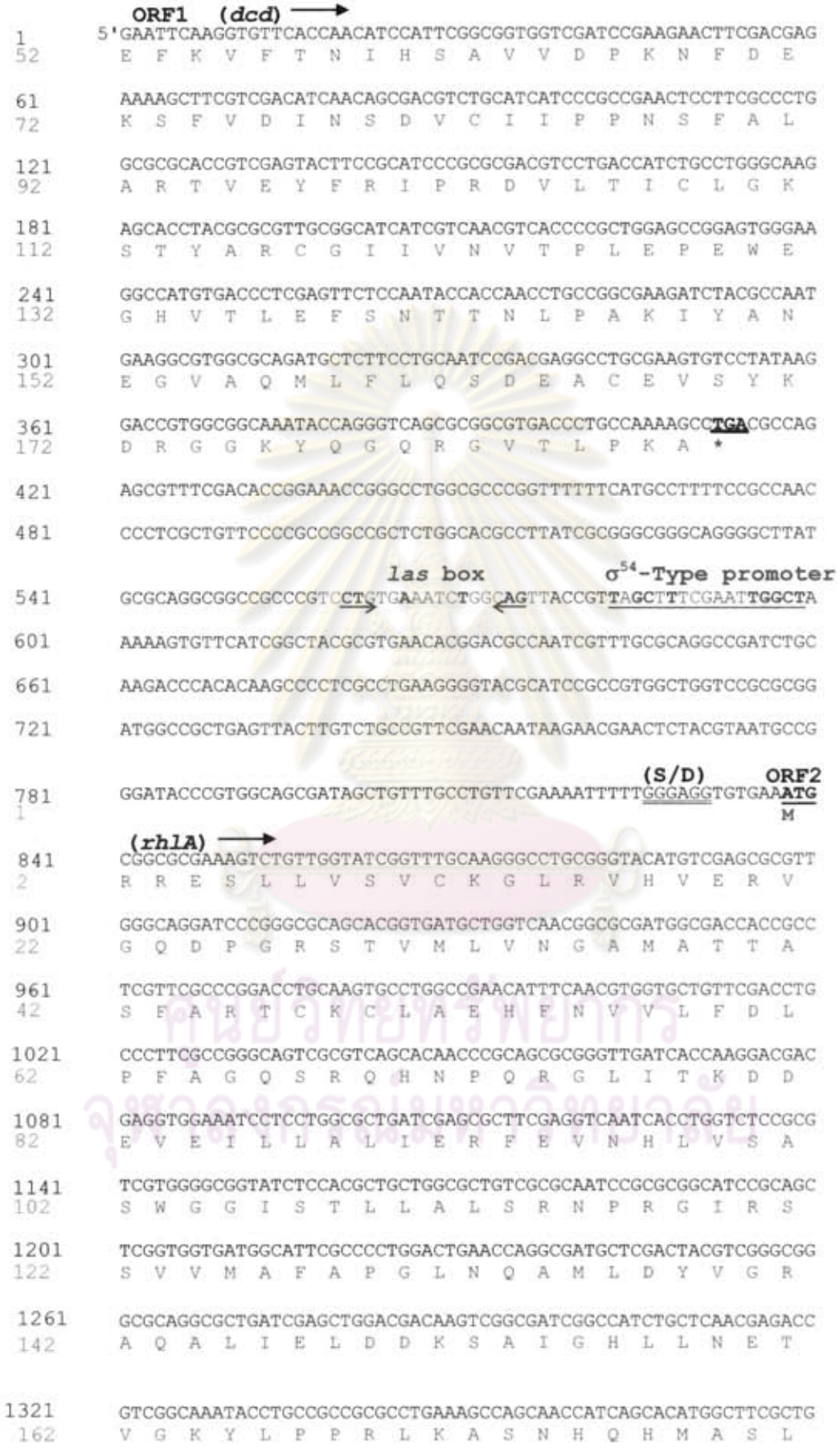
กรดอะมิโน คล้าย 100% กับกรดอะมิโนที่ 1-81 ของ regulatory protein RhlR ที่ระบุรหัสโดย *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b)

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pKB261 พบว่ากรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 ซึ่งอยู่ที่ปลาย 5' มีความคล้าย rhamnosyltransferase chain A เช่นเดียวกับ กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 บริเวณปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pGA396 พอนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกันพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอยู่ 93 bp โดยชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pGA396 จะเรียงตัวอยู่หน้าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pKB261

ส่วนกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 และ 3 ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pKB261 พบว่าคล้าย rhamnosyltransferase chain B และ regulatory protein RhlR เหมือนกับชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบกันพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอยู่ 513 bp โดย pKB261 เรียงอยู่หน้า pBR530 ดังนั้นแสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pGA396 pKB261 pBR530 และ pBR123 เรียงตัวต่อกันตามลำดับ

4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่สร้างขึ้นของ *Pseudomonas* sp. A41

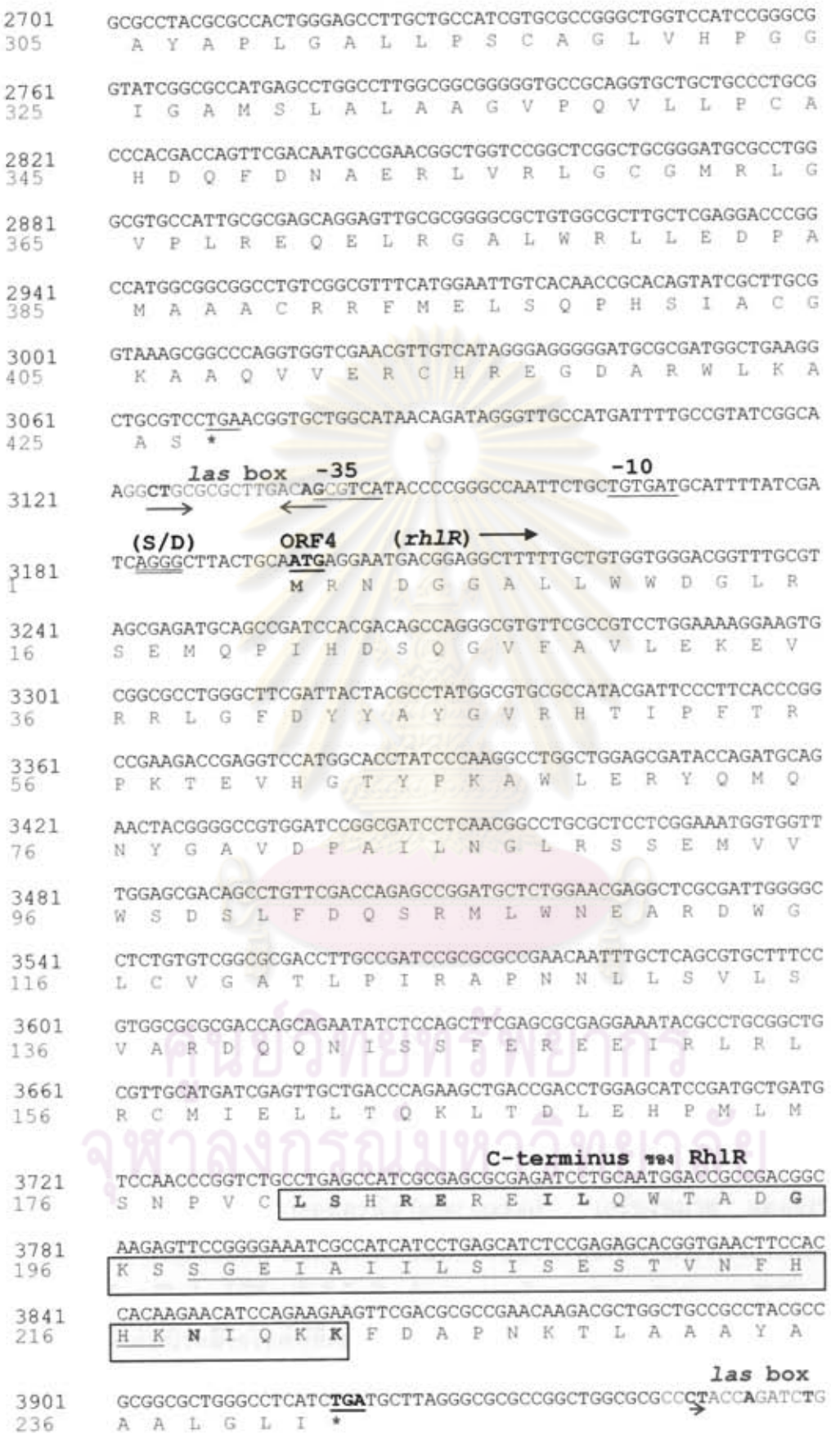
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 pKB261 pBR530 และ pBR123 ที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาเชื่อมต่อกันจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 4,965 bp ตามที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.24 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากนั้นนำไปเทียบหาความคล้ายกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank (ภาคผนวก ค) พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิงได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในรูปที่ 4.24และสามารถนำไปสร้างเป็นแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่4.26 จากรูปจะแสดงบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบและบริเวณที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม



(มีต่อหน้าถัดไป)

```
1381  GCCACCGGCGAATACGAGCAGGCGCGCTTTCACATCGACCAGGTGCTGGCGCTCAACGAT
182     A  T  G  E  Y  E  Q  A  R  A  H  I  D  Q  V  L  A  L  N  D

1441  CGGGGCTACCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGC
202     R  G  Y  L  A  C  L  E  R  I  Q  S  H  V  H  F  I  N  G  S

1501  TGGGACGAATACACCACCGCCGAGGACGCCCGCCAGTTCCGCGACTACCTGCCGCACTGC
222     W  D  E  Y  T  T  A  E  D  A  R  Q  F  R  D  Y  L  P  H  C

1561  AGTTTCTCGCGGGTGGAGGGCACCGGGCATTTCCTCGACCTGGAGTCCAAGCTGGCCGCG
242     S  F  S  R  V  E  G  T  G  H  F  L  D  L  E  S  K  L  A  A

1621  GTACGCGTGCACCGCGCCCTGCTCGAGCACCTGCTGAAGCAACCGGAGCCGCAGCGGGCG
262     V  R  V  H  R  A  L  L  E  H  L  L  K  Q  P  E  P  Q  R  A

1681  GAACGCGCGGCGGGATTCCACGAGATGGCCATCGGCTACGCCTGAACCCTTGACCTGCGA
282     E  R  A  A  G  F  H  E  M  A  I  G  Y  A  *

                                                  (S/D)      ORF3
1741  AGACCCGGCCTGGCCGGGCTTTGCGGTTGCATAACGCACGGAGTAGCCCCATGCACGCCA
1                                                          M  H  A  I

      (rhlB) ⟶
1801  TCCTCATCGCCATCGGCTCGGCCGGCGACGTATTTCCCTTCATCGGCTTGGCCCGGACCC
5       L  I  A  I  G  S  A  G  D  V  A  P  F  I  G  L  A  R  T  L

1861  TGAAATTGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGGTGG
25      K  L  R  G  H  R  V  S  L  C  T  I  P  V  A  R  D  A  V  E

1921  AGCAGCACGGCATCGCGTTCGTCCCGCTGAGCGACGAACTGACCTACCGCCGGACCATGG
45      Q  H  G  I  A  F  V  P  L  S  D  E  L  T  Y  R  R  T  M  G

1981  GCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAAGCCATCGCCG
65      D  P  R  L  W  D  P  K  T  S  F  G  V  L  W  Q  A  I  A  G

2041  GGATGATCGAGCCGGTCTACGAGTACGTCTCGGCGCAGCGCCATGACGACATCGTGGTGG
85      M  I  E  P  V  Y  E  Y  V  S  A  Q  R  H  D  D  I  V  V  V

2101  TCGGCTCGCTCTGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCCTACC
105     G  S  L  W  A  L  G  A  R  I  A  H  E  K  Y  G  I  P  Y  L

2161  TGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCTTGTTGTCGGCGCACCTGCCGCCGGTACACCCCA
125     S  A  Q  V  S  P  S  T  L  L  S  A  H  L  P  P  V  H  P  K

2221  AGTTCAACGTGCCCGAGCAGATGCCGCTGGCGATGCGCAAGCTGCTCTGGCGCTGCATCG
145     F  N  V  P  E  Q  M  P  L  A  M  R  K  L  L  W  R  C  I  E

2281  AGCGCTTCAAGCTGGATCGCACCTGCGCGCCGGAGATCAACGCGGTGCGCCGCAAGGTCG
165     R  F  K  L  D  R  T  C  A  P  E  I  N  A  V  R  R  K  V  G

2341  GCCTGGAGACGCCGGTGAAGCGCATCTTCACCCAATGGATGCATTCGCCGCAGGGCGTGG
185     L  E  T  P  V  K  R  I  F  T  Q  W  M  H  S  P  Q  G  V  V

2401  TCTGCCTGTTCCCGGCCTGGTTCGCGCCGCCCCAGCAGGATTGGCCGCAACCCCTGCACA
205     C  L  F  P  A  W  F  A  P  P  Q  Q  D  W  P  Q  P  L  H  M

2461  TGACCGGCTTCCCGCTGTTCGACGGCAGTATCCCGGGGACCCCGCTCGACGACGAACTGC
225     T  G  F  P  L  F  D  G  S  I  P  G  T  P  L  D  D  E  L  Q

2521  AACGCTTTCTCGATCAGGGCAGCCGGCCGCTGGTGTTCACCCAGGGCTCGACCGAACACC
245     R  A  L  D  Q  G  S  R  P  L  V  F  T  Q  G  S  T  E  H  L

2581  TGCAGGGCGACTTCTACGCCATGGCCCTGCGCGCGCTGGAACGCCTCGGCGCGCGTGGGA
265     Q  G  D  F  Y  A  M  A  L  R  A  L  E  R  L  G  A  R  G  I

2641  TCTTCCTCACCGGCGCCGGCCAGGAACCGCTGCGCGGCTTGCCGAATCACGTGCTGCAGC
285     F  L  T  G  A  G  Q  E  P  L  R  G  L  P  N  H  V  L  Q  R
```

