บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษา

จากการทดสอบ hemolytic activity ของเชื้อแบคทีเรีย *P. pseudomallei* ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และจากคณะเวชศาสตร์เขตร้อนมหาวิทยาลัยมหิดล โดยวิธี cellophane plate technique (20) พบว่าทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบให้ hemolytic activity อยู่ในช่วง 2-256 HU ส่วน *E. coli* JM 109 (pUC18) ซึ่งใช้เป็นเซลล์สำหรับรับยีนนั้นไม่มี hemolytic activity เชื้อที่ให้ hemolytic activity สูงสุด คือ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 ได้ค่า hemolytic activity 256 HU ดังตารางที่ 2 ดังนั้นจึงเลือก *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 มาใช้ในการศึกษา

2. การโคลนยีนจากโครโมโซม (genomic DNA cloning) ของ *P. pseudomallei*

2.1 การสกัด chromosomal DNA ของเชื้อ *P. pseudomallei*

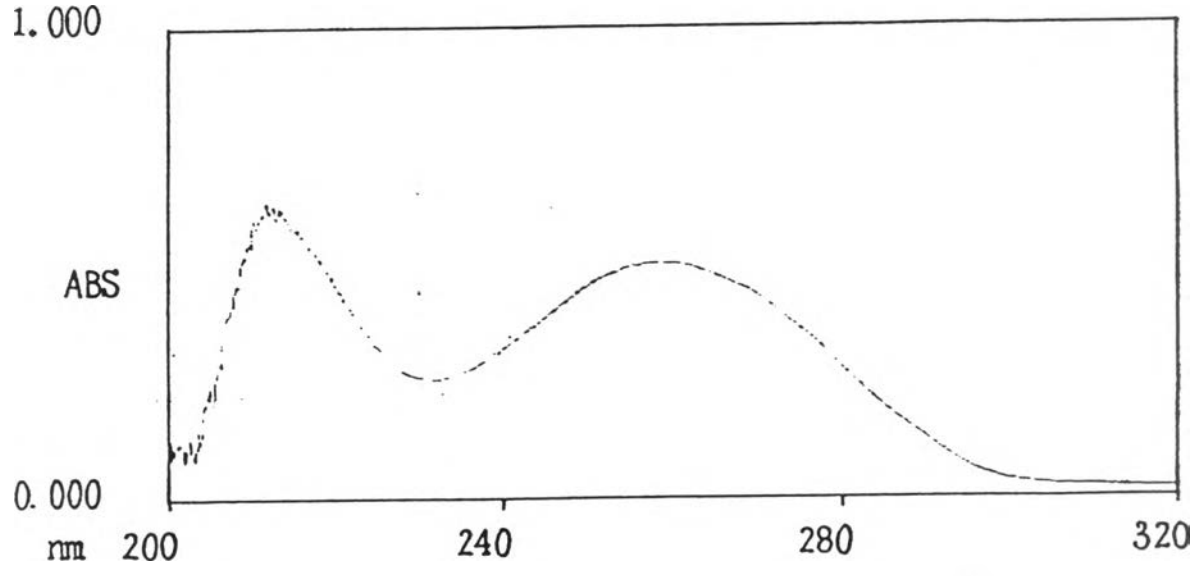
Chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ที่เตรียมได้จากวิธี alkaline lysis ร่วมด้วยกับการใช้ CTAB เพื่อกำจัด polysaccharide และทำการตกตะกอน DNA ด้วย ethanol เมื่อนำมาวัดค่า optical density (O.D.) ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-300 nm ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่า O.D. ของ chromosomal DNA ที่เจือจาง 1:20 มีค่าเท่ากับ 0.498 ดังนั้นความเข้มข้นของ chromosomal DNA จึงมีค่าเท่ากับ 0.498 mg/mL ส่วนค่า O.D.260: O.D.280 เท่ากับ 0.498 : 0.274 คือเท่ากับ 1.8 ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์อยู่ในช่วงที่นำมาใช้ได้ การวิเคราะห์ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ด้วย agarose gel electrophoresis และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide พบว่า chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ที่สกัดได้อยู่ในรูป "high molecular weight" มีขนาดใหญ่กว่า 23 kb ดังรูปที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบหา hemolytic activity ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี cellophane plate technique ของ Liu และคณะ (20)

ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Dilution สุดท้ายที่ให้ hemolysis	Hemolytic U/mL	ลักษณะของการ hemolysis บน blood agar
JM109(pUC18)	-	-	-	non
C1/85	human,blood	1:32	64	∝
C1/86	human,blood	1:1	2	∝
C2/30	ไม่มีข้อมูล	1:4	8	non
C2/88	human,blood	1:2	4	non
C3/87	ไม่มีข้อมูล	1:4	8	∝
C3/88	human,blood	1:2	4	non
C4/86	human,pus	1:4	8	non
C4/88	synovial fluid	1:8	16	∝
C6/88	human,blood	1:32	64	∝
E1/88	human,pus	1:4	8	∝
K1/88	human,pus	1:128	256	∝
S2/87	ไม่มีข้อมูล	1:16	32	∝
S6/87	human,sptum	1:1	2	∝
NCTC 7431	human	1:2	4	∝
NCTC 4845	monkey	1:8	16	∝

non คือ ลักษณะการไม่สลายเม็ดเลือดแดง

∝ คือ ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงเพียงบางส่วน



nm	ABS
320.0	0.019
310.0	0.022
300.0	0.037
290.0	0.131
280.0	0.274
270.0	0.429
260.0	0.498
250.0	0.450
240.0	0.316
230.0	0.254
220.0	0.451
210.0	0.591
200.0	0.112

