**การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนโดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน**

**โดย**

**นายเมธัส สวนจันทร์**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**

**สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ**

**ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ**

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร**

**ปีการศึกษา 2556**

**ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร**

**การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนโดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน**

**โดย**
**นายเมธัส สวนจันทร์**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**
**สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ**
**ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ**
**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร**
**ปีการศึกษา 2556**

**ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร**

# CLONING AND EXPRESSION OF *mpdB* GENE RESPONSIBLE FOR METHYL PARATHION DEGRADATION USING A VECTOR DESIGNED FOR PROTEIN SECRETION

**By**

**Mr. Mathus  Suanjan**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree**

**Master of Science Program in Biotechnology**

**Department of Biotechnology**

**Graduate School, Silpakorn University**

**Academic Year 2013**

**Copyright of Graduate School, Silpakorn University**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง "การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนโดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน" เสนอโดย นายเมธัส สวนจันทร์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

……..........................................................
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่..........เดือน.................... พ.ศ...........

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา
3. อาจารย์ ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิท

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.................................................... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม)
............/......................../..............

.................................................... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อัญชีรา วิบูลย์จันทร์)
............/......................../..............

.................................................... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ)
............/......................../..............

.................................................... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)
............/......................../..............

.................................................... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิท)
............/......................../..............

53401208 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คำสำคัญ : เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส/ยีน *mpdB*/การหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์

เมธัส สวนจันทร์ : การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน.อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ , ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และ อ.ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท. 125 หน้า.

ยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (methyl parathion; MP) จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ในประเทศไทยมีการค้นพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เมธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (methyl parathion hydrolase; MPH) โดยได้มีการโคลนยีน *mpdB* และทำการแสดงออกใน *E. coli* แต่อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งเอนไซม์ทำได้ยาก เนื่องจากข้อเสียบางประการของการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์ที่ได้จะอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และยังต้องการกระบวนการในการแตกเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตเอนไซม์ MPH โดยการหลั่งออกสู่ periplasmic space หรือสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 ซึ่งเป็นพาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีนออกสู่ periplasmic space ที่มีการเติมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้าง polyhistidine ซึ่งจะช่วยให้ง่ายต่อการแยกบริสุทธิ์โปรตีน และการแสดงออกใน *E. coli* จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยวิธี microtiter plate MPH assay พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้มีการแสดงออกและผลิตเอนไซม์ MPH ที่สามารถย่อยสลาย MP ได้เป็นสีเหลืองของพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol; PNP) ทำการตรวจสอบความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์ MPH ที่หลั่งออกนอกเซลล์ โดยทดสอบบนอาหารแข็ง MP agar ที่มี MP พบว่าปรากฏสีเหลืองของ PNP รอบๆ โคโลนี (yellow halo) ของรีคอมบิแนนท์โคลน แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากส่วนของ periplasmic space และอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ cobalt column พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่า specific activity เท่ากับ 9.03 และ 3.44 U/mg ตามลำดับ และมีขนาดประมาณ 36 kDa ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ MPH ที่มีขนาดประมาณ 35 kDa รวมอยู่กับ polyhistidine-tag ที่มีขนาดประมาณ 0.84 kDa จากการวิเคราะห์ด้วย zymogram analysis ปรากฏแถบสีเหลืองของ PNP ที่ตำแหน่งของแถบโปรตีนขนาด 36 kDa จึงยืนยันได้ว่าแถบโปรตีนนั้นเป็น MPH จริง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ลายมือชื่อนักศึกษา........................................ ปีการศึกษา 2556
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ........................ 2. ........................ 3. ........................

53401208 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : METHYL PARATHION HYDROLASE/*mpdB* GENE/PERIPLAMIC SECRETION

MATHUS SUANJAN : CLONING AND EXPRESSION OF *mpdB* GENE RESPONSIBLE FOR METHYL PARATHION DEGRADATION USING A VECTOR DESIGNED FOR PROTEIN SECRETION. THESIS ADVISORS : ASST.PROF.JESDAWAN WICHITWECHKARN,Ph.D.,ASST.PROF.BUDSARAPRON NGAMPANYA,Ph.D.,AND RUJIKAN NASANIT,Ph.D. 125 pp.

Methyl parathion (MP) pesticide widely used in many developing countries is highly toxic, imposing threats to human health and environment. The MP-degrading *Burkholderia cepacia* indigenous to Thailand have been reported to produce methyl parathion hydrolase (MPH), an enzyme capable of degrading this insecticide. Its gene, *mpdB*, was previously cloned in *E. coli*, and the expression, purification and characterization of the recombinant MPH were performed. However, because of some difficulties and disadvantages of intracellular enzyme production such as protein insolubility and complicated cell lysis, this research then aims at an attempt to secrete MPH into either periplasmic space or culture medium. This was done by subcloning the *mpdB* gene into *E. coli* using expression vector pHisFlag-1, a vector designed for periplasmic expression. The coding sequence for polyhistidines added to its C-terminus would allow easier purification by metal affinity column. Using microtiter plate MPH assay, the recombinant clone was shown to produce MPH with enzymatic activity for degrading MP to the yellow-colored hydrolytic product, *p*-nitrophenol (PNP). The expressed enzyme was observed as yellow halo around the colony on MP agar plate assay, indicating the secretion of MPH. The recombinant MPH, as a polyhistidine C-terminal fusion protein, were separated from periplasmic fraction and culture medium fractions and purified by cobalt column. The specific activities of these purified proteins are 9.03 and 3.44 U/mg protein, respectively. The purified recombinant MPH was shown to have the molecular weight of about 36 kDa, corresponding to the 35 kDa of MPH and 0.84 kDa of polyhistidine-tag. The zymogram analysis revealed yellow color at the position of the 36-kDa protein band, confirming that the band was MPH.

---

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University

Student's signature ........................................ Academic Year 2013

Thesis Advisors' signature 1. ....................... 2. ....................... 3. .......................

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และอ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำต่างๆ และช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ปัญหาในการทำวิจัย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม และอ.ดร.อัญชีรา วิบูลย์จันทร์ ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่มอบวิชาความรู้ที่เป็นพื้นฐานในการนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.มณฑารพ ยมาภัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pHisFlag-1

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม และผศ.ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือของภาควิชาต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการดำเนินการด้านเอกสารต่างๆ และให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีตลอดการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) โครงการทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2556, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโททุกคน รวมทั้งเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในหลายๆ เรื่องที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยนี้ รวมทั้งน้องๆ ในห้องแลบทุกคนที่ทำให้เกิดบรรยากาศที่ดีในการทำงานวิจัย

และที่สำคัญยิ่งขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และทุกคนในครอบครัว สำหรับกำลังใจ ซึ่งเป็นสิ่งที่เป็นพลังผลักดันในการทำวิจัย รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ประโยชน์และประสบการณ์ที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยจะนำไปประยุกต์ใช้ในการดำเนินชีวิต และการทำงานโดยเต็มกำลังความรู้ ความสามารถ เพื่อให้ก่อประโยชน์สูงสุดทั้งต่อตนเอง สังคม และประเทศชาติต่อไป

# สารบัญ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | | จ |
| กิตติกรรมประกาศ | | ฉ |
| สารบัญตาราง | | ฌ |
| สารบัญภาพ | | ญ |
| บทที่ | | |
| 1 | บทนำ | 1 |
| | ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 1 |
| | วัตถุประสงค์ | 2 |
| | ขอบเขตงานวิจัย | 3 |
| | ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| | ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต | 4 |
| | เมทธิลพาราไธออน | 19 |
| | เชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP | 34 |
| | รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 35 |
| 3 | วิธีดำเนินการวิจัย | 42 |
| | เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย | 42 |
| | ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการวิจัย | 43 |
| | ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย | 47 |
| | ดีเอ็นเอมาตรฐาน | 47 |
| | โปรตีนมาตรฐาน | 47 |
| | เอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัย | 47 |
| | ชุดทดสอบสำเร็จรูป | 47 |
| | คอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์ | 48 |

บทที่ หน้า


สารเคมี ........ 48
เครื่องมือ ........ 50
อุปกรณ์อื่นๆ ........ 51
วิธีดำเนินการวิจัย ........ 52
การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีน *mpdB* โดยใช้พาหะที่ออกแบบ
เพื่อการหลั่งโปรตีน ........ 52
การแสดงออกของเอนไซม์ MPH ........ 63
การสกัดเอนไซม์ MPH จากส่วนต่างๆ ของเซลล์ ........ 64
การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH ........ 65
การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ... 67
การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Zymogram Analysis ........ 68
การหาค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford Protein Assay ........ 69
การหาค่ากิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ MPH ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี ...... 69
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง ........ 71
การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีน *mpdB* โดยใช้พาหะที่ออกแบบ
เพื่อการหลั่งโปรตีน ........ 71
การแสดงออกและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ........ 83
5 สรุปผลการวิจัย ........ 92
รายการอ้างอิง ........ 94
ภาคผนวก ........ 101
ภาคผนวก ก ........ 102
ภาคผนวก ข ........ 107
ภาคผนวก ค ........ 115
ภาคผนวก ง ........ 122
ประวัติผู้วิจัย ........ 124

## สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า


1 ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภท OP ........ 6

2 รายชื่อสารกำจัดแมลงนำเข้าในปี พ.ศ. 2530 ที่มีปริมาณสูงสุด 10 ชนิดแรก........ 15

3 ระดับสารพิษตกค้างประเภท OP ในดินเป็น ppm (mg/kg) จากแหล่งเกษตรกรรม ทั่วประเทศ สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531........ 16

4 ระดับสารพิษตกค้างประเภท OP ในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป และแหล่งเกษตรกรรม เป็น ppb (µg/l) สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531........ 17

5 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้........ 27

6 จำนวนตัวอย่างของผักและผลไม้ที่ตรวจพบสารพิษตกค้าง........ 29

7 ชนิดและปริมาณของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในผักและผลไม้ ........ 30

8 วัตถุอันตรายที่ห้ามใช้ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อ วัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2547 มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 19 ตุลาคม 2547 จำนวน 2 ชนิด ........ 32

9 รายชื่อชนิดพืช ประเทศและเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ของมนุษย์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช เป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556........ 33

10 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด และทำการแสดงออกของยีน *mpdB*........ 42

11 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย ........ 47

12 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ........ 86

13 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของเพอริพลาสซึม........ 87

14 อัตราส่วนของสารในการเตรียม phosphate buffer ........ 111

15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PNP กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นที่ 410 นาโนเมตร ........ 116

16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร ........ 118

17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า $R_f$ ........ 119

## สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | สูตรโครงสร้างทั่วไปของย่าฆ่าแมลงประเภท OP | 4 |
| 2 | ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP | 6 |
| 3 | การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงฟอสฟอโรไธโอเนทส์ เป็นสารในรูปที่ออกฤทธิ์ (ฟอสเฟต) | 8 |
| 4 | การสลายตัวของยาฆ่าแมลง ฟอสฟามิดอน และไดเมโธเอท | 9 |
| 5 | การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต | 10 |
| 6 | ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยาฆ่าแมลงพาราไธออน | 10 |
| 7 | การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสโดยสารประกอบ OP | 13 |
| 8 | การใช้ที่ดินในประเทศไทย ปี 2553 | 14 |
| 9 | สูตรโครงสร้างของ MP | 19 |
| 10 | กระบวนการเมตาบอลิซึมของ MP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม | 21 |
| 11 | proposed pathways ของ MP ในจุลินทรีย์โดยทั่วไป | 24 |
| 12 | การกระตุ้น (activation) ของ MP ให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ | 26 |
| 13 | องค์ประกอบของ signal peptide sequence ซึ่งประกอบด้วย N- H- และ C-domain | 39 |
| 14 | recombinant protein ที่หลั่งออกนอกเซลล์โดยอาศัย type II mechanism และวิธีการในการหลั่ง recombinant proteins ออกจาก periplasmic space | 40 |
| 15 | แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pTA2 | 44 |
| 16 | ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ multiple cloning site (MCS) ของดีเอ็นเอพาหะ pTA2 | 44 |
| 17 | แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pFlag-CTS | 45 |
| 18 | ตำแหน่งของลักษณะพิเศษของดีเอ็นเอพาหะ pFlag-CTS | 45 |
| 19 | แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pHisFlag-1 | 46 |
| 20 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 (accession number: AF338729) | 55 |
| 21 | ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *mpdB* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์ | 72 |

| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 22 | แผนภาพการโคลนยีน *mpdB* พลาสมิด pTA2 | 73 |
| 23 | การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Xho*I และ *Kpn*I | 74 |
| 24 | การแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *mpdB* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit | 75 |
| 25 | การแยกบริสุทธิ์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit | 76 |
| 26 | แผนภาพรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 (พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB*) | 77 |
| 27 | แผนภาพการโคลนยีน *mpdB* พลาสมิด pHisFlag-1 | 78 |
| 28 | การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH ในการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์โดยวิธี microtiter plate MPH assay | 79 |
| 29 | การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I | 80 |
| 30 | การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ทำการคัดเลือกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* | 81 |
| 31 | การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH บน MP agar plate | 82 |
| 32 | ปริมาณเอนไซม์ MPH ในส่วนต่างๆ ของเซลล์ | 84 |
| 33 | แผนผังขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้คอลัมน์ HisPure cobalt column | 85 |
| 34 | แผนผังขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากเพอริพลาสซึมโดยใช้คอลัมน์ HisPure cobalt column | 86 |
| 35 | การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ HisPure cobalt spin column | 89 |

ภาพที่ หน้า


36 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในส่วนเพอริพลาสซึม ของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ โดยใช้ HisPure cobalt spin column .................................................................. 89

37 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค zymogram analysis ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ HisPure cobalt spin column ....................... 90

38 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค zymogram analysis ในส่วนของเพอริพลาสซึม โดยใช้ HisPure cobalt column................................ 91

39 กราฟมาตรฐานของ PNP........................................................................................ 117

40 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford method....................... 118

41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ($R_f$) ใน 12 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE ............................. 120