(มีต่อหน้าถัดไป)



(มีต่อหน้าถัดไป)

รูปที่ 4.24 **ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด** pGA396 pKB261 pBR530 **และ** pBR123 **รวมกัน มีขนาด** 4,965 bp **ลูกศรแสดงทิศทางการถอดรหัส ตัวอักษร** M **แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส** (start codon) **เครื่องหมาย** * **แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส** (stop codon) **ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด บริเวณโปรโมเตอร์แสดงด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น และบริเวณ** Shine-Dalgarno (S/D) sequence **แสดงด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้สองเส้น กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดเดียวกันแสดงด้วยตัวอักษรสีเดียวกัน (ตัวอักษรสีน้ำเงินและแดง) กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม บริเวณ** *las* box **แสดงเป็นตัวอักษรสีม่วงอยู่หน้าโปรโมเตอร์**

กรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ทั้ง 5 กรอบที่พบ มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกับกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 และ 4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 411 bp อยู่ตำแหน่งที่ 1-411 แปลงได้เป็น 137 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับ deoxycytidine triphosphate (dCTP) deaminase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas putida* KT2440 (Nelson และคณะ, 2002) เท่ากับ 100% และ 94% ตามลำดับ ทำหน้าที่กระตุ้นการสังเคราะห์ dUTP จาก dCTP ในกระบวนการสังเคราะห์ dUMP เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง thymine nucleotide ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ให้ชื่อ ORF1 ว่า *dcd* เนื่องจาก ORF 1 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ดังนั้นจึงไม่พบส่วนโปรโมเตอร์และส่วนที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence (S/D)

2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 885 bp อยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 838-1722 พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งแสดงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาและขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น กรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้มีความคล้ายกับ rhamnosyl transferase ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ส่วนนอกจากนี้จะมีความคล้ายน้อยลงตามลำดับคือ rhamnosyltransferase chain A ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) 3-hydroxyacyl-Co A-acyl carrier protein transferase ของ *Pseudomonas syringae* pv. Tomato strain DC3000 (Buell และคณะ, 2003) และ acyl-transferase ของ *Pseudomonas putida* KT2440 (Rehm และคณะ, 1998) เท่ากับ 99% 51% และ 42% ตามลำดับให้ชื่อ ORF2 ว่า *rhlA*

บริเวณเหนือ ORF 2 (*rhlA*) ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-GGGAGG-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 12 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับที่ Shine และ Dalgarno (1974) เสนอว่า Shine-Dalgarno sequence คือ บริเวณตำแหน่งเกาะของไรโบโซมมักจะประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์ขนิดพิวรีน 3-10 เบส อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิดประมาณ 10 เบส

นอกจากนี้ยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณ consensus sequence ของโปรโมเตอร์ชนิด σ^{54} บริเวณดังกล่าวประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ "TGGCAT-N_{5-6}-TTGCT" (N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ตัวใดๆ) (Ochsner และคณะ, 1994a, Pearson และคณะ, 1997) โดยใน ORF 2 นี้มีบริเวณ consensus sequence ดังกล่าวประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-TAGCTTTCGA ATTGGCT-3' ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ 583-600 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ซึ่งคล้ายกับที่พบในโปรโมเตอร์ของ *PAK* ใน *P. aeruginosa* *xylCAB* และ *xylS* ในพลาสมิดของ *P. putida* TOL และยีนที่ระบุรหัส carboxypeptidase ของ *Pseudomonas* CPG2

เหนือขึ้นไปจากโปรโมเตอร์พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนกลับกันในลักษณะ dyad symmetry region และสามารถเข้าคู่กันได้เกิดเป็น palindrome คือ 5'-TCCTGTGAAATCTGGC AGTT-3' ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 558-577 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบว่ามี consensus sequence ของ *las* box คือ "NNCT-$[N]_{11-12}$-AGNN" (N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ตัวใดๆ) มักพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่ถูกควบคุมด้วย regulatory protein ที่เกี่ยวข้องกับ quorum sensing system (Devine และคณะ, 1989; Whiteley และคณะ, 1999; Whiteley และ Greenberg, 2001) ซึ่งคล้ายกับ *las* box ของ *lasB* OP1 และ *rhlA* ของ *P. aeruginosa* ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นบริเวณจดจำของ RhlR-PAI-2 complex (RhlR-C_4-HSL) ที่กระตุ้นการทำงานของยีนบริเวณ *las* box ของ *lasB* OP1 และ *rhlA* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACCTGCCAGTTCT GGCAGGT-3' และ 5'-TCCTGTGAAATCTGGCAGTT-3' ตามลำดับ (Pearson และคณะ, 1997)

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1791-3068 มีขนาด 1278 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งแสดงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาและขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น กรดอะมิโนมีความคล้ายกับ rhamnosyltransferase chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ rhamnosyltransferase ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% และ 99% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF3 ว่า *rhlB*

เหนือ ORF 3 (*rhlB*) ขึ้นไปยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-GGAG-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 11 นิวคลีโอไทด์ ไม่พบส่วนที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *rhlB* น่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกับ *rhlA* ซึ่งสอดคล้องกับที่ Ochsner และคณะ (1994b) รายงานไว้ อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกับกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5

4. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 3196-3918 มีขนาด 723 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งแสดงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาและขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น กรดอะมิโนมีความคล้ายกับ transcriptional regulator RhlR ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) regulator protein ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% นอกจากนี้ยังคล้ายกับโปรตีนควบคุมอื่นอีกคือ VSMR ของ *P. aeruginosa* PAO1 (Latifi และคณะ, 1995) และ transcriptional activator CsaR ของ *Pseudomonas chlororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 98% และ 67% ตามลำดับ ให้ชื่อ ORF4 ว่า *rhlR*

บริเวณเหนือ ORF 4 (*rhlR*) ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-AGGG-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 13 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับที่ Shine และ Dalgarno (1974) เสนอดังที่ได้อธิบายแล้วในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-GCGTCA-3' และ 5'-TGTGAT-3' (ดังแสดงในรูปที่ 4.17) อยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 3138 และ 3163 ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับ consensus sequence ของ -35 region และ consensus sequence ของ -10 region ตามลำดับ ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993) ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.25 consensus sequence **ของโปรโมเตอร์** (Lisser **และ** Margalit, 1993) **ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดงเปอร์เซ็นต์การพบเบส**

บริเวณปลายด้าน-C ของลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น "$LSXREX_2ILX_5GX_{22}NX_3K$" (X หมายถึงกรดอะมิโนใดๆ) (Ochsner และคณะ, 1994b) โดยใน ORF นี้มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ดังกล่าวประกอบด้วย LSHREREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKK ซึ่งพบอยู่ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 181-222 โดยตัวอักษรหนาแสดงส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่ควบคุมการ

ถอดรหัส (regulatory protein) นอกจากนี้ภายในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวยังพบบริเวณ DNA-binding helix-turn-helix motif หรือเรียกว่า H-T-H motif อยู่ภายในแสดงด้วยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ซึ่งเป็นบริเวณที่เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ควบคุมอยู่ มักพบในตัวควบคุมแบบที่ต้องอาศัยตัวควบคุมอื่นมากระตุ้นก่อนจึงทำงานได้ (two-component regulatory system) (Henikolf และคณะ, 1989)

พบบริเวณอนุรักษ์ *las* box อยู่ก่อนตำแหน่ง start codon (ATG) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ 5-GGCTGCGCGCTTGACAGCG-3' อยู่ตำแหน่งที่ 3122-3140 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ซึ่งคล้ายกับ *las* box ของ *lasB* OP2 และ *rhlR* ของ *P. aeruginosa* ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นบริเวณจดจำของ LasR-PAI-1 complex (LasR-3O-C_{12}-HSL) ที่กระตุ้นการทำงานของยีนบริเวณ *las* box ของ *lasB* OP2 และ *rhlR* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACCTGCTTTTCTGCTAGC-3' และ 5'-GGCTGCGCGCTTGACAGCG-3' ตามลำดับ (Medina และคณะ, 2003)

5. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 4101-4703 มีขนาด 603 bp พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งแสดงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาและขีดเส้นใต้หนึ่งเส้น พบว่ากรดอะมิโนมีความคล้ายกับ autoinducer synthetase RhlI ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และ Reiser, 1995) เท่ากับ 94% autoinducer synthesis protein RhlI (Stover และคณะ, 2000) และ VSMI ซึ่งเป็น autoinducer synthesis protein (Latifi และคณะ, 1995) ของ *P. aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 93% และ *N*-acyl-homoserine lactone synthase CSaI ของ *Pseudomonas chlororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 50% โปรตีน RhlI นี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer ชนิด butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) ทำงานร่วมกับโปรตีน RhlR ไปกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlAB* ได้เป็น rhamnosyltransferase 1 ไปใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ให้ชื่อ ORF5 ว่า *rhlI*

บริเวณเหนือ ORF 5 (*rhlI*) ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-GGGGA-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 12 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับที่ Shine และ Dalgarno (1974) เสนอดังที่ได้อธิบายแล้วในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-CTGAGA-3' และ 5'-TATCAG-3' (ดังแสดงในรูปที่ 4.24) อยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 4027 และ 4044 ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับ consensus sequence ของ -35 region และ consensus sequence ของ -10 region ตามลำดับ ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993)