รูปที่ 2 แสดงช่วงค่าการดูดกลืนแสงของ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 วัดโดย UV-visible recording spectrophotometer (HITACHI model U-200)

2.2 การตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei*

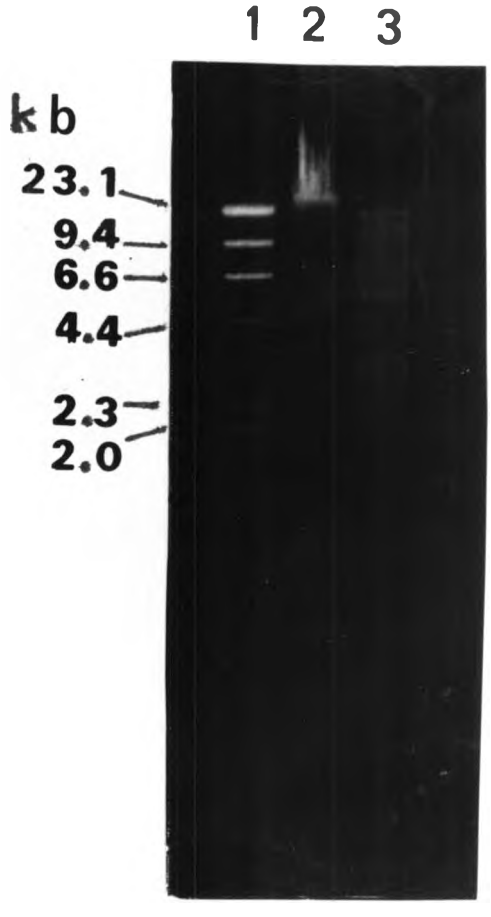
เริ่มต้นจากการคัดเลือก Restriction endonuclease ที่ตัด sites บริเวณ polylinker ของ pUC18 เช่น EcoRI,KpnI,SmaII และ PstI มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อใช้ตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ให้ได้ลักษณะ partial digestion พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ PstI ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นไม่สามารถตัด chromosomal DNA ของ K1/88 ได้ดังนั้นจึงใช้ PstI ตัด chromosomal DNA ด้วยปริมาณ 1 µg ต่อเอ็นไซม์ 1 unit เป็นเวลา 5 นาที ในปริมาณ DNA 20 µg ต่อปริมาตรรวม 400 mL จะให้แบบแผนการตัด chromosomal DNA เป็น smear (smear band) ดังรูปที่ 3

2.3 การตัด pUC18 DNA แบบ complete digestion

พลาสมิด pUC18 ความเข้มข้น 0.662 mg/mL เมื่อนำมาตัดแบบ complete digestion ด้วย Restriction endonuclease PstI ในอัตราส่วน DNA 1 µg ต่อเอ็นไซม์ 1 unit ได้ Linear DNA ดังแสดงในรูปที่ 4

2.4 การ transform recombinant plasmid เข้าสู่ *E. coli*

หลังเตรียม chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 โดยตัดด้วย PstI ได้แบบ partial digestion แล้วจึงนำมาเชื่อม (ligation) กับชิ้น DNA ที่ได้จากการตัด pUC18 ด้วย PstI แล้วนำไปดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดย alkaline phosphatase หลังเชื่อมเสร็จแล้วนำไป transform *E. coli* JM109 คัดเลือก transformant ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผสม ampicillin 50 µg/mL และ X-gal 0.1 mg/mL คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามี recombinant plasmid ซึ่งมียีนไทป์เป็น ampicillin resistance และ β - galactosidase negative ได้จำนวน 160 โคโลนี ได้เปอร์เซนต์ของโคโลนีสีขาวต่อโคโลนีสีฟ้า 85% และมีประสิทธิภาพในการ transform เท่ากับ $5x10^3$ CFU/µg DNA หลังจากคัดเลือกร่วมกับวิธีเทียบขนาดกับพลาสมิด pUC18 โดยวิธีของ Deininger (85) ส่วนโคโลนีสีฟ้าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli* JM109 ที่ได้รับ pUC18 ซึ่งมียีนไทป์เป็น ampicillin resistance และ β-galactosidase positive ดังรูปที่ 5.1 และ 5.2

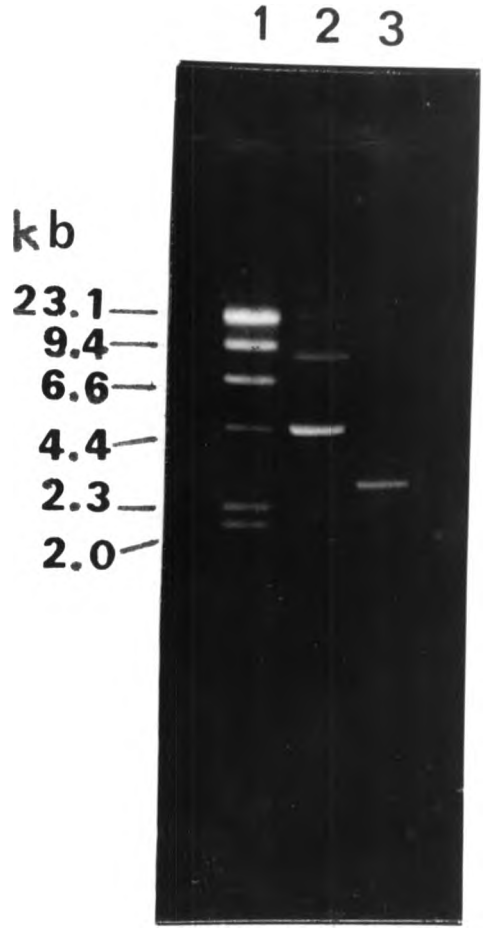


รูปที่ 3 แสดงผลการตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 ตัดด้วย PstI แบบ partial digestion แยกด้วย agarose gel electrophoresis ใช้ 0.8% agarose gel ความต่างศักดิ์ 76 V เวลา 2 ชม.