# บทที่ 1

# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญกับความปลอดภัยด้านอาหารเป็นอย่างมาก ประเทศไทยซึ่งอยู่ภายใต้ระบบเกษตรเชิงพาณิชย์ ที่เน้นการส่งออกไปยังต่างประเทศจึงจำเป็นต้องเตรียมความพร้อมที่จะปฏิบัติตามกฎเกณฑ์ด้านการผลิตสินค้าให้ได้มาตรฐานและคุณภาพเป็นที่ยอมรับในระดับสากล อย่างไรก็ตามในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา ยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate; OP) ได้แก่ เมทธิลพาราไธออน (methyl parathion; MP) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในบริเวณที่เป็นแหล่งเกษตรกรรมของไทย โดยใช้เป็นยาฆ่าแมลง (insecticide) ยาฆ่าเชื้อรา (fungicides) และสารกำจัดศัตรูพืช (pesticide) ซึ่งการใช้สารเหล่านี้ในภาคเกษตรกรรมมีปริมาณมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้สารพิษเหล่านี้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งแหล่งดิน แหล่งน้ำ และในผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการส่งออกสินค้าเกษตรของไทย (Konstantinou และคณะ, 2006; Siddavattam และคณะ, 2006; Yang และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตรให้มีคุณภาพตามมาตรฐานสากล ซึ่งวิธีการกำจัด และ/หรือ ตรวจสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ โดยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง ง่าย ราคาถูก และมีความปลอดภัยสูงเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมี ในประเทศไทยมีการค้นพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่ได้จากการคัดแยก (isolation) จากดิน ซึ่งมียีน *mpdB* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (methyl parathion hydrolase; MPH) (Keprasertsup และคณะ, 2001) โดยได้มีการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 และทำการแสดงออกใน *E. coli* ซึ่งเอนไซม์ MPH ที่ได้นี้ถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ เช่น นำมาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ที่มีความจำเพาะสูง (Wongthianlai และคณะ, 2007; Anh และคณะ, 2011; Ekkhunnatham และคณะ, 2010; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) แต่อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งเอนไซม์ทำได้ยาก เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ (intracellular production) จะทำให้เอนไซม์ที่ได้อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) หรือเอนไซม์อาจถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ protease และยังต้องการกระบวนการในการแตกเซลล์ (cell lysis) ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อน รวมทั้ง

เสียค่าใช้จ่ายในการทำให้เสียสภาพของโปรตีน (denaturation) และกระบวนการ refold โปรตีนก่อนการทำบริสุทธิ์ (Suppaluknaree และคณะ, 2007) ดังนั้นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์จึงมีปริมาณที่ต่ำ (Ekkhunnatham และคณะ, 2012) มีหลายเทคนิคที่พัฒนาเพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้ โดยเทคนิคหนึ่ง ได้แก่ การหลั่งโปรตีนออกสู่ periplasmic space หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) (Yoon และคณะ, 2010) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้น โดยการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH ให้หลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งการหลั่งของโปรตีนออกนอกเซลล์นี้จะอาศัยการทำงานของ signal peptide (Choi และ Lee, 2004; Mergulhao และคณะ, 2005; Yoon และคณะ, 2010) ข้อดีของกระบวนการนี้คือ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้จะมีผลผลิต และมีกิจกรรมของเอนไซม์ (activity) ที่สูง มีความเสถียร (stability) สูง มีการละลาย (solubility) ที่ดี และมีปริมาณผลผลิตที่สูง รวมทั้งง่ายต่อการทำบริสุทธิ์เนื่องจากใน periplasmic space มีโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ต่ำ อีกทั้งภายใน periplasmic space จะพบ protease activity ต่ำกว่าไซโตพลาสซึมมาก (Choi และ Lee, 2004; Yamabhai และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและการหลั่งเอนไซม์ MPH ออกนอกเซลล์ในระบบการแสดงออกของ *E. coli* เท่าใดนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* ใน *E. coli* เพื่อให้เกิดการหลั่งของเอนไซม์ MPH ออกนอกเซลล์ ซึ่งจะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ MPH ที่มีประสิทธิภาพสูง ง่ายต่อการนำไปใช้ และช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์นี้ได้ เพื่อประโยชน์ในการนำเอนไซม์ที่ได้จากงานวิจัยมาพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมและผลิตภัณฑ์ที่จะช่วยตรวจสอบ หรือกำจัด/ลดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ ในแหล่งทรัพยากรดินและน้ำให้อยู่ในสภาพสมดุลเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมให้เกิดความยั่งยืนต่อไปในอนาคต และเป็นการเพิ่มคุณภาพผลผลิตทางการเกษตรให้มีมาตรฐานเพียงพอในการส่งออก ซึ่งจะก่อให้เกิดความปลอดภัยอาหารด้านพืช และเป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรได้อีกด้วย

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อทำการโคลนยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (*mpdB* gene) ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (MP) โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีนได้

2. เพื่อศึกษาการผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (MPH) ที่เกิดจากการแสดงออกของโคลน *mpd* ลูกผสม

**ขอบเขตงานวิจัย**

1. ศึกษาการโคลนยีนย่อยสลายเมทธิลพาราไธออน (*mpdB* gene) ใน *E. coli* โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน

2. ศึกษาการแสดงออกและการหลั่งเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ออกนอกเซลล์ใน *E. coli*

3. ศึกษาการผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส จากโคลน *mpdB* ลูกผสม

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

นักวิจัยสามารถผลิตเชื้อที่ได้รับการถ่ายโอนโคลน *mpdB* ลูกผสม โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งเอนไซม์ MPH และสามารถผลิตและหลั่งเอนไซม์ MPH จากโคลน *mpdB* ลูกผสม ซึ่งง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ มีการละลาย (solubility) ที่ดี และมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงได้

หากสามารถโคลนยีน *mpdB* นี้ ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP และสามารถทำให้เอนไซม์ MPH ที่ผลิตจากยีน *mpdB* หลั่งออกมาจากโคลน ก็จะนำมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ MPH ที่มีประสิทธิภาพสูง ง่ายต่อการนำไปใช้ และช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์นี้ได้ ก็จะเป็นความสำเร็จที่สำคัญ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัด และ/หรือ ตรวจสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งทรัพยากรดินและน้ำ ให้อยู่ในสภาพสมดุลเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมให้เกิดความยั่งยืนต่อไปในอนาคต และเป็นการเพิ่มคุณภาพผลผลิตทางการเกษตรให้เป็นไปตามมาตรฐานการส่งออก อันเป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางด้านการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

## บทที่ 2

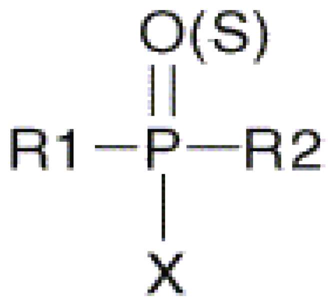
## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**1. ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate Insecticides)**

ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate; OP) เป็นยาฆ่าแมลงที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศเกษตรกรรม โดยเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ใช้ในปัจจุบัน แทนที่ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน (organochlorine insecticides) เนื่องจากมีความสามารถในการฆ่าแมลงได้อย่างกว้างขวางมากกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน และไม่มีความคงทน อย่างไรก็ตาม ยาฆ่าแมลงประเภทนี้มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลังสูงกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน และเมื่อเปรียบเทียบปัญหาการเกิดภาวะเป็นพิษจากสารเคมีทางการเกษตรแล้ว OP จัดเป็นสาเหตุอันดับต้นๆ ของปัญหาดังกล่าว ทั้งยังเป็นปัญหาที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุที่มีอัตราการตายสูง (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527; Perry และคณะ, 1998)

**1.1 สูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP**

ยาฆ่าแมลงประเภท OP มีสารอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญ
โดยมีสูตรโครงสร้างทั่วไป (general structure) ดังนี้




ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทั่วไปของย่าฆ่าแมลงประเภท OP
ที่มา: http://www.ams.ac.ir/AIM/08111/0015.html

**1.2 คุณสมบัติของสาร OP ซึ่งจะมีฤทธิ์ฆ่าแมลงได้**

จากสูตรโครงสร้างในภาพที่ 1 สามารถอธิบายถึงคุณสมบัติของสาร OP ที่จะมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงได้ ดังนี้

1.2.1 ซัลเฟอร์หรือออกซิเจนต้องเชื่อมโดยตรงกับฟอสฟอรัส ซึ่งมีวาเลนซีเป็นห้า (pentavalent phosphorus)

1.2.2 $R^1$ และ $R^2$ ต้องเป็นกลุ่มอัลคอกซี (alkoxy), อัลคิล (alkyl) หรือ อะมิโน (amino)

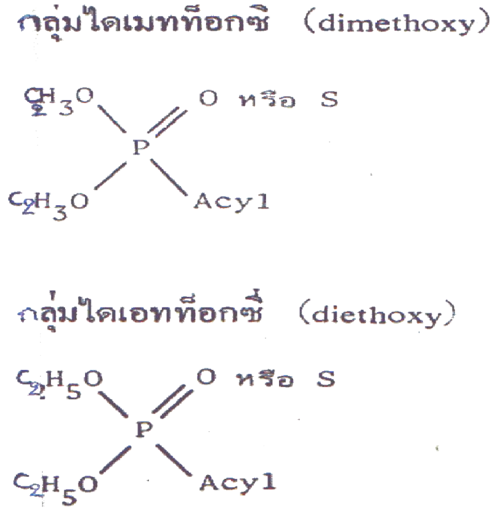
1.2.3 X คือ กลุ่มเอซิล (acyl) ต้องเป็นกลุ่มที่มีประจุลบในกรดอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ เช่น ฟลูโอรีน (fluorine), ไซยาเนท (cyanate), ไธโอไซยาเนท (thiocyanate) หรือต้องเป็นส่วนหนึ่งของกรด เช่น ส่วนอีนอล (enol), เมอแคบโต (mercapto) เป็นต้น

**1.3 ประเภทของยาฆ่าแมลงประเภท OP**

ยาฆ่าแมลงประเภท OP แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.3.1 กลุ่มไดเมทท็อกซี (dimethoxy) ยาฆ่าแมลงประเภท OP กลุ่มนี้ เป็นสารแปร (derivative) ได้โดยง่ายของกรดฟอสฟอริกที่ประกอบด้วยโซ่คาร์บอนสั้นๆ ต่อเนื่องกันในทางตรง โดยมีสูตรโครงสร้างหลักของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ ดังแสดงในภาพที่ 2 (A) ซึ่งได้แก่ มาลาไธออน (malathion), ไตรคลอร์ฟอน (trichlorfon), โมโนโครฟอส (monochlophos), คาร์โบฟีโนไธออน (carbophenothion), คูมาฟอส (coumaphos), ครูฟอเมต (crufomate), ไดคลอร์วอส (dichlorvos), เฟนไธออน (fenthion), เมวินฟอส (mevinphos), รอนเนล (runnel) และฟอสฟามิดอน (phosphamidon) มีการนำมาลาไธออนมาใช้ในครัวเรือนและสัตว์เลี้ยง ไตรคลอร์ฟอนใช้ในทางการเกษตรกับพืชและการควบคุมแมลงวันในฟาร์ม ยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้มีสารดูดซึมมาก เช่น ไดเมโธเอท (dimethoate), ไดโครโตฟอส (dicrotophos) และไดซัลโฟตอน (dicylphoton)

1.3.2 กลุ่มไดเอทท็อกซี (diethoxy) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างหลัก ดังแสดงในภาพที่ 2 (B) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้จะมีความคงทนสูงกว่าและมีพิษตกค้างนานกว่ายาฆ่าแมลงในกลุ่มไดเมทท็อกซี ตัวอย่างยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ คือ ดีมีตอน (demeton), ไดอาซีนอน (diazinon), โฟเรต (phorate) และทีอีพีพี (TEPP)




ภาพที่ 2 ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP

A ไดเมทท็อกซี (dimethoxy)

B ไดเอทท็อกซี (diethoxy)

**1.4 ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภท OP**

ปัจจุบันนี้มีการผลิตยาฆ่าแมลงประเภท OP ในรูปแบบการค้าประมาณ 100 ชนิด แบ่งตามระดับอันตรายโดยใช้ค่าแอลดี 50 ($LD_{50}$) เป็นเกณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภท OP

| ประเภท | ระดับอันตราย | ค่าแอลดี 50 สำหรับหนู (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | พิษทางปาก | | พิษทางผิวหนัง | |
| | | ยาผง | ยาน้ำ | ยาผง | ยาน้ำ |
| Ia | อันตรายร้ายแรงที่สุด | <5 | <20 | <10 | <40 |
| Ib | อันตรายร้ายแรงสูง | 5-50 | 20-200 | 10-100 | 40-400 |
| II | อันตรายร้ายแรงปานกลาง | 50-500 | 200-2,000 | 100-1,000 | 400-4,000 |
| III | อันตรายต่ำ | >500 | >2,000 | >1,000 | >4,000 |

ที่มา: ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายร้ายแรงที่สุด** ได้แก่

1. ออลลิคาร์บ เช่น เทมิค
2. เดมีตอน เช่น ซิสต๊อกซ์, โซลวิเร็กซ์
3. ไดซัลโฟตอน เช่น ไดซีสตอน, โซลิวเร็กซ์, ไธโอเดมิตอน
4. เมวินฟอส เช่น ฟอสดริน, ฟีนิฟอส, ฟอสฟีน
5. พาราไธออน เช่น โฟลิดอล อี 605, พาราดอล, พาราท็อกซ์
6. ฟอเรท เช่น ไธเมท, แกรนนูท็อกซ์
7. ชราดาน หรือโอเอมพีเอ เช่น ไดแพค, เพสต๊อกซ์ 3, ไซแตม
8. เทพพ์ เช่น ฟ๊อสเวกซ์, นีฟอส, คิลเลกซ์
9. ไธโอนาซีน เช่น ไซเนม, นีมาฟอส, ซีโนฟอส

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายร้ายแรงสูง** ได้แก่

1. ออลดริน เช่น ออลเดร็กซ์, ออลไดร้ท์, อโกรดิน
2. ไดโครโตฟอส เช่น ไบดริน, คาร์บีครอน, เอคตาฟอส
3. คาร์โบฟีโนไธออน เช่น ไตรไธออน
4. ไดโคลวอส หรือดีดีวีพี เช่น แอ๊ทการ์ด, เดเดวับ, โนโกส์, วาโปน่า
5. ดีลดริน เช่น ดีลเดร็กซ์, ดีลไดร้ท์, เอนโดซีน
6. เอนดริน เช่น ไดรน่าฟ๊อก, เอนเดร็กซ์, เฮกซาดริน
7. เมทธิลพาราไธออน เช่น อรามูล, มาลิโซล, โฟลิดอล-เอ็ม, เมตาฟอส

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายปานกลาง** ได้แก่

1. อซินฟอสเมธิล เช่น เบนไธออน, กูซาไธออน, กูไธออน
2. บีเอชซี และลินเดน
3. คลอร์เดน เช่น คลอร์เดน, คลอร์ดิลล์
4. คูมาฟอส เช่น โค-ราล, เบย์เออร์ 21/199
5. ไดอาร์ซีโนน เช่น แอลฟาท็อกซ์, บาซูดิน, สเปคตราไซด์
6. ไดเมโธเอท เช่น ไซกอน, ริดไม๊ท์ โรเกอร์
7. เอนโดซัลเฟน เช่น ไธโอดาน, เบโอสิท, โอเน็กซ์
8. เฟนไธออน เช่น เบย์โท๊กซ์, เลเบซิด, เมอร์แคปโตฟอส

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายต่ำ** ได้แก่

1. เทมีฟอส เช่น อะเบท
2. อราไม๊ท์ เช่น อราไซด์
3. คาร์บาริล เช่น เซวิน, เอส-85
4. คลอโรเบนซิเลท เช่น อคาราแบน, คอพไม้ท์
5. ดีดีดี
6. ไดโคฟอล เช่น เคลเธน
7. มาลาไธออน

