



ผลการทดลอง

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 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน จากการทดลองในข้อ 3.6 พบว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ใช้ ไพร์เมอร์ 27f และ 1492r จะให้ผลิตภัณฑ์จาก 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบสเมื่อเทียบกับขั้นดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA ladder) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไพร์เมอร์ 27f 350f 1240r และ 1492r ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนคือ 1430 bp (ภาคผนวก จ1) นำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastN เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ใน GenBank พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. A41 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสโรโบโซมัลอาร์เอ็นเอของสายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนี้

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

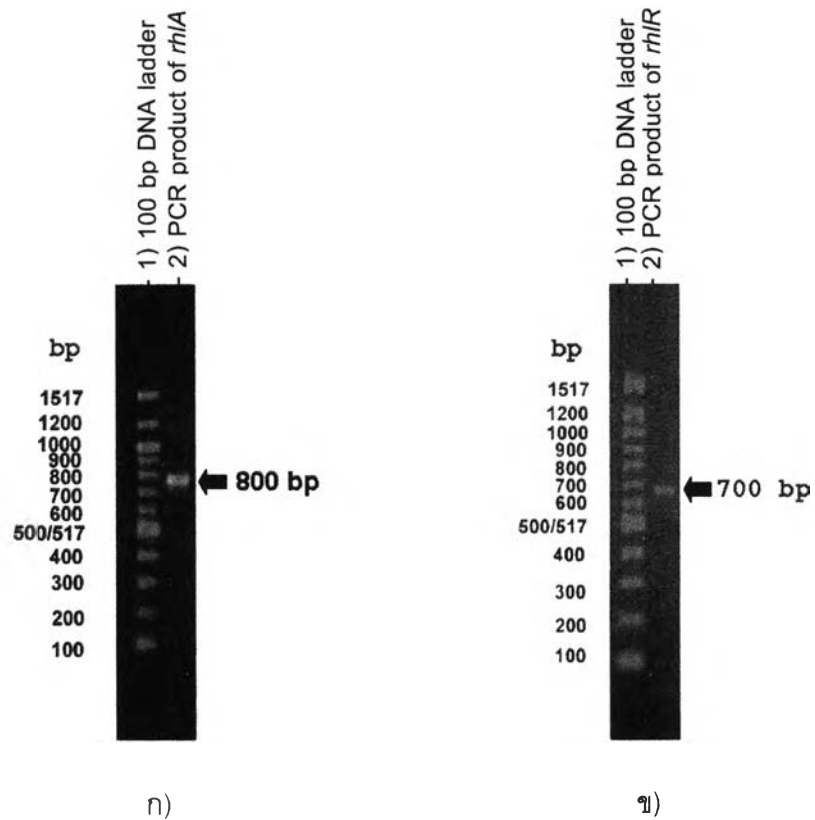
ลำดับ	สายพันธุ์จุลินทรีย์	% ความ เหมือน	Accession number	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OLB-1	100%	AJ387904	Wintzingerode และคณะ, 2000
2	<i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ AL98	100%	AJ249451	Linos และคณะ, 2000
3	<i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1	100%	AE004844	Stover และคณะ, 2000
4	<i>P.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

#### 4.2 การเพิ่มจำนวน *rhIA* หรือ *rhIR* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

##### 4.2.1) การเพิ่มจำนวน *rhIA*

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *rhIA* ของ *Pseudomonas* sp. A41 ใช้ไพรเมอร์ RA-F และ RA-R ไพรเมอร์ดังกล่าวออกแบบจากการหาลำดับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *rhIA* จากแบคทีเรียที่สร้างแรมโนลิพิด 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) โดยใช้โปรแกรม Blast ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RA-F และ RA-R มีขนาดประมาณ 800 bp เป็นไปตามที่คาดหมายดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RA-F ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 405 bp นำไปเปรียบเทียบกับความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบว่าลำดับมีความเหมือนกับ rhamnosyltransferase 1 unit A (Rhl-A) ที่ระบุรหัสโดย *rhIA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ดังแสดงในภาคผนวก ค4



#### รูปที่ 4.1 อะการสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR

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

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

#### 4.2.2) การเพิ่มจำนวน *rhIR*

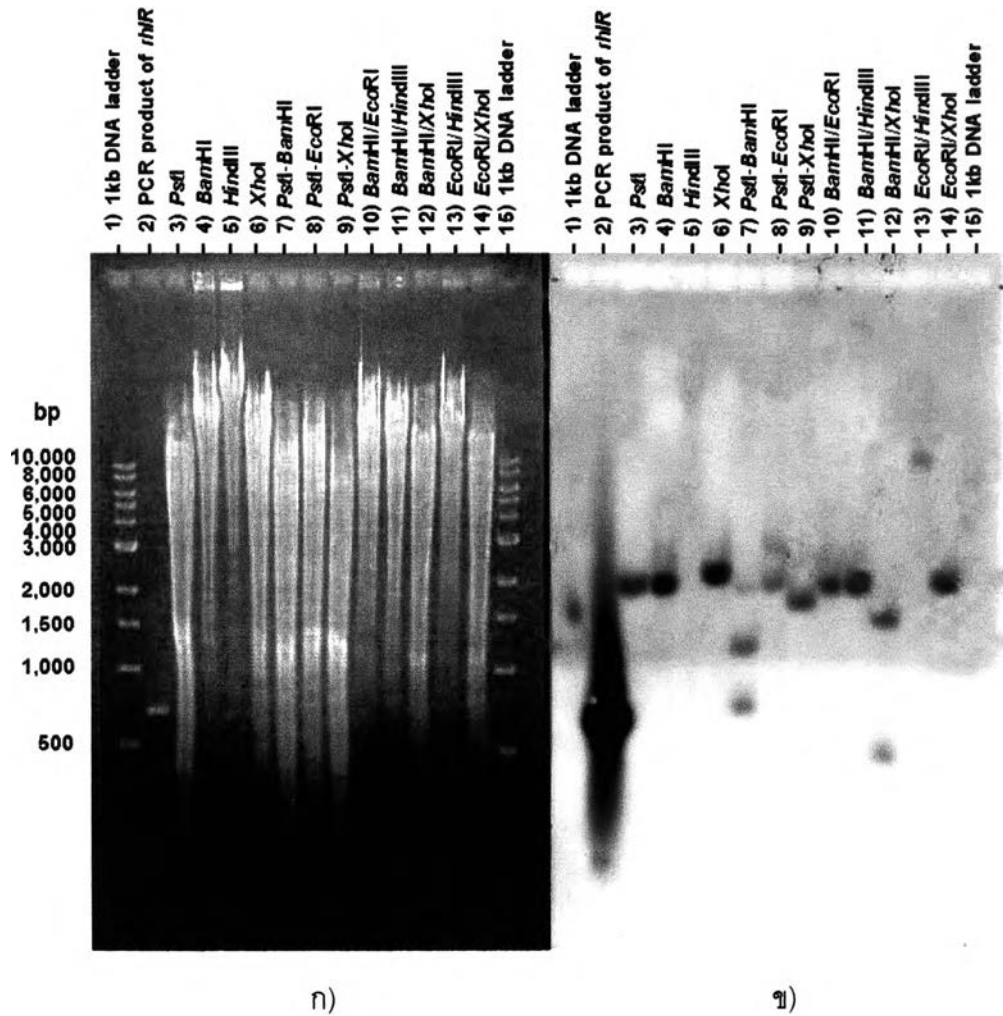
ในปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *rhIR* ของ *Pseudomonas* sp. A41 ใช้ไพรเมอร์ RR-F และ RR-R ไพรเมอร์ดังกล่าวออกแบบจากการหาลำดับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *rhIR* จากแบคทีเรียที่สร้างแรมโนลิพิด 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) โดยใช้โปรแกรม Blast ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค3 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3.3 ทำปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมที่ดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RR-F และ RR-R มีขนาดประมาณ 700 bp เป็นไปตามที่คาดหมายดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RR-F ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 200 bp นำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ RHIR ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัสของ *rhIAB* ระบุรหัสโดย *rhIR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% ดังแสดงในภาคผนวก ค5

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RA-F และ RA-R หรือ RR-F และ RR-R ดังกล่าวซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุรหัส rhamnosyltransferase 1 unit A ที่ระบุรหัสโดย *rhIA* หรือ RHIR ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัสของ *rhIAB* ระบุรหัสโดย *rhIR* ตามลำดับ จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* หรือ *rhIR* บนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยการติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี random labeling ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 และตั้งชื่อว่า *rhIA*-probe หรือ *rhIR*-probe ตามลำดับ