Lane ที่ 1 คือ λDNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* ก่อนตัดด้วยเอนไซม์

Lane ที่ 3 คือ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* หลังตัดด้วยเอนไซม์

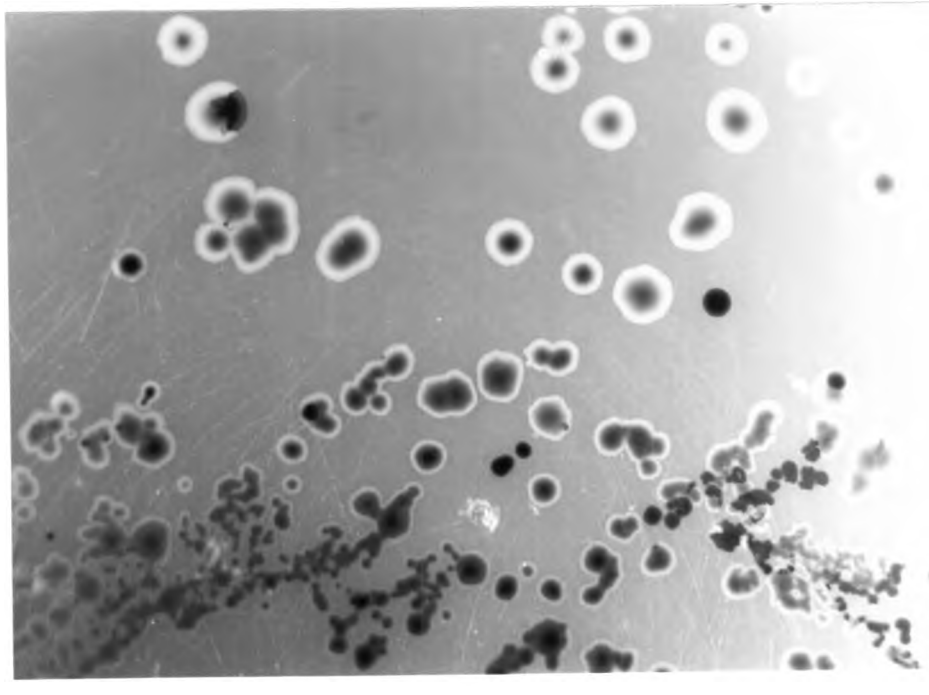


รูปที่ 4 แสดงผลการตัดพลาสมิด pUC18 แบบ complete digestion ด้วย PstI วิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis ใช้ 0.8% agarose gel ความต่างศักย์ 80 V เวลา 2 ชม.

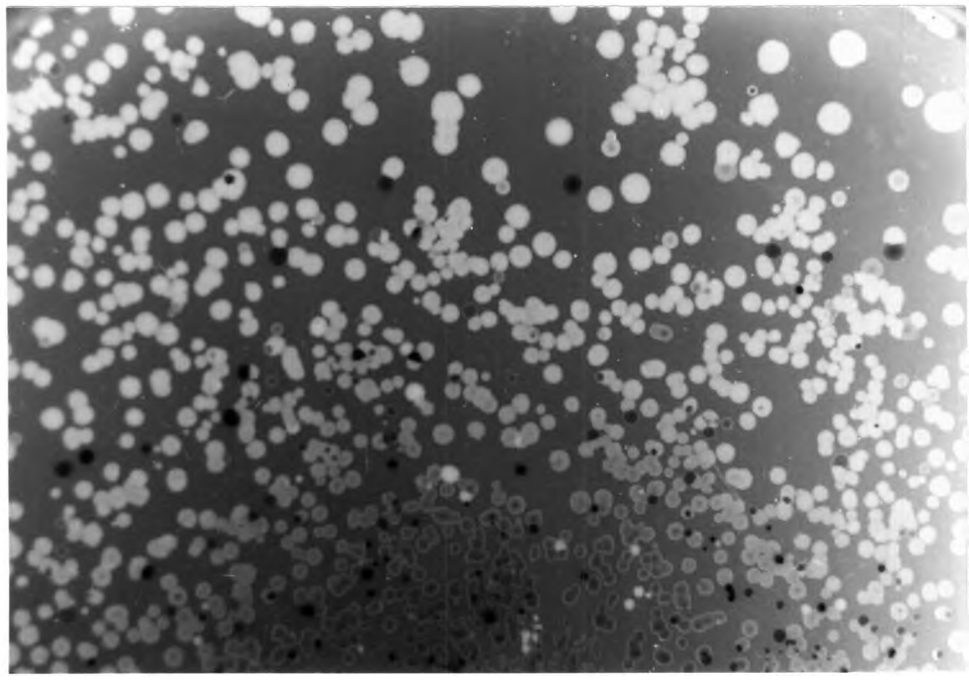
Lane ที่ 1 คือ λDNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ pUC18

