



บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแบคทีริโอซิน และ 16S rDNA จาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

(ภาษาอังกฤษ) Cloning and DNA sequence analyses of a gene encoding bacteriocin and 16S rDNA from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแบคทีริโอซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2
2. เพื่อโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ และเปรียบเทียบกับผลการจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้

ที่มาของการวิจัย

ก่อนหน้านี้ได้มีการแยกแบคทีเรียแลคติก (LAB) ที่สร้างแบคทีริโอซินได้ คือไอโซเลท FFL17-2 จากปลาสมัก จ.ลพบุรี และมีการศึกษาสมบัติของแบคทีริโอซินดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้ทำการจัดจำแนกเบื้องต้น และพบว่าเชื้อมีลักษณะน่าจะเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (สมใจ และคณะ, 2550) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแบคทีริโอซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และรวมทั้งการโคลน 16S rDNA เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้

การดำเนินงานและผลงานที่ได้รับจากการวิจัย (โดยสังเขป) พร้อมภาพประกอบ

ทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 โดยวิธี PCR ด้วย primers fD1 + rD1 จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปโคลนในพลาสมิด pCR2.1 แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว (ความยาว 1,502 bp) โดยใช้โปรแกรม NCBI Blast พบว่ามีความเหมือน 100% กับ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *lactis* CV56 และ *L. lactis* subsp. *lactis* KF147 ที่มีรายงานใน EMBL Database ซึ่งเป็นการยืนยันว่า *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 เป็นสมาชิกของ species *Lactococcus lactis* จริง และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ได้ถูกบันทึกไว้ใน EMBL Database โดยมี Accession number คือ HE805077

ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *lanB* ซึ่งเชื่อว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แบคทีริโอซิน โดยวิธี PCR ด้วย degenerate primers LanBFwd + LanBRev จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปโคลนในพลาสมิด pCR2.1 แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 1) แล้วทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม FASTA พบว่ามีความเหมือนกับ NisB จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ 99.2–100% (ตารางที่ 1) โดยมีรายงานว่า NisB เป็นเอนไซม์ dehydratase ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ nisin และถูกกำหนดรหัสโดยยีน *nisB* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ *nis* operon

ในการโคลนยีนโครงสร้างสำหรับแบคทีริโอซิน ทำโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nis* operon จาก *L. lactis* ที่มีรายงานใน EMBL Database ซึ่งได้แก่ *L. lactis* 6F3, *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 และ *L. lactis* subsp. *lactis* M78 มาทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalW แล้วเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันในทุก 3 สายพันธุ์ และครอบคลุมยีน *nisA* และส่วน 5' ของยีน *nisB* มาใช้ในการออกแบบ primers Nis-fwd (5'-cattaacaaatctaaaacagtc-3') และ Nis-rev (5'-ttcgtctccatagcaadagc-3')

ทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 1 kb โดยวิธี PCR ด้วย primers Nis-fwd + Nis-rev และมีความพยายามโคลนผลผลิต PCR ดังกล่าวในพลาสมิด pCR2.1 แต่ไม่ประสบความสำเร็จ จึงได้นำผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บางส่วน) โดยตรง แต่พบว่ามียีนหลายตำแหน่งที่ไม่สามารถระบุนิวคลีโอไทด์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ผลผลิต PCR นั้นประกอบด้วยชิ้นส่วน DNA มากกว่า 1 รูปแบบปะปนกัน อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อว่าเป็นยีนสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NCBI Blast พบว่ามีความเหมือน 85.0% กับยีน *nisA* และ *nisZ* จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน EMBL Database

การนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้

งานวิจัยนี้เป็นการยืนยันข้อมูลการจัดจำแนก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ให้แน่นอนยิ่งขึ้น ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียดังกล่าวกับ *L. lactis* สายพันธุ์อื่นๆ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แบคทีริโอซิน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้สร้างแบคทีริโอซินในปริมาณมากขึ้นได้

ผลงานวิจัย/ผลผลิต สิ่งประดิษฐ์ นวัตกรรม หรืออื่น ๆ ที่ได้จากการทำวิจัย

และมี Impact ต่อสังคม, ประเทศชาติได้รับประโยชน์อะไร

เป็นการเพิ่มพูนองค์ความรู้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ 16S rDNA และยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แบคทีริโอซินจาก *L. lactis*

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

เกิดปัญหาการปนเปื้อนของ stock เชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียหลักที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จึงจำเป็นต้องทำการแยกเชื้อดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และทำการยืนยันสมบัติของเชื้อ ซึ่งทำให้แผนการวิจัยเกิดความล่าช้า

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

-

งานวิจัยที่คาดว่าจะดำเนินการต่อไป

ควรมีการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักท้องถิ่นในประเทศไทย เพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโชนชนิดใหม่ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในอนาคต

คณะผู้ทำวิจัย

ชื่อสกุล นายประวดี อังประภาพรชัย

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

สังกัด คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ที่ตั้ง ถ.สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม.

โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-664-1000 ต่อ 8521 โทรสาร 02-260-0127

อีเมลล์ prawat@swu.ac.th

ทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2553

เริ่มงานวิจัย ปี 2552

สิ้นสุดงานวิจัย ปี 2555

1 TATGATCGAGAAGCAGATAGATATGGTGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATA
G F D T L E L S E A I

61 TTTTGTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAAT
F C A D S K I I P N L L T L I K D T N N

121 GATTGGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTT
D W K V D D V S I L V N Y L Y L K C F F

181 CAGAATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTTGAATTTAGTTAGTCCTAAAAAGGTTAAA
Q N D N K K I L N F L N L V S P K K V K

241 GAAAATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGT
E N V N E K I E H Y L K L L K V N N L G

301 GACCAAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTT
D Q I F Y D K N F K E L K H A I K N L F

361 TTAAAAATGATAGCTCAAGATTTTGAACCTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGACAGTATA
L K M I A Q D F E L Q K V Y S I I D

421 GTCCATTTGCATAATAA

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* ความยาว 437 bp และลำดับกรดอะมิโน ความยาว 129 กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส โดยบริเวณที่เป็นตัวเข้มและขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ primers LanBFwd และ LanBRev ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลที่มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนความยาว 129 กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ *lanB*

Organism	Protein	% identity	% similarity	amino acid overlap	Accession No.
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IO-1	NisB	100	100	129	H5SXJ4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NisB	99.2	100	129	D9IXB6
<i>L. lactis</i>	NisB	99.2	100	129	Q48673
<i>L. lactis</i>	NisB	99.2	99.2	129	C4PKI4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NisB	99.2	99.2	129	P20103
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CV56	NisB	99.2	99.2	129	F2HKA5
<i>L. lactis</i>	Lantibiotic dehydratase (NiqB)	66.7	89.9	129	B5MET7
<i>Streptococcus salivarius</i>	Putative lantibiotic dehydratase (SlvB)	37.4	67.2	131	H2D759