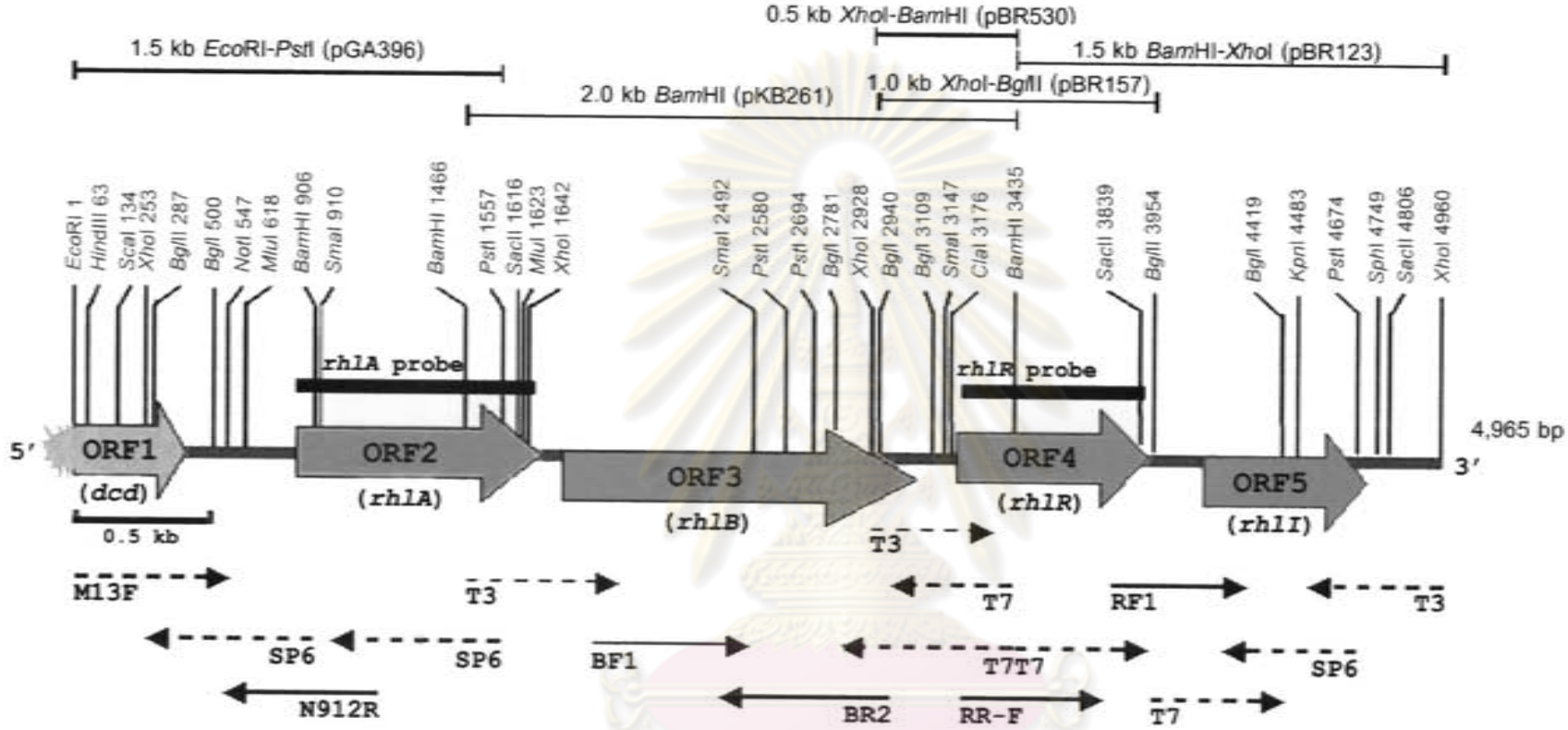
consensus sequence ของ *las* box ของยีนที่ถูกควบคุมด้วย quorum sensing มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้คือ "NNCT[N]$_{11-12}$AGNN" (Whiteley และ Greengerg, 2001) ซึ่งใน ORF 5 พบบริเวณ consensus sequence ของ *las* box อยู่ก่อนตำแหน่ง start codon (ATG) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้เป็น 5'-CCCTACCAGATCTGGCAGGT-3' และพบว่าในตำแหน่งที่ 8 และ 13 ของ consensus sequence นี้เป็น A และ T ตามลำดับ ซึ่งการอนุรักษ์เบสตำแหน่งดังกล่าวจะพบใน *las* box ที่ถูกควบคุมได้ทั้ง regulatory protein LasR และ RhlR ซึ่งเกี่ยวข้องกับ quorum sensing

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิง

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ (ORF)	ยีน	ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนกรดอะมิโน	ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุด	จำนวนกรดอะมิโนของยีนอ้างอิง	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับกรดอะมิโนอ้างอิง	เอกสารอ้างอิง
1	*dcd*	1-411	137	*dcd* ของ *P. aeruginosa* PAO1 ประมวลรหัส deoxycytidine triphosphate deaminase	188	100%	Stover และคณะ, 2000
2	*rhlA*	838-1722	295	*rhlA* ของ *P. aeruginosa* PG201 ประมวลรหัส rhamnosyltransferase chain A	295	100%	Ochsner และคณะ, 1994a
3	*rhlB*	1791-3068	426	*rhlB* ของ *P. aeruginosa* PAO1 ประมวลรหัส rhamnosyltransferase chain B	426	100%	Stover และคณะ, 2000
4	*rhlR*	3196-3882	241	*rhlR* ของ *P. aeruginosa* PAO1 และ PG201 ประมวลรหัส transcriptional regulator RhlR	241	100%	Stover และคณะ, 2000 และ Ochsner และคณะ, 1994b
5	*rhlI*	4101-4703	201	*rhlI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 ประมวลรหัส autoinducer synthetase RhlI	201	94%	Ochsner และ Riser, 1995

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.26 **แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด** pGA396 pKB261 pBR530 **และ** pBR123 **ขนาด** 4,965 bp **แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด** (ORF) **ดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* **และ** *rhlR* **และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ต่างๆ ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ตัวต่างๆ ตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย ⟶ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบเอง**(designed primer) **และ** - - → **เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้** universal primer **เครื่องหมาย** ✸ **แสดง** ORF **ที่ไม่สมบูรณ์**

บทที่ 5
การอภิปรายผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แรมโนลิพิด เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997; Lang และ Wullbrandt, 1999) มีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้ เช่น ใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลแรมโนส ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และใช้ในการบำบัดคราบน้ำมันและสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีผู้สนใจหันมาผลิต แรมโนลิพิดขายในระดับอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากต้นทุนในการผลิตแรมโนลิพิดดังกล่าวมีราคาสูงทำให้ไม่สามารถแข่งขันในทางการตลาดกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ มีผู้วิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนากระบวนการผลิตแรมโนลิพิดให้มีต้นทุนที่ต่ำลงโดยการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก หาได้ง่าย พัฒนาขั้นตอนการสกัดและทำให้แรมโนลิพิดบริสุทธิ์ ตลอดจนคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้แรมโนลิพิดที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูง

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบริเวณอ่าวไทย จ.สมุทรสงคราม (อารีย์ กังฉิน, 2542) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ได้เป็น 29 mN/m เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) ได้พิสูจน์ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าวเป็นแรมโนลิพิดโดยใช้ LC-MS และ IR-spectrum จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 พบว่ามีเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากับ 100% ประกอบกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี (อารีย์ กังฉิน, 2542) จึงสามารถจัดจำแนก *Pseudomonas* sp. A41 เป็นสมาชิกหนึ่งใน *Pseudomonas aeruginosa*

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas aeruginosa* A41 เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับพันธุวิศวกรรม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* และ *rhlR* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. aeruginosa* A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำไปติดตามในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยใช้เทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* นำชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกจากไฮบริไดเซชันโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ต่างๆ จากการทดลองจะได้โคลนทั้งหมด 4 ตัว คือ pBR123 pBR530 pGA396 และ pKB261 ซึ่งมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก 1531 513 1562 และ 1975 bp ตามลำดับ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกได้โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของโคลนนั้น นำ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมาเชื่อมต่อกันจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 4965 bp จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS เพื่อหากรอบอ่านรหัสเปิด และโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรด อะมิโน และเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และหาบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ consensus sequence –35 region และ –10 region ของโปรโมเตอร์ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993) จะสามารถสรุปกรอบอ่านรหัสเปิดได้ทั้งหมด 5 กรอบอ่านรหัสเปิดดังนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1(ORF1) หรือ *dcd* เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่พบมีความคล้ายคลึงกับ deoxycytidine triphosphate deaminase (dCTP deaminase) ใน *P. aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 100% ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสร้าง dUMP เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ thymidine อีกทีหนึ่ง

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือ *rhlA* ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain A ที่ประมวลรหัสโดย *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlA มีขนาด 32.5 กิโลดาลตัน พบอยู่ในเพอริพลาสซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด หรือส่งผ่านสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ให้ rhamnosyltransferase หรือเป็นตัวช่วยให้โปรตีน RhlB เสถียรคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane (Ochsner และคณะ, 1994a)

โปรโมเตอร์แบบ σ^{54} เป็นโปรโมเตอร์ที่มีบริเวณจดจำของ σ^{54} factor ของ RNA polymerase และต้องการ transcriptional activator หรือ regulatory protein มากระตุ้นบริเวณโปรโมเตอร์ให้เกิดการถอดรหัส (Collado-Vides และคณะ, 1991; Woods และ Reid, 1993; Morett และSegovia, 1993) โปรโมเตอร์ของ *rhlA* ของสายพันธุ์ A41 เป็นแบบ σ^{54} เช่นกัน เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ของโปรโมเตอร์แบบ σ^{54} ที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ "TGGCA T-N_{5-6}-TTGCT" (N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ตัวใดๆ) อยู่เหนือยีน *rhlA* ตัวอย่างยีนที่มีโปรโมเตอร์แบบ σ^{54} ได้แก่ pilin gene (*PAK*) ใน *P. aeruginosa* *xylCAB* และ *xylS* ที่อยู่บนพลาสมิดของ *P. putida* TOL ยีนที่ระบุรหัสโปรตีน carboxypeptidase ของ *Pseudomonas* CPG2 (Deretic และคณะ, 1987, 1989) และ *rhlA* ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

นอกจากนี้ยังพบ *las* box ซึ่งมีลักษณะเป็น palindrome อยู่เหนือยีน Ochsner และคณะ (1994a) ได้ศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์ *rhlA* ใน *P. aeruginosa* PG201 โดยเชื่อมโปรโมเตอร์เข้ากับ *lacZ* เพื่อใช้เป็น reporter gene พบว่าโปรโมเตอร์จะทำงานได้ต้องอาศัย regulatory protein RhlR แต่ถ้าขาดส่วนที่มีลักษณะเป็น palindrome *rhlA* ก็ไม่สามารถทำงานได้เช่นกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าบริเวณ palindrome เป็นส่วนขัดขวางการทำงานของ *rhlA* ต้องอาศัย regulatory protein RhlR เข้าจับบริเวณ palindrome ดังกล่าวก่อนยีนจึงทำงาน Pearson และคณะ (1997) ศึกษา RhlR-binding site นี้พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน consensus sequence ของ *las* box ของ *lasB* OP1 ซึ่งถูกควบคุมด้วย regulatory protein RhlR บริเวณ *las* box ของ ORF-2 (*rhlA*) ของสายพันธุ์ A41 มี consensus sequence คล้าย *las* box ของ *lasB* OP1 และ *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ORF-2 (*rhlA*) จะถูกควบคุมด้วย regulatory protein RhlR บริเวณ *las* box เช่นเดียวกัน