Lane ที่ 3 คือ pUC18 ตัดด้วยเอ็นไซม์ PstI



รูปที่ 5.1 แสดงโคโลนีของ *E. coli* JM109 (pUC18) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม ampicillin 50 µg/mL และ X-gal 0.1 mg/mL ลักษณะโคโลนีสีฟ้าเกิดจากการย่อยสลาย X-gal ให้ผลิตภัณฑ์สีฟ้า



รูปที่ 5.2 แสดงโคโลนีของ *E. coli* JM109 ที่ได้รับเอา recombinant plasmid เข้าไปในเซล ทำให้โคโลนีมีฟีโนไทป์เปลี่ยนไป เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม ampicillin 50 µg/mL และ X-gal 0.1 mg/mL สังเกตลักษณะโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีขาว เมื่อเทียบกับโคโลนีของ *E. coli* JM109(pUC18) เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลาย X-gal

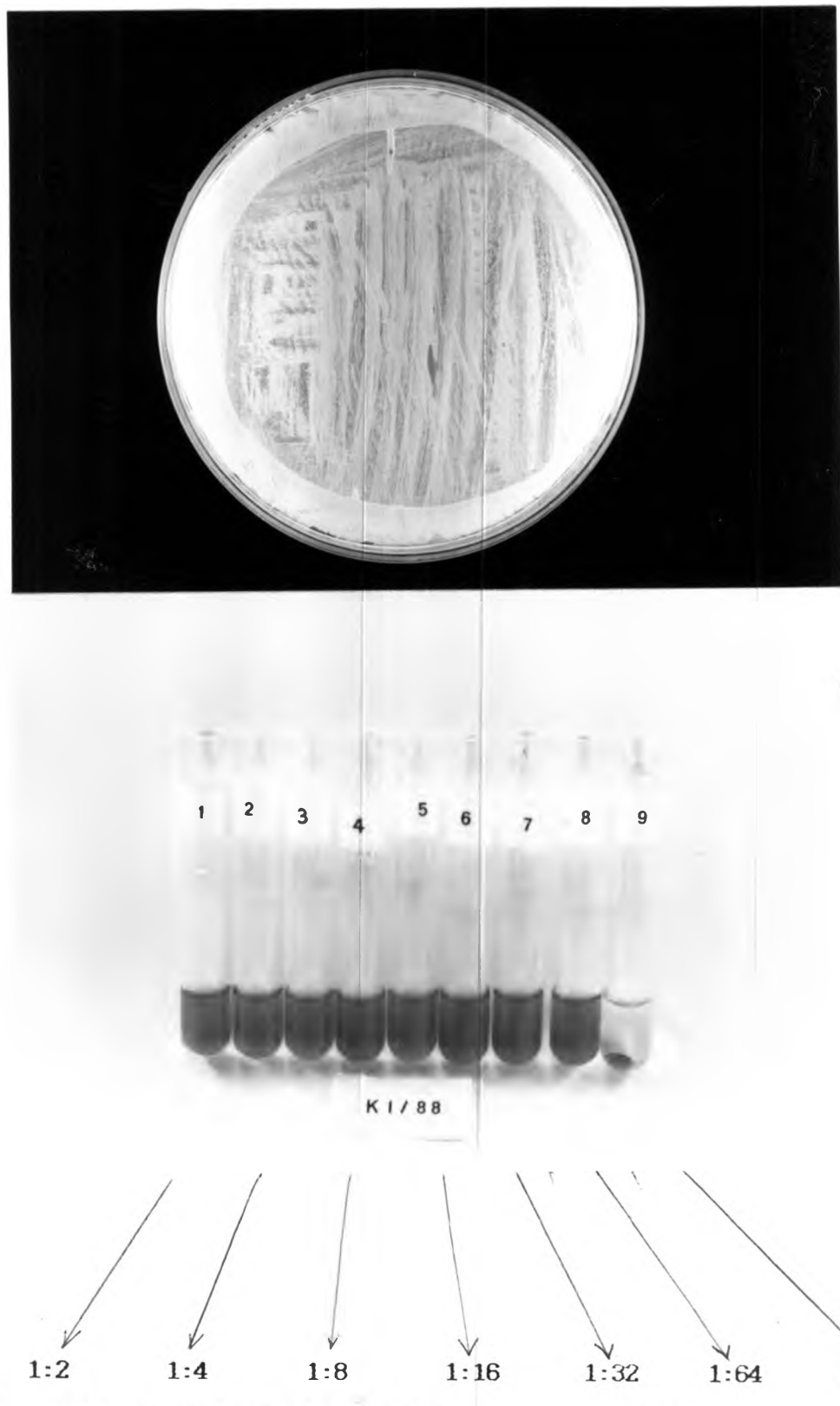
3. การคัดเลือก *E. coli* transformant ที่มี hemolytic activity

ผลจากการโคลนยีนทั้งหมดได้ transformant จำนวน 160 โคโลนี นำมาทดสอบ hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique หา hemolysin titer เทียบกับ *P. pseudomallei* K1/88 และ *E. coli* JM109 (pUC18) ซึ่งใช้เป็น negative control ตามลำดับ พบ transformant จำนวน 3 โคลน จาก 160 โคลนที่ให้ hemolytic activity หลังจากสกัด recombinant plasmid ออกจากเซลเจ้าบ้าน (host cell) โดยวิธี alkaline lysis พบ recombinant plasmid pWC3 pWC7 และ pWD1 ขนาดประมาณ 4.4 kb 4.0 kb และ 7.0 kb ตามลำดับ เมื่อเทียบกับขนาดของพลาสมิด pUC18 ในลักษณะ linear form ผลการทดสอบหา hemolytic activity ของ *E. coli* transformants แสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 6.1 และ 6.2

