บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิก

นำแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์จากอะคริลาไมด์ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera intermedia* และ *Enterobacter aerogenes* มาทำเลี้ยงในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว สังเกตการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักมวลชีวภาพ (Biomass) เป็นหน่วยจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นต่อหน่วยการเจริญ (Colony forming unit; CFU) ร่วมกับการติดตามความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์จากปริมาณของกรดอะคริลิกที่เกิดขึ้นและปริมาณของอะคริลาไมด์ที่ลดลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนกรองไนลอน (Nylon membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) ด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการติดตามการสลายอะคริลาไมด์ที่หาได้จากการทดลอง คือ ใช้ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตรเป็นตัวติดตาม มีเฟสคงที่ (Stationary phase) คือ คอลัมน์วิเคราะห์ μBondapack C_{18} (reverse phase) ขนาด 3.9 มม. × 300 มม. (10 ไมโครเมตร 125 Å) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ 25 mM sodium phosphate buffer (ค่าพีเอช 7.0) ทำการแยกที่อุณหภูมิห้องที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมาณความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่เหลือและกรดอะคริลิกที่เพิ่มขึ้นจากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีค (Peak area) เทียบกับสารมาตรฐานอะคริลาไมด์และกรดอะคริลิกที่ทราบความเข้มข้น นอกจากนี้ยังติดตามปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการสลายโดยวิธีของ phenate (APHA *et al.*, 1985) อีกด้วย

3.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสจาก *E. aerogenes* ที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การออกแบบดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของ Enterobacter spp.

หาลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิโดไฮโดรเลส (อะมิเดส) ของ *Enterobacter* spp. ที่เคยมีรายงานมาแล้วในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โลก (GenBank; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากการเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL-W multiple sequence alignment ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์ (Multiple sequence alignment: http://align.genome.jp) และหาโอกาสการใช้โคดอน (Codon usage)

ของ *Enterobacter* spp. จากฐานข้อมูลการใช้โคดอนของแบคทีเรีย (Codon usage database; http://www.kazusa.or.jp/codon/) พบลำดับกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์สูง (ภาพที่ 1) และมีโอกาสนำมาออกแบบดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ (Degeneracy primers) ได้จำนวน 4 ช่วง คือ WMDGPAN, KRHLFRM, WRGWRIL และ EKFPAWQ (แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม) นำลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ทั้ง 4 ช่วงที่ได้มาออกแบบดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์โดยการอ้างอิงโอกาสการใช้โคดอนร่วมด้วย และให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ที่ปลาย 5' ได้ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ จำนวน 4 สาย แสดงในตารางที่ 1

ภาพที่ 1 การหาบริเวณอนุรักษ์จากการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W ในฐานข้อมูลออนไลน์ http://align.genome.jp

ตารางที่ 1 ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิเดสจาก *Enterobacter* spp.

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')*
EnAmi1	GGGGAATTCTGGATGGAYGGCCCGGCSAA
EnAmi2	CCCAAGCTTCATRCGRAASAGRTGRCGTT
EnAmi3	GGGGAATTCTGGCGYGGCTGGCGYATYCT
EnAmi4	CCCAAGCTTTGCCASGCCGGRAATTTYTC

* บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII แสดงดังตัวหนังสือขีดเส้นใต้

3.2.2 การหายีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ E. aerogenes โดยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ที่ออกแบบในหัวข้อ 4.2.1 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) กับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เตรียมได้จากการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA) ของ *E. aerogenes* ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด ได้แก่ *Aha*I, *Cla*I, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Nde*I, *Not*I, *Pst*I, *Sal*I, *Spe*I, *Xba*I และ *Xho*I ด้วยสภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้นอะกาโรส 1.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) หาขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดว่าจะได้จากระยะห่างของลำดับกรดอะมิโนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ (EnAmi1 + EnAmi2 = 300 คู่เบส และ EnAmi3 + EnAmi4 = 381 คู่เบส) ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 Gel DNA recovery kit (Vivantis, Malaysia) ตามวิธีที่แนะนำของบริษัท จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 (ภาคผนวก 1) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และทรานส์ฟอร์ม (Transformation) เข้าเซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* DH 5α คัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีการคัดเลือกโคโลนีสีฟ้าขาว (Blue/white screening) ซึ่งจะเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกได้มาสกัดพลาสมิดสายผสม (Recombinant plasmid) ด้วยชุดสกัด GF-1 Plasmid DNA extraction kit และตรวจสอบชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสจากการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เตรียมได้ นำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีที่จะกล่าวต่อไป

3.2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ E. aerogenes ช่วงปลาย 5'

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในข้อ 4.2.2 มาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่ (ตารางที่ 2) เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* ช่วงปลาย 5' ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบย้อนกลับอย่างจำเพาะ (Nested-inverse PCR) ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง ได้แก่

- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ครั้งที่ 1 จะใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมได้จากการเชื่อมกันเอง (Self-ligation) ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I และ *Nde*I และใช้คู่ไพรเมอร์ คือ NI-EnAmi3 + CI-EnAmi3

- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 จะใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์คือ NI-EnAmi4 + CI-EnAmi4

สภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 2 ครั้งที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ทั้ง 2 ปฏิกิริยา มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสความเข้มข้นอะกาโรส 1.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กลงเล็กน้อย (Band shift) มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 Gel DNA recovery kit ตามที่ได้อธิบายมาแล้วและเชื่อมเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTG19-T ที่มีปลายโอลิโกไทมีน (ภาคผนวก 2) ด้วยการทำปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรรวมของสารละลายในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม พลาสมิด pTG19-T ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น1X และเอนไซม์ T4 DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH 5α และคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดสายผสมตรวจสอบการมีชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และนำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีที่จะกล่าวต่อไป

3.2.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ E. aerogenes ช่วงปลาย 3'

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เพิ่มเติมในข้อ 4.2.3 มาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่ (ตารางที่ 2) เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* ช่วง

ปลาย 3' ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบย้อนกลับอย่างจำเพาะ (Nested-inverse PCR) ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง ได้แก่

- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ครั้งที่ 1 จะใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมได้จากการเชื่อมกันเอง (Self-ligation) ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I, *Eco*RI, *Nde*I, *Pst*I, *Sal*I และ *Xho*I และใช้คู่ไพรเมอร์ คือ NI-EnAmi1 + CI-EnAmi1 (หรือ NI-EnAmi3 + CI-EnAmi1)

- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 จะใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์คือ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 (หรือ NI-EnAmi4 + CI-EnAmi2)

สภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 2 ครั้งที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ทั้ง 2 ปฏิกิริยา มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสความเข้มข้นอะกาโรส 1.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กลงเล็กน้อย (Band shift) มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 Gel DNA recovery kit ตามที่ได้อธิบายมาแล้วและเชื่อมเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTG19-T ที่มีปลายโอลิโกไทมีน ด้วยการทำปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรรวมของสารละลายในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม พลาสมิด pTG19-T ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น1X และเอนไซม์ T4 DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH 5α และคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดสายผสม ตรวจสอบการมีชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และนำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีที่จะกล่าวต่อไป

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
NI-EnAmi3	TGCGGCATCGACTGCTTCGC
NI-EnAmi4	TTGGCCGGGCCGTCCATCCA
CI-EnAmi1	ACAGGGAGAGATTATCGCTA
CI-EnAmi2	AGGAGTATCGCGAAAAATTC
CI-EnAmi3	GGATGCTGGCGAAAGCGGAG
CI-EnAmi4	ACTTTTACGATAAACGTCAC

3.2.5 การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ E. aerogenes

3.2.5.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอะมิเดส

นำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* จากข้อ 4.2.2-4.2.4ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI3700 sequencer (บริษัท First BASE Laboratories, ประเทศสิงคโปร์) ที่ใช้ชุดอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ Big Dye 3.1 Terminator ด้วยไพรเมอร์ M13 forward

3.2.5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอะมิเดส

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากหัวข้อ 4.2.5.1 มาเปรียบเทียบความเหมือน (Basic local alignment search tool; BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก (GenBank: http://www.ncbi. nlm.nih.gov) และคาดเดาเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Expasy Proteomics Server (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) เทียบความเหมือน (alignment) ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดากับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W Multiple sequence alignment ในฐานข้อมูลออนไลน์ (http://align.genome.jp/)

3.3 การคาดเดาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes*

การคาดเดาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* จะใช้หลักการสร้างแบบจำลองความเหมือน (Homology modeling) ด้วยโปรแกรมสำเร็จ PDB