บริเวณปลายด้าน-N ของลำดับกรดอะมิโนของ RhlA พบว่ามีความคล้ายกับ Signal peptide ที่พบในแบคทีเรียติดสีแกรมลบ(Pugsley, 1993) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน RhlA อาจถูกส่งออกไปที่เพอริพลาสซึมสอดคล้องกับรายงานในลำดับกรดอะมิโนของ RhlA ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain B (RhlB) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlB* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlB มีขนาด 47 กิโลดาลตัน (kDa) ทำหน้าที่เป็น catalytic protein ของเอนไซม์ rhamnosyl- transferase 1 ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการส่งผ่านโมเลกุลแรมโนสจาก TDP-L-rhamnose ไปยัง β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate อย่างจำเพาะได้เป็น L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate หรือ rhamnolipid 1 ในกระบวนการผลิตแรมโนลิพิด ทั้งนี้ได้พิสูจน์ใน *E. coli* แล้วว่าเพียง *rhlB* ยีนเดียวก็สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น rhamnosyl transferase ได้ แต่ก็ต้องการ RhlA เพื่อให้เอนไซม์เกิดความเสถียรและคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane ส่วน RhlB จะฝังตัวอยู่ในเมมเบรนโดยใช้ส่วนปลายด้าน-N เป็นตัวยึดเหนี่ยวกับเมมเบรนไว้และวางตัวข้ามเมมเบรนโดยมีส่วน domain เปิดออกทั้งสองข้าง (Ochsner และคณะ, 1994a)

rhlB เรียงตัวต่อจาก *rhlA* ไม่พบส่วนโปรโมเตอร์ *rhlB* ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *rhlB* น่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกับ *rhlA* สอดคล้องกับการรายงานของ Ochsner และคณะ 1994a) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลาย UO299 ที่ไม่มีการทำงานของ *rhlA* จะไม่พบทั้งโปรตีน RhlA และ RhlB ที่มีขนาด 32 และ 47 กิโลดาลตันตามลำดับ แต่ในสายพันธุ์กลาย UO287 (*rhlB*) จะพบเพียงโปรตีน RhlA ขนาด 32 กิโลดาลตันเท่านั้น

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) หรือ *rhlR* ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับ transcriptional regulator RhlR ที่ประมวลรหัสโดย *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlR มีขนาด 28 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น *rhlAB* promoter ซึ่งอยู่เหนือขึ้นไปจากยีน *rhlR* 2.5 กิโลเบส ให้เกิดการถอดรหัส (transcriptional activator) (Ochsner และคณะ 1994a, 1994b) นอกจากนี้ Ochsner (1994b) ยังกล่าวว่าโปรตีน RhlR เป็นตัวควบคุมแบบ pleiotropic regulator คือมีผลควบคุมการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ได้มากกว่าหนึ่งโปรโมเตอร์

บริเวณปลายด้าน-C ของลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน " $LSXREX_2ILX_5GX_{22}NX_3K$" (X หมายถึงกรดอะมิโนใดๆ) นอกจากนี้ภายในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวยังพบ helix-turn-helix motif (H-T-H motif) ซึ่งใช้ในการเข้าจับโปรโมเตอร์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA-binding) (Ochsner และคณะ 1994b) regulatory protein ที่มีบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวที่ปลายด้าน-C มักจะพบในกลุ่ม regulatory protein ที่อาศัยตัวควบคุมอื่นอีกหนึ่งชนิดจึงทำงานได้ (two-component regulatory system) (Henikolf และคณะ, 1989) กลไกการควบคุมแบบนี้มักเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรีย (Adhya และ Garges, 1990; Bourret และคณะ, 1991; Stock และคณะ, 1989 และ Stock และคณะ, 1990) เช่น chemotaxis, osmosensitivity ความรุนแรงของการก่อโรค การเคลื่อนที่ ตลอดจนการผลิตสาร secondary metabolite ภายใต้ภาวะที่แน่นอนเป็นต้น การผลิตแรมโนลิพิดของ *P. aeruginosa* A41 และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเกิดขึ้นในระยะ late exponential และระยะ stationary phase ในภาวะที่ให้ไนโตรเจนจำกัด (อารีย์ กังฉิน, 2542; นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, 2545; Wagner และคณะ, 1984) ดังนั้นจึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าการผลิตแรมโนลิพิดถูกควบคุมโดยปัจจัยต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์แรมโนลิพิดจะเกี่ยวข้องกับ two-component regulatory system ในปี 2003 Medina และคณะ พบว่าโปรตีน RhlR ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ *rhlAB*

promoter ได้ด้วยตัวมันเอง กลับไปยับยั้งการทำงานของ *rhlAB* promoter และการแสดงออกของยีนตัวมันเอง แต่เมื่อโปรตีน RhlR พันธะกับ butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่งได้เป็น RhlR-PAI-2 complex กลับสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของ โอเพอรอน *rhlAB* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน RhlR เป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวกดการทำงานของ *rhlAB* promoter ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเร็วในการพันธะกับ PAI-2 และกลไกในการควบคุมในระดับพันธุศาสตร์ซึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจ Lamb และคณะ (2003) ได้พิสูจน์ว่าบริเวณปลายด้าน-N ของโปรตีน RhlR เป็นส่วนที่ autoinducer เข้าจับและสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของดีเอ็นเอเป้าหมาย (*rhlAB* promoter) ได้โดยใช้ปลายด้าน-C ที่มี DNA-binding helix-turn-helix motif ตัวอย่างของ regulatory protein ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ RhlR ได้แก่ LuxR และ LasR ซึ่งรายงานว่าต้องรวมตัวกับ autoinducer ก่อนจึงกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิด bioluminescence และการสังเคราะห์ elastase ใน *V. fischeri* และ *P. aeruginosa* ได้ตามลำดับ

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) หรือ *rhlI* ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น autoinducer synthetase (RhlI) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และ Reiser, 1995) เท่ากับ 94% และ autoinducer synthesis protein RhlI ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 93% โปรตีน RhlI มีขนาด 22 กิโลดาลตัน (kDa) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer ชนิด butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ทำงานร่วมกับโปรตีน RhlR ไปกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlAB* โดย เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ butanoyl-homoserine lactone (Pearson และคณะ, 1995) ที่สังเคราะห์จากโปรตีน RhlI ก็จะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจึงเข้าจับกับโปรตีน RhlR ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัส (Ochsner และคณะ, 1994b) สารประกอบ RhlR-PAI-2 complex นี้จะเข้าจับบริเวณ *las* box เหนือยีน *rhlAB* ทำให้เกิดการถอดรหัสได้เป็น rhamnosyltransferase 1 ใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด (Pearson และคณะ, 1997) นอกจากนี้บริเวณเหนือยีน *rhlI* เองยังพบ *las* box ชนิดที่มีการอนุรักษ์นิวคลีโอไทด์ที่ 8A และ 13T แสดงให้เห็นว่า *rhlI* เองก็ถูกควบคุมการแสดงออกด้วย LasR และ RhlR อีกทีหนึ่ง ซึ่งต่างกับ *las* box ของ *lasI* ที่ระบุรหัส autoinducer synthetase (LasI) ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer PAI-1 (N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone) ที่ไม่มีการอนุรักษ์นิวคลีโอไทด์ 8A และ 13T ของ *las* box ดังนั้นจึงถูกควบคุมด้วย LasR เท่านั้น (Whiteley และ Greenberg, 2001)

จากการศึกษาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* A41 จะเห็นว่า *rhlA* *rhlB* *rhlR* และ *rhlI* มีการเรียงตัวต่อกันตามลำดับ โดย *rhlA* และ *rhlB* ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันอยู่ในโอเพอรอนเดียวกัน ส่วน *rhlR* และ *rhlI* มีโปรโมเตอร์แยกต่างหาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ochsner และ Reiser (1995)

นอกจากนี้บริเวณเหนือโปรโมเตอร์ของทั้ง *rhlAB* *rhlR* และ *rhlI* จะพบ *las* box ที่มีลักษณะเป็น palindrome ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวจะถูกควบคุมด้วย regulatory protein ที่เกี่ยวข้องกับ quorum sensing system สอดคล้องกับที่ Pesci และคณะ (1997) ได้รายงานถึงกลไกการควบคุมของ *las* และ *rhl* quorum sensing ใน *P. aeruginosa* PAO1 ว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
ข้อสรุป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas aeruginosa* A41 เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับพันธุวิศวกรรม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* และ *rhlR* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. aeruginosa* A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำไปติดตามในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยใช้เทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* นำชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกจากไฮบริไดเซชันโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ต่างๆ จากการทดลองจะได้โคลนทั้งหมด 4 ตัว คือ pBR123 pBR530 pGA396 และ pKB261 ซึ่งมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก 1531 513 1562 และ 1975 bp ตามลำดับ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกได้โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของโคลนนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาประกอบรวมกันจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 4965 bp และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS เพื่อหากรอบอ่านรหัสเปิด และโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรด อะมิโน และเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และหาบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ consensus sequence –35 region และ –10 region ของโปรโมเตอร์ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993) จะสามารถสรุปกรอบอ่านรหัสเปิดได้ทั้งหมด 5 กรอบอ่านรหัสเปิดดังนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) หรือ *dcd* เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่พบมีความคล้ายคลึงกับ deoxycytidine triphosphate deaminase (dCTP deaminase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสร้าง dUMP เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ thymidine อีกทีหนึ่ง

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือ *rhlA* ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain A ที่ประมวลรหัสโดย *rhlA* โปรตีน RhlA มีขนาด 32.5 กิโลดาลตัน พบอยู่ในเพอริพลาสซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดหรือส่งผ่านสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ให้ rhamnosyltransferase หรือเป็นตัวช่วยให้โปรตีน RhlB เสถียรคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane (Ochsner และคณะ, 1994a)

นอกจากนี้ ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของโปรโมเตอร์แบบ σ^{54} ที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ "TGGCA T-N_{5-6}-TTGCT" (N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ตัวใดๆ) และพบ *las* box ซึ่งมีลักษณะเป็น

palindrome อยู่เหนือยีน *rhlA* ดังนั้นแสดงว่าการทำงานของโปรโมเตอร์ต้องอาศัย transcriptional activator หรือ regulatory protein ซึ่งในที่นี้คือ regulatory protein RhlR มากระตุ้นบริเวณโปรโมเตอร์เพื่อให้เกิดการถอดรหัส (Collado-Vides และคณะ, 1991; Woods และ Reid, 1993; Morett และSegovia; 1993 Ochsner และคณะ, 1994a)

บริเวณปลายด้าน-N ของลำดับกรดอะมิโนของ RhlA พบว่ามีความคล้ายกับ Signal peptide ที่พบในแบคทีเรียติดสีแกรมลบ(Pugsley, 1993) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน RhlA อาจถูกส่งออกไปที่เพอริพลาสซึมสอดคล้องกับรายงานในลำดับกรดอะมิโนของ RhlA ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain B (RhlB) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlB* ซึ่งเรียงตัวต่อจาก *rhlA* ไม่พบส่วนโปรโมเตอร์ *rhlB* ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *rhlB* น่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกับ *rhlA* สอดคล้องกับการรายงานของ Ochsner และคณะ 1994a) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลาย UO299 ที่ไม่มีการทำงานของ *rhlA* จะไม่พบทั้งโปรตีน RhlA และ RhlB ที่มีขนาด 32 และ 47 กิโลดาลตันตามลำดับ แต่ในสายพันธุ์กลาย UO287 (*rhlB*) จะพบเพียงโปรตีน RhlA ขนาด 32 กิโลดาลตันเท่านั้น

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) หรือ *rhlR* ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับ transcriptional regulator RhlR ที่ประมวลรหัสโดย *rhlR*