4. การพิสูจน์ว่า hemolysin-expressing *E. coli* มี *P. pseudomallei* DNA inserts

4.1 หาขนาดของ inserted DNA จาก recombinant plasmids

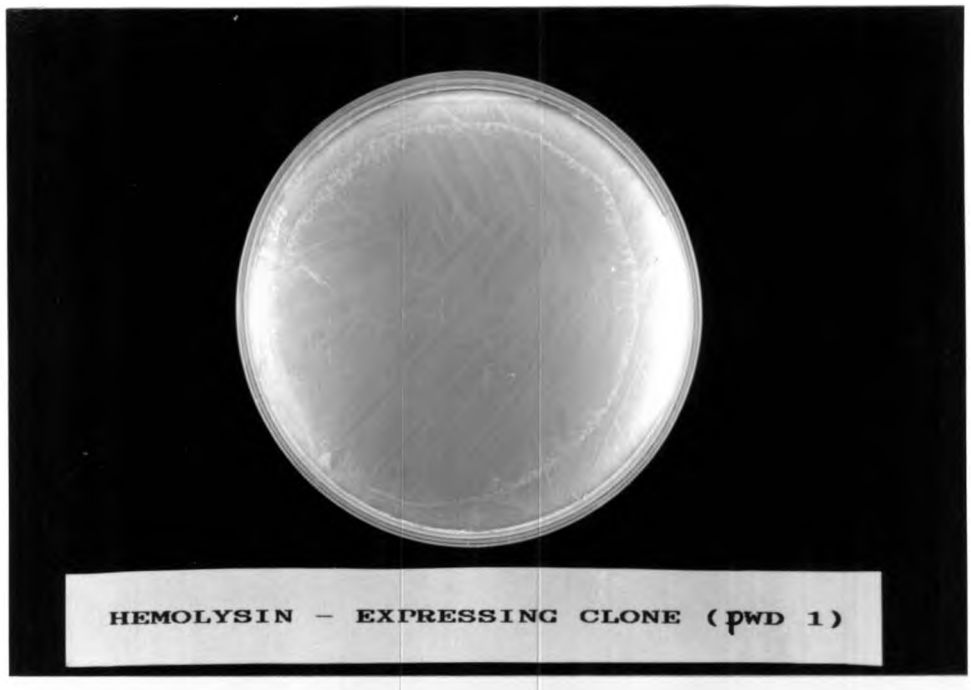
เมื่อนำ hemolysin-expressing *E. coli* คือ *E. coli* JM109 (pWC3) *E. coli* JM109 (pWC7) และ *E. coli* JM109 (pWD1) มาสกัดพลาสมิดและนำพลาสมิดเหล่านั้นมาตัดด้วย restriction endonuclease PstI หลังตัดแล้วนำไปตรวจสอบหาขนาด inserted DNA เทียบกับ DNA มาตราฐาน ผลการทดลองพบว่า pWC3 ตัดด้วย PstI ให้ inserted DNA ขนาด 900 bp. และ pUC18 ในรูป linear form ขนาด 2,686 bp. เช่นเดียวกับ pWD1 ให้ inserted DNA ขนาด 5,600 bp. และ linear form ของ pUC18 กรณีของ pWC7 พบ inserted DNA 2 ส่วน มีขนาด 400 bp. และ 500 bp. (รูปที่ 7) ตารางที่ 4 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ inserted DNA ที่ได้จาก recombinant plasmids และค่า hemolytic activity ของ hemolysin-expressing *E. coli*



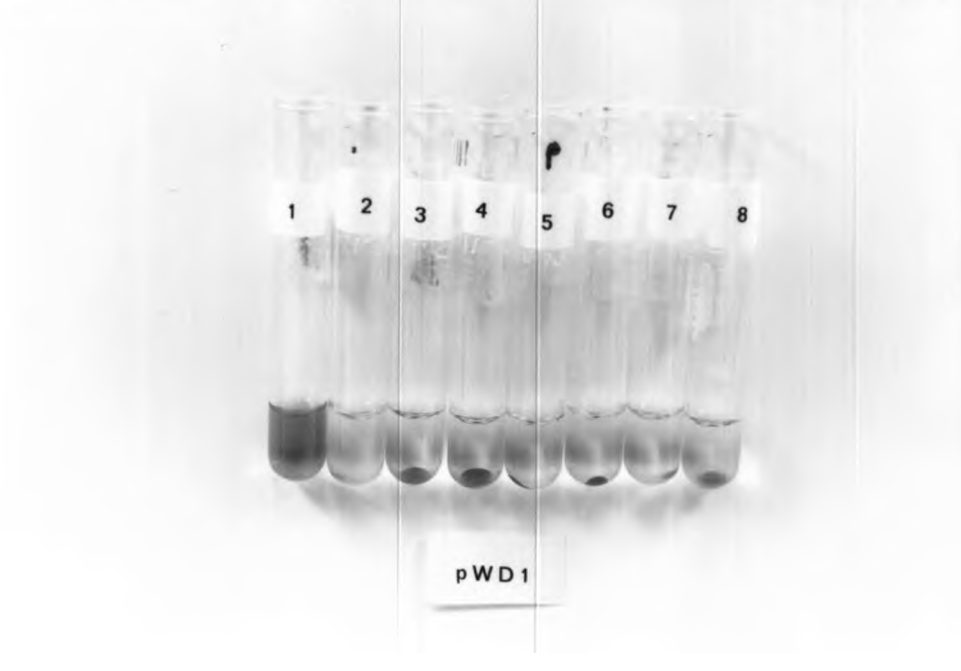
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6.1 แสดงผลการทดสอบหา hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique ของ *P. pseudomallei* K1/88 ภาพ A คือ *P. pseudomallei* ที่เลี้ยงบน tryptone glucose agar (TGA) ภาพ B แสดงความแรงของ hemolysin โดยการเจือจางแบบ two-fold dilution เริ่มต้นจาก undiluted ในหลอดที่ 1 ค่า hemolysin titer คือ 1/128 เมื่อเทียบกับ negative control ในหลอดที่ 9