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

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

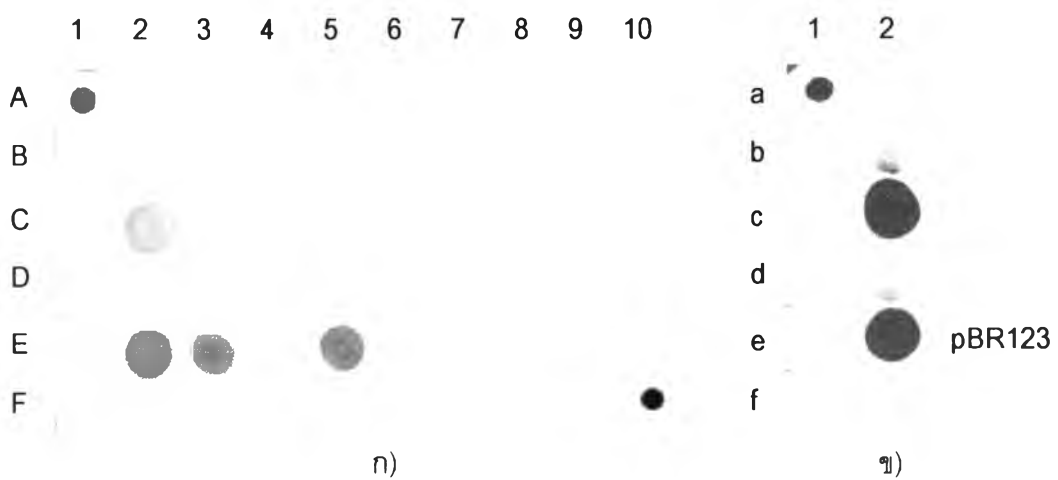


รูปที่ 4.2 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlR*

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

จากผลการทดลองข้อ 4.3 ทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlR* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *Bam*HI-*Xho*I ซึ่งตัดจีโนมดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 โดยให้สัญญาณขนาด 1.5 และ 0.5 กิโลเบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$

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

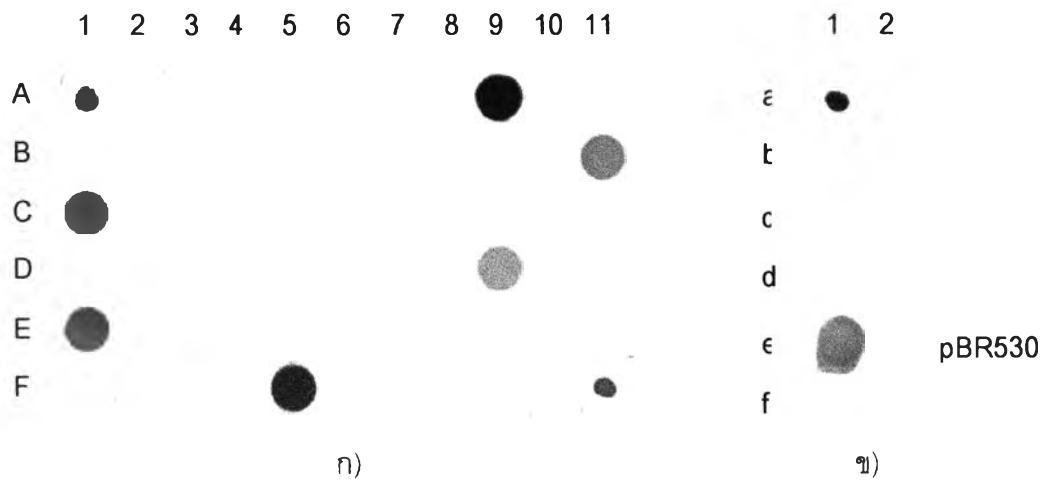


รูปที่ 4.3 n) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขึ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 1.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม E2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR*

ช่องที่ A1 F10 และ a1	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>rhIR</i> (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 F9 และ a2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-F8	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม
ช่องที่ b1-f2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม E2

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.3 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่มคือ ตัวอย่างกลุ่ม C2 E2 E3 และ E5 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 n) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม E2 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลนมาแยกให้ได้โคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot

hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ c2 และ e2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริโดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน e2 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pBR123 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ข)

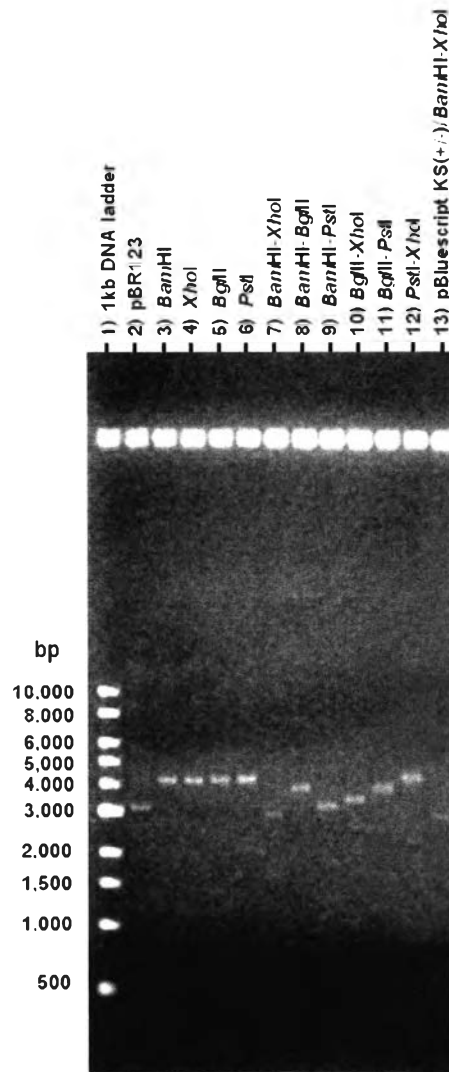


รูปที่ 4.4 n) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 0.5 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A9 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR*

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

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

ทำการตัดพลาสมิด pBR123 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.5 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของซันดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.6 ส่วนพลาสมิด pBR530 มีซันดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดเล็กดังนั้นไม่จำเป็นต้องหาการจัดเรียงตัวของซันดีเอ็นเอสอีกสามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer ได้



รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอสของพลาสมิด pBR123 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของซันดีเอ็นเอสอดแทรก

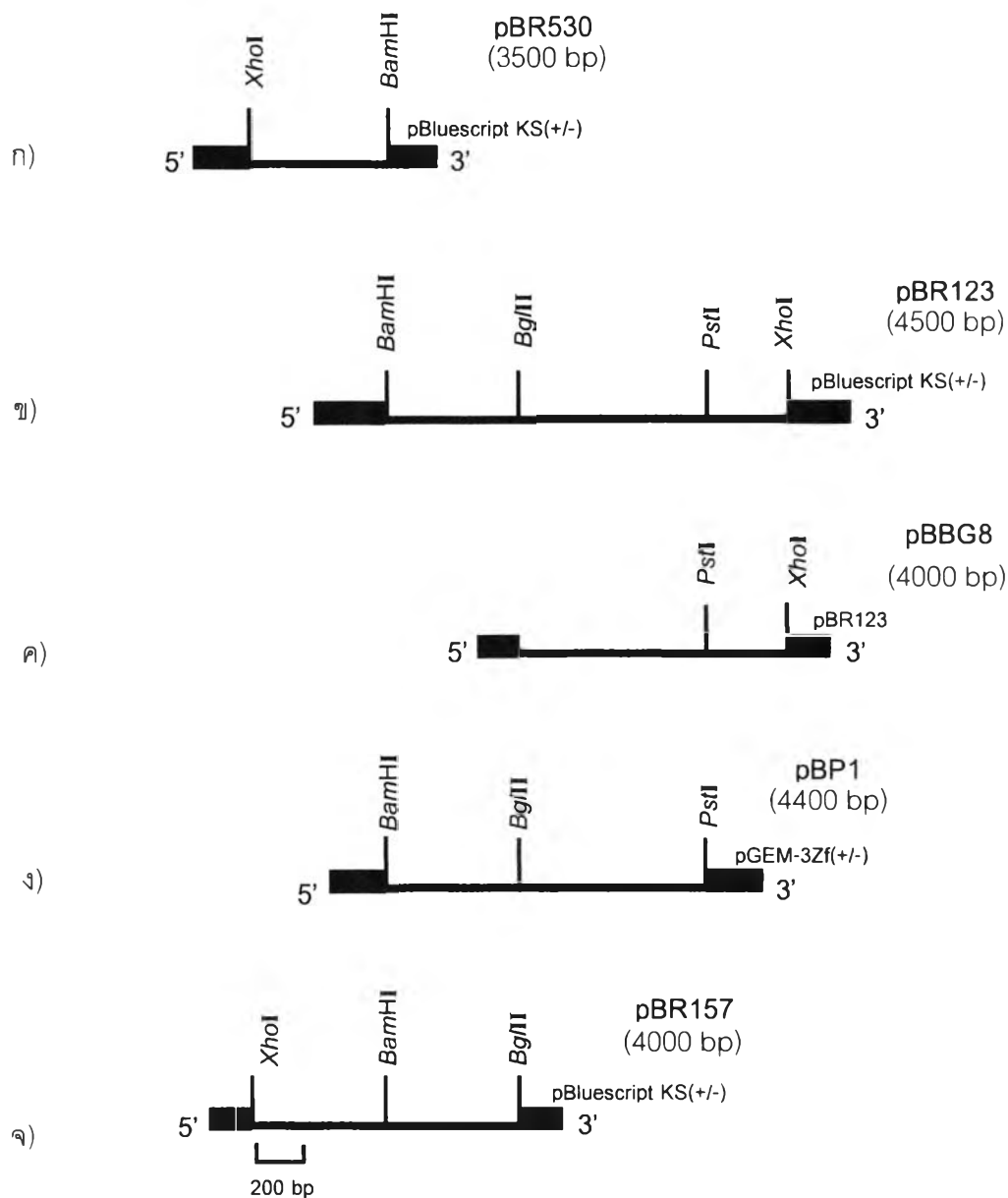
ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pBR123

ช่องวิ่งที่ 3-12 พลาสมิด pBR123 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