บริเวณปลายด้าน-C ของลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน " $LSXREX_2ILX_5GX_{22}NX_3K$" (X หมายถึงกรดอะมิโนใดๆ) นอกจากนี้ภายในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวยังพบ helix-turn-helix motif (H-T-H motif) ซึ่งใช้ในการเข้าจับโปรโมเตอร์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA-binding) (Ochsner และคณะ 1994b) regulatory protein ที่มีบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวที่ปลายด้าน-C มักจะพบในกลุ่ม regulatory protein ที่อาศัยตัวควบคุมอื่นอีกหนึ่งชนิดจึงทำงานได้ (two-component regulatory system) (Henikolf และคณะ, 1989) กลไกการควบคุมแบบนี้มักเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรีย (Adhya และ Garges, 1990; Bourret และคณะ, 1991; Stock และคณะ, 1989 และ Stock และคณะ, 1990) เช่น chemotaxis, osmosensitivity ความรุนแรงของการก่อโรค การเคลื่อนที่ ตลอดจนการผลิตสาร secondary metabolite ภายใต้ภาวะที่แน่นอนเป็นต้น การผลิตแรมโนลิพิดของ *P. aeruginosa* A41 และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเกิดขึ้นในระยะ late exponential และระยะ stationary phase ในภาวะที่ให้

ไนโตรเจนจำกัด (อารีย์ กังฉิน, 2542; นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, 2545; Wagner และคณะ, 1984) ดังนั้นจึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าการผลิตแรมโนลิพิดถูกควบคุมโดยปัจจัยต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์แรมโนลิพิดจะเกี่ยวข้องกับ two-component regulatory system ซึ่งในที่นี้ก็คือ RhlR และ butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่ง ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยใช้ enzyme autoindecer synthetase ที่ระบุรหัสโดย *rhlI* โปรตีน RhlR ต้องรวมตัวกับ autoinducer synthetase ก่อนจึงจะสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของดีเอ็นเอเป้าหมาย (rhlAB promoter) (Lamb และคณะ, 2003)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) หรือ *rhlI* ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น autoinducer synthetase (RhlI) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlI* เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer ชนิด butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ทำงานร่วมกับโปรตีน RhlR ไปกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlAB* (Ochsner และคณะ, 1994b) สารประกอบ RhlR-PAI-2 complex นี้จะเข้าจับบริเวณ *las* box เหนือยีน *rhlAB* ทำให้เกิดการถอดรหัสได้เป็น rhamnosyltransferase 1 ใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด (Pearson และคณะ, 1997)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7
ข้อเสนอแนะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1.จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Rhamnosyltransferase I ใน *P. aeruginosa* A41 ทำให้ทราบว่า ยีน *rhlA* และ *rhlB* ถูกควบคุมด้วยโปรตีน RhlR และ autoinducer synthetase ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *rhlAB* ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มปริมาณของแรมโนลิพิดอาจปรับปรุงหรือเปลี่ยนโปรโมเตอร์ของยีน *rhlAB* ให้เป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

2.ทำการศึกษากลไกการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารแรมโนลิพิดบริเวณอื่นอีก เพื่อนำไปสู่การศึกษาการชักนำให้มีผลผลิตโดยรวมสูงขึ้น

3.การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร เพื่อนำไปสู่การสังเคราะห์สารโดยวิธีอื่น ๆอีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ. 2545. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อารีย์ กังฉิน. 2542. การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F. and Manresa, A. 2001. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir. 17: 1367-1371.

Achenbach, L.A., Carey, J. and Madigan, M.T. 2001. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2922-2926.

Adhya, S., and Garges, S. 1990. Positive control. Minireview. J. Biol. Chem. 265: 10797-10800.

Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1999. Current protocols in molecular biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.

Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A. and Khanna, P. 1996. Kenetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial waste. Biotechnol Lett. 18: 263 – 268.

Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. 53: 495-508.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Beal, R. and Betts, W.B. 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol. 89: 158-168.

Bergstrom, S., Theorell, H. and Davide, H. 1946. On a metabolic product of *Ps Pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. Ark Kem Mineral Geol 23A: 1-12.

Bertrand, J.C., Bonin, P., Goutex, M. and Mille, G. 1994. The potential application of biosurfactant in combating hydrocarbon pollution in marine environments. Res. Microbiol. 145: 53-56.

Bloomberg, G. 1991. Designing proteins as emulsifiers. Lebensmitteltechnologie. 24: 130-131.

Bourret, R.B., Borkovich, K.A. and Simon, M.I. 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. 60: 401-441.

Brown, M.J. 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. Int. J. Cosmet. Sci. 13: 61-64.

Buell,C.R., Joardar,V., Lindeberg,M., Selengut,J., Paulsen,I.T., Gwinn,M.L., Dodson,R.J., Deboy,R.T., Durkin,A.S., Kolonay,J.F., Madupu,R., Daugherty,S., Brinkac,L., Beanan,M.J., Haft,D.H., Nelson,W.C., Davidsen,T., Zafar,N., Zhou,L., Liu,J., Yuan,Q., Khouri,H., Fedorova,N., Tran,B., Russell,D., Berry,K., Utterback,T., Van Aken,S.E., Feldblyum,T.V., D'Ascenzo,M., Deng,W.L., Ramos,A.R., Alfano,J.R., Cartinhour,S., Chatterjee,A.K., Delaney,T.P., Lazarowitz,S.G., Martin,G.B., Schneider,D.J., Tang,X., Bender,C.L., White,O., Fraser,C.M. and Collmer,A. 2003. The complete genome sequence of the arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 10181-10186.

Burger, M.M., Glaser. L. and Burton. R.M. 1963. The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 238: 2595-2602.

Cameotra, S.S. and Makkar, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 50: 520-529.

Collado-Vides, J., Magasanik, B. and Gralla, J.D. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 55: 371-394.

Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980. Surface-active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.

Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M. and Syldatk, C. 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rape seed oil without consumption of lactose. Biotechnol. Lett. 20: 805-807.

Deretic, V., Gill, J.F. and Chakrabarty, A.M. 1987. BioTechnology. 5: 469-477.

Deretic, V., Konyecsni, W.M., Nohr, C.D., Martin, D.W. and Hibler, N.S. 1989. BioTechnology. 7: 1249-1254.

Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:47-64.

Devine, J.H., Shadel, G.S. and Baldwin, T.O. 1989. Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC 7744. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5688-5692.

Edwards, J.R. and Hayashi, J.A. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 111: 415-421.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208-217.

Finnerty, W.R. and Singer, M.E. 1985. Membranes of hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: Ghosh BK (ed) Organization of prokaryotic cell membranes, vol 3. CRC Press, Boca Raton,Fla., pp 1-44.

Fuqua, W.C. and Greenberg, E.P. 1998. Self perception in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. Curr Opin Microbiol. 1:183-189.

Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum-sensing. Annu. Rev. Genet. 35: 439-468.

Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176: 269-275.

Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 50: 727-751.

Gambello, M.J. and Iglewski, B.H. 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene: a transcriptional activator of elastase expression. J. Bacteriol. 173: 3000-3009.

Gambello, M.J., Kaye, S. and Iglewski, B.H. 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect. Immun. 61: 1180-1184.

Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: growth on insoluble substrates. In N. Kosaric (ed), Biosurfactant : production, properties, applications, pp. 169-286. New York: Marcel Dekker.

Gilman, L.B. 1993. A review of instruments for static and dynamicsurface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmbtt and Scientific promotion Co., Ltd, at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1957. Rhamnose and rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 224: 91-105.

Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1958. Studies on biosynthesis of L-rhamnose. J. Biol. Chem. 233: 287-291.

Hayes, M.E., Nestaas, E. and Hrebenar, K.R. 1986. Microbial surfactants. Chemtech. 4: 239-243.

Henikolf, S., Wallace, J.C. and Brown, J.P. 1989. Finding protein similarities with nucleotide sequence databases. Methods Enzymol. 183: 111-132.

Hirayama, T. and Kato, I. 1982. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS. Lett. 139: 81-85.

Hisatuska, K., Nakahare, T., Sano, N. and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and function in hydrocarbon fermentation. Agr. Biol. Chem. 35: 686-692.

Ishigami. 1997. Characterization of biosurfactants. In: Esumi, L. and Ueno, M. (ed) Structure-performance relationships in surfactants. New York: Dekker: pp 197-226.

Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahara, H., Motomiya, T. and Yamaguchi, M. 1988a. Liposome containing rhamnolipids. Japanese Patent Kokai. 63-182, 029.

Ishigami, Y., Gama, Y., Uji, Y., Nasui, K. and Shibayama, Y. 1988b. Japanese Patent Kokai. 63-77, 535.

Itoh, A., Honda, H., Tomato, F. and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. J. Antibiot. 24: 855-859.

Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71: 4124-4126. Cited in Desai, J. D. and Banat, I.M. 1997. in Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.

Kaweshima, H., Nakahara, T., Oogaki, M. and Tabuchi, T. 1983. Extracellular production of a mannosylerythritol lipid of a mutant of *Candida* sp. From *n*-alkane and triglycerides. J. Ferment. Technol. 61: 143-149.

Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Makane, T., Kanmisawa, C. and Nakahora, T. 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactant produced be *Candida antarctica*. J. Biotechnol. 29: 91-96.

Kleckner, V. and Kosaric, N. 1993. Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric N (ed) Biosurfactants, production, properties, applications. Surfactant science series: vol 48. New York: Dekker. pp. 373-389.

Kosaric, N. 1993. Biosurfactant *Production *Property *Application. Surfactant Science Series: vol 48. New York: Marcel Dekker.

Kosaric, N., Cairns, W. L., Gray, N. C. C., Stechey, D. and Wood, J. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. J. Am Oil Chem. Soc. 61: 1735-1743.

Lamb, J.R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V.E. and Iglewski, B.H. 2003. Functional domains of the RhlR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 185: 7129-7139.

Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipid-biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol Biotechnol. 51: 22-32.

Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. and Lazdunski. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. Mol. Microbiol. 21: 1137-1146.

Latifi,A., Winson,M.K., Foglino,M., Bycroft,B.W., Stewart,G.S., Lazdunski,A. and Williams,P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol. Microbiol. 17: 333-343.

Leenhouts, J.M., Van der Winingard, P.W.J., De Kroon, A.I.P.M. and Der Kruijff, B. 1995. Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. FEBS Lett. 370: 361-369.

Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F. and Pickenhagen, W. 1989. Microbially produce rhamnolipid as a source of rhamnose. Biotechnol. Bioeng. 33: 365-368.

Lisser, S. and Margalit, H. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. Nucleic acids Res. 21(7): 1507-1516.

Maier, R.M. and Soberon-Chavez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633.

Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1999a. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources-a review. J. Surf. Det. 2: 237-241.

Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1999b. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by Bacillus subtilis at thermophilic conditions. J. Surf. Det. 2: 371-376.

Matsuyama, T., Kaneda, L., Ishizuka, I., Toida, T. and Yano, I. 1990. Surface-active novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 174: 1769-1776.

Medina, G., Juarez, K., Balderrama, B. and Soberon-Chavez. G. 2003. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. J. Bacteriol. 185: 5976-5983.

Medina, G., Juarez, K., Diaz, R. And Soberon-Chavez, G. 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. Microbiology. 149: 3073-3081.

Mercade, M.E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andres, C. and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresource Technol. 43: 1 – 6

Morett , E. and Segovia, L. 1993. J. Bacteriol. 175: 6067-6074.

Mueller, J.G., Devereux, R., Santavy, D.L., Lantz, S.E., Willis, S.G. and Pritchard, P.H. 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. Antonie van Lecuwenhoek. 71: 329-343.

Mulligan, C.N., Chow, T.Y.K. and Gibbs, B.F. 1989. Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 486-489.