A



B



รูปที่ 6.2 แสดงผลการทดสอบ hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique ของ transformant ซึ่งมี recombinant plasmid pWD1 ภาพ A transformant pWD1 ที่เลี้ยงบน tryptone glucose agar (TGA) ภาพ B แสดงความแรงของ hemolysin โดยการเจือจางแบบ two-fold dilution เริ่มต้นจาก undiluted ในหลอดที่ 1 ค่า hemolysin titer ที่อ่านได้คือ 1:1 เมื่อเทียบกับ negative control ในหลอดที่ 6

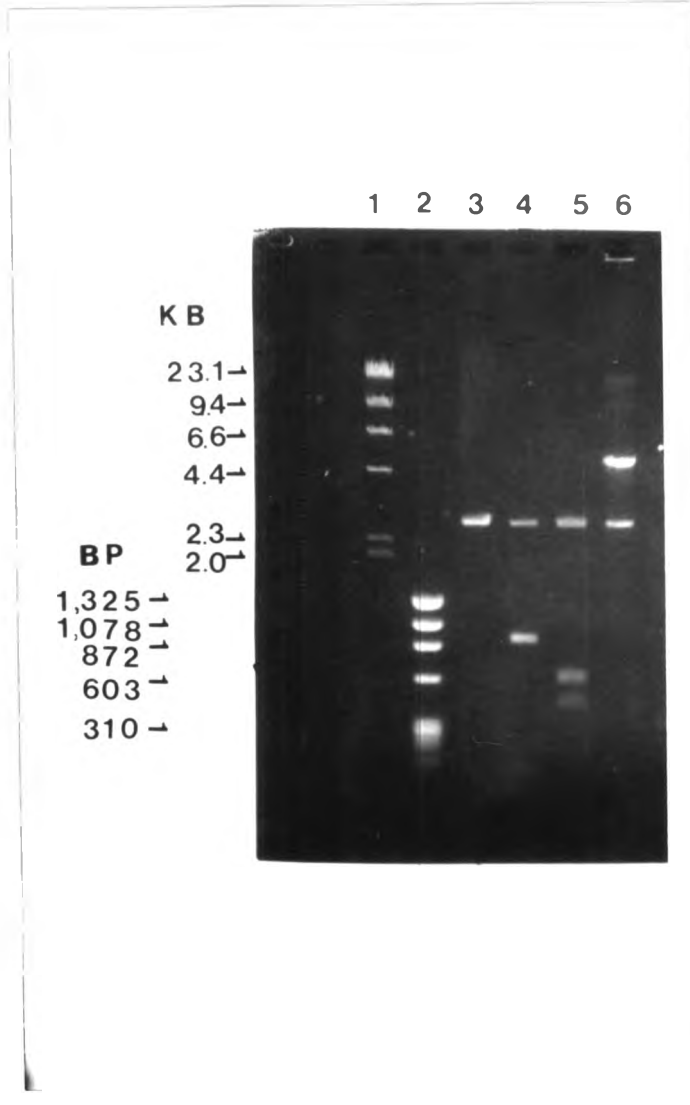
ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบหา hemolytic activity ของ *E. coli* transformants เทียบกับ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 และ *E. coli* JM109 (pUC18) โดยวิธี cellophane plate technique

ชนิดของแบคทีเรีย	hemolytic * activity (titer)	Hemolytic ** unit/mL (HU)
E. coli JM109 (pUC18)	-	-
P. pseudomallei K1/88	1:128	256
E. coli JM109 (pWC3)	1:1	2
E. coli JM109 (pWC7)	1:2	4
E. coli JM109 (pWD1)	1:1	2

---

* hemolytic activity (titer) คือค่า dilution ในหลอดสุดท้ายที่สลายเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ (100% hemolysis) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชม.

** 1HU คือ ปริมาณ hemolysin ในหลอด dilution สูงสุด ที่สลายเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ (100% hemolysis) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชม.



รูปที่ 7 แสดง recombinant plasmids จาก hemolysin-expressing *E. coli* ตัดด้วย PstI วิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis ใช้ 0.8% agarose gel ใน TAE buffer ความต่างศักย์ 76 V เวลา 2 ชม.

Lane ที่ 1 คือ λDNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ ϕX174 digested with HaeIII

Lane ที่ 3 คือ pUC18 digested with PstI

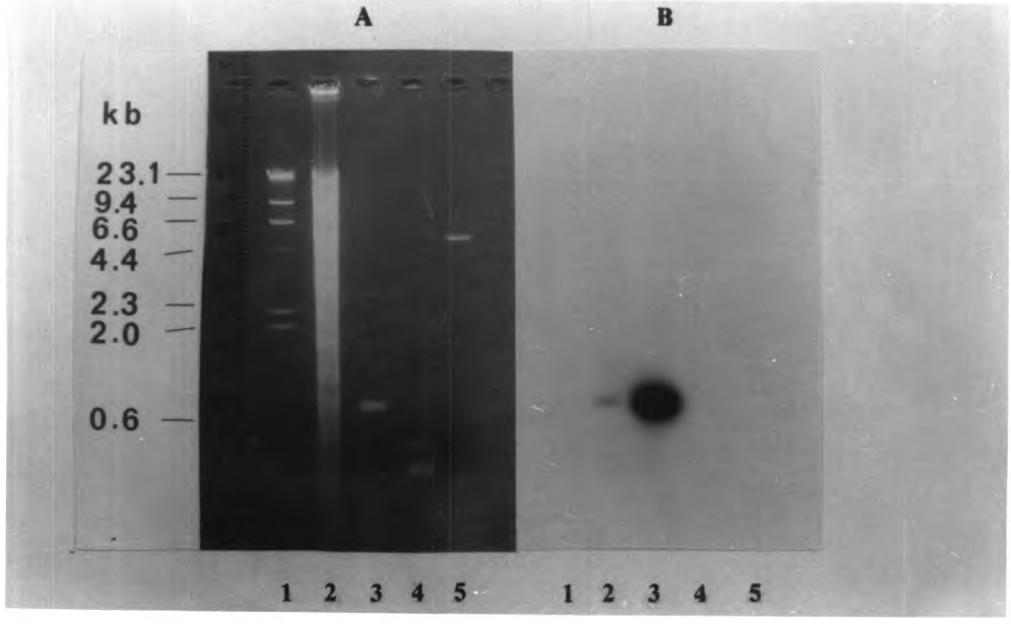
Lanes ที่ 4,5 และ 6 คือ pWC5 pWC7 และ pWD1 ตัดด้วย PstI ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ inserted DNAs ที่ได้จาก recombinant plasmids และค่า hemolytic activity ของ hemolysin-expressing *E. coli*

โคลน	Hemolytic units	ขนาดของ inserted DNA (bp.)
E. coli JM109 (pWC3)	2	900
E. coli JM109 (pWC7)	4	900 (400,500)
E. coli JM109 (pWD1)	2	5,600

4.2 การพิสูจน์ยืนยันว่า inserts DNA เป็น *P. pseudomallei* DNA โดยวิธี Southern blot hybridization

นำ inserted DNA ของ pWC3 ,pWC7 และ pWD1 มาติดฉลากรังสีด้วย [α-P^{32}] dCTP โดยวิธี Random primer Labelling ได้ค่า radioactive activity $5.2X10^7$ cpm/ug $7.9X10^7$ cpm/ug และ $2.4X10^8$ cmp/ug ตามลำดับจากนั้นนำไปใช้เป็น probe ในการทำ Southern blot hybridized กับ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* ซึ่งได้จากการตัดด้วย PstI แบบ complete digestion ผลการทดลองพบว่า 1) เมื่อใช้ inserted DNA ของ pWC3 ซึ่งมีขนาด 900 bp. เป็น probe พบว่าสามารถไฮบริไดซ์กับ chromosomal DNA fragments ที่ตำแหน่งขนาด 900 bp ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ inserted DNA ของ pWC3 ใน lane ที่ 2 และ 3 รูปที่ 8.1 นอกจากนี้ยังพบ band จาง ๆ ที่ตำแหน่ง 1,000 bp. ด้วยและ Inserted DNA ของ pWC3 ไม่ไฮบริไดซ์กับ inserted DNA ของ pWC7 และ pWD1 2) เมื่อใช้ inserted DNA ของ pWC7 ซึ่งมีขนาด 400 bp. และ 500 bp. เป็น probe พบว่าสามารถไฮบริไดซ์กับ chromosomal DNA ที่ตำแหน่ง 500 bp. ส่วนตรงตำแหน่ง 400 bp. ไม่มี band เกิดขึ้นแต่เกิด smear ที่ตำแหน่งมากกว่า 500 bp. ขึ้นไปในเนื่องจาก intensity ของ probe ขนาด 500 bp. สูงกว่าของ probe ขนาด 400 bp. lane ที่ 2 และ 4 รูปที่ 8.2 Inserted DNA ของ pWC7 ไม่ไฮบริไดซ์กับ inserted DNA ของ pWC3 และ pWD1 3) เมื่อใช้ inserted DNA ของ pWD1 ซึ่งมีขนาด 5,600 bp. เป็น probe พบว่าสามารถไฮบริไดซ์กับ chromosomal DNA ที่ตำแหน่ง 5,600 bp. ตรงกับตำแหน่งของ inserted DNA ของ pWD1 ใน lane ที่ 2 และ 5 รูปที่ 8.3 Inserted DNA ของ pWD1 ไม่ไฮบริไดซ์กับ inserted DNA ของ pWC3 และ pWC7



รูปที่ 8.1 แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ที่ตัดด้วย PstI และ inserted DNA จาก recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA จาก pWC3 เป็น probe