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





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 สามารถสับโคลนได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBBG8 และ pBP1 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และ universal primer ดังอธิบายในข้อ 4.5

#### 4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pBR123 และ pBR530

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อกันบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 มีขนาด 1531 bp (ภาคผนวก ๑2) ซึ่งได้จากการใช้ไพรเมอร์ T3 T7 และ RF1 กับ pBR123 ใช้ไพรเมอร์ T7 กับ pBBG8 และใช้ไพรเมอร์ SP6 กับ pBP1 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 3435-4965 ซึ่งเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งจะทำให้การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 2 กรอบมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสเปิดแรกประกอบด้วย 161 ลำดับกรดอะมิโน พบรหัสหยุด (stop codon) แต่ไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) จึงทำให้กรอบอ่านรหัสนี้ไม่สมบูรณ์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งถอดรหัสกรดอะมิโนคล้ายกับ transcriptional regulator RhIR ในลำดับกรดอะมิโนตัวที่ 81-229 เท่ากับ 100% ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด โปรตีนดังกล่าวถอดรหัสมาจาก *rhIR* 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 *rhII*

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 โดยใช้ universal primer T3 และ T7 ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 513 bp (ภาคผนวก ๑3) ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2928-3440 และเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 พบกรอบอ่านรหัสเปิด 2 กรอบที่ไม่สมบูรณ์มีทิศทางการ

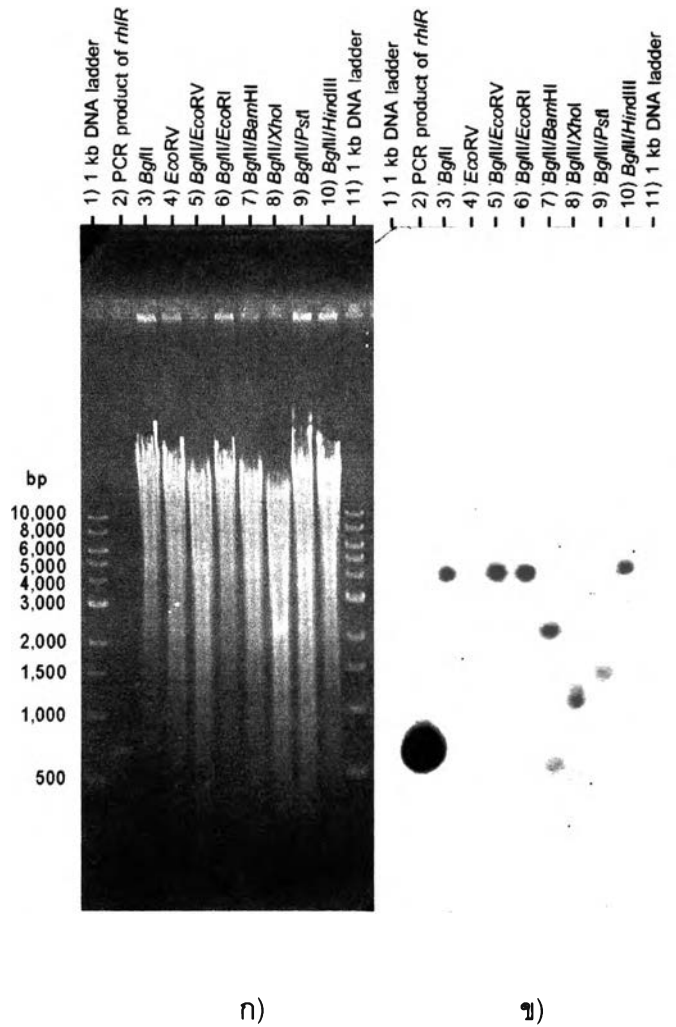
ถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสเปิดแรกไม่สมบูรณ์เพราะไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) ประกอบด้วย 47 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 380-426 ของ rhamnosyltransferase 1 chain B ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ซึ่งถอดรหัสจาก *rhIB* ถัดไปทางปลาย 3' จะพบกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 ไม่สมบูรณ์เช่นกันเพราะไม่พบรหัสหยุด (stop codon) ประกอบด้วย 81 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 1-81 ของ transcriptional regulator *RhIR* ที่ถอดรหัสมาจาก *rhIR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100%

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความคล้ายของซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 และ pBR530 กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank พบว่าปลาย 3' ของซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 คล้ายกับกรดอะมิโน transcriptional regulator *RhIR* ตัวที่ 1-81 ส่วนปลาย 5' ของซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 พบว่าคล้ายกับกรดอะมิโน transcriptional regulator *RhIR* ตัวที่ 81-229 แสดงให้เห็นว่าซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองน่าจะต่อกันโดยซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 น่าจะเรียงตัวอยู่หน้าซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดทั้งสองเชื่อมต่อกันจึงต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมบริเวณเชื่อมต่อดังกล่าว

#### 4.6 การค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอเบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhIR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมบริเวณเชื่อมต่อของซีเอ็นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR123 และ pBR530 ได้นั้นต้องค้นหาและโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhIR* ซึ่งมีส่วนเชื่อมต่อดังกล่าวอยู่ภายในให้ได้ก่อนจึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดจีโนมดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.7 ก) ผลไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* เป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.7 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhIR* บนจีโนมดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพรเมอร์ RR-F และ RR-R จะให้สัญญาณซีเอ็นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* (*rhIR*-probe)

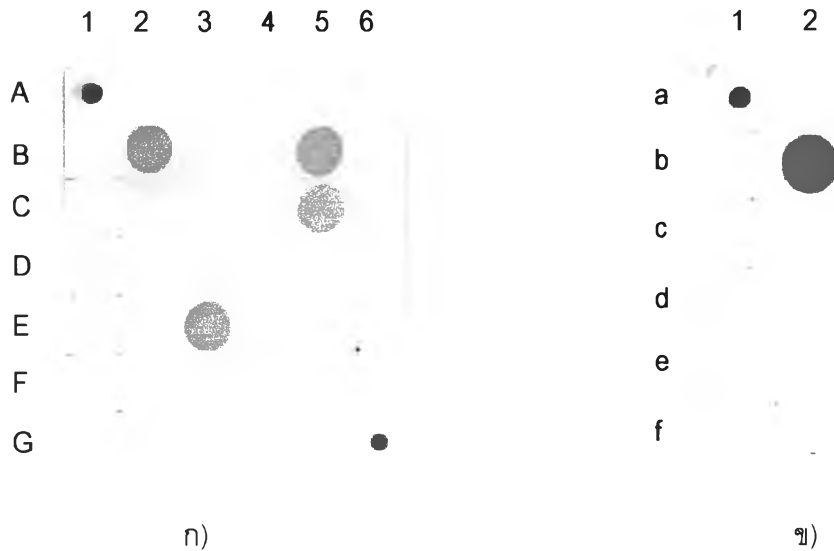


รูปที่ 4.7 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR*

#### 4.7 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhIR* ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization)

จากผลการทดลองข้อ 4.6 ทำให้ทราบขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ครอบคลุมยีน *rhIR* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *XhoI*-*BglII* ซึ่งตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 ที่ให้สัญญาณขนาด 1.0 กิโลเบส ให้ผลสอดคล้องกับแผนที่แสดงการจัดเรียงตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 และ pBR123 (รูปที่ 4.6) เมื่อเรียงต่อกัน จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังกล่าวด้วยวิธี Blue/ White selection และนำพลาสมิดของโคลนที่ได้ดังกล่าวมาทำ Dot blot

hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* (*rhIR*-probe) ตามวิธีการในข้อ 3.9.4.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.8 ก)



รูปที่ 4.8 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *XhoI*-*BglII* ของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 1.0 กิโลเบส ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม B2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR*

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

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.8 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ *XhoI*-*BglII* ขนาด 1.0 กิโลเบสที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่มคือ ตัวอย่างกลุ่ม B2 B5 C5 และ E3 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม B2 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลนมาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIR* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ b2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดซ์ชันแสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน b2 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pBR157 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ข) จากนั้นนำไปสกัดเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดและ

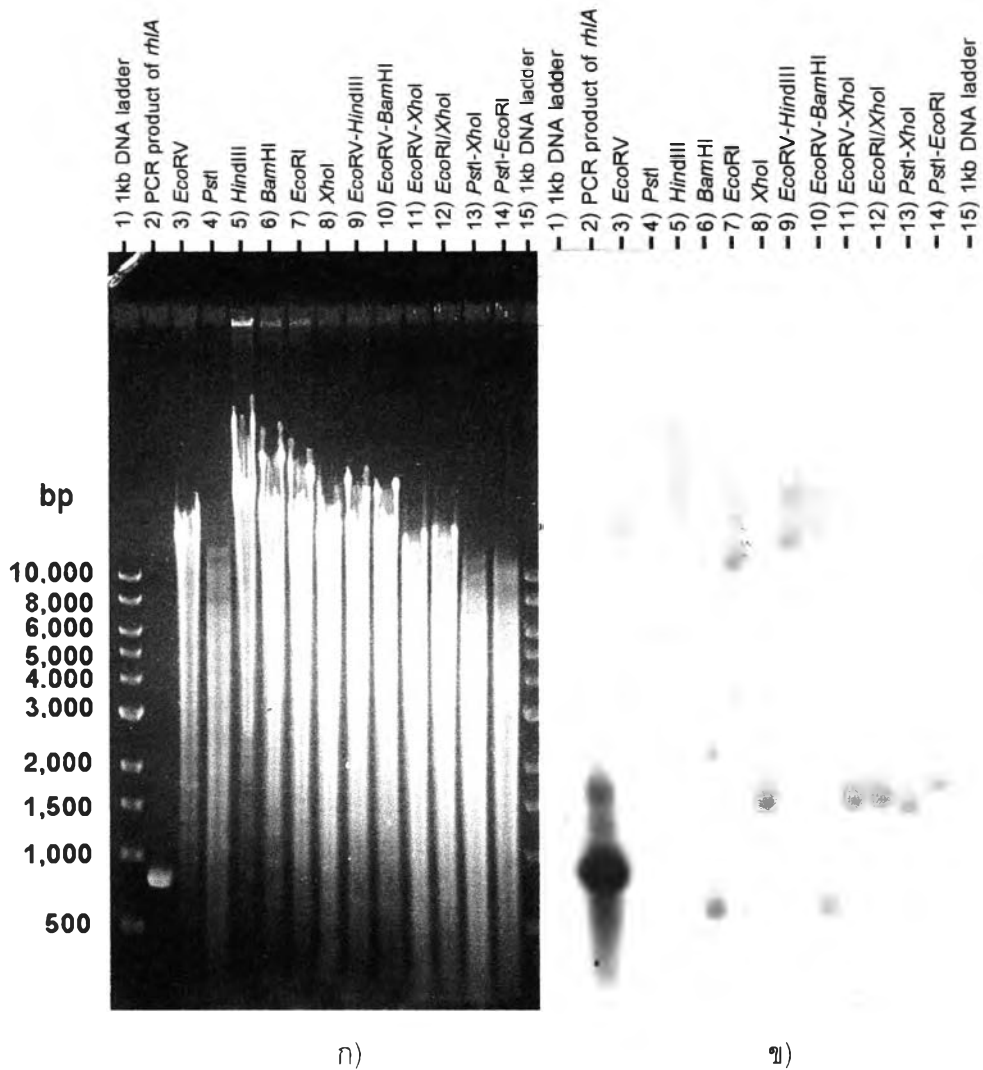
หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhIR* ซึ่งออกแบบและใช้ในการสร้างตัวติดตามยีน *rhIR* ในการทดลองนี้

#### 4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ *XhoI*-*BglII* ที่ของยีน *rhIR*

เนื่องจากต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งอยู่ก่อนและหลังบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งอยู่บนยีน *rhIR* เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 เรียงต่อจาก pBR530 จริง ดังนั้นจึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR157 โดยใช้ไพรเมอร์ RR-F ซึ่งจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' ของยีน *rhIR* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 533 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 3226-3758 ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ถอดรหัสได้คล้ายกับกรดอะมิโนที่ 11-187 ของ transcriptional regulator RhIR ที่ระบุรหัสโดย *rhIR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% ตามคาดหมาย และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวยังคงคลุมส่วนเชื่อมต่อระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 กับ pBR530 ทำให้ทราบว่าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR530 เรียงตัวอยู่หน้าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBR123 จริง โดยเชื่อมกันด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ตามรูปที่ 4.6 ซึ่งแสดงการวางตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกใน pBR530 ต่อกับ pBR123

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

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.9 ก) ผลไฮบริไดเซชันเป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.9 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ขึ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhIA* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพรเมอร์ RA-F และ RA-R จะให้สัญญาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* (*rhIA*-probe)

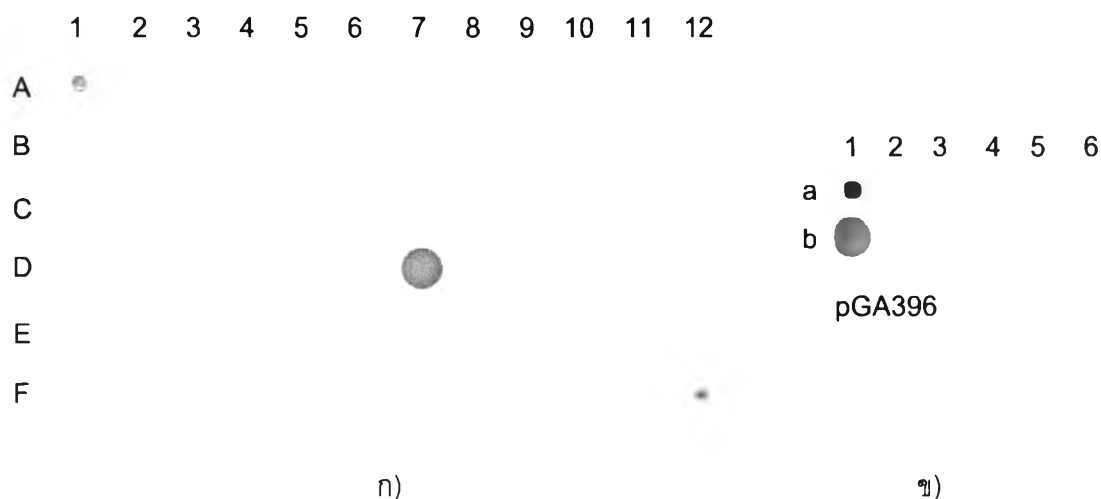


รูปที่ 4.9 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ชนิดต่างๆ ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA*

#### 4.10 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhIA*

จากผลการทดลองข้อ 4.9 ทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhIA* อยู่ ดังนั้นจึงเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนคือ *EcoRI-PstI* ซึ่งตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ A41 ที่ให้สัญญาณขนาด 1.5 กิโลเบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอแยกโคลนเข้า pGEM-3Zf(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำได้ด้วยวิธี Blue/ White selection เลือกเฉพาะโคลนที่มีโคโลนีสีขาว จากนั้นคัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ใน

ข้อ 3.9.4.3) ผลสัญญาณจากการไฮบริดซ์ของโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งมี ยีน *rhIA* อยู่ เป็นไปตามรูปที่ 4.10



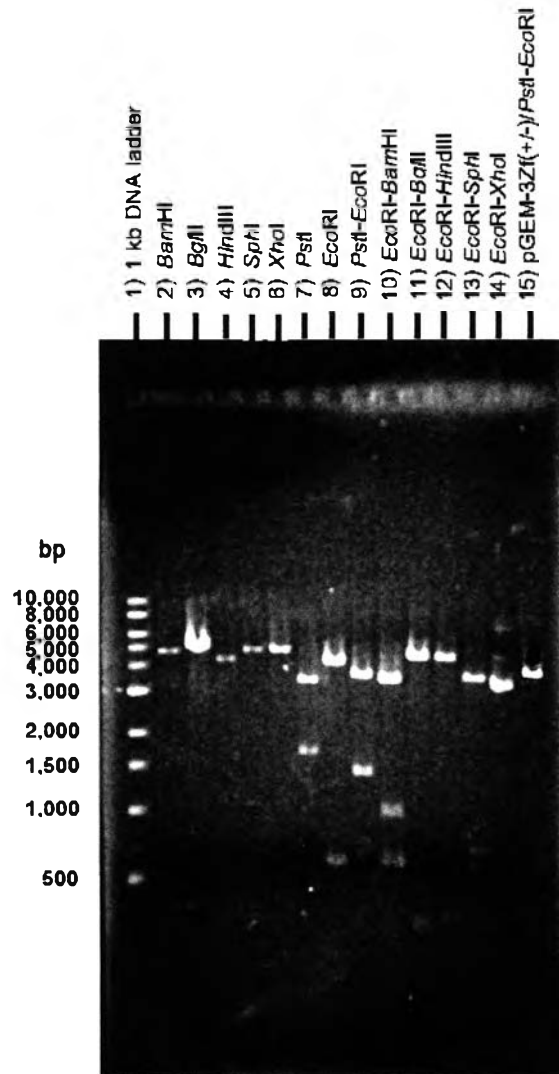
รูปที่ 4.10 ก) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 1.5 กิโลเบสอยู่ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D7 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA*

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

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.10 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในตัวอย่างกลุ่ม D7 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ก) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D7 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลนมาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ b1 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน b1 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pGA396 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ข)



ทำการตัดพลาสมิด pGA396 ด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่ restriction ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.12 เพื่อใช้ในการสืบโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pGA396 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

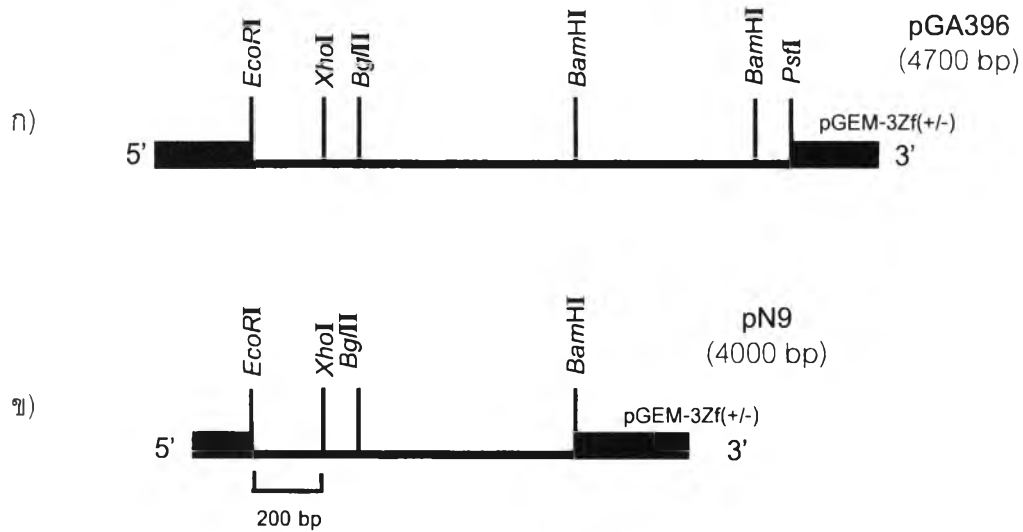


รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิด pGA396 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2-14 พลาสมิด pGA396 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction

ช่องวิ่งที่ 15 พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ PstI-EcoRI



รูปที่ 4.12 ก) แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pGA396 ข) แสดงริคอมบิแนนท์พลาสมิด pN9 ที่ได้จากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pGA396 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 4.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pGA396

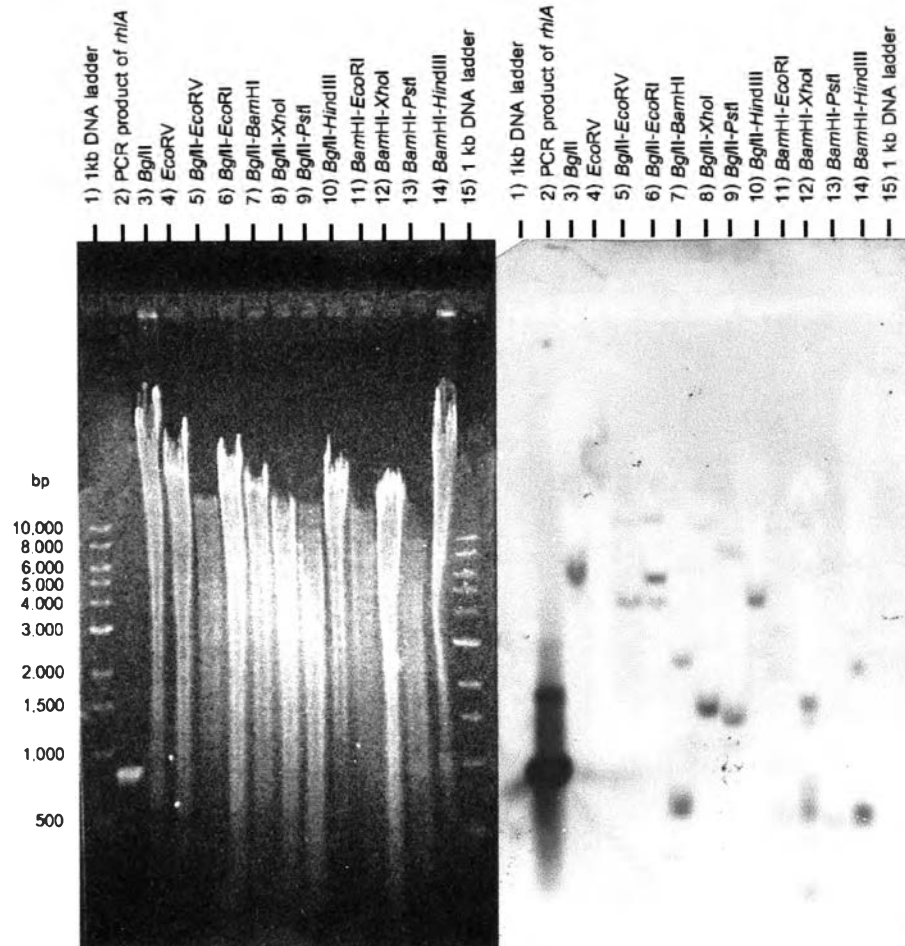
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในริคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของริคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ขนาด 1562 bp (ภาคผนวก ๑4) ซึ่งได้จากการใช้ไพรเมอร์ M13 forward SP6 และ N912R กับพลาสมิด pGA396 และไพรเมอร์ SP6 กับพลาสมิด pN9 ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-1562 เมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งจะทำให้การแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด 2 กรอบที่ไม่สมบูรณ์ มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสแรกประกอบด้วย 137 ลำดับกรดอะมิโน พบรหัสหยุด (stop codon) แต่ไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับอะมิโนมีความคล้ายกับ deoxycytidine triphosphate deaminase (dCTP deaminase) ในกรดอะมิโนที่ 52-

188 ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 100% ซึ่งระบุรหัสโดย *dcd* กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 ไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่พบรหัสหยุด ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน ซึ่งมีคล้ายกับกรดอะมิโนที่ 1-241 ของ rhamnosyltransferase 1 chain A ซึ่งระบุรหัสโดย *rhIA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% ซึ่งเป็นหนึ่งหน่วยของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 แต่กรอบอ่านรหัสเปิดที่ได้นี้ยังไม่ครบกรอบอ่านรหัสเปิดและยังไม่พบรหัสหยุด จึงต้องติดตามส่วนที่เหลือและโคลนยีน *rhIA* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดต่อไป

#### 4.12 การโคลน *rhIA* ส่วนที่เหลือ

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 พบว่ากรอบอ่านรหัสเปิดที่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดถอดรหัสคล้าย rhamnosyltransferase 1 chain A แต่ไม่พบรหัสหยุดจึงทำให้กรอบอ่านรหัสดังกล่าวไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rhIA* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดจึงโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มีส่วน *rhIA* ที่เหลือ จากผลการค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhIA* ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชันในข้อ 4.9 ตามรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI จะตัดดีเอ็นเอให้สัญญาณ 3 สัญญาณ ซึ่งมีขนาด 5.5 2.0 และ 0.5 กิโลเบส จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGA396 ในรูปที่ 4.12 ทำให้ทราบเพิ่มเติมอีกว่าชิ้น *Bam*HI ขนาด 0.5 กิโลเบส นั้นอยู่กลางยีน *rhIA* ส่วนอีกสองชิ้นที่เหลือนั้นไม่ทราบว่าชิ้นใดอยู่บริเวณปลายยีน *rhIA* ดังนั้นจึงทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด ตามที่แสดงในรูปที่ 4.13 เพื่อเปรียบเทียบหาชิ้นที่คาดว่าจะมีส่วนปลายของยีน *rhIA*

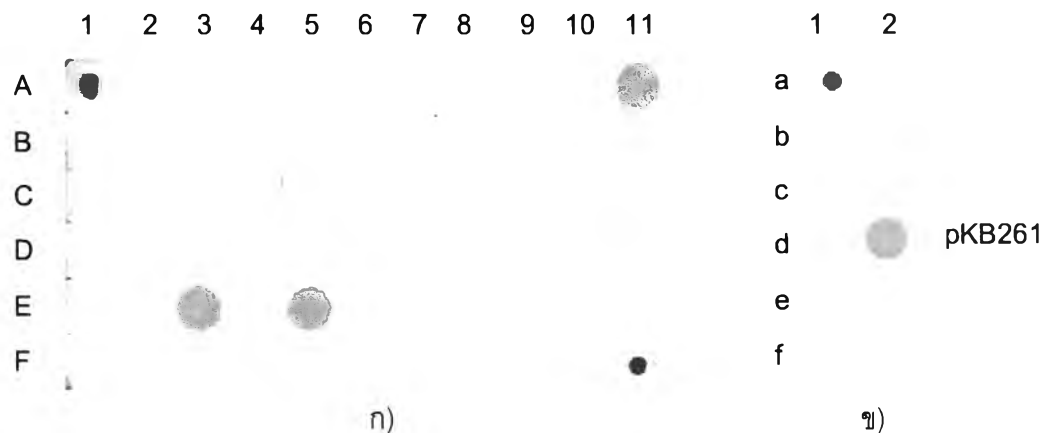
ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.13 ก) ผลไฮบริดเซชันเป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.13 ข) พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริดซ์ต่างกัน ขึ้นผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวน *rhIA* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยไพรเมอร์ RA-F และ RA-R จะให้สัญญาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* (*rhIA*-probe)



รูปที่ 4.13 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์บางชนิด ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhlA*

จากผลการค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มีส่วนปลายยื่นของ *rhlA* ด้วยเทคนิคไฮบริโดเซชันตามรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่าเมื่อตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ *BglII-BamHI* จะตัดดีเอ็นเอให้สัญญาณ 2 สัญญาณ ซึ่งมีขนาด 2.0 และ 0.5 กิโลเบส ไม่พบสัญญาณขนาด 5.0 กิโลเบส จะแสดงให้เห็นว่าเรสทริกชันเอนไซม์ *BglII* จะตัดภายในชิ้น *BamHI* ขนาด 5.0 กิโลเบส ให้มีสัญญาณรวมกับชิ้น *BamHI* ขนาด 0.5 กิโลเบส ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGA396 ในรูปที่ 4.12 ที่จะมามีบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ *BglII* อยู่เหนือบริเวณจดจำของ *BamHI* ไปทางปลาย 5' เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BglII-BamHI* จะให้ดีเอ็นเอขนาด 0.5 เช่นกัน แสดงว่าชิ้น *BamHI* ขนาด 5.0 กิโลเบสนี้จะอยู่บริเวณเหนือยีน *rhlA* ดังนั้นเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมในการโคลนชิ้น *rhlA* ส่วนปลายยื่นให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดคือ *BamHI* ที่ให้สัญญาณขนาด 2.0 กิโลเบส

นำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแยกโคลนเข้า pBluescript KS(+/-) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทำได้ด้วยวิธี Blue/White selection เลือกเฉพาะโคลนที่มีโคโลนีสีขาว จากนั้นคัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.9.4.3) ผลสัญญาณจากการไฮบริดซ์ของโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.0 กิโลเบส ซึ่งมีส่วนปลายยื่น *rhIA* อยู่ เป็นไปตามรูปที่ 4.14

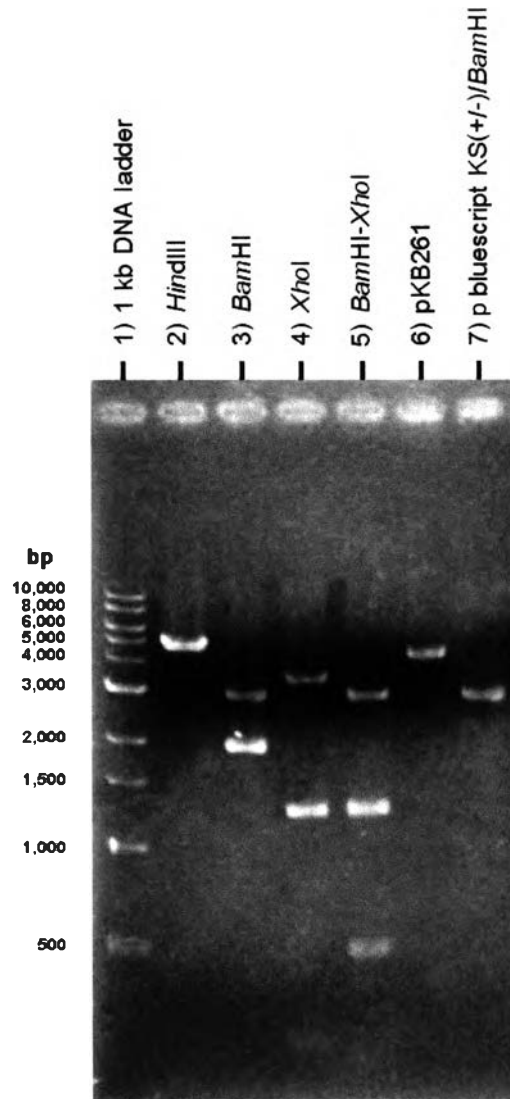


รูปที่ 4.14 n) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาด 2.0 กิโลเบสอยู่ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* ข) Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม A11 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA*

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

จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นในรูปที่ 4.14 แสดงว่าในโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.0 กิโลเบส มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในตัวอย่างกลุ่ม A11 ดังแสดงในรูปที่ 4.14 n) คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม A11 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* อีกครั้งพบว่าโคลนที่ d2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริดซ์ชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

จึงเลือกโคลน d2 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pKB261 ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ข) ทำการตัดพลาสมิด pKB261 ด้วยเอนไซม์ restriction บางชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.15 เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เอนไซม์ restriction ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.16

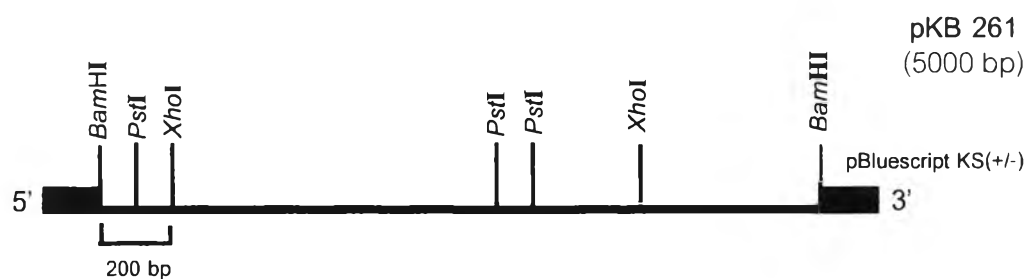


รูปที่ 4.15 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของยีนดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2-6 พลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction

ช่องวิ่งที่ 7 พลาสมิด pKB261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction BamHI



รูปที่ 4.16 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pKB261

#### 4.13 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ใน pKB261

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อกันจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pKB261 ขนาด 1975 bp (ภาคผนวก ๑5) โดยใช้ไพรเมอร์ T3 T7 BF1 และ BR2 ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1466-3440 ซึ่งเมื่อนำไปเทียบความคล้ายของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast X version 2.2.9 ซึ่งจะทำให้การแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank พบกรอบอ่านรหัสเปิด 3 กรอบ มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ กรอบอ่านรหัสแรก ประกอบด้วย 85 ลำดับกรดอะมิโน พบรหัสหยุดแต่ไม่พบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 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 ลำดับกรดอะมิโน คล้าย 100% กับกรดอะมิโนที่ 1-81 ของ regulatory

protein RhIR ที่ระบุรหัสโดย *rhIR* 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 พอนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอยู่ 93 bp โดยชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pGA396 จะเรียงตัวอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pKB261

ส่วนกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 และ 3 ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pKB261 พบว่าคล้าย rhamnosyltransferase chain B และ regulatory protein RhIR เหมือนกับชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pBR530 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบกันพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอยู่ 513 bp โดย pKB261 เรียงอยู่บน 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 4.17 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากนั้นนำไปเทียบหาความคล้ายกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ใน GenBank (ภาคผนวก ค) พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิงได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.1 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในรูปที่ 4.17 และสามารถนำไปสร้างเป็นแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.19 จากรูปจะแสดงบริเวณจุดจำของเรสทริกชันเอ็นไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบและบริเวณที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม



**ORF1 (dcd) →**

1 5' GAATTCAAGGTGTTACCAACATCCATTCGGCGGTGGTTCGATCCGAAGAACTTCGACGAG  
52 E F K V F T N I H S A V V D P K N F D E

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

121 GCGCGCACCGTTCGAGTACTTCCGCATCCCGCGCGACGTCTGACCATCTGCCTGGGCAAG  
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 GAAGGCGTGGCGCAGATGCTCTTCCTGCAATCCGACGAGGCTGCGAAGTGTCTATAAG  
152 E G V A Q M L F L Q S D E A C E V S Y K

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

421 AGCGTTTCGACACCGGAAACCGGGCCTGGCGCCCGGTTTTTTCATGCCTTTTCGCCAAC  
481 CCCTCGCTGTTCCCCGCCGGCCGCTCTGGCACGCCTTATCGGGCGGGCAGGGGCTTAT

541 GCGCAGGCGGCCGCCCGTCTCTGTGAAATCTGGCAGTTACCGTTAGCTTTCGAATTGGCTA  
601 AAAAGTGTTCATCGGCTACGCGTGAACACGGACGCCAATCGTTTGCAGGCGGATCTGC  
661 AAGACCCACACAAGCCCCTCGCCTGAAGGGGTACGCATCCGCCGTGGCTGGTCCGCGCGG  
721 ATGGCCGCTGAGTTACTTGTCTGCCGTTTGAACAATAAGAACGAACCTTACGTAATGCCG

781 GGATACCCGTGGCAGCGATAGCTGTTTGCTGTTTCGAAAATTTTTGGGAGGTGTGAAATG  
1 (S/D) ORF2  
M

**(rhla) →**

841 CGGCGCGAAAGTCTGTTGGTATCGGTTTGAAGGGCCTGCGGGTACATGTCGAGCGCGTT  
2 R R E S L L V S V C K G L R V H V E R V

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

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

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

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

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

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

(มีต่อหน้าถัดไป)

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

1501 TGGGACGAATACACCACCGCCGAGGACGCCCGCCAGTTCGCGACTACCTGCCGCACTGC  
 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 GTACCGGTGCACCGCGCCCTGCTCGAGCACCTGCTGAAGCAACCGGAGCCGCGAGCGGGCG  
 262 V R V H R A L L E H L L K Q P E P Q R A

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

**(S/D) ORF3**

1741 AGACCCGGCCTGGCCGGGCTTTGCGGTTGCATAACGCACGGAGTAGCCCC**ATG**CACGCCA  
 1 M H A I

**(*rh1B*)** →

1801 TCCTCATCGCCATCGGCTCGGCCGGCGACGTATTTCCCTTCATCGGCTTGCCCGGACCC  
 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 AGCAGCACGGCATCGGTTTCGTCCCGCTGAGCGACGAACTGACCTACCGCCGGACCATGG  
 45 Q H G I A F V P L S D E L T Y R R T M G

1981 GCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTCTGGCAAGCCATCGCCG  
 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 TGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCTTGTGTGCGGCGCACCTGCCGCCGGTACACCCCA  
 125 S A Q V S P S T L L S A H L P P V H P K

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

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

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

(มีต่อหน้าถัดไป)