Nelson,K., Paulsen,I., Weinel,C., Dodson,R., Hilbert,H., Fouts,D., Gill,S., Pop,M., Martins Dos Santos,V., Holmes,M., Brinkac,L., Beanan,M., DeBoy,R., Daugherty,S., Kolonay,J., Madupu,R., Nelson,W., White,O., Peterson,J., Khouri,H., Hance,I., Lee,P., Holtzapple,E., Scanlan,D., Tran,K., Moazzez,A., Utterback,T., Rizzo,M., Lee,K., Kosack,D., Moestl,D., Wedler,H., Lauber,J., Hoheisel,J., Straetz,M.,

im,S., Kiewitz,C., Eisen,J., Timmis,K., Duesterhoft,A., Tummler,B. and Fraser,C. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440. Environ. Microbiol. 4: 799-808.

Nielsen, T.H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christophersen, C., Givskov, M. and Sørensen, J. 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3416-3423.

Ochsner, U.A., Fiechter,A. and Reiser,J. 1994a. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J. Biol. Chem. 269: 19787-19795.

Ochsner, U.A., Hembach, T. and Fiechter, A. 1996. Production of rhamnolipid biosurfactant. In Fiechter A. (ed) Advances in biochemical engineering biotechnology, vol 53. Springer, Berlim Heidelberg. New York. Pp. 89-118.

Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A. and Reiser, J. 1994b. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 176:2044-2054.

Ochsner,U.A. and Reiser,J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 6424-6428.

Ochsner, U.A., Reiser, J., Fiechter, A. and Witholt, B. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. Appl. Environ. Microbiol. 61:3503-3506.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 47: 209-214.

Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell

communication. Science. 260: 1127-1130.

Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997a. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. Appl Microbiol. 25: 91-94.

Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997b. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. J. Basic. Microbiol. 37: 281-286.

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 197-201.

Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, P. 1995. A second *N* acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 1490-1494.

Pearson, J.P., Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. J. Bacteriol. 179: 5756-5767.

Pesci, E.C., Pearson, J.P. Seed, P.C. and Iglewski, B.H. 1997. Regulation of *las* and *rhlI* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179: 3127-3132.

Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108.

Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S. and Soberon-Chavez, G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol. 40: 708-718.

Rehm,B.H., Kruger,N. and Steinbuchel, A. 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. 1998. J. Biol. Chem. 273: 24044-24051.

Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R. and Cole, P.J. 1990.

Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. Biochemica et Biophysica Acta. 1045: 189-193.

Rosenberg, E. 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. Trends. Biotechnol. 11: 419-424.

Rosenberg, E. and Ron, E.Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 154-162.

Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1995. The bacterial enigma: cracking the code of cell-cell communication. Mol. Microbiol. 16: 615-624.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 12: 370-375.

Seed, P.C., Passador, L. and Iglewski, B.H. 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. J. Bacteriol. 177: 654-659.

Shabtai, Y. and Gutnick, D.L. 1986. Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide. Appl. Environ. Microbiol. 52: 146-151.

Shine, J. and Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 1342-1346.

Stanghellini, M.E., Rasmussen, S.L., Kim, D.H. and Rorabaugh, P.A. 1996. Efficacy of nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. Plant. Dis. 80: 422-428.

Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M. 1989. Protein phophorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53: 450-490.

Stock, J.B., Stock, A.M. and Nottonen, J.M. 1990. Signal transduction in bacteria.

Nature (London). 344: 395-400.

Stover,C.K., Pham,X.-Q.T., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrener,P., Hickey,M.J., Brinkman,F.S.L., Hufnagle,W.O., Kowalik,D.J., Lagrou,M., Garber,R.L., Goltry,L., Tolentino,E., Westbrock-Wadman,S., Yuan,Y., Brody,L.L., Coulter,S.N., Folger,K.R., Kas,A., Larbig,K., Lim,R.M., Smith,K.A., Spencer,D.H., Wong,G.K.-S., Wu,Z. and Paulsen,I.T. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 406: 959-964.

Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Witte, L. 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkane. Z. Naturforsch. 40: 51-60.

Tahzibi, A., Kamal, F. and Assadi, M. M. 2004. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. Iran. Biomed. J. 8: 25-31.

Toder, D.S., Gambello, M.J. and Iglewski, B.H. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA; a second elastase gene under transcriptional control of *lasR*. Mol. Microbiol. 5: 2003-2010.

Volkering, F., Breure, A.M. and Rulkens, W.H. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation 8: 401-417.

Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M. and Vater, J., 1997. Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 44-49.

Wagner, F., Kim, J.S., Lang, S., Li, Z.Y., Mawede, G., Matulovic, U., Ristau, E. and Syldatk, C. 1984. Production of surface active compounds by resting and immobilized microbial cells. p. 1-8.

Whiteley, M. and Greenberg, E.P. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. 183: 5529-5534.

Whiteley, M., Lee, K.M. and Greenberg, E.P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natt. Acad. Sci. USA. 96: 13904-13909.

Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 202-209.

Woods, D.R. and Reid, S.J. 1993. FEMS Microbiol. Rev. 11: 273-284.

Yamagushi, M., Sato, A. and Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. Chem. Ind. 4: 741-742.

Zhang,Z. and Pierson,L.S. 2001. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4305-4315.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (trytone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** 2YT (2YT broth)

ทริปโตน (trytone)	160	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. **กลีเซอรอล**

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. **สารปฏิชีวนะ**

แอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มก./น้ำ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ –20°ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 1 เดือน

3. **ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย** QIAprep Spin Miniprep Kit

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE (concentrate)

Buffer EB

Rnase A

Collection tube

QIAprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม Rnase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

4. **ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล** QIAquick® Gel Extraction kit

ประกอบด้วย

Buffer QG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Buffer PE (concentrate)

Buffer EB

Collection tube

QIAquick Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลให้เติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE ทำการสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

5. **สารละลาย 10%SDS**

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60°ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

6. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

7. Neutralization buffer

Trismabase	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

8. **สารละลาย 20XSSC**

โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)	0.3	โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

9. **สารละลาย** 2XSSC

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

10. **สารละลาย** 2XSSC/0.1% SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

11. **สารละลาย** 0.5XSSC/0.1% SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

12. **ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ** DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1.	DIG-High Prime, 5Xconc.
หลอดหมายเลข 2.	DIG-labeled control DNA 5 µg/ml
หลอดหมายเลข 3.	DNA dilution buffer
หลอดหมายเลข 4.	Anti-Digoxygenin-AP Conjugate 750 U/ml
หลอดหมายเลข 5.	NBT/BCIP, 50X conc.
ขวดหมายเลข 6.	Blocking solution, 10X conc.
ขวดหมายเลข 7.	DIG Easy Hyb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37°C)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

Detection buffer

Trismabase	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

13. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

14. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

15. **บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0**

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

16. **บัฟเฟอร์** 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

17. **สารละลาย** CTAB/NaCl (10%CTAB **ใน** 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. **สารละลายฟีนอล** (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 °ซ จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน ดูชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

19. **สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

20. **สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

21. **สารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด**

สารละลาย I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	25	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.2 มล. เข้ากับน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 8.8 มล. แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 1.0 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตทเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. กับกรดอะซีติกเข้มข้นปริมาตร 11.50 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

22. Loading dye

Bromphenolblue	0.025%
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ

23. **สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์** TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

24. **สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น** 3 **โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ** 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

25. **สารละลายโปรตีเนสเค** (proteinaseK) **ความเข้มข้น** 20 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ

26. **สารละลาย** RNase A **เข้มข้น** 10 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ

27. **สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ในหลอดปิดสนิทและมืด

28. **สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์**

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

29. **สารละลายผสม dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว)**

ผสม dNTP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรสารละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

30. **ถุงไดแอลิซิสสำหรับทำ** Electroelution

แช่ถุงไดแอลิซิสที่ตัดให้ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ในสารละลาย 3% โซเดียมไบคาร์บอเนท ใน 1 mM EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างถุงไดแอลิซิสด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ย้ายถุงไดแอลิซิสไปแช่ในสารละลาย 1 mM EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาทีอีกครั้ง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบความเหมือนและหาบริเวณอนุรักษ์โดยโปรแกรม BlastN

1. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยโปรแกรม BlastN

Query หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ *P. aeruginosa* A41

Sbjct หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ *P. aeruginosa* PAO1

gi|9946537|gb|AE004501.1| *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, section 62 of 529 of the complete genome Length = 10832

Score = 2835 bits (1430), Expect = 0.0
Identities = 1430/1430 (100%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1    ggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggatgaagggagcttgctcctggattcagcggc 60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 8949 ggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggatgaagggagcttgctcctggattcagcggc 9008

Query: 61   ggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtgggggataacgtccggaaacggg 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9009 ggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtgggggataacgtccggaaacggg 9068

Query: 121  cgctaataccgcatacgtcctgagggagaaagtgggggatcttcggacctcacgctatca 180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9069 cgctaataccgcatacgtcctgagggagaaagtgggggatcttcggacctcacgctatca 9128

Query: 181  gatgagcctaggtcggattagctagttggtggggtaaaggcctaccaaggcgacgatccg 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9129 gatgagcctaggtcggattagctagttggtggggtaaaggcctaccaaggcgacgatccg 9188

Query: 241  taactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacggtccagactcctacg 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9189 taactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacggtccagactcctacg 9248

Query: 301  ggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtg 360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9249 ggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtg 9308

Query: 361  tgtgaagaaggtcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcagtaagttaa 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9309 tgtgaagaaggtcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcagtaagttaa 9368

Query: 421  taccttgctgttttgacgttaccaacagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagcc 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9369 taccttgctgttttgacgttaccaacagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagcc 9428
```

```
Query: 481   gcggtaatacgaagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcgcgtaggt 540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9429  gcggtaatacgaagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcgcgtaggt 9488

Query: 541   ggttcagcaagttggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatccaaaactac 600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9489  ggttcagcaagttggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatccaaaactac 9548

Query: 601   tgagctagagtacggtagagggtggtggaatttcctgtgtagcggtgaaatgcgtagata 660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9549  tgagctagagtacggtagagggtggtggaatttcctgtgtagcggtgaaatgcgtagata 9608

Query: 661   taggaaggaacaccagtggcgaaggcgaccacctggactgatactgacactgaggtgcga 720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9609  taggaaggaacaccagtggcgaaggcgaccacctggactgatactgacactgaggtgcga 9668

Query: 721   aagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtcgac 780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9669  aagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtcgac 9728

Query: 781   tagccgttgggatccttgagatcttagtggcgcagctaacgcgataagtcgaccgcctgg 840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9729  tagccgttgggatccttgagatcttagtggcgcagctaacgcgataagtcgaccgcctgg 9788

Query: 841   ggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaagcggtgga 900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9789  ggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaagcggtgga 9848

Query: 901   gcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttacctggccttgacatgctgagaac 960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9849  gcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttacctggccttgacatgctgagaac 9908

Query: 961   tttccagagatggattggtgccttcgggaactcagacacaggtgctgcatggctgtcgtc 1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9909  tttccagagatggattggtgccttcgggaactcagacacaggtgctgcatggctgtcgtc 9968

Query: 1021  agctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgtaacgagcgcaacccttgtccttagtt 1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 9969  agctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgtaacgagcgcaacccttgtccttagtt 10028

Query: 1081  accagcacctcgggtgggcactctaaggagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggg 1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10029 accagcacctcgggtgggcactctaaggagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggg 10088

Query: 1141  gatgacgtcaagtcatcatggcccttacggccagggctacacacgtgctacaatggtcgg 1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10089 gatgacgtcaagtcatcatggcccttacggccagggctacacacgtgctacaatggtcgg 10148