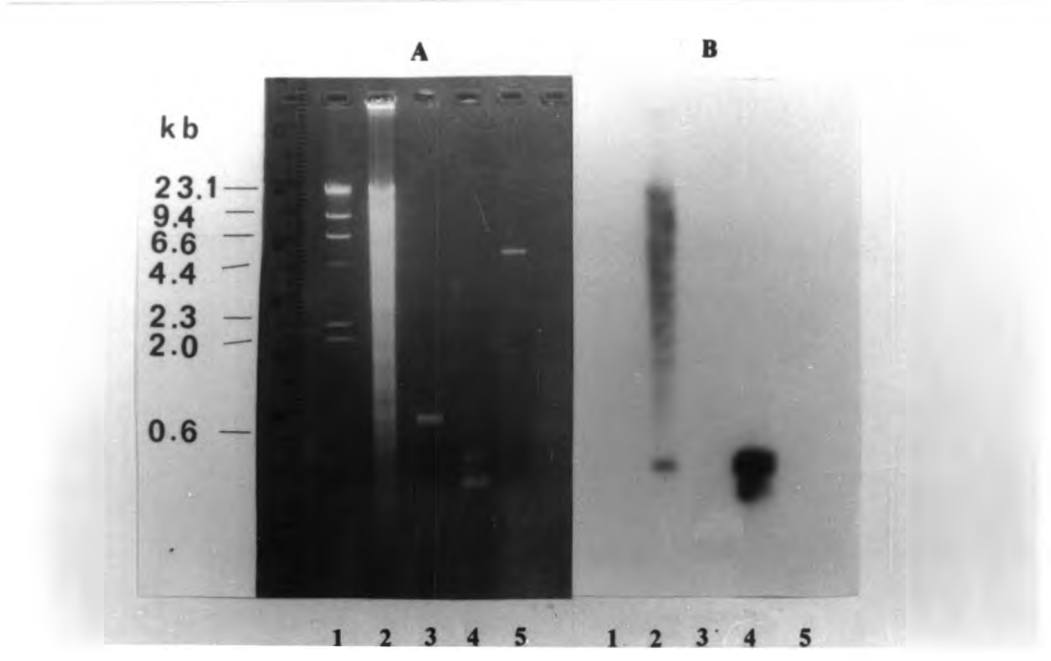
A ภาพ agarose gel electrophoresis ของ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ใช้ 1.0% agarose gel ความต่างศักดิ์ 70 V เวลา 3 ชม.

Lane ที่ 1 คือ λ DNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ตัดด้วย PstI แบบ complete digestion

Lanes ที่ 3,4 และ 5 คือ inserted DNA จาก pWC3 pWC7 และ pWD1 ตามลำดับ

B ภาพถ่าย Autoradiograph ของ A



รูปที่ 8.2 แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ที่ตัดด้วย PstI และ inserted DNA จาก recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA จาก pWC7 เป็น probe

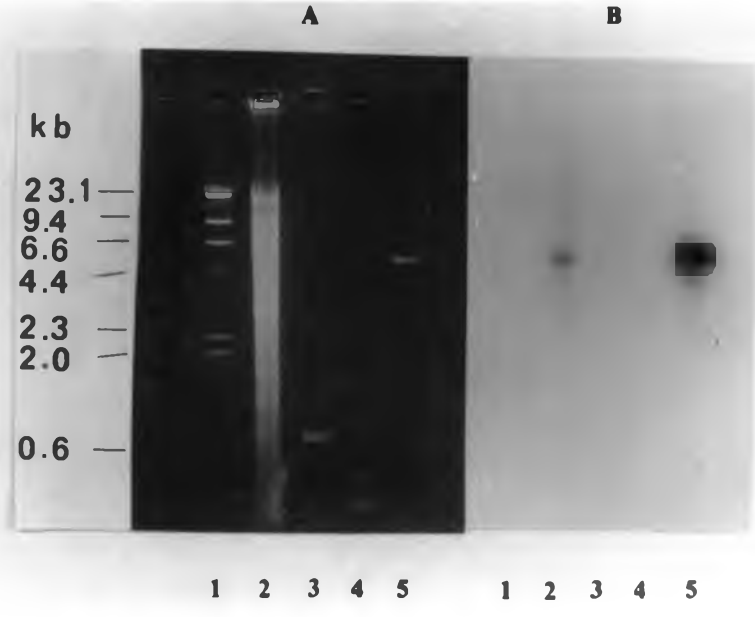
A ภาพ agarose gel electrophoresis ของ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ใช้ 1.0% agarose gel ความต่างศักดิ์ 70 V เวลา 3 ชม.

Lane ที่ 1 คือ λ DNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ตัดด้วย PstI แบบ complete digestion

Lanes ที่ 3,4 และ 5 คือ inserted DNA จาก pWC3 pWC7 และ pWD1 ตามลำดับ

B ภาพถ่าย Autoradiograph ของ A



<u>รูปที่ 8.3</u> แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ที่ตัดด้วย PstI และ inserted DNA จาก recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA จาก pWD1 เป็น probe

A ภาพ agarose gel electrophoresis ของ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ใช้ 1.0% agarose gel ความต่างศักดิ์ 70 V เวลา 3 ชม.

A ภาพ agarose gel electrophoresis ของ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* K1/88 ใช้ 1.0% agarose gel ความต่างศักดิ์ 70 V เวลา 3 ชม.

Lane ที่ 1 คือ λ DNA digested with HindIII

Lane ที่ 2 คือ chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 ตัดด้วย PstI แบบ complete digestion

Lanes ที่ 3,4 และ 5 คือ inserted DNA จาก pWC3 pWC7 และ pWD1 ตามลำดับ

B ภาพถ่าย Autoradiograph ของ A