2401 TCTGCCTGTTCCCGGCCTGGTTCGCGCCGCCCCAGCAGGATTGGCCGCAACCCCTGCACA  
 205 C L F P A W F A P P Q Q D W P Q P L H M  
 2461 TGACCGGCTTCCCGCTGTTTCGACGGCAGTATCCCGGGGACCCCGCTCGACGACGAACTGC  
 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 TCTTCCTCACC GCGCCGGCCAGGAACCGCTGCGCGGCTTGCCGAATCACGTGCTGCAGC  
 285 F L T G A G Q E P L R G L P N H V L Q R  
 2701 GCGCCTACGCGCCACTGGGAGCCTTGCTGCCATCGTGCGCCGGGCTGGTCCATCCGGGGC  
 305 A Y A P L G A L L P S C A G L V H P G G  
 2761 GTATCGGCGCCATGAGCCTGGCCTTGCGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTGCG  
 325 I G A M S L A L A A G V P Q V L L P C A  
 2821 CCCACGACCAGTTCGACAATGCCGAACGGCTGGTCCGGCTCGGCTGCGGGATGCGCCTGG  
 345 H D Q F D N A E R L V R L G C G M R L G  
 2881 GCGTGCCATTGCGCGAGCAGGAGTTGCGCGGGGCGCTGTGGCGCTTGCTCGAGGACCCGG  
 365 V P L R E Q E L R G A L W R L L E D P A  
 2941 CCATGGCGGGCCCTGTTCGGCGTTTCATGGAATTGTCACAACCGCACAGTATCGCTTGCG  
 385 M A A A C R R F M E L S Q P H S I A C G  
 3001 GTAAAGCGGCCCAGGTGGTTCGAACGTTGTCATAGGGAGGGGATGCGCGATGGCTGAAGG  
 405 K A A Q V V E R C H R E G D A R W L K A  
 3061 CTGCGTCCTGAACGGTCTGGCATAACAGATAGGGTTGCCATGATTTTGCCGTATCGGCA  
 425 A S \*  
**las box -35 -10**  
 3121 AGGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGTGATGCATTTTATCGA  
 → ←  
**(S/D) ORF4 (rhIR) →**  
 3181 TCAGGGCTTACTGCAATGAGGAATGACGGAGGCTTTTGTGCTGTGGTGGGACGGTTTGCCT  
 1 M R N D G G A L L W W D G L R  
 3241 AGCGAGATGCAGCCGATCCACGACAGCCAGGGCGTGTTCGCCGTCTGGAAAAGGAAGTG  
 16 S E M Q P I H D S Q G V F A V L E K E V  
 3301 CGGCGCCTGGGCTTCGATTACTACGCCTATGGCGTGCGCCATACGATTCCCTTACCCCGG  
 36 R R L G F D Y Y A Y G V R H T I P F T R  
 3361 CCGAAGACCGAGGTCCATGGCACCTATCCCAAGGCCTGGCTGGAGCGATACCAGATGCAG  
 56 P K T E V H G T Y P K A W L E R Y Q M Q  
 3421 AACTACGGGGCCGTGGATCCGGCGATCCTCAACGGCCTGCGCTCCTCGGAAATGGTGGTT  
 76 N Y G A V D P A I L N G L R S S E M V V  
 3481 TGGAGCGACAGCCTGTTTCGACCAGAGCCGGATGCTCTGGAACGAGGCTCGCGATTGGGGC  
 96 W S D S L F D Q S R M L W N E A R D W G  
 3541 CTCTGTGTCGGCGCGACCTTGCCGATCCGCGCGCCGAACAATTTGCTCAGCGTGCTTTCC  
 116 L C V G A T L P I R A P N N L L S V L S

(มีต่อหน้าถัดไป)

3601 GTGGCGCGGACCAGCAGAATATCTCCAGCTTCGAGCGCGAGGAAATACGCCTGCGGCTG  
 136 V A R D Q Q N I S S F E R E E I R L R L

3661 CGTTGCATGATCGAGTTGCTGACCCAGAAGCTGACCGACCTGGAGCATCCGATGCTGATG  
 156 R C M I E L L T Q K L T D L E H P M L M

**C-terminus ของ RhlR**

3721 TCCAACCCGGTCTGCCTGAGCCATCGCGAGCGGAGATCCTGCAATGGACCGCCGACGGC  
 176 S N P V C L S H R E R E I L Q W T A D G

3781 AAGAGTTCCGGGGAAATCGCCATCATCTGAGCATCTCCGAGAGCACGGTGAACCTCCAC  
 196 K S S G E I A I I L S I S E S T V N F H

3841 CACAAGAACATCCAGAAGAAGTTTCGACGCGCCGAACAAGACGCTGGCTGCCGCTACGCC  
 216 H K N I Q K K F D A P N K T L A A A Y A

**las box**

3901 GCGGCGCTGGGCCTCATCTGATGCTTAGGGCGCGCCGGCTGGCGCGCCCTACAGATCTG  
 236 A A L G L I \*

3961 GCAAGTTGCTGCCGTTTCATCTCCTTTAGTCTTCCCCCTCATGTGTGTGCTGGTATGTC  
 ←

-35
-10

4021 CTCCGACTGAGAGGGCCCAGGAGTATCAGGGTAGGGATGCCGCTTTTTTTCTCGGCCGG

(S/D)
ORF5
(rhII) →

4081 CACGACACGGGGACTTGGTCAATGATCGAATTGCTCTCTGAATCGCTGGAAGGGCTTTCCG  
 1 M I E L L S E S L E G L S A

4141 CCGCCATGATCGCCGAGCTGGGACGCTACCGGCATCAGGTCTTCATCGAGAAGCTGGGCT  
 15 A M I A E L G R Y R H Q V F I E K L G W

4201 GGGATGTGGTCTCCACCTCCAGGGTCCGCGACCAGGAGTTCGACCAGTTCGACCATCCGC  
 35 D V V S T S R V R D Q E F D Q F D H P Q

4261 AAACCCGCTACATCGTCGCCATGGGCCGCCAGGGTATCTGCGGTTGTGCCCGCTGTTGC  
 55 T R Y I V A M G R Q G I C G C A R L L P

4321 CGACGACCGACGCTACCTGCTCAAGGAAGTCTTCGCTACCTGTGCAGCGAAACCCCGC  
 75 T T D A Y L L K E V F A Y L C S E T P P

4381 CCAGCGATCCGTCGGTCTGGGAGCTTTCGCGTTACGCCGCCAGCGCGGGCGGACGATCCGC  
 95 S D P S V W E L S R Y A A S A A D D P Q

4441 AACTGGCGATGAAGATATTCTGGTCCAGCCTGCAATGCGCCTGGTACCTGGGCGCCAGTT  
 115 L A M K I F W S S L Q C A W Y L G A S S

4501 CGGTGGTGGCGGTGACCACCACGGCCATGGAGCGCTATTTTCGTTGCAACGGCGTGATCC  
 135 V V A V T T T A M E R Y F V R N G V I L

4561 TCCAGCGCCTCGGCCCGCCGAGAAGGTCAAGGGCGAGACGCTGGTCGCGATCAGCTTCC  
 155 Q R L G P P Q K V K G E T L V A I S F P

4621 CGGCCTACCAGGAGCGCGGCCTGGAGATGCTGCTGCGCTACCACCCGGAATGGCTGCAGG  
 175 A Y Q E R G L E M L L R Y H P E W L Q G

4681 GCGTACCGCTGTGATGGCGGTGTGAGGTGCTCAGCCGTTTCGCGCACTTTTTTCCGCTT  
 195 V P L S M A V \*

(มีต่อหน้าถัดไป)

4741 CTCTGCCGCATGCTCGGCCCGCGCCCCGGCGTCATCGGGCGTTCCCCTGCATTCCGGGA  
 4801 TTTGGCCGCGGCTGCCGACTTGCGTAGTCTCTCTGCGGTCCGCCATCCCGAGGAGTCGCC  
 4861 ATGCCGAAGTCATTCCGCCATCTCGTCCAGGCCCTGGCCTGCCTTGCCTGCTGGCCAGC  
 4921 GCCAGCCTCCAGGCGCAGGAGAGCCGCTCGACCGCATCCTCGAG 3'

รูปที่ 4.17 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 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ดังนั้นก็จึงไม่พบส่วนโปรโมเตอร์และส่วนที่คาดว่าจะเป็ตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (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 *rhIA*

บริเวณเหนือ ORF 2 (*rhIA*) 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 บริเวณตำแหน่งเกาะของไรโบโซมมักจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีน 3-10 เบส อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิดประมาณ 10 เบส

นอกจากนี้ยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณ consensus sequence ของโปรโมเตอร์ชนิด  $\sigma^{54}$  บริเวณดังกล่าวประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ "TGGCAT-N<sub>5-6</sub>-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* *xyICAB* และ *xyIS* ในพลาสมิดของ *P. putida* TOL และยีนที่ระบุนรหัส carboxypeptidase ของ *Pseudomonas* CPG2

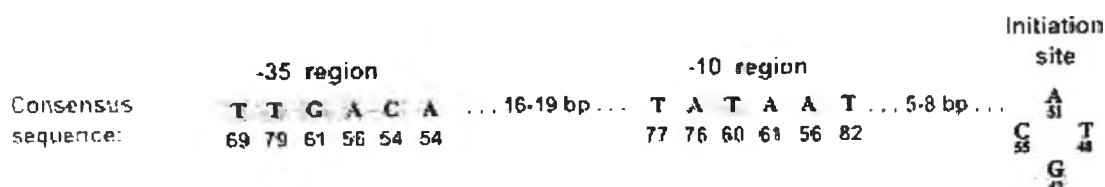
เหนือขึ้นไปจากโปรโมเตอร์พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนกลับกันในลักษณะ dyad symmetry region และสามารถเข้าคู่กันได้เกิดเป็น palindrome คือ 5'-TCCTGTGAAATCTGGC AGTT-3' ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 558-577 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบว่ามี consensus sequence ของ *las* box คือ "NNCT-[N]<sub>11-12</sub>-AGNN" (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 *rhIA* ของ *P. aeruginosa* ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นบริเวณจดจำของ RhIR-PAI-2 complex (RhIR-C<sub>4</sub>-HSL) ที่กระตุ้นการทำงานของยีนบริเวณ *las* box ของ *lasB* OP1 และ *rhIA* 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 *rhIB* เหนือ ORF 3 (*rhIB*) ขึ้นไปยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-GGAG-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 11 นิวคลีโอไทด์ ไม่พบส่วนที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *rhIB* น่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกับ *rhIA* 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 RhIR 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 *rhIR*