Query: 1201  tacaaagggttgccaagccgcgaggtggagctaatcccataaaaccgatcgtagtccgga 1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10149 tacaaagggttgccaagccgcgaggtggagctaatcccataaaaccgatcgtagtccgga 10208

Query: 1261  tcgcagtctgcaactcgactgcgtgaagtcggaatcgctagtaatcgtgaatcagaatgt 1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10209 tcgcagtctgcaactcgactgcgtgaagtcggaatcgctagtaatcgtgaatcagaatgt 10268

Query: 1321  cacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtgggttg 1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10269 cacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtgggttg 10328
```

```
Query: 1381  ctccagaagtagctagtctaaccgcaaggggacggttaccacggagtga 1430
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10329 ctccagaagtagctagtctaaccgcaaggggacggttaccacggagtga 10378
```

2. การเปรียบเทียบหาบริเวณอนุรักษ์ของ *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) กับ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

```
Score = 1679 bits (873), Expect = 0.0, Identities = 881/885 (99%), Strand = Plus / Plus

                RA-F ⟶
PAO1 : 1    atgcggcgcgaaagtctgttggtatcggtttgcaagggcctgcgggtacatgtcgagcgc 60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 1    atgcggcgcgaaagtctgttggtatcggtttgcaagggcctgcgggtacatgtcgagcgc 60

PAO1 : 61   gttgggcaggatcccgggcgcagcacggtgatgctggtcaacggcgcgatggcgaccacc 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 61   gttgggcaggatcccgggcgcagcacggtgatgctggtcaacggcgcgatggcgaccacc 120

PAO1 : 121  gcctcgttcgcccggacctgcaagtgcctggccgaacatttcaacgtggtgctgttcgac 180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 121  gcctcgttcgcccggacctgcaagtgcctggccgaacatttcaacgtggtgctgttcgac 180

PAO1 : 181  ctgcccttcgccgggcagtcgcgtcagcacaacccgcagcgcgggttgatcaccaaggac 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 181  ctgcccttcgccgggcagtcgcgtcagcacaacccgcagcgggggttgatcaccaaggac 240

PAO1 : 241  gacgaggtggaaatcctcctggcgctgatcgagcgcttcgaggtcaatcacctggtctcc 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 241  gacgaggtggaaatcctcctggcgctgatcgagcgcttcgaggtcaatcacctggtctcc 300

PAO1 : 301  gcgtcctggggcggtatctccacgctgctggcgctgtcgcgcaatccgcgcggcatccgc 360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 301  gcgtcctggggcggtatctccacgctgctggcgctgtcgcgcaatccgcgcggcatccgc 360

PAO1 : 361  agctcggtggtgatggcattcgcccctggactgaaccaggcgatgctcgactacgtcggg 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 361  agctcggtggtgatggcattcgcccctggactgaaccaggcgatgctcgactacgtcggg 420

PAO1 : 421  cgggcgcaggcgctgatcgagctggacgacaagtcggcgatcggccatctgctcaacgag 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 421  cgggcgcaggcgctgatcgagctggacgacaagtcggcgatcggccatctgctcaacgag 480

PAO1 : 481  accgtcggcaaatacctgccgcagcgcctgaaagccagcaaccatcagcacatggcttcg 540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 481  accgtcggcaaatacctgccgccgcgcctgaaagccagcaaccatcagcacatggcttcg 540

PAO1 : 541  ctggccaccggcgaatacgagcaggcgcgctttcacatcgaccaggtgctggcgctcaac 600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 541  ctggccaccggcgaatacgagcaggcgcgctttcacatcgaccaggtgctggcgctcaac 600

PAO1 : 601  gatcggggctacttggcttgcctggagcggatccagagccacgtgcatttcatcaacggc 660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 601  gatcggggctacctggcttgcctggagcggatccagagccacgtgcatttcatcaacggc 660

PAO1 : 661  agctgggacgaatacaccaccgccgaggacgcccgccagttccgcgactacctgccgcac 720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PG201: 661  agctgggacgaatacaccaccgccgaggacgcccgccagttccgcgactacctgccgcac 720
```

```
PAO1 : 721 tgcagtttctcgcgggtggagggcaccgggcatttcctcgacctggagtccaagctggca 780
PG201: 721 tgcagtttctcgcgggtggagggcaccgggcatttcctcgacctggagtccaagctggcc 780
                                                  ←— RA-R
PAO1 : 781 gcggtacgcgtgcaccgcgccctgctcgagcacctgctgaagcaaccggagccgcagcgg 840
PG201: 781 gcggtacgcgtgcaccgcgccctgctcgagcacctgctgaagcaaccggagccgcagcgg 840

PAO1 : 841 gcggaacgcgcggcgggattccacgagatggccatcggctacgcctga 888
PG201: 841 gcggaacgcgcggcgggattccacgagatggccatcggctacgcctga 888
```

3. การเปรียบเทียบหาบริเวณอนุรักษ์ของ *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) กับ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b)

Score = 1356 bits (705), Expect = 0.0,Identities = 717/723 (99%), Strand = Plus / Plus

```
                RR-F ——►
PAO1 : 1   atgaggaatgacggaggcttttttgctgtggtgggacggtttgcgtagcgagatgcagccg 60
PG201: 1   atgaggaatgacggaggcttttttgctgtggtgggacggtttgcgtagcgagatgcagccg 60

PAO1 : 61  atccacgacagccagggcgtgttcgccgtcctggaaaaggaagtgcggcgcctgggcttc 120
PG201: 61  atccacgacagccagggcgtgttcgccgtcctggaaaaggaagtgcggcgcctgggcttc 120

PAO1 : 121 gattactacgcctatggcgtgcgccacacgattcccttcacccggccgaagaccgaggtc 180
PG201: 121 gattactacgcctatggcgtgcgccatacgattcccttcacccggccgaagaccgaggtc 180

PAO1 : 181 catggcacctatcccaaggcctggctggagcgataccagatgcagaactacggggccgtg 240
PG201: 181 catggcacctatcccaaggcctggctggagcgataccagatgcagaactacggggccgtg 240

PAO1 : 241 gatccggcgatcctcaacggcctgcgctcctcggaaatggtggtctggagcgacagcctg 300
PG201: 241 gatccggcgatcctcaacggcctgcgctcctcggaaatggtggtctggagcgacagcctg 300

PAO1 : 301 ttcgaccagagccggatgctctggaacgaggctcgcgattggggcctctgtgtcggcgcg 360
PG201: 301 ttcgaccagagccggatgctctggaacgaggctcgcgattggggcctctgtgtcggcgcg 360

PAO1 : 361 accttgccgatccgcgcgccgaacaatttgctcagcgtgctttccgtggcgcgcgaccag 420
PG201: 361 actttgccgatccgcgcgccgaacaatttgctcagcgtgctttccgtggcgcgcgaccag 420

PAO1 : 421 cagaacatctccagcttcgagcgcgaggaaatccgcctgcggctgcgttgcatgatcgag 480
PG201: 421 cagaacatctccagcttcgagcgcgaggaaatacgcctgcggctgcgttgcatgatcgag 480

PAO1 : 481 ttgctgacccagaagctgaccgacctggagcatccgatgctgatgtccaacccggtctgc 540
PG201: 481 ttgctgacccagaagctgaccgacctggagcatccgatgctgatgtccaacccggtctgc 540

PAO1 : 541 ctgagccatcgcgaacgcgagatcctgcaatggaccgccgacggcaagagttccggggaa 600
PG201: 541 ctgagccatcgcgaacgcgagatcctgcaatggaccgccgacggcaagagctccggggaa 600
```

```
PAO1 : 601 atcgccatcatcctgagcatctccgagagcacggtgaacttccaccacaagaacatccag 660
           ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||:||||||:||||||||||
PG201: 601 atcgccatcatcctgagcatttccgagagcacggtgaacttccaccacaagaacatccag 660
                                    ←— RR-R
PAO1 : 661 aagaagttcgacgcgccgaacaagacgctggctgccgcctacgccgcggcgctgggtctc 720
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
PG201: 661 aagaagttcgacgcgccgaacaagacgctggctgccgcctacgccgcggcgctgggcctc 720

PAO1 : 721 atc 723
           |||
PG201: 721 atc 723
```

การเปรียบเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม

BlastX version 2.2.9

Query หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนที่เปรียบเทียบใน GenBank

\+ หมายถึง กรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน

4. ผลจากการเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *rhlA* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยใช้ไพร์เมอร์ RA-F และ RA-R

```
gi|9949623|gb|AAG06867.1|  rhamnosyltransferase chain A [Pseudomonas
aeruginosa PAO1]  Length = 295

 Score =  251 bits (640), Expect = 4e-66
 Identities = 126/126 (100%), Positives = 126/126 (100%)
 Frame = +2

Query: 2   LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ 181
           LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ
Sbjct: 14  LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ 73

Query: 182 RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ 361
           RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ
Sbjct: 74  RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ 133

Query: 362 AMLDYV 379
           AMLDYV
Sbjct: 134 AMLDYV 139
```

```
gi|452503|gb|AAA62128.1|   rhamnosyl transferase [Pseudomonas aeruginosa PG201]
, Length = 295

 Score =  251 bits (640), Expect = 4e-66
 Identities = 126/126 (100%), Positives = 126/126 (100%)
 Frame = +2

Query: 2   LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ 181
           LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ
Sbjct: 14  LRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFDLPFAGQSRQHNPQ 73

Query: 182 RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ 361
           RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ
Sbjct: 74  RGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIRSSVVMAFAPGLNQ 133

Query: 362 AMLDYV 379
           AMLDYV
Sbjct: 134 AMLDYV 139
```

5. ผลจากการเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *rhlR* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยใช้ไพร์เมอร์ RR-F และ RR-R

```
gi|452505|gb|AAA62130.1|   regulatory protein [Pseudomonas aeruginosa PG201]
gi|9949621|gb|AAG06865.1|   transcriptional regulator RhlR [Pseudomonas
aeruginosa PAO1]   Length = 241

 Score =  146 bits (369), Expect = 1e-34
 Identities = 66/66 (100%), Positives = 66/66 (100%)
 Frame = +2

Query: 2   FLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEVHGTYPK 181
           FLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEVHGTYPK
Sbjct: 7   FLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEVHGTYPK 66

Query: 182 AWLERY 199
           AWLERY
Sbjct: 67  AWLERY 72
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ผลจากการเทียบความคล้ายของ ORF1

gi|9949625|gb|AAG06868.1| probable deoxycytidine triphosphate deaminase [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] Length = 188

Score = 282 bits (722), Expect = 1e-74
Identities = 137/137 (100%), Positives = 137/137 (100%)
Frame = +1

```
Query: 1   EFKVFTNIHSAVVDPKNFDEKSFVDINSDVCIIPPNSFALARTVEYFRIPRDVLTICLGK 180
           EFKVFTNIHSAVVDPKNFDEKSFVDINSDVCIIPPNSFALARTVEYFRIPRDVLTICLGK
Sbjct: 52  EFKVFTNIHSAVVDPKNFDEKSFVDINSDVCIIPPNSFALARTVEYFRIPRDVLTICLGK 111

Query: 181 STYARCGIIVNVTPLEPEWEGHVTLEFSNTTNLPAKIYANEGVAQMLFLQSDEACEVSYK 360
           STYARCGIIVNVTPLEPEWEGHVTLEFSNTTNLPAKIYANEGVAQMLFLQSDEACEVSYK
Sbjct: 112 STYARCGIIVNVTPLEPEWEGHVTLEFSNTTNLPAKIYANEGVAQMLFLQSDEACEVSYK 171

Query: 361 DRGGKYQGQRGVTLPKA 411
           DRGGKYQGQRGVTLPKA
Sbjct: 172 DRGGKYQGQRGVTLPKA 188
```