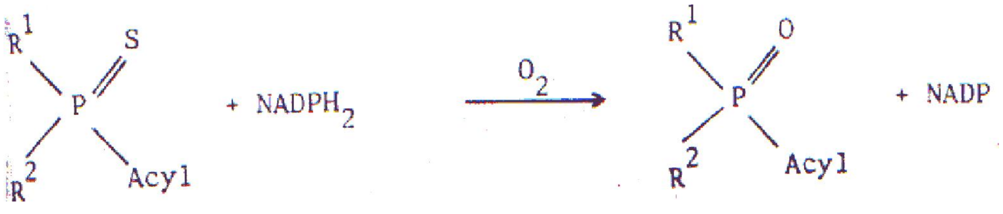
(ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527)

**1.5 การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP ในพืชและสัตว์**

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกายโดยทำให้อยู่ในรูปซึ่งมีประจุมากขึ้น จึงละลายน้ำได้ดีขึ้น และถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะในรูปดังกล่าว หรือในรูปของคอนจูเกตส์ (conjugates) ส่วนพืชมักจะเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมให้อยู่ในรูปซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ (peptides) โปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรต

การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ ซึ่งมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) อยู่เป็นจำนวนมาก ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภท OP ที่สำคัญ ได้แก่

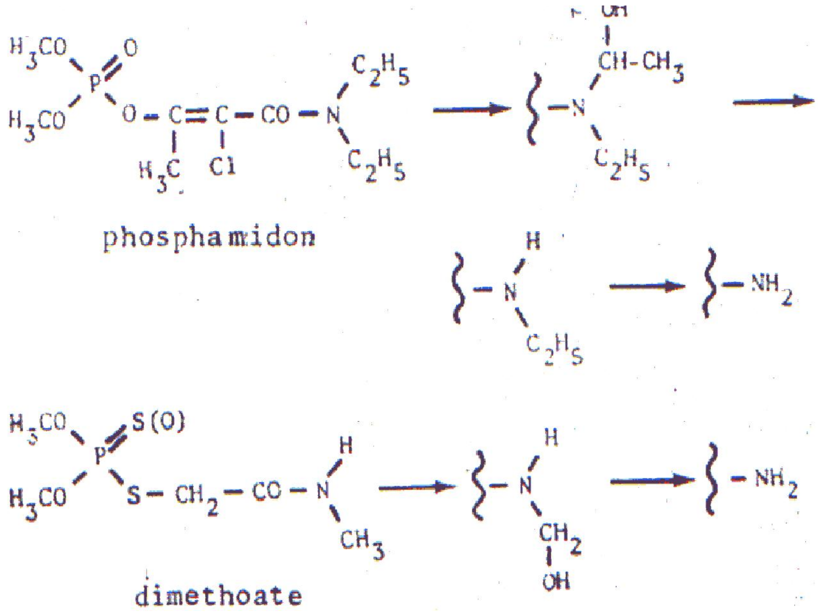
1.5.1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลุ่มไธโอโน (thiono) เป็นกลุ่มออกโซ (oxo) ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของซัลเฟอร์จะเปลี่ยนสารฟอสฟอโรไธโอเนทส์ (phosphorothionates) เป็นฟอสเฟต (phosphate) ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาซึ่งทำให้ได้สารมีฤทธิ์เกิดขึ้นที่ส่วนไมโครโซม (microsome) ของตับโดยมี $NADPH_2$ และออกซิเจน ดังแสดงในภาพที่ 3




ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงฟอสฟอโรไธโอเนทส์เป็นสารในรูปที่ออกฤทธิ์ (ฟอสเฟต)

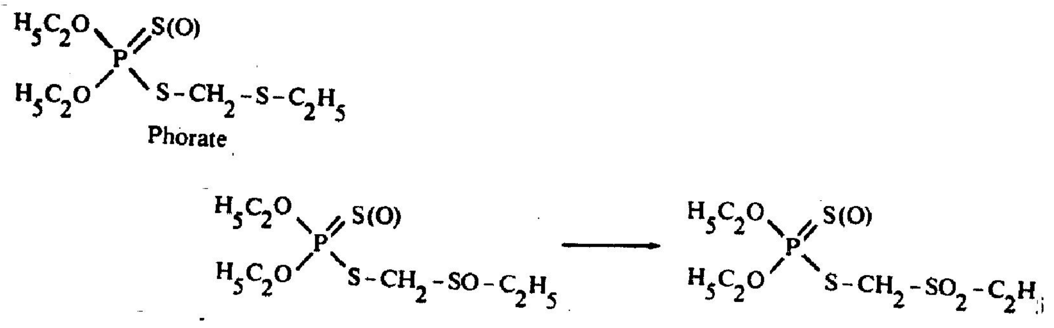
ที่มา: พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.2 ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอัลคิเลชัน (oxidative dealkylation) เป็นปฏิกิริยาซึ่งกลุ่มอัลคิลเชื่อมกับไนโตรเจน จะถูกกำจัดออกโดยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอัลคิลเลชัน เช่น การที่ยาฆ่าแมลงไดเมโธเอท (dimethoate) และฟอสฟามิดอน (phosphamidon) ดังแสดงในภาพที่ 4 และยาฆ่าแมลงเช่น ไดโครโทฟอส (dicrotophos), โอเอ็มพีเอ (OMPA) และเอโซดริน (azodrin®) สลายตัวได้เอไมด์ที่ไม่มีการแทนที่



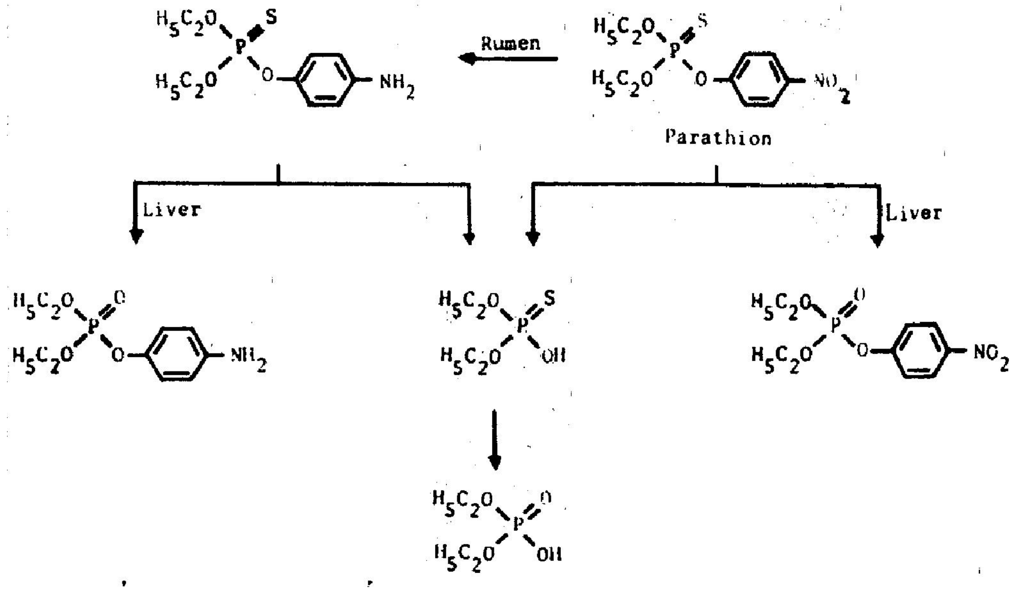

ภาพที่ 4 การสลายตัวของยาฆ่าแมลง ฟอสฟามิดอน และไดเมโธเอท
ที่มา: พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.3 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไธโออีเธอร์ส (oxidation of thioethers) เป็นปฏิกิริยาการสลายตัวที่มีความสำคัญปฏิกิริยาหนึ่ง ซึ่งเป็นการเปลี่ยนยาฆ่าแมลงประเภท OP ที่เป็นไธโออีเธอร์ให้เป็นสารซัลฟอกไซด์ (sulfoxides) และซัลโฟน (sulfones) เช่น การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต (phorate) ดังแสดงในภาพที่ 5




ภาพที่ 5 การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต
ที่มา: พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.4 ปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพร้อมๆ กับปฏิกิริยาออกซิเดชันของไธโอโนซัลเฟอร์และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตัวอย่างเช่น การเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยใช้เอนไซม์ซึ่งเปลี่ยนแปลงกลุ่มไนโตรของพาราไธออน (parathion) เป็นกลุ่มอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 6




ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยาฆ่าแมลงพาราไธออน
ที่มา: พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดร่วมกับปฏิกิริยาการสลายตัวอื่นแทบทุกแบบ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้มักเรียกว่า ฟอสฟาเทส (phosphatase) หรืออาจเรียกตามชื่อของสารที่ถูกเปลี่ยนแปลง เช่น พาราออกซอนเนส (paraoxonase) เป็นต้น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโดยเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญที่สุดในการทำให้ OP หมดฤทธิ์ ขณะที่ในปฏิกิริยาการเกิดพิษจะเกิดขึ้น เมื่อกลุ่มฟอสฟอริลถูกย้ายไปให้แก่กลุ่มซีรีนแอลกอฮอล์ (serine-alcohol group) ในเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) ปฏิกิริยาทั้งสองจะแข่งขันกัน ฤทธิ์ของยาฆ่าแมลง OP จะสูงสุดเมื่อยาฆ่าแมลงเข้าสู่ร่างกาย และขนส่งภายในร่างกายในรูปที่ไม่ไวต่อการเกิดไฮโดรไลซิสที่ทำให้หมดฤทธิ์ และยาฆ่าแมลงในรูปที่ถูกขนส่งควรถูกเปลี่ยนแปลงเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ที่จุดออกฤทธิ์ (site of action)

1.5.6 ปฏิกิริยาคอนจูเกชัน (conjugation) เป็นปฏิกิริยาที่นำไปสู่การเกิดสารไร้พิษซึ่งละลายน้ำได้ และจะถูกกำจัดออกจากสัตว์หรือสะสมไว้ในพืช

**1.6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาฆ่าแมลงประเภท OP**

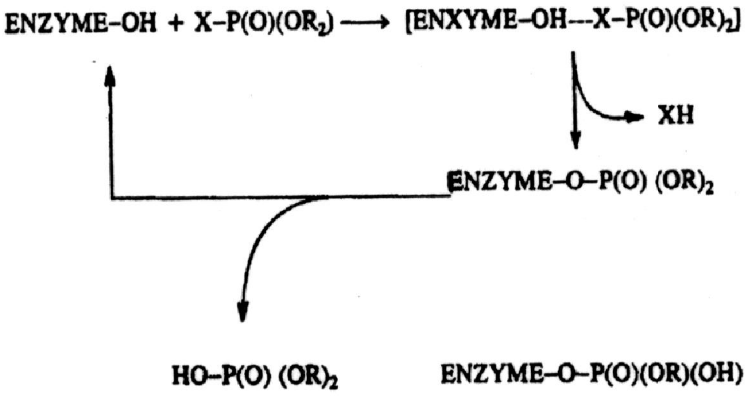
ระบบประสาทโดยสังเขปของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) ระบบประสาทส่วนกลางประกอบด้วย สมองและไขสันหลัง ทำหน้าที่เป็นระบบกลางในการผสมผสาน (integration) โดยใช้เซลล์ประสาทจำนวนล้านๆ เซลล์ ส่วนระบบประสาทส่วนปลาย ประกอบด้วยระบบย่อย คือ ระบบโซมาติค (somatic system) ซึ่งเป็นระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนไหวโดยมีการทำงานของกล้ามเนื้อสนองตอบการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม และระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ซึ่งควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้ออวัยวะภายในและต่อมต่างๆ ระบบนี้ถูกควบคุมโดยระบบย่อยสองระบบ ซึ่งออกฤทธิ์ตรงข้ามกัน และสิ่งมีชีวิตไม่สามารถบังคับได้ (involuntary) ระบบย่อยดังกล่าว ได้แก่ ระบบประสาทซิมปาเธติค (sympathetic nervous system) และระบบพาราซิมปาเธติค (parasympathetic nervous system)

ระบบซิมปาเธติค (sympathetic) ประกอบด้วยปุ่มประสาท (ganglia) ขนาดใหญ่ต่อกันอยู่นอกระบบประสาทส่วนกลาง แบ่งออกเป็นช่วงๆ โดยสัญญาณจะส่งผ่านช่องว่างซินแนปส์ที่อยู่บริเวณปุ่มประสาท (synaptic gaps) โดยสื่อเคมีอะซิติลโคลีน เส้นประสาทในช่วงที่ต่อจากสมองส่วนกลางมายังปุ่มประสาท ซึ่งเราเรียกว่า เส้นประสาทแอคซอนก่อนปุ่มประสาท (preganglionic axon) เส้นประสาทในช่วงที่ต่อจากปุ่มประสาทไปยังอวัยวะ เช่น กล้ามเนื้อหรือต่อม เราเรียกว่าเส้นประสาทแอคซอนหลังปุ่มประสาท (postganglionic axon) ซึ่งสื่อเคมีแอดรีนะลิน (adrenaline) หรือ นอร์แอดรีนะลิน (noradenaline) เป็นสารสื่อสัญญาณส่งผ่านช่องว่างซินแนปส์ไปยังกล้ามเนื้อหรือต่อม (ยกเว้นต่อมเหงื่อและต่อมแอดรีนัล (adrenals) ซึ่งใช้สื่อเคมีอะซิติลคอลีน) ส่วนระบบ

พาราซิมปาเธติคจะมีขนาดของปุ่มประสาทเล็กกว่า กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ส่วนมากมักพบทางด้านขวาของอวัยวะต่างๆ จึงทำให้เส้นประสาทแอคซอนหลังปุ่มประสาทสั้นกว่าระบบพาราซิมปาเธติคมีสารสื่อประสาททั้งก่อนและหลังปุ่มประสาทเป็นอะซิติลคอลีน

ตัวอย่างการควบคุมซึ่งตรงกันข้ามกับระบบซิมปาเธติคและพาราซิมปาเธติค เช่น ระบบซิมปาเธติค ทำให้เกิดการเร่งการเต้นของหัวใจ การลดการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร การหรี่ม่านตา การหยุดยั้งการหลั่งน้ำลาย ในขณะที่ระบบพาราซิมปาเธติคทำให้การเต้นของหัวใจช้าลง เพิ่มการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร เป็นต้น ในการที่สื่อเคมีอะซิติลคอลีนจะทำหน้าที่ในการสื่อสัญญาณได้นั้น สื่อเคมีอะซิติลคอลีนซึ่งจัดทางเคมีอยู่ในพวกเอสเทอร์จะต้องถูกย้ายไปที่อื่น หรือถูกทำให้หมดฤทธิ์ลงภายในเวลาอัน รวดเร็วระยะเวลาหนึ่งซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของแหล่งออกฤทธิ์ ในส่วนของเหลวและเนื้อเยื่อของร่างกาย มีเอนไซม์ซึ่งเรียกว่าเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase หรือ AChE) สามารถไฮโดรไลส์อะซิติลคอลีนให้เป็นคอลีน และกรดอะซิติค พบว่าสารซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสเกือบทั้งหมดออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสนี้

ยาฆ่าแมลงประเภท OP จะออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรส ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยในขั้นแรก เอนไซม์จะจับกับสารประกอบ OP ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible complex) จากนั้นเอนไซม์จะถูกฟอสฟอรีเลท (phosphorylated) แล้วปล่อยสารประกอบ OP (leaving group) ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้ระยะเวลานาน และในขั้นสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้เอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสและฟอสเฟต เนื่องจากในขั้นตอนเหล่านี้ใช้ระยะเวลานานในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลคอลีนที่ซินแนปส์ของเส้นประสาท ดังนั้นจึงทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมาก ในกรณีรุนแรงจะทำให้สิ่งมีชีวิตถึงแก่ชีวิตได้




ภาพที่ 7 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสโดยสารประกอบ OP
ที่มา: Perry และคณะ, 1998

**1.7 อาการพิษของยาฆ่าแมลงประเภท OP**

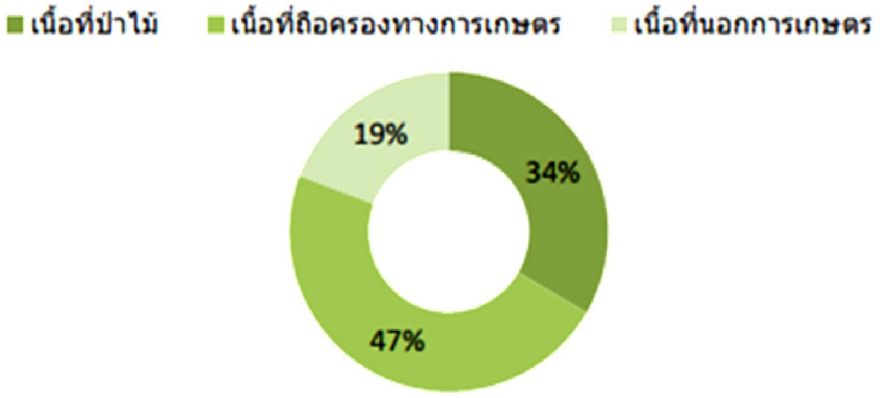
1.7.1 อาการแบบมัสคารินิค (muscarinic signs และ symptoms) จุดรับสัมผัสมัสคารินิค (muscarinic receptors) สำหรับอะซิติลคอลีนพบส่วนใหญ่ที่กล้ามเนื้อเรียบ หัวใจและต่อมมีท่อ อาการที่เกิดขึ้นในระยะแรกคือ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน น้ำตาไหล เหงื่อออก ม่านตาหดตัว ถ่ายอุจจาระ และปัสสาวะโดยกลั้นไม่อยู่ การเกร็งของหลอดลม หลอดลมมีเมือก และเสมหะมาก เป็นต้น

1.7.2 อาการแบบนิโคตินิค (nicotinic signs และ symptoms) อาการแบบนี้เกิดขึ้น เนื่องจากการสะสมของอะซิติลคอลีนที่ปลายประสาทมอเตอร์และที่ซินแนปส์ของระบบประสาทอัตโนมัติ อาการที่เกิดขึ้นคือ กล้ามเนื้อถูกกระตุ้นมากกว่าปกติ มีการกระตุกของกล้ามเนื้อที่หน้า หนังตา ลิ้น ถ้าอาการรุนแรงขึ้นจะพบว่ากระตุกมากขึ้นทั่วร่างกาย ต่อมาจึงจะมีอาการอ่อนเพลียตามกล้ามเนื้อทั่วไป และเกิดเป็นอัมพาตของกล้ามเนื้อในที่สุด

1.7.3 อาการทางสมอง เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง อาการที่พบได้แก่ มึนศีรษะ ปวดศีรษะ งง และกระสับกระส่าย ตื่นตกใจง่าย อารมณ์พลุ่งพล่าน ถ้าอาการมากอาจชักและหมดสติได้ ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากอาจถึงตายได้เนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว (respiratory failure) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากหลอดลมตีบตัน กล้ามเนื้อของระบบหายใจเป็นอัมพาต และศูนย์การควบคุมการหายใจในสมองหยุดทำงาน ในรายที่มีอาการไม่รุนแรงนัก อาการจะดีขึ้นใน 2-3 วัน แต่จะอ่อนเพลีย ไม่มีแรงเป็นเวลานาน (พาลาภ สิงหเสนี, 2531)

**1.8 ผลกระทบของยาฆ่าแมลงประเภท OP ต่อสิ่งแวดล้อม**

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 320.6 ล้านไร่ โดยเมื่อแบ่งเนื้อที่การใช้ที่ดินออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ 1. เนื้อที่ป่าไม้ 2. เนื้อที่ถือครองทางการเกษตร และ 3. เนื้อที่นอกการเกษตร โดยในปี 2553 ประเทศไทยมีเนื้อที่ถือครองทางการเกษตรมากที่สุด กล่าวคือเป็นเนื้อที่ถือครองทางการเกษตรถึง 151.9 ล้านไร่ (ร้อยละ 47.31) รองลงมา คือ เนื้อที่ป่าไม้ 107.2 ล้านไร่ (ร้อยละ 33.41) ส่วนเนื้อที่นอกการเกษตรมีจำนวนเพียง 61.5 ล้านไร่ (ร้อยละ 19.28) ซึ่งเป็นประเภทที่น้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 8




ภาพที่ 8 การใช้ที่ดินในประเทศไทย ปี 2553

ที่มา: เอกสารสถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2554 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์สูตร ภูมิอากาศร้อนชื้น ฝนตกชุก มีความเหมาะสมสำหรับโรคและแมลงที่จะแพร่ขยายพันธุ์ได้อย่างดี ทั้งชนิดและปริมาณ การแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่ปฏิบัติกันอยู่อย่างแพร่หลายในปัจจุบันของเกษตรกรคือ การใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในการป้องกันและกำจัดโรคแมลง และวัชพืช ทำให้มีแนวโน้มการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชสูงขึ้นทุกปี สารกำจัดแมลงที่นิยมใช้กันมากในประเทศไทย โดยมีปริมาณนำเข้าสูงสุด 10 ชนิดแรกในปี พ.ศ. 2530 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อสารกำจัดแมลงนำเข้าในปี พ.ศ. 2530 ที่มีปริมาณสูงสุด 10 ชนิดแรก

| Type of Insecticide | Quantity (kg) | Value (B) |
|---|---|---|
| 1. Methyl parathion | 1,538,599 | 83,927,568 |
| 2. Monocrotophos | 951,043 | 96,042,709 |
| 3. Methamidophos | 417,452 | 45,273,444 |
| 4. Dimethoate | 415,650 | 34,131,532 |
| 5. Methomyl | 358,296 | 130,693,483 |
| 6. Malathion | 309,354 | 17,965,900 |
| 7. Carbaryl | 242,150 | 25,006,268 |
| 8. Mevinphos | 240,691 | 18,803,315 |
| 9. Carbofuran | 204,661 | 71,077,271 |
| 10. Ethyl parathion | 174,038 | 34,131,532 |
| Other (58 types) | 1,821,361 | 207,920,359 |
| Total | 6,673,295 | 764,937,381 |

ที่มา: นวลศรี ทยาพัชร, 2533

ปัญหาเกี่ยวกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในสิ่งแวดล้อมนั้น มิได้เกิดขึ้นเฉพาะพื้นที่ที่มีการใช้สารเหล่านี้เท่านั้น แต่สามารถแพร่กระจายและตกค้างในบริเวณกว้างได้ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา เริ่มจากสารพิษตกค้างในดินและลำต้นพืชหลังจากการฉีดพ่น จะเกิดการสะสมส่วนหนึ่ง บางส่วนฟุ้งกระจายในบรรยากาศ และบางส่วนซึมลงไปในดิน ส่วนใหญ่จะถูกฝนชะ แล้วพัดพาไปกับน้ำหน้าดินไหลลงสู่แหล่งน้ำ จากนั้นจะเกิดการถ่ายทอดสารเหล่านี้ผ่านห่วงโซ่อาหารเข้าสู่สิ่งมีชีวิตต่างๆ ต่อไป

1.8.1 การแพร่กระจายของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในดิน

ในการเพาะปลูกพืชนั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ต้องใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้งก่อนปลูก ขณะที่พืชกำลังเติบโต และก่อนการเก็บเกี่ยว ดินจึงเป็นแหล่งรองรับสารเหล่านี้โดยตรง นอกจาก นี้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชบางชนิดยังนิยมใช้ในอาคารบ้านเรือนด้วย ทำให้โอกาสที่สารเหล่านี้จะสะสมในดินจึงมีมากยิ่งขึ้น สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในดิน อาจมีการเปลี่ยนแปลงไปในหลายลักษณะได้แก่

1.8.1.1 การสลายตัวโดยปฏิกิริยาทางเคมี (chemical decomposition)

1.8.1.2 การสลายตัวโดยแสง (photodegradation)

1.8.1.3 การสลายตัวโดยถูกจุลินทรีย์ย่อยสลาย (microbial degradation)

1.8.1.4 การระเหยจากดินสู่บรรยากาศ (volatilization)

1.8.1.5 การเคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งน้ำ (movement by runoff and water-table)

1.8.1.6 การเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (plant or organism uptake)

จากการศึกษาปริมาณสารตกค้างของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย ตรวจพบสารตกค้างในดินอยู่มากทั้งชนิดและปริมาณ กระจายไปตามดินเกษตรกรรมต่างๆ ทั่วประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระดับสารพิษตกค้างประเภท OP ในดินเป็น ppm (mg/kg) จากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศ สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531

| Organophosphate pesticide | No. of positive sample | % of positive sample | concentration (ppm) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Range | Average |
| Dimethoate | 31 | 10.26 | tr – 0.051 | 0.016 |
| Diazinon | 49 | 63.64 | tr – 0.054 | 0.010 |
| Methyl parathion | 59 | 76.62 | tr – 0.475 | 0.023 |
| Malathion | 10 | 12.99 | tr – 0.009 | 0.004 |
| Parathion | 26 | 33.77 | tr – 0.018 | 0.005 |

Total 77 samples; tr = trace (less than 0.001 ppm)

ที่มา: นวลศรี ทยาพัชร, 2533

1.8.2 การแพร่กระจายของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำ

การปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำนั้น มาจากหลายสาเหตุดังต่อไปนี้

1.8.2.1 การฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง

1.8.2.2 การกัดชะดินของฝนและน้ำไหลบ่าหน้าดินผ่านพื้นที่ที่มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนลงสู่แหล่งน้ำ

1.8.2.3 การระบายน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ โดยมิได้มีวิธีกำจัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

1.8.2.4 การทิ้งหรือล้างภาชนะที่บรรจุสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ

1.8.2.5 การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบริเวณพื้นที่การเกษตรใกล้กับแหล่งน้ำ

สำหรับประเทศไทย มีการตรวจสอบชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในแหล่งน้ำทั่วไปและแหล่งน้ำในแปลงเกษตรกรรมทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2530-2531 จำนวน 149 ตัวอย่าง พบสารในกลุ่ม OP จำนวน 3 ชนิด โดยสารในกลุ่มนี้ที่พบมากที่สุดคือ MP ความเข้มข้น 0.68 ppb ดังแสดงในตารางที่ 4

นอกจากนี้ยังมีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินตะกอนจากแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ จำนวน 71 ตัวอย่าง ตรวจพบสารตกค้างกลุ่ม OP ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ไดเมทโธเอท, ไดอะซีนอน, เมทธิลพาราไธออน, มาลาไธออน และพาราไธออน

ตารางที่ 4 ระดับสารพิษตกค้างประเภท OP ในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป และแหล่งเกษตรกรรมเป็น ppb (μg/l) สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531

| Organophosphate pesticide | No. of positive sample | % of positive sample | ppb (μg/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Range | Average |
| Dimethoate | 1 | 0.67 | tr-0.06 | 0.06 |
| Diazinon | 4 | 2.68 | tr-0.28 | 0.15 |
| Methyl parathion | 5 | 3.36 | tr-068 | ND |
| Matathion | 0 | 0 | ND | ND |
| Parathion | 0 | 0 | ND | ND |

Total 149 samples    ND = Non detectable    tr = trace (less than 0.01 ppb)

ที่มา : นวลศรี ทยาพัชร, 2533

1.8.3 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในพืชอาหาร

พืชสามารถรับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้หลายทาง เช่น การฉีดพ่นลงบนพืชโดยตรง พืชอาจดูดซึมจากดินหรือมากับน้ำ หรือจากสารพิษที่ปลิวอยู่ในอากาศ โดยส่วนใหญ่เกษตรกรมักใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินความจำเป็น จนเป็นอันตรายต่อพืชหรือเกิดการสะสมในพืช ทำให้เกิดสารตกค้างในพืช

1.8.4 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสัตว์

สาเหตุที่สัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากสัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยตรงจากการฉีดพ่น เพื่อป้องกันหรือทำลายแมลงที่เป็นศัตรูพืช สัตว์สามารถรับสารเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางอาหาร ทางการหายใจ และทางผิวหนัง ปริมาณสารที่สัตว์ได้รับเข้าไปนั้นอาจไม่มากพอที่จะทำอันตรายกับสัตว์ แต่ก็อาจเกิดการสะสมในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ได้

1.8.4.1 สัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยทางอ้อม กล่าวคือสัตว์กินอาหารตามลำดับขั้นในห่วงโซ่อาหาร ถ้าผู้ผลิตหรือพืชมีสารพิษตกค้างอยู่ สัตว์จะได้รับสารพิษและสะสมในร่างกายได้ โดยเฉพาะในสัตว์น้ำ ที่มีการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะสามารถสะสมสารพิษได้จากห่วงโซ่อาหารของแหล่งน้ำนั้น ได้มีผู้รายงานถึงความเป็นพิษเฉียบพลันของยาฆ่าแมลงประเภท OP ต่อปลา ได้แก่ อาการว่ายน้ำรวดเร็วอย่างผิดปกติ อาการชักกระตุก เป็นต้น ปลาบลูกิล (bluegill, *Lepomis macrochirus*) ที่ได้รับยาฆ่าแมลงมาลาไธออน จะมีลักษณะกางครีบจนสุดก่อนตาย และปลาที่ได้รับยาฆ่าแมลงชนิดนี้ขนาดต่ำเพียง 10 ppm เป็นเวลานานๆ อาจให้กำเนิดลูกที่มีความผิดปกติทางโครงสร้างของกระดูกสันหลังได้ นอกจากนี้ยัง พบว่ายาฆ่าแมลงประเภท OP มีพิษต่อผึ้งโดยทำให้น้ำและน้ำหวานซึ่งเป็นอาหารของผึ้งปะปนด้วยสารพิษ

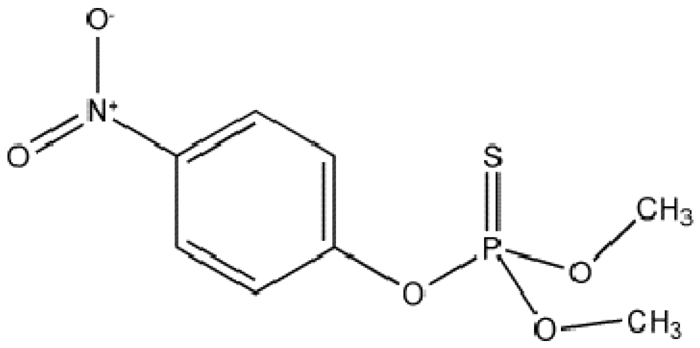
1.8.4.2 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในมนุษย์ มนุษย์ก็เช่นเดียวกันกับสัตว์ทั้งหลาย ที่สามารถรับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ 2 ทาง คือ โดยทางตรงจากการฉีดพ่น ได้แก่ ผู้ที่เกี่ยวข้องกับสาร เช่น เกษตรกร ประชาชนที่ใช้สารเหล่านี้ตามบ้านเรือน หรือคนงานในโรงงานที่เกี่ยวข้องกับสารพิษ เมื่อได้รับสารเข้าไปในปริมาณมากพอก็จะแสดงอาการพิษได้อีกทางหนึ่งคือโดยทางอ้อม จากการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีสารพิษเจือปนอยู่ เช่น บริโภคข้าว ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ไข่ เป็นต้น (พาลาภ สิงหเสนี, 2531; นวลศรี ทยาพัชร, 2533)

**2. เมทธิลพาราไธออน (Methyl Parathion)**

**2.1 การบ่งชี้ลักษณะและคุณสมบัติ (Identification and Properties)**

เมทธิลพาราไธออน (methyl parathion; MP) เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ชนิดหนึ่งมีชื่อทางเคมี (chemical name) หลายชื่อได้แก่ *o,o*-dimethyl *o*-(4-nitrophenyl) ester หรือ *o,o*-dimethyl *o*-*p*-nitrophenyl phosphorothiate หรือ phosphorothioic acid หรือ *o,o*-dimethyl *o*-4-nitrophenyl phosphorothiate (IUPAC systematic name) นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นๆ (synonyms) อีก เช่น alenthione, Bayer E-601, carthion M, demethylfenitrothion dimethyl parathiofolidol-M, malatyr, demethylfenitrothion dimethyl parathion, folidol-M, metacid, methaphos, methylfolidol, nitrox, vofatox และชื่อทางการค้า (trade name) เช่น A-Gro, Folidol M, Metacide, Methyl-E 605, Metron, M-Parathion, Nitrox, Paratox, Paridol, Vofatox, Wofatox

สูตรโมเลกุลของ MP คือ $C_8H_{10}O_5NSP$ และมีสูตรโครงสร้าง
ดังแสดงในภาพที่ 9




ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้างของ MP
ที่มา: http://www.pesticideinfo.org/ChemGifs/PC35110.gif

โดย MP ที่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกไม่มีสี มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 263.22 มีจุดหลอมเหลว (melting point) ที่ 35-36 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด (boiling point) ที่ 160 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 1 มิลลิเมตรของปรอท สามารถละลายได้ดีในสารอินทรีย์ทุกชนิด เสถียร (stability) ในสภาพสารละลายที่เป็นกลางและกรดที่อุณหภูมิปกติ แต่จะถูก hydrolyze โดยด่าง และสลายตัวเล็กน้อยที่ 100 องศาเซลเซียส

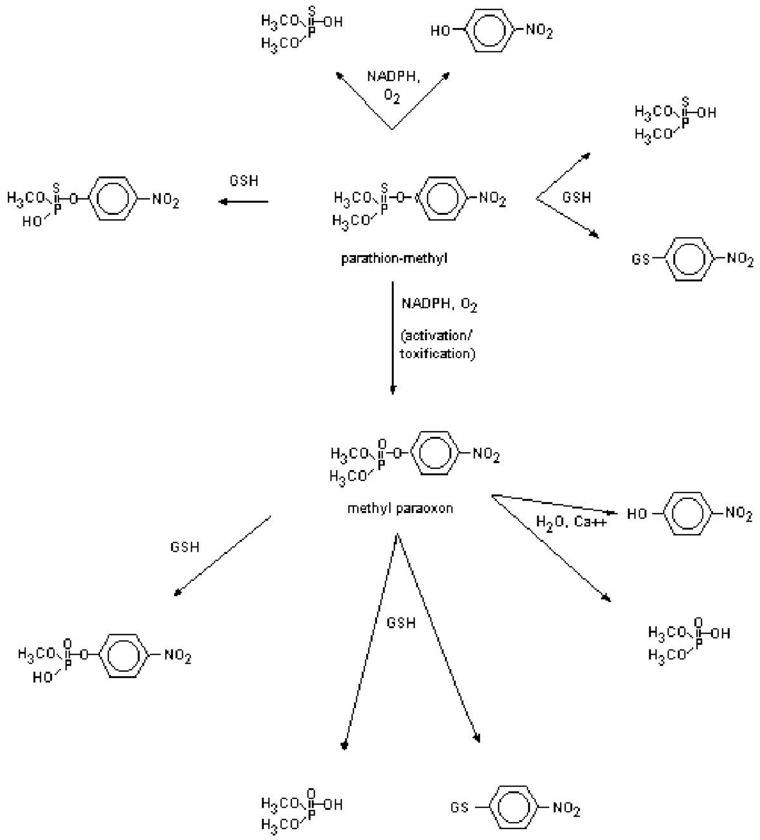
**2.2 กรรมวิธีการผลิตและการนำไปใช้ (Production Processes and Uses)**

ในวงการอุตสาหกรรม MP ได้จากปฏิกิริยาของ dimethyl chlorothiophos-phate กับ *p*-nitrophenol โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ hydrogen chloride หรือ sodium *p*-nitrophenolate ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในน้ำในรูปของสารที่จับตัวกับน้ำและน้ำมันได้ดี (emulsifier) ตัวอย่างเช่น ammonium naphthenate หรือ amines หรือสารละลายอินทรีย์

ซึ่ง MP เป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้ในทางการเกษตรได้อย่างกว้างขวางโดยมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดทั้งประเภทปากดูดหรือปากกัด (sucking หรือ biting) โดยเฉพาะ ด้วงงวงเจาะสมอฝ้าย (cotton bollweevil) นอกจากนี้ยังใช้กำจัดแมลง หมัด ไร หนอนผีเสื้อ หนอนกอชนิดต่างๆ หนอนม้วนใบ หนอนกระทู้ หนอนใยผัก หนอนคืบ หนอนกัดกินใบ แมลงชนิดที่มีปากดูด ได้แก่ เพลี้ยชนิดต่างๆ แมลงชนิดอื่นๆ เช่น บั่ว ด้วงดีด มวนต่างๆ และแมลงหวี่ขาว MP ถูกนำไปใช้ในพืชสวน ส้ม กาแฟ ชา องุ่น พืชไร่ แตงโม ยาสูบ อ้อย ฝ้าย สับปะรด ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ธัญพืช สตรอเบอรี่ มันฝรั่ง พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วลิสง พืชผัก และไม้ดอก ไม้ประดับทั่วไป (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

**2.3 กระบวนการเมตาบอลิซึม และการขับถ่ายในสิ่งมีชีวิต (Metabolism and Excretion)**

สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึม MP ผ่านปาก ผิวหนัง และการหายใจ โดยจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปตามเนื้อเยื่อของร่างกาย ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง หลังจากได้รับสาร การเปลี่ยน MP เป็นเมทธิลพาราออกซอน (methylparaoxon) เกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่นาทีหลังจากได้รับสาร และกระบวนการกำจัดพิษ (metabolism และ detoxification) จาก MP และเมทธิลพาราออกซอนจะเกิดขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ โดยปฏิกิริยา oxidation, hydrolysis และ demethylation หรือ dealkylation ด้วยการ reduce glutathione (GSH) ได้เป็น *o*-methyl-*o*-*p*-nitrophenyl phosphorothioate หรือ dimethyl phosphorothioic หรือ dimethyl phosphorothioic acids และ *p*-nitrophenol ดังแสดงในภาพที่ 9 ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบปริมาณ MP ที่ได้รับจากปริมาณ *p*-nitrophenol ที่ถูกขับออกมากับปัสสาวะ โดยพบว่า *p*-nitrophenol จะถูกขับออกมาร้อยละ 60 ภายใน 4 ชั่วโมง และขับออกมาทั้งหมดภายใน 24 ชั่วโมง




ภาพที่ 10 กระบวนการเมตาบอลิซึมของ MP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
ที่มา: http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr14.htm

**2.4 ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian Toxicity)**

ฝุ่นผง MP เข้าสู่ร่างกายมนุษย์โดยการสูดดมเข้าไปในปริมาณความเข้มข้นของ MP เท่ากับ 0.4-11 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งจะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ลดลงหลายวัน

2.4.1 อาการได้รับพิษอย่างเฉียบพลันจาก MP แยกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้นดังนี้

2.4.1.1 ฤทธิ์มัสคารินิค มีผลมาจากการกระตุ้น M-cholinergic receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเธติค มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวที่ระบบทางเดินอาหาร มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งในท้องและท้องเดิน น้ำลายออกมากผิดปกติ เหงื่อออก สำหรับระบบการหายใจมีอาการแน่นในอก หายใจมีเสียงหวีด มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจทำให้เต้นช้าลง ความดันโลหิตต่ำ สิ่งหลั่งเพิ่มมากขึ้น และรูม่านตาหด

2.4.1.2 ฤทธิ์นิโคตินิค มีผลมาจากการกระตุ้น N-cholinergic receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเธติคและกล้ามเนื้อลาย ทำให้มีฤทธิ์ตรงข้ามกับการกระตุ้นระบบพาราซิมพาเธติค ซึ่งอาการของผู้ได้รับพิษที่แสดงอาการซิมพาเธติค จะมีอาการหัวใจเต้นเร็ว รูม่านตาขยาย ความดันโลหิตสูงมีการกระตุกของกล้ามเนื้อบริเวณเปลือกตา ใบหน้า และคอ กล้ามเนื้ออ่อนแอ โดยในระยะแรกจะแสดงอาการเด่นทางซิมพาเธติค แต่ต่อมาจะแสดงอาการเด่นทางพาราซิมพาเธติค ส่วนการกระตุ้นกล้ามเนื้อลายที่ motor end plate ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนกำลังในที่สุดจะเกิดอัมพาตโดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจ

2.4.1.3 ฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง อาจมีผลมาจากการกระตุ้นระบบ central M-cholinergic ทำให้มีอาการวิงเวียน ความคิดฟุ้งซ่าน การเคลื่อนไหวเปะปะ พูดไม่ชัด การหายใจผิดปกติ ไม่มีปฏิกิริยาโต้ตอบต่อสิ่งกระตุ้น มีการกระตุกของกล้ามเนื้อ การชักเกร็งของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง มีการสับสนทางจิต ชัก อาการโคม่า และหมดสติ

2.4.2 ส่วนอาการที่ได้รับพิษจาก MP อาจแยกประเภทตามความรุนแรงของอาการได้ 3 ประเภท คือ

2.4.2.1 อาการขั้นเล็กน้อย ผู้ป่วยยังพอที่จะเคลื่อนไหวได้โดยไม่ต้องรับความช่วยเหลือ มักแสดงอาการคลื่นเหียน น้ำลายออกมากผิดปกติ น้ำตาไหล อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง ไม่อยากรับประทานอาหาร อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ทรงตัวลำบาก ในทางตรงกันข้าม อาจมีอาการง่วงนอน กล้ามเนื้อบิด เหงื่อออกมาก การหายใจผิดปกติ หัวใจเต้นช้าสลับกับเต้นเร็ว หายใจมีเสียงหวีด เนื่องจาก MP มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดง และการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ใน serum ของเลือดลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวสามารถกลับสู่สภาวะปกติได้อย่างรวดเร็วในกรณีที่การได้รับพิษอยู่ในขั้นเล็กน้อย

2.4.2.2 อาการขั้นปานกลาง ผู้ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจะแสดงลักษณะต่างๆ ที่บริเวณระบบประสาทส่วนกลาง และระบบประสาทอัตโนมัติ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบหายใจ ระบบที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด และระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยมักแสดงอาการน้ำลายออกมากผิดปกติ อาเจียนมีอาการเสียดท้อง (โดยเฉพาะบริเวณสะดือ) ท้องร่วงและเหงื่อออกมาก กล้ามเนื้อบิด มือสั่น ตากระตุก กล้ามเนื้อไม่ประสานงานกัน การหายใจลำบาก ความดันโลหิตสูง อุณหภูมิของร่างกายอยู่ในช่วง 37.2-38.8 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดง และการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ใน serum ของเลือดมีเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์

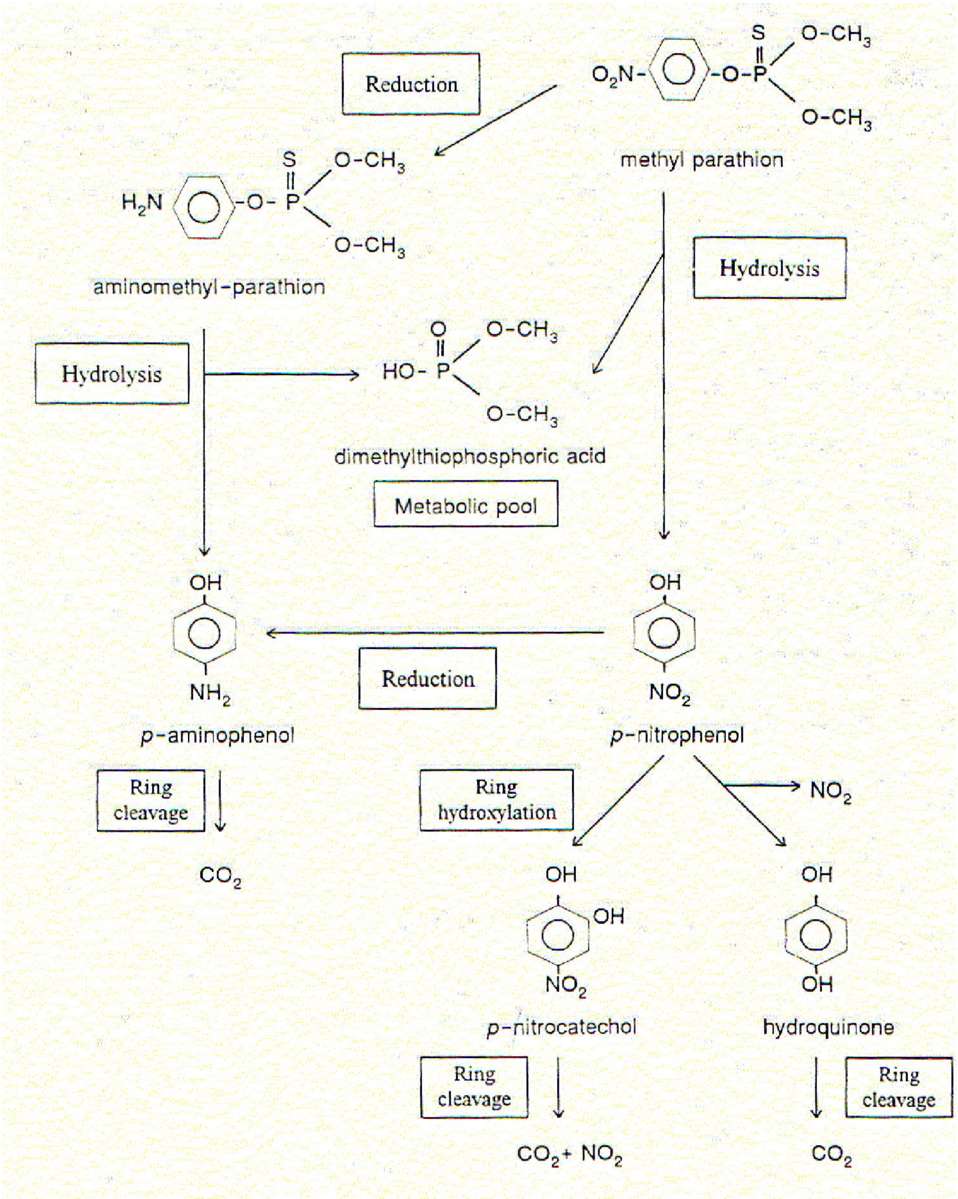
2.4.2.3 อาการขั้นรุนแรง ผู้ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวและมีความสับสนทางจิตใจ เกิดขึ้นจะแสดงอาการชัก และเกิดความผิดปกติของระบบหายใจ กล้ามเนื้อบิดทั่วร่างกายอัตรา การหาย ใจมากกว่า 40 ครั้งต่อนาที บริเวณปลายแขนขาเขียวเนื่องจากการขาดออกซิเจน ปฏิกิริยาโต้ตอบต่อสิ่งกระตุ้นเกิดขึ้นอย่างแผ่วเบา อุณหภูมิในร่างกายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 39 องศาเซลเซียส การถ่ายอุจจาระและปัสสาวะเกิดขึ้นโดยไม่รู้ตัว ม่านตาหรี่ การทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดง และการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ใน serum ของเลือดจะลดลงหรือถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิง การได้รับพิษอย่างเฉียบพลันของ MP เป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ตรงบริเวณปลายประสาท ซึ่งจะทำให้การสะสมของ endogenous acetylcholine อาการที่ปรากฏ ได้แก่ เหงื่อออก มีน้ำลายไหล ท้องร่วง อาการโคม่า และตายเนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว

**2.5 การทดสอบความเป็นไปในสิ่งแวดล้อม (Environmental Fate Tests)**

2.5.1 การย่อยสลายโดยชีววิธีและการเปลี่ยนรูปโดยชีววิธี (Biodegradation and Biotransformation)

การย่อยสลายโดยชีววิธีของ MP พบว่าสารชนิดนี้สามารถสลายตัวได้ด้วยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน ซึ่ง pathway ในการย่อยสลาย MP ของจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา hydrolysis และปฏิกิริยา reduction ดังแสดงในภาพที่ 10

ปฏิกิริยา hydrolysis ของ MP เกิดที่พันธะ nitrophenyl (C-O-P) แล้วได้ผลผลิตเป็นพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol; PNP) และกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค (dimethyl thiophosphoric acid) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการ metabolism ของ PNP ได้เป็นไนไตรท์ (nitrite) และไฮโดรควิโนน (hydroquinone) หรือพาราไนโตรเคทิคอล (*p*-nitrocatechol) ปฏิกิริยา reduction ของ MP เกิดที่กลุ่มไนโตร (nitro group) ได้เป็นอะมิโนเมทธิลพาราไธออน (aminomethyl-parathion) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลส์ (hydrolyse) ต่อไปได้พาราอะมิโนฟีนอล (*p*-aminophenol) และกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค (dimethylthiophosphoric acid) อย่างไรก็ตาม PNP ซึ่งเป็น metabolite ของ MP ในปฏิกิริยา hydrolysis สามารถถูกรีดิวซ์เป็นพาราอะมิโนฟีนอล ในสภาวะไร้อากาศ (Keprasertsup, 1995)




ภาพที่ 11 proposed pathways ของ MP ในจุลินทรีย์โดยทั่วไป

ที่มา: Keprasertsup, 1995

2.5.2 การย่อยสลายโดยแสง (Photodegradation)

การย่อยสลายโดยแสงของ MP สามารถถูกย่อยสลายได้เป็น dimethyl thiophosphoric acid, paranitrophenol และ methyl paraoxon ในสภาพแวดล้อมหลังจาก 8 ชั่วโมงไปแล้ว กระบวนการเกิด methyl paraoxon โดยอาศัยแสงอัลตร้าไวโอเลตจะเกิดเพิ่มขึ้น

2.5.3 การแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำ (Hydrolysis)

การแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำของ MP ขึ้นกับค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 175 วัน ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 1-5 ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 5 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ และเมื่อพีเอชเท่ากับ 12 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 6-7 และ 9 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำเพียง 6.9 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ

อัตราการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำโดยด่าง (alkali) ของ MP เท่ากับ 4.3 ซึ่งสูงกว่าพาราไธออน ครึ่งชีวิต (half-life) ของ MP ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเอทานอล ซึ่งมีพีเอชเท่ากับ 6.0 และในสารละลายบัฟเฟอร์ (1:4) มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 8.4 ชั่วโมง

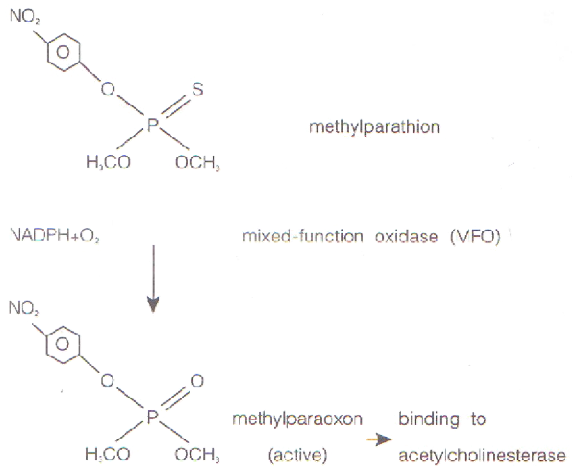
จากการศึกษาของ Douglas M. Munnecke (1974) พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้จากแบคทีเรียทำให้เกิดการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำได้อย่างรวดเร็วกว่าการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำด้วยสารเคมี โดยที่ครึ่งชีวิตของสารละลายสูตรผสมเจือจางของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ อยู่ในช่วง 27-80 ชั่วโมง และการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวไม่ถูกขัดขวางโดยผงซักฟอกและองค์ประกอบตัวทำละลายที่เป็นสูตรผสมทางการค้า

2.5.4 การกลายเป็นไอ (Evaporation)

การกลายเป็นไอจากพื้นผิวดินของ MP ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของ MP ในดินและอัตราการเคลื่อนย้ายอากาศเหนือผิวดิน ดัชนีการกลายเป็นไอเท่ากับ 4 หรืออัตราการกลายเป็นไอเท่ากับ 7-14 กิโลกรัมต่อพื้นที่ 1 เฮคตาร์ต่อปี

2.5.5 การเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ (Oxidation)

การเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ เป็นการลดกำมะถันที่รวมตัวอยู่ใน MP โดยลำพังแล้ว MP ไม่สามารถกระตุ้นฤทธิ์ (active) ได้ ต้องอาศัยการกระตุ้นฤทธิ์จากระบบเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ (mixed-function oxidases; MFO) ซึ่งปรากฏในร่างกายของแมลง สัตว์ทดลอง และคน ระบบเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ใน microsome และต้องอาศัย NADPH และ $O_2$ ในการทำงานด้วย ดังภาพต่อไปนี้




ภาพที่ 12 การกระตุ้น (activation) ของ MP ให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
ที่มา: พรพิมล เจริญส่ง, 2533

**2.6 การแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม (Environmental Exposure)**

การกระจายของ MP ในอากาศ น้ำ ดิน และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม มักเกิดขึ้นจากปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ การแพร่กระจายของ MP ในอากาศส่วนใหญ่เกิดจากการฉีดพ่น ทำให้ละอองฟุ้งกระจาย และการระเหยของน้ำจากใบไม้และผิวดิน พบว่าระดับ MP ในชั้นบรรยากาศบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรมีค่าสูงสุดประมาณ 70 นาโนกรัมต่อตารางเมตร และลดลงสู่ระดับปกติเมื่อผ่านไป 9 วัน

จากการศึกษาระดับ MP ในดิน พบว่า MP สามารถคงสภาพในดินได้นานกว่าในอากาศหรือในน้ำ โดยระยะเวลาที่อยู่ในดินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของดิน เช่น MP ในดินทรายจะสลายได้เร็วกว่าในดินเหนียว การย่อยสลาย MP ในสัตว์และการขับถ่ายของเสียเกิดขึ้นภายในเวลาสั้นๆ อย่างไรก็ตาม กระบวนการเหล่านี้จะเกิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกได้รวดเร็วกว่าสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

แนวทางการย่อยสลาย MP ในสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุด คือ การย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้ โดยมีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้

| **Compound** | **microorganism** |
|---|---|
| Parathion | *Bacillus*<br>*Arthrobacter*<br>*Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Pseudomonas* sp. ATCC 29353<br>*Pseudomonas* spp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Pseudomonas* strain CTP-01<br>*Pseudomonas diminuta* MG<br>*Pseudomonas* sp. strain SC |
| Methyl parathion | *Pseudomonas* sp.<br>*Pseudomonas* sp. isolate 50541<br>*Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Plesiomonas* sp. M6<br>*Burkholderia cepacia*<br>*Aufwuchs* |
| *p*-Nitrophenol | *Flavobacterium* sp.<br>*Pseudomonas* spp. PNP-1, 2, and 3<br>*Pseudomonas* sp. isolate 50445<br>*Moraxella* sp.<br>*Pseudomonas* strain 24 |

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chaudhry, 1994

ตารางที่ 5 (ต่อ) ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้

| **Compound** | **microorganism** |
|---|---|
| Diazinon | *Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Pseudomonas* sp. ATCC 29353<br>*Pseudomonas* spp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Arthrobacter* sp. SB3 and SB4 |
| Isofenphos | *Arthrobacter* sp.<br>*Pseudomonas* sp. |
| Fenetrothion | *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 |
| Dichlorovos | *Pseudomonas aeruginosa* sp.<br>*Pseudomonas* sp. |
| Coumaphos | Isolates B-1, B-2, and B-3 |
| Mathidathion | *Bacillus coagulans* |

**2.7 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม (Effects on Organisms in the Environment)**

ยาฆ่าแมลง MP เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ที่ใช้ป้องกันและกำจัดแมลงซึ่งเกษตรกรนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยในปี พ.ศ. 2536 มีสถิติการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยสูงเป็นอันดับที่ 3 ของสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มเดียวกัน คิดเป็นปริมาณที่นำเข้า 1,117 ตัน หรือเป็นมูลค่ากว่า 70 ล้านบาท จากการที่มีการใช้ MP อย่างแพร่หลายเป็นเหตุให้ตรวจพบการปนเปื้อนและตกค้างอยู่ในผลิตผลทางการเกษตร เช่น พืช ผัก และผลไม้ชนิดต่างๆ รวมทั้งแหล่งในพื้นที่เพาะปลูก แหล่งน้ำธรรมชาติ และดินเกษตรกรรมอยู่เสมอ (กรมวิชาการเกษตร, 2537)

สำหรับผลกระทบของ MP ต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำพบว่า ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำ มีค่าความเป็นพิษของ MP ในรูปของค่า $LC_{50}$ (Lethal Concentration; ความเข้มข้นของสารที่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ศึกษาลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในช่วงน้อยกว่า 1-40 ไมโครกรัมต่อลิตร สัตว์จำพวกหอยมีค่า $LC_{50}$ อยู่ในช่วง 12-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาทะเลและปลาน้ำจืดส่วนใหญ่ มีค่า $LC_{50}$ อยู่ในช่วง 6-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการฉีดพ่น MP ใกล้แหล่งน้ำ เช่น หนอง

น้ำ แม่น้ำ และทะเลสาบ ในสภาวะที่มีลมแรงสำหรับผลกระทบของ MP ต่อสัตว์ปีก มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า MP มีค่าความเป็นพิษต่อนกในรูปของค่า $LD_{50}$ (Lethal Dose; ปริมาณสารพิษที่ใช้ต่อน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตที่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ศึกษาลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ทางปากอยู่ในช่วง 3-8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว สำหรับประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้ศึกษาสารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างผักและผลไม้ในท้องที่จังหวัดต่างๆ เช่น นครปฐม อ่างทอง นนทบุรี ปทุมธานี และชลบุรี เป็นต้น มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารตกค้างในผลิตผลเหล่านั้นพบว่า ตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมดมีสารพิษตกค้างของยาฆ่าแมลงปนเปื้อนอยู่ประมาณร้อยละ 75 ของตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่าในตัวอย่างส้มที่นำมาวิเคราะห์ร้อยละ 12.8 ของตัวอย่างทั้งหมด มีปริมาณ MP เกินค่าความปลอดภัยที่กำหนดไว้ (0.2 ppm) ร้อยละ 1.4 ของตัวอย่างทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2538)

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างของผักและผลไม้ที่ตรวจพบสารพิษตกค้าง

| **Commodity** | **No. of samples analysed** | **Samples found** | |
|---|---|---|---|
| | | **No.** | **(%)** |
| Grape | 156 | 139 | 89.1 |
| Tangerine | 70 | 51 | 72.8 |
| Brassica | 15 | 5 | 33.3 |
| Cabbage | 123 | 51 | 41.5 |
| Cauliflower | 12 | 4 | 33.3 |
| Corn, baby | 26 | 5 | 19.2 |
| Cowpea | 30 | 8 | 26.7 |
| Cucumber | 20 | 8 | 40 |
| Ipomoea (morning glory) | 16 | 5 | 31.2 |
| Kale | 76 | 40 | 52.6 |
| Mushroom | 21 | 3 | 14.3 |
| Tomato | 26 | 6 | 23.1 |

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2538

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในผักและผลไม้

| **Commodity (No. of samples analyzed)** | **Pesticide** | **Range of residue (ppm)** | **Total found** | **Total violations** | **Codex MRL (ppm)** |
|---|---|---|---|---|---|
| Grape (156) | captan | <0.01-1.91 | 47 | | |
| | dimethoate | 0.01-0.07 | 26 | | |
| | methomyl | 0.01-1.07 | 29 | | |
| | monocrotophos | 0.02-1.58 | 117 | 40 | 0.2 |
| Tangerine (70) | dimethoate | 0.01-1.31 | 33 | | |
| | malathion | 0.03-1.07 | 10 | | 4 |
| | monocrotophos | 0.01-1.72 | | 7 | 0.2 |
| | Parathion-methyl | 0.01-0.99 | 9 | 1 | 0.2 |

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2538

จากรายงานการวิจัยในแง่ต่างๆ ของ MP จะเห็นได้ว่า MP เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษสูง สามารถซึมผ่านปาก ผิวหนัง และการหายใจ หากได้รับในปริมาณมากอาจทำให้เสียชีวิตได้ โดยในประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปได้มีการประกาศห้ามใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้ในพื้นที่การเกษตรแล้ว ประเทศไทยซึ่งมีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้มาเป็นระยะเวลานานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2490 จึงเกิดความตระหนักถึงอันตรายจากความเป็นพิษของ MP โดยในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยได้ประกาศห้ามใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้ในพื้นที่เกษตรกรรม โดยประกาศเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ที่ห้ามมิให้มีการผลิต การนำเข้า การส่งออก หรือการมีไว้ในครอบครอง ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2547 แล้ว ดังแสดงในตารางที่ 8 แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังขาดความเข้มงวด และไม่มีการตรวจสอบติดตามการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งขาดแผนการที่ชัดเจนและเพียงพอในการควบคุมการตลาด และการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชทั้งในระดับชาติและระดับท้องถิ่น ดังนั้นการจำหน่ายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยจึงไม่มีการควบคุมที่ชัดเจนแต่อย่างใด จึงทำให้ยังมีการจำหน่ายและใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายแม้จะถูกขึ้นบัญชีเป็นวัตถุอันตรายแล้วก็ตาม โดยจะเห็นได้จากรายงานการตรวจสอบสารพิษตกค้างในตัวอย่างพืชแปลงของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 5 กรมวิชาการเกษตร ในเขตจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี

ราชบุรี เพชรบุรี นครปฐม สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงกันยายน พ.ศ. 2551 พบว่ายังมีการตรวจพบ MP ตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตรอยู่ (สุนีย์ นิเทศพัตรพงศ์, 2552) ซึ่งจากการใช้สารเคมีชนิดนี้อย่างต่อเนื่องของเกษตรกรจึงก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในแหล่งดิน แหล่งน้ำ และในผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งจะส่งผลกระทบโดยก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการตรวจพบสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ได้ห้ามใช้ในประเทศ หรือห้ามใช้ในพืชบางชนิดในผักส่งออกจากประเทศไทย ส่งผลให้คุณภาพของสินค้าเกษตรส่งออกที่มีคุณภาพต่ำจากการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในการเกษตรทำให้สินค้าที่ได้ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดในการส่งสินค้าเกษตรไปยังประเทศต่างๆ ตามมาตรฐานของประเทศคู่ค้านั้นๆ โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556 ในการควบคุมพืชที่จะส่งออกไปนอกราชอาณาจักรไทยจะต้องผ่านการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารในกลุ่ม OP โดยเฉพาะยาฆ่าแมลง MP ถูกจัดเป็นสารเคมีที่ประเทศคู่ค้าในหลายประเทศไม่อนุญาตให้ใช้ ด้วยเหตุนี้เองประเทศไทยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาหาวิธีย่อยสลายและลดการปนเปื้อน รวมทั้งวิธีการตรวจสอบยาฆ่าแมลง MP ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีการย่อยสลายยาฆ่าแมลงด้วยจุลินทรีย์จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ราคาถูกที่สุด และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Munnecke และคณะ, 1974) ดังนั้นในการศึกษาการโคลนและการแสดงออกเอนไซม์ของยีนที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP และยาฆ่าแมลงชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม OP ในเชื้อจุลินทรีย์ที่หลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการผลิตและการนำเอนไซม์ไปใช้ จึงเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการตรวจวัด ลดหรือกำจัดสารพิษจากยาฆ่าแมลงในสิ่งแวดล้อม และผลผลิตทางการเกษตรต่อไป

ตารางที่ 8 วัตถุอันตรายที่ห้ามใช้ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2547 มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 19 ตุลาคม 2547 จำนวน 2 ชนิด

| ลำดับที่ | ชื่อวัตถุอันตราย | ประเภทการใช้ | เดือน ปี ที่ห้าม | เหตุผล |
|---|---|---|---|---|
| 1 | parathion methyl | สารกำจัดแมลง | ตุลาคม 2547 | - มีพิษเฉียบพลันสูง<br>- ประเทศที่พัฒนาแล้วบางประเทศห้ามใช้แล้ว |
| 2 | endosulfan (ยกเว้น CS formulation) | สารกำจัดแมลง | ตุลาคม 2547 | - เป็นพิษต่อปลาและสัตว์น้ำต่างๆ สูงมาก มีการนำไปใช้ผิดวัตถุประสงค์จากที่ขึ้นทะเบียนไว้ โดยนำไปใช้กำจัดหอยเชอรี่ในนาข้าวทำให้ปลาและสัตว์น้ำตาย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะเมื่อมีการรั่วไหลออกจากนาข้าว |

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2547

ตารางที่ 9 รายชื่อชนิดพืช ประเทศ และเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556

| ชนิดพืช | ประเทศ | เชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย |
|---|---|---|
| ทุเรียน ลำไย ลิ้นจี่ มังคุด ส้มโอ้ มะม่วง ขิง ถั่วฝักยาว คะน้า กวางตุ้ง พริก หน่อไม้ฝรั่ง ผักชีไทย มะเขือ กระเจี๊ยบเขียว<br>เฉพาะที่เป็นพืชผักสดและผลไม้สด | สหภาพยุโรป<br>นอร์เวย์<br>สมาพันธรัฐสวิส | กลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates) :<br>ไดคลอร์วอส (dichlorvos,DDVP),<br>เมทามิโดฟอส (methamidophos),<br>ไดอะซินนอน (diazinon),<br>คอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos),<br>พิริมิฟอสเอทิล (pirimiphos ethyl),<br>พิริมิฟอส-เมทิล (pirimiphos-methyl),<br>พาราไทออน (parathion),<br>พาราไทออนเมทิล (parathion methyl),<br>เมวินฟอส (mevinphos),<br>มาลาไทออน (malathion),<br>โพรฟีโนฟอส (profenofos),<br>โพรไทโอฟอส (prothiophos),<br>โมโนโครโทฟอส (monocrotophos),<br>ไดเมโทเอต (dimethoate),<br>โอเมโทเอต (omethoate),<br>ไดโครโทฟอส (dicrotophos),<br>โฟซาโลน (phosalone),<br>ไตรอะโซฟอส (triazophos),<br>เฟนิโทรไทออน (fenitrothion),<br>เมทิดาไทออน (methidathion),<br>อีไทออน (ethion),<br>อีพีเอ็น (EPN) และ อะซินฟอส- เอทิล ( azinphos-ethyl)<br>กลุ่มไพเรทรอยด์ (Pyrethroids) :<br>เพอร์เมทริน (permethrin),<br>ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin),<br>ไซฮาโลทริน (cyhalothrin),<br>เฟนวาเลอเรต (fenvalerate),<br>ไซฟลูทริน(cyfluthrin) และ เดลทาเมทริน (deltamethrin)<br>กลุ่มอื่นๆ :<br>เอ็นโดซัลแฟน (Endosulfan)<br>คาร์บาเมต (Carbamate)<br>โพรพิโคนาโซล (Propiconazole) เฉพาะมะม่วง (ญี่ปุ่น) |
| ทุเรียน ลำไย ลิ้นจี่ มังคุด ส้มโอ้ มะม่วง ขิง ถั่วฝักยาว คะน้า กวางตุ้ง พริก หน่อไม้ฝรั่ง ผักชีไทย กระเจี๊ยบเขียว<br>เฉพาะที่เป็นพืชผักสดและผลไม้สด | สิงคโปร์ | |
| ทุเรียน ลำไย ลิ้นจี่ มังคุด ส้มโอ้ มะม่วง ขิง ถั่วฝักยาว คะน้า กวางตุ้ง พริก หน่อไม้ฝรั่ง ผักชีไทย กระเจี๊ยบเขียว ขึ้นฉ่าย ผักชีฝรั่ง ผักชีลาว โหระพา กะเพรา ผักคะแยง ยี่หร่า แมงลัก สะระแหน่ ผักแพรว ใบบัวบก ถั่วลันเตา กะหล่ำปลี ส้มป่อย ชะอม ใบมะกรูด ผักกระเฉด ตะไคร้ ผักเป็ด<br>เฉพาะที่เป็นพืชผักสดและผลไม้สด | ญี่ปุ่น | |

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2556

ตารางที่ 9 (ต่อ) รายชื่อชนิดพืช ประเทศ และเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556

| ชนิดพืช | ประเทศ | เชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งอื่นใดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย |
|---|---|---|
| พริก ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง กะเพรา โหระพา สะระแหน่ ขึ้นฉ่าย ผักคะแยง ผักแพรว ต้นหอม กุยช่าย ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขม ผักปลัง เฉพาะที่เป็นพืชผักสดและผลไม้สด | สหภาพยุโรป<br>นอร์เวย์<br>ไอซ์แลนด์ | เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)<br>ซัลโมเนลลา สปีชีส์ (*Salmonella* spp.) |
| ลำไยสด | สาธารณรัฐประชาชนจีน | ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ($SO_2$) |
| เมล็ดแมงลัก ลูกเดือย พริกแห้ง | ญี่ปุ่น | อะฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) |

**3. เชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP (Keprasertsup และคณะ, 2001)**

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่ได้มีการวิจัยก่อนหน้านี้เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน โคโลนีมีลักษณะสีขาว ทึบแสง ขนาดเล็ก ต้องการอากาศในการเจริญ เติบโต (aerobic bacteria) และให้ผลบวกกับปฏิกิริยาออกซิเดสและคะตาเลส (oxidase-positive และ catalase-positive)

เชื้อแบคทีเรียตัวนี้แยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรมในเขตตลิ่งชัน บางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง (26±2 องศาเซลเซียส) และมีคุณสมบัติในการย่อยสลายและสามารถใช้ยาฆ่าแมลง MP เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต โดยเชื้อแบคทีเรียตัวนี้จะย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP เป็น PNP นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย PNP ต่อไปได้อีกด้วย

การเลี้ยงเชื้อจะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็น (Basal Mineral Medium; BMM) ที่มี MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้หมดภายในเวลา 12-18 ชั่วโมง สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนจากสีเขียวปนเหลืองเป็นสีขาวขุ่น โดยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลาย MP เป็น membrane bound และมีการ

แสดงออกแบบเหนี่ยวนำ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียตัวนี้ยังสามารถย่อยสลายมาลาไธออน และไดเมโธเอท ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ได้อีกด้วยเนื่องจากเชื้อตัวนี้สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาฆ่าแมลงเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และคณะ, 2543)

**4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

ซึ่งในปี ค.ศ. 1996 มีรายงานการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน organophosphorus acid anhydrolase (*opa* A) ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. JD 6.5 ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบประเภท OP แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *opa* A กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน organophosphate-degrading (*opd*) ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas diminuta* MG และเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองไม่มี homology กัน (Cheng และคณะ, 1996) ต่อมามีรายงานว่ายีน *opd* A ของเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium radiobactor* P230 ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงประเภท OP มีลำดับนิวคลีโอ-ไทด์คล้ายกับยีน *opd* ของเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta* MG (*Pseudomonas diminuta* MG) และเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 แต่เอนไซม์ Opd A ที่ถูก encode จากยีน *opd* A สามารถไฮไดรไลซ์ยาฆ่าแมลงประเภท OP ได้หลายชนิดกว่าเอนไซม์ OPH ที่ถูก encode จากยีน *opd* (Horne และคณะ, 2002)

ปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการโคลนยีน *phn* E และ *glp* T ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่าน (transport) ยาฆ่าแมลงไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropyl fluorophosphate) ของเชื้อ *Eschericia coli* K-12 โดยพบว่ายีนทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้เชื้อ *Eschericia coli* K-12 สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟตได้ดีขึ้น (Elashvili และคณะ, 1998) และยีน *phn* ของเชื้อ *Burkholderia* sp. RP007 ที่สามารถย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากยีนอื่นที่สามารถย่อยสลาย PAH ได้ (Laurie และ Jones, 1999)

ปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. A3 จากดินซึ่งพบว่า *Pseudomonas* sp. A3 สามารถย่อยสลาย methyl parathion, malathion, monocrotophos และ diazinon ซึ่ง *Pseudomonas* sp. A3 จะเปลี่ยน methyl parathion ไปเป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Ramanathan และ Lalithakumari, 1999)

ปี ค.ศ. 2001 มีรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งเกษตรกรรมในประเทศไทยโดยการนำดินจากการเกษตรไปเลี้ยงใน basal mineral medium (BMM) ที่มีกลูโคสและไม่มีกลูโคส และอาหารทั้งสองชนิดจะมี MP เป็นส่วนประกอบ จากการทดลองสามารถคัดแยก *Burkholderia cepacia* ออกมาจาก mixed culture ใน BMM ที่ไม่มีกลูโคส และพบว่า *Burkholderia cepacia* เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย MP ได้ดี และเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญในอาหาร BMM ที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-8 และความเข้มข้นของเกลือ 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดลองเพิ่มกลูโคสลงในอาหารพบว่าการเพิ่มกลูโคสไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการย่อย MP (Keprasertsup และคณะ, 2001)

ในปี ค.ศ. 2002 มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียชนิดหนึ่งออกจากดินสกปรกรอบๆ โรงงานผลิตยาฆ่าแมลง โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลาย MP ได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าอยู่ในจำพวก *Pseudomonas* sp. WBC-3 แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการต้านทานความเข้มข้นของ MP สูงถึง 800 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารพื้นฐานและสามารถเพิ่มความต้านทานได้ถึง 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ glucose และนอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่มของ OP และสารประกอบ aromatic (Chen และคณะ, 2002)

ปี ค.ศ. 2003 มีรายงานการศึกษาส่วนของพลาสมิด pPDL2 จากเชื้อ *Flavobacterium* sp. และพลาสมิด pCMS1 จากเชื้อ *Pseudomonas diminuta* ซึ่งทั้งสองพลาสมิดมีส่วนที่มีขนาด 5.1 kb ซึ่งมียีน *opd* โดยพบว่าพลาสมิด pPDl2 นั้นมียีน *opd* อยู่ระหว่าง ISFlsp*1* และ Tn-3 และมี open reading frame (orf243) ซึ่ง code ให้โพลีเปปไทด์ขนาด 27 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถย่อยสลาย PNP (Siddavattam และคณะ, 2003)

ปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการศึกษาการแสดงออก การแยกบริสุทธิ์ และการหาคุณลักษณะของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (methyl parathion-degrading; *mpd* gene) โดยการทำ PCR และแสดงออกใน *E. coli* ในรูปแบบของฟิวชั่นโปรตีน (hexa - His C - terminal fusion protein) และแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ metal - affinity chromatography column ซึ่งจากการศึกษา enzyme activity และ zymogram ของเอนไซม์ที่แยกได้พบว่า เอนไซม์ที่อยู่ในรูปที่แอคทีฟ (active form) เกิดจาก precursor protein ที่มีขนาดใหญ่กว่าโดยการตัด signal peptide ในบริเวณ N-terminal ของสายโปรตีนออกไปและผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ MPH เป็นโมโน-เมอร์ (Fu และคณะ, 2004)

ปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการศึกษาการพัฒนาการแสดงออกของยีน *mpd* ใน *E. coli* โดยทำการโคลนยีนไว้ภายใต้การควบคุมของ P43 promoter และเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal peptide ของ *Bacillus subtilis* (*nprB* gene) จากการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับสูงและมีการ

หลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์โดยเอนไซม์ที่ได้มีความสามารถในการย่อยสลาย MP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhang และคณะ, 2005)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Burkholderia cepacia* ในประเทศไทยพบว่ามีรายงานการแยกเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP และ PNP จากดินที่ทำการเกษตรในประเทศไทย โดยพบว่าเชื้อตัวนี้สามารถใช้ MP เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต (Keprasertsup และคณะ, 2001) และในปีเดียวกันนี้ ได้มีการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากเชื้อตัวนี้ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลายด้าน N-terminus ได้ 40 amino acid residues (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ บุญศรี จงเสรีจิต , 2544)

ปี พ.ศ. 2547 มีรายงานการบ่งชี้และศึกษาลักษณะของยีน *mpdB* จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* โดยพบว่าเมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* ที่สมบูรณ์ตรวจหาได้จากการทำ PCR และส่วน ORF ที่สมบูรณ์ขนาด 996 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 331 ตัว ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ มีความเหมือนกับยีน *mpd* ของเชื้อ *Plesiomonas* sp. M6 คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเหมือนกับยีน organophosphate pesticide hydrolase ของ *Ochrobactrum* sp. Mp-3 คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างจากยีน *opd* ของเชื้อ *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่ายีน *mpdB* ที่ได้อยู่ในกลุ่มของยีน *mpd* ซึ่งมีความแตกต่างจากยีนในกลุ่ม *opd* (เสาวลักษณ์ วงค์เทียนหลาย, 2547)

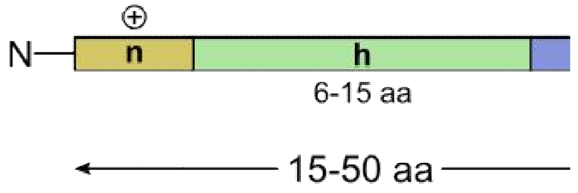
ปี พ.ศ. 2549 มีรายงานการบ่งชี้ การศึกษาลักษณะ และการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* โดยได้มีการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มี glutathione-S-transferase (GST) tag ซึ่งพบว่าสามารถแสดงออกเอนไซม์ MPH ได้สูง ในการทำบริสุทธิ์ฟิวส์ชันโปรตีน GST-MPH นั้นทำได้ยาก เนื่องจาก MPH ที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์โคลนส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องทำการละลายด้วย 8 โมลาร์ urea แล้วทำการ refold โปรตีนก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย GSTrapp FF affinity column พร้อมกับการตัด GST ออกจากเอนไซม์ จาก SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์ MPH ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูงและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตัน specific activity ของ MPH หลังทำให้บริสุทธิ์แล้วมีค่า 166.6 unit/mg protein ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความบริสุทธิ์ 6.1 เท่า (วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี, 2549)

ปี ค.ศ. 2012 มีรายงานการแยกบริสุทธิ์ และการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ MPH จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP โดยพบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่มีขนาด 35 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 8.5 โดยใช้วิธีทางโครมาโตกราฟฟี ซึ่งอาศัยขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์นี้ 3 ขั้นตอนโดยใช้คอลัมน์ Resource S, Sephadex G100 และ Octyl Sepharose 4FF ตามลำดับ และยังสามารถแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH ที่ผลิตได้จากรีคอมบิแนนท์โคลน *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGT1 (pGEX-4T-2::*mpdB*) โดยเอนไซม์ที่ได้จะอยู่ในรูปของ GST-MPH fusion protein ซึ่งทำให้ง่ายแก่การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยอาศัยเพียงขั้นตอนเดียวโดยใช้คอลัมน์ GSTPrep FF affinity column ซึ่งได้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ขนาด 35 กิโลดาลตัน เช่นกัน ค่า specific activity ของเอนไซม์ MPH บริสุทธิ์มีค่า 1,600 unit/mg protein ได้ผลผลิตในปริมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความบริสุทธิ์ 39 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* โดยอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.0 ตามลำดับ รวมทั้งเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และที่พีเอช 6-7 นาน 8-15 ชั่วโมง (Ekkhunnatham และคณะ, 2012)

การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายในเซลล์ *E. coli* มีปัญหาหลายประการเพราะถึงแม้ว่าแบคทีเรียแกรมลบจำพวก *E. coli* ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในอุตสาหกรรมต่างๆ ด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นของ *E. coli* เช่น *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว, ง่ายต่อการเพาะลี้ยง, สามารถเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์สูง และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมดภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม *E. coli* ทั้งสายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปจะไม่สามารถหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ (Choi และ Lee, 2004; Pines และ Inouye, 1999; Yamabhai และคณะ, 2008; Yoon และคณะ, 2010) นอกจากนั้นการ overexpression ของโปรตีนที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์นั้นมักพบอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากการผลิตโปรตีนในเซลล์เป็นจำนวนมาก จึงเกิดการรวมตัวกันของโปรตีนและตกตะกอนในลักษณะที่เรียกว่า inclusion body ซึ่งในการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจึงต้องใช้วิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อน เสียค่าใช้จ่ายในการ denaturation และกระบวนการ refold โปรตีนก่อนการทำบริสุทธิ์ จึงทำให้ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มีปริมาณที่ต่ำ (Suppaluknaree และคณะ, 2007; Yoon และคณะ, 2010) ดังนั้นวิธีการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของ *E. coli* จึงมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น การแยกและการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถทำได้ง่าย เนื่องจากการหลั่งของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

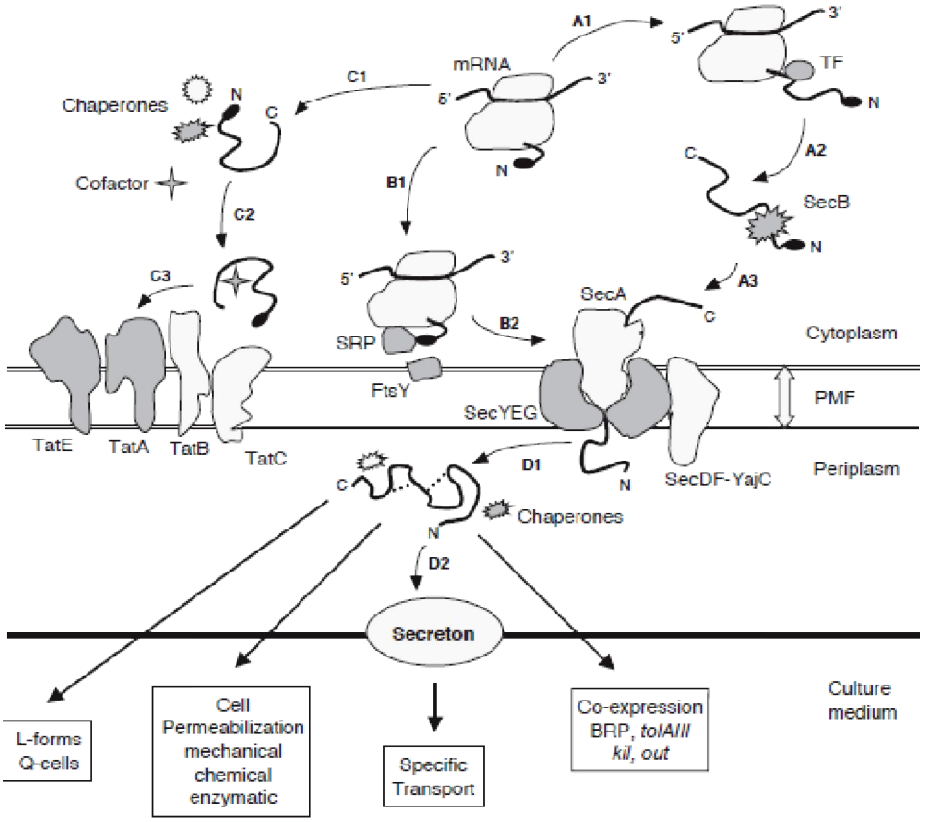
ออกมานอกเซลล์นั้น จะช่วยลดการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่อยู่ภายในเซลล์และลดการเกิด proteolytic degradation จาก protease ที่อยู่ภายในเซลล์ (Yoon และคณะ, 2010)

การหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจำพวก *E. coli* โปรตีนจะถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มชั้นใน (inner-membrane) ไปยัง periplasmic space และหลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อในที่สุด (Thanassi และ Hultgren, 2000) โดยระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของ *E. coli* มีหลายระบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ type I, type II, type III, type IV และ type V โดย type II เป็นระบบที่นิยมใช้โดยทั่วไป ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ 1. periplasmic translocation ซึ่งจะประกอบด้วย pathway หลัก 3 pathway ได้แก่ SecB-dependent pathway, signal recognition particle (SRP) และ twin-arginine translocation (TAT) pathway และ 2. extracellular transport เป็นการหลั่งออกนอกเซลล์ของ periplasmic protein ซึ่งจะอาศัยการทำงานของ secreton ที่ประกอบด้วยโปรตีน 12-16 โมเลกุล (Mergulhao และคณะ, 2005) โดย Sec-dependent pathway ได้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จในการหลั่งโปรตีนชนิดต่างๆ ออกสู่ periplasmic space หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ (Kang และคณะ, 2006; Songsiriritthigul และคณะ, 2010; Yamabhai และคณะ, 2008) ซึ่งโปรตีนที่หลั่งผ่าน Sec-dependent pathway จะประกอบด้วย amino-terminal signal peptide ที่มีขนาดประมาณ 15–50 amino acid ทำหน้าที่เป็น recognition signal ซึ่ง signal sequence โดยทั่วไปจะประกอบด้วย positively charged amino terminus (n-region) ที่มีความยาวประมาณ 2-10 amino acid, central hydrophobic core (h-region) ที่มีความยาวประมาณ 6–15 amino acid และ polar cleavage region (c-region) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกจดจำโดย signal peptidase ดังแสดงในภาพที่ 13 โดย signal sequence ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้หลั่งออกนอกเซลล์โดยอาศัย Sec-dependent pathway ใน *E. coli* ได้แก่ outer membrane protein A (*Omp*A), pectate lysate from *Erwinia carotovora* (PelB), alkaline phosphatase (PhoA), endoxylanase from *Bacillus* sp. (Enx) และ heat-stable enterotoxin II (SthII) เป็นต้น (Choi และ Lee, 2004; Mergulhao และคณะ, 2005)




ภาพที่ 13 องค์ประกอบของ signal peptide sequence ซึ่งประกอบด้วย N- H- และ C-domain
ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Signal_sequence.svg?uselang=de

โดยกระบวนการหลั่งโปรตีนจะอาศัยการจับกันระหว่าง cytosolic chaperone SecB กับ unfold preprotein ที่มี N-terminal signal peptide และนำโปรตีนเคลื่อนผ่าน inner membrane-bound SecA เมื่อ preprotein ถูกส่งไปยัง inner-membrane ผ่านทาง SecYEG โดยอาศัยพลังงานจาก ATP hydrolysis และ proton-motive force (PMF) ซึ่งในขั้นตอนนี้ signal peptide จะถูกกำจัดออกโดย signal peptidase ส่วนการหลั่งของโปรตีนออกมานอกเซลล์จะเกิดจากการรั่วของโปรตีนจาก periplasmic space เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยการทำงานของ secreton หรือเป็นผลมาจากการเพิ่ม permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ ในช่วงระยะเวลาระหว่างการเหนี่ยวนำด้วยตัวเหนี่ยวนำ (inducer) โปรตีนที่มีขนาดเล็กที่หลั่งเข้าสู่ periplasmic space จะสามารถหลั่งเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (Choi และ Lee, 2004; Mergulhao และคณะ, 2005; Yamabhai และคณะ, 2008) แสดงดังภาพที่ 14




ภาพที่ 14 recombinant protein ที่หลั่งออกนอกเซลล์โดยอาศัย type II mechanism และวิธีการในการหลั่ง recombinant proteins ออกจาก periplasmic space
ที่มา: Mergulhao และคณะ, 2005

ซึ่งในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์ OPH ออกสู่ periplasmic space ใน *E. coli* โดยอาศัย twin-arginine signal sequence โดยใช้ twin-arginine translocation (Tat) pathway พบว่าประสบความสำเร็จในการใช้ Tat pathway สำหรับการหลั่งเอนไซม์ OPH ออกสู่ periplasmic space และเมื่อทำการแยก (isolate) และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ OPH ในส่วนของ periplasmic fraction พบกิจกรรมของเอนไซม์ OPH ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ OPH ที่ผลิตภายในเซลล์ ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์เพียง 1.7 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตใน periplasmic fraction แสดงให้เห็นว่ามีการหลั่ง OPH ออกสู่ periplasmic space ได้ (Kang และคณะ, 2005)

ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์ OPH ออกสู่ periplasmic space ใน *E. coli* โดยอาศัย pelB signal sequence โดยใช้ secretory (sec) pathway พบว่าประสบความสำเร็จในการแสดงออกของเอนไซม์ OPH ให้หลั่งเข้าสู่ periplasmic space และเมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนของ periplasmic fraction พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ OPH มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พบใน periplasmic space ประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์ใน total cell lysate (Kang และคณะ, 2006)

ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการ cotranslocation ของเอนไซม์ MPH และ OPH ใน periplasmic space และผิวเซลล์ใน *E. coli* โดยใช้ twin-arginine translocation (Tat) pathway และ ice nucleation protein (INP) display system ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง MPH และ OPH ให้หลั่งออกมายัง periplasmic space และผิวเซลล์ ตามลำดับ โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ periplasmic fraction และ outer membrane fraction มีค่าประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์ใน cell lysate ตามลำดับ (Yang และคณะ, 2010)

และจากงานวิจัยที่ผ่านมานั้นยังไม่มีการผลิตเอนไซม์ MPH ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยใช้ *Omp*A signal sequence ผ่านทาง SecB-dependent pathway ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีน *mpd*B เพื่อผลิตเอนไซม์ MPH โดยใช้ พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ประกอบด้วย *Omp*A signal sequence ซึ่งออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน ซึ่งหากงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ก็จะเป็นการเพิ่มช่องทางในการผลิตเอนไซม์ MPH ที่ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ มีการละลาย (solubility) ที่ดี และยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

**1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย**

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเชื้อ BpGP คือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอม-บิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีน *mpdB* จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร (วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี, 2549) และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.มณฑารพ ยมาภัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและทำการแสดงออกของยีน *mpdB* ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด และทำการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ MPH

| แบคทีเรีย | จีโนไทป์ | แหล่งที่มา |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α | $F^-$ *lend* A1 *hsd* R17 ($r^-_k m^+_k$) *supE44 thi-1 rec*A1 *gyr* A ($Nal^r$) relA1 Δ(*lac*IZYA-*arg*F ) U169*deo*R (ϕ*80dlac*Δ(*lac*Z)M15) | Ausubel, 1997 |
| *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) | $F^-$ *omp*T *gal dcm lon hsd*$S_B$($r_B^-$ $m_B^-$) λ(DE3 [*lacI lac*UV5-T7 gene 1 *ind*1 *sam*7 *nin*5]) | Invitrogen, USA |

**2. ดีเอ็นเอพาหะ (vector) ที่ใช้ในการวิจัย**