บริเวณเหนือ ORF 4 (*rhIR*) ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-AGGG-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 13 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับที่ Shine และ Dalgarno (1974) เสนอด้งที่ได้อธิบายแล้วในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-GCGTCA-3' และ 5'-TGTGAT-3' (ด้งแสดงในรูปที่ 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) ด้งแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.18 consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Lisser และ Margalit, 1993) ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดงเปอร์เซ็นต์การพบเบส

บริเวณปลายด้าน-C ของลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น "LSXREX<sub>2</sub>ILX<sub>5</sub>GX<sub>22</sub>NX<sub>3</sub>K" (X หมายถึงกรดอะมิโนใดๆ) (Ochsner และคณะ, 1994b) โดยใน ORF นี้มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ดังกล่าวประกอบด้วย LSHREREILQWTADGKSSGEIAILLSISESTVNFHHKNIQKK ซึ่งพบอยู่ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 181-222 โดยตัวอักษรหนาแสดงส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัส (regulatory protein) นอกจากนี้ภายในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวยังพบบริเวณ DNA-binding helix-turn-helix motif หรือเรียกว่า H-T-H motif อยู่ภายในแสดงด้วยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ซึ่งเป็นบริเวณที่เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ควบคุมอยู่ มักพบในตัวควบคุมแบบที่ต้องอาศัยตัวควบคุมอื่นมาก่อนจึงทำงานได้ (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 *rhIR* ของ *P. aeruginosa* ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นบริเวณจดจำของ LasR-PAI-1 complex (LasR-3O-C<sub>12</sub>-HSL) ที่กระตุ้นการทำงานของยีนบริเวณ *las* box ของ *lasB* OP2 และ *rhIR* 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 RhII ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และ Reiser, 1995) เท่ากับ 94% autoinducer synthesis protein RhII (Stover และคณะ, 2000) และ VSMI ซึ่งเป็น autoinducer synthesis protein (Latifi และคณะ, 1995) ของ *P. aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 93% และ *N*-acyl-homoserine lactone synthase CSal ของ *Pseudomonas chlororaphis* (Zhang และ Pierson, 2001) เท่ากับ 50% โปรตีน RhII นี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer ชนิด butanoyl-homoserine



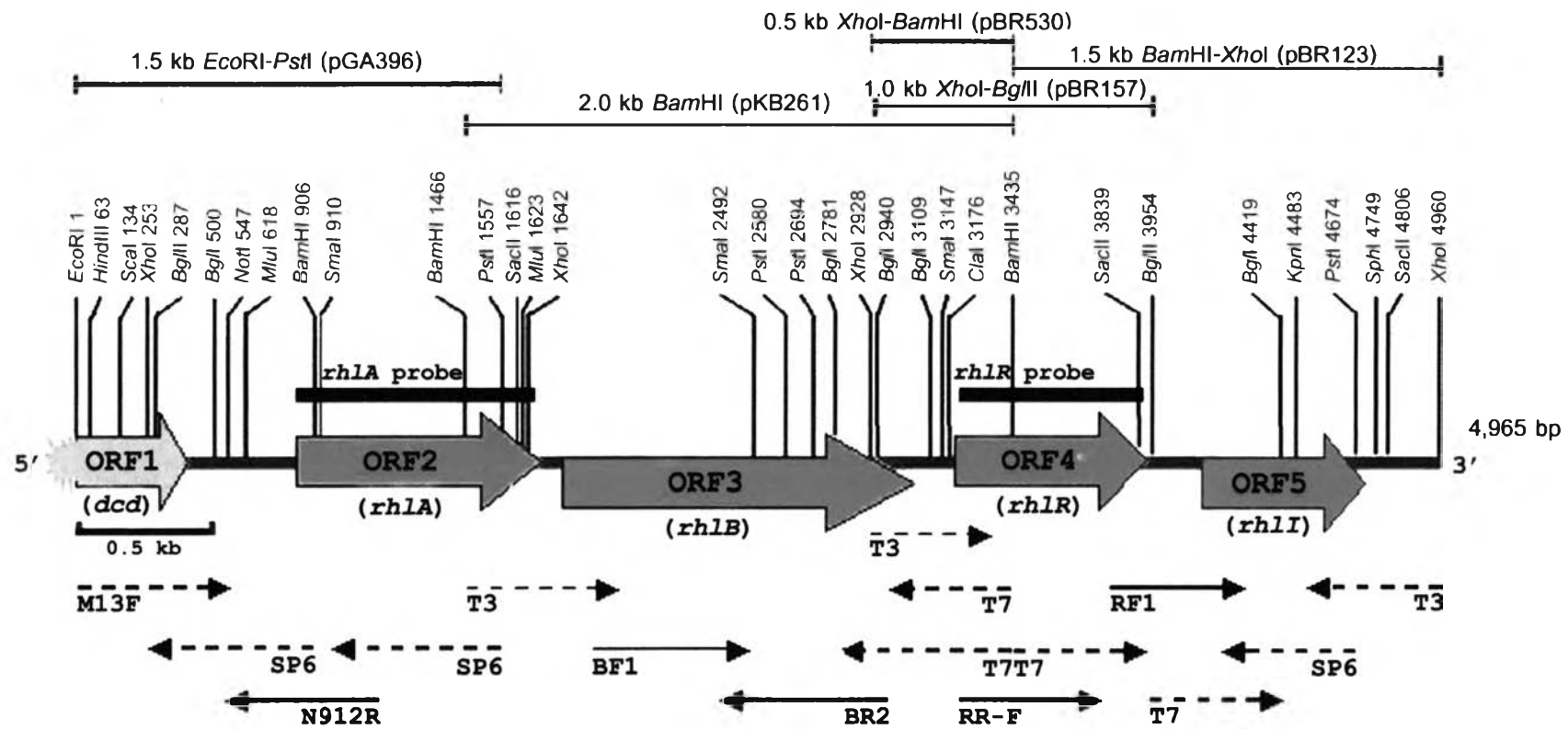
lactone (C<sub>4</sub>-HSL) ทำงานร่วมกับโปรตีน RhlR ไปกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlAB* ได้เป็น rhamnosyltransferase 1 ไปใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ให้ชื่อ ORF5 ว่า *rhlI*

บริเวณเหนือ ORF 5 (*rhlI*) ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นที่ตำแหน่งเกาะของไรโบซอม (Shine-Dalgarno sequence (S/D)) คือ 5'-GGGGA-3' ซึ่งอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นกรอบอ่านรหัสเปิด 12 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับที่ Shine และ Dalgarno (1974) เสนอตั้งที่ได้อธิบายแล้วในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-CTGAGA-3' และ 5'-TATCAG-3' (ดังแสดงในรูปที่ 4.17) 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]<sub>11-12</sub>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

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับยีนอ้างอิง

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ (ORF)	ยีน	ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนกรดอะมิโน	ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุด	จำนวนกรดอะมิโนของยีนอ้างอิง	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายกับกรดอะมิโนอ้างอิง	เอกสารอ้างอิง
1	<i>dcd</i>	1-411	137	<i>dcd</i> ของ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 ประมวลรหัส deoxycytidine triphosphate deaminase	188	100%	Stover และคณะ, 2000
2	<i>rhIA</i>	838-1722	295	<i>rhIA</i> ของ <i>P. aeruginosa</i> PG201 ประมวลรหัส rhamnosyltransferase chain A	295	100%	Ochsner และคณะ, 1994a
3	<i>rhIB</i>	1791-3068	426	<i>rhIB</i> ของ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 ประมวลรหัส rhamnosyltransferase chain B	426	100%	Stover และคณะ, 2000
4	<i>rhIR</i>	3196-3882	241	<i>rhIR</i> ของ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 และ PG201 ประมวลรหัส transcriptional regulator RhIR	241	100%	Stover และคณะ, 2000 และ Ochsner และคณะ, 1994b
5	<i>rhII</i>	4101-4703	201	<i>rhII</i> ของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201 ประมวลรหัส autoinducer synthetase RhII	201	94%	Ochsner และ Riser, 1995



รูปที่ 4.19 แผนที่เรสทริกชันของจีนดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pGA396 pKB261 pBR530 และ pBR123 ขนาด 4,965 bp แสดงตำแหน่งที่เป็น กรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม *rhIA* และ *rhIR* และทิศทางในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ ของจีนดีเอ็นเอสอดแทรก ลูกศร ใหญ่แสดงทิศทางในการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไพรเมอร์ตัวต่างๆ ตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย  $\rightarrow$  เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ  $- \rightarrow$  เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย  $\star$  แสดง ORF ที่ไม่สมบูรณ์