7. ผลจากการเทียบความคล้ายของ ORF 2

gi|452503|gb|AAA62128.1| rhamnosyl transferase [*Pseudomonas aeruginosa* PG201] Length = 295

Score = 591 bits (1523), Expect = e-167
Identities = 295/295 (100%), Positives = 295/295 (100%)
Frame = +1

```
Query: 838  MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD 1017
           MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD
Sbjct: 1    MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD 60


Query: 1018 LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR 1197
           LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR
Sbjct: 61   LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR 120

Query: 1198 SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLPPRLKASNHQHMAS 1377
           SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLPPRLKASNHQHMAS
Sbjct: 121  SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLPPRLKASNHQHMAS 180

Query: 1378 LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH 1557
           LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH
Sbjct: 181  LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH 240

Query: 1558 CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA 1722
           CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA
Sbjct: 241  CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA 295
```

gi|9949623|gb|AAG06867.1| rhamnosyltransferase chain A [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] Length = 295

```
 Score =  588 bits (1515), Expect = e-166
 Identities = 294/295 (99%), Positives = 294/295 (99%)
 Frame = +1

Query: 838  MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD 1017
            MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD
Sbjct: 1    MRRESLLVSVCKGLRVHVERVGQDPGRSTVMLVNGAMATTASFARTCKCLAEHFNVVLFD 60

Query: 1018 LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR 1197
            LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR
Sbjct: 61   LPFAGQSRQHNPQRGLITKDDEVEILLALIERFEVNHLVSASWGGISTLLALSRNPRGIR 120

Query: 1198 SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLPPRLKASNHQHMAS 1377
            SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLP RLKASNHQHMAS
Sbjct: 121  SSVVMAFAPGLNQAMLDYVGRAQALIELDDKSAIGHLLNETVGKYLPQRLKASNHQHMAS 180

Query: 1378 LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH 1557
            LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH
Sbjct: 181  LATGEYEQARFHIDQVLALNDRGYLACLERIQSHVHFINGSWDEYTTAEDARQFRDYLPH 240

Query: 1558 CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA 1722
            CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA
Sbjct: 241  CSFSRVEGTGHFLDLESKLAAVRVHRALLEHLLKQPEPQRAERAAGFHEMAIGYA 295
```

8. ผลจากการเทียบความคล้ายของORF 3

gi|9949622|gb|AAG06866.1| rhamnosyltransferase chain B [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] Length = 426

```
 Score =  877 bits (2266), Expect = 0.0
 Identities = 426/426 (100%), Positives = 426/426 (100%)
 Frame = +3

Query: 1791 MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR 1970
            MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR
Sbjct: 1    MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR 60

Query: 1971 RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQAIAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG 2150
            RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQAIAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG
Sbjct: 61   RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQAIAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG 120

Query: 2151 IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAPEINAVR 2330
            IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAPEINAVR
Sbjct: 121  IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAPEINAVR 180

Query: 2331 RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD 2510
            RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD
Sbjct: 181  RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD 240

Query: 2511 DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH 2690
            DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH
Sbjct: 241  DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH 300
```

```
Query: 2691 VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG 2870
            VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG
Sbjct: 301  VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG 360

Query: 2871 MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR 3050
            MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR
Sbjct: 361  MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR 420

Query: 3051 WLKAAS 3068
            WLKAAS
Sbjct: 421  WLKAAS 426
```

gi|452504|gb|AAA62129.1| rhamnosyl transferase [*Pseudomonas aeruginosa* PG201], Length = 426

```
 Score =  874 bits (2259), Expect = 0.0
 Identities = 424/426 (99%), Positives = 425/426 (99%)
 Frame = +3

Query: 1791 MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR 1970
            MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR
Sbjct: 1    MHAILIAIGSAGDVFPFIGLARTLKLRGHRVSLCTIPVFRDAVEQHGIAFVPLSDELTYR 60

Query: 1971 RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQAIAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG 2150
            RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQ IAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG
Sbjct: 61   RTMGDPRLWDPKTSFGVLWQTIAGMIEPVYEYVSAQRHDDIVVVGSLWALGARIAHEKYG 120

Query: 2151 IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAPEINAVR 2330
            IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAP+INAVR
Sbjct: 121  IPYLSAQVSPSTLLSAHLPPVHPKFNVPEQMPLAMRKLLWRCIERFKLDRTCAPDINAVR 180

Query: 2331 RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD 2510
            RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD
Sbjct: 181  RKVGLETPVKRIFTQWMHSPQGVVCLFPAWFAPPQQDWPQPLHMTGFPLFDGSIPGTPLD 240

Query: 2511 DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH 2690
            DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH
Sbjct: 241  DELQRFLDQGSRPLVFTQGSTEHLQGDFYAMALRALERLGARGIFLTGAGQEPLRGLPNH 300

Query: 2691 VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG 2870
            VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG
Sbjct: 301  VLQRAYAPLGALLPSCAGLVHPGGIGAMSLALAAGVPQVLLPCAHDQFDNAERLVRLGCG 360

Query: 2871 MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR 3050
            MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR
Sbjct: 361  MRLGVPLREQELRGALWRLLEDPAMAAACRRFMELSQPHSIACGKAAQVVERCHREGDAR 420

Query: 3051 WLKAAS 3068
            WLKAAS
Sbjct: 421  WLKAAS 426
```

9. ผลจากการเทียบความคล้ายของ ORF 4

```
gi|452505|gb|AAA62130.1|   regulatory protein [Pseudomonas aeruginosa PG201]
gi|9949621|gb|AAG06865.1|  transcriptional regulator RhlR [Pseudomonas
aeruginosa PAO1]  Length = 241

 Score =  472 bits (1215), Expect = e-131
 Identities = 229/229 (100%), Positives = 229/229 (100%)
 Frame = +1

Query: 3196 MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEV 3375
          MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEV
Sbjct: 1    MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEV 60

Query: 3376 HGTYPKAWLERYQMQNYGAVDPAILNGLRSSEMVVWSDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGA 3555
          HGTYPKAWLERYQMQNYGAVDPAILNGLRSSEMVVWSDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGA
Sbjct: 61   HGTYPKAWLERYQMQNYGAVDPAILNGLRSSEMVVWSDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGA 120

Query: 3556 TLPIRAPNNLLSVLSVARDQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLEHPMLMSNPVC 3735
          TLPIRAPNNLLSVLSVARDQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLEHPMLMSNPVC
Sbjct: 121  TLPIRAPNNLLSVLSVARDQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLEHPMLMSNPVC 180

Query: 3736 LSHREREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKT 3882
          LSHREREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKT
Sbjct: 181  LSHREREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKT 229
```

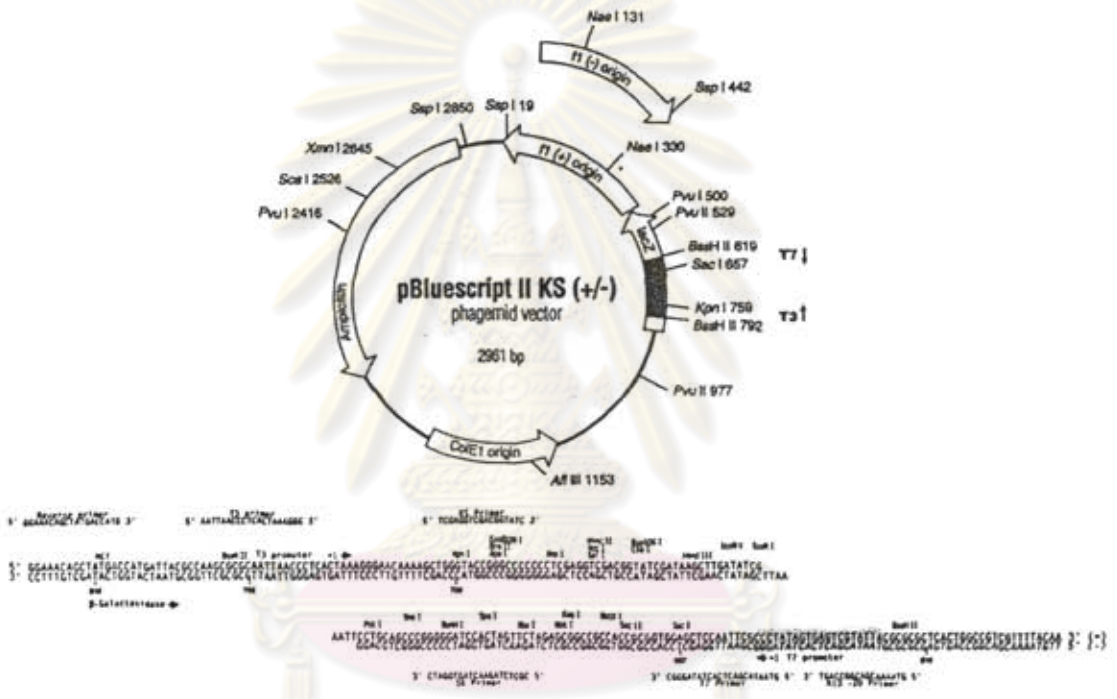
10. ผลจากการเทียบความคล้ายของ ORF 5

```
gi|511478|gb|AAA82725.1|   putative autoinducer synthetase (PG201)
 Length = 201

 Score =  385 bits (989), Expect = e-105
 Identities = 190/201 (94%), Positives = 190/201 (94%)
 Frame = +3

Query: 4101 MIXXXXXXXXXXXAAMIAELGRYRHQVFIEKLGWDVVSTSRVRDQEFDQFDHPQTRYIVA 4280
          MI          AAMIAELGRYRHQVFIEKLGWDVVSTSRVRDQEFDQFDHPQTRYIVA
Sbjct: 1    MIELLSESLEGLSAAMIAELGRYRHQVFIEKLGWDVVSTSRVRDQEFDQFDHPQTRYIVA 60

Query: 4281 MGRQGICGCARLLPTTDAYLLKEVFAYLCSETPPSDPSVWELSRYAASAADDPQLAMKIF 4460
          MGRQGICGCARLLPTTDAYLLKEVFAYLCSETPPSDPSVWELSRYAASAADDPQLAMKIF
Sbjct: 61   MGRQGICGCARLLPTTDAYLLKEVFAYLCSETPPSDPSVWELSRYAASAADDPQLAMKIF 120

Query: 4461 WSSLQCAWYLGASSVVAVTTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQKVKGETLVAISFPAYQERG 4640
          WSSLQCAWYLGASSVVAVTTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQKVKGETLVAISFPAYQERG
Sbjct: 121  WSSLQCAWYLGASSVVAVTTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQKVKGETLVAISFPAYQERG 180

Query: 4641 LEMLLRYHPEWLQGVPLSMAV 4703
          LEMLLRYHPEWLQGVPLSMAV
Sbjct: 181  LEMLLRYHPEWLQGVPLSMAV 201
```

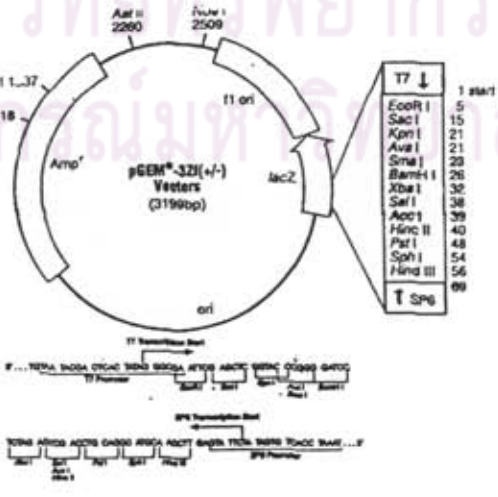
ภาคผนวก ง

พลาสมิดพาหะ

1. **พลาสมิด** pBluescript KS(+/-)



2. **พลาสมิด** pGEM-3Zf(+/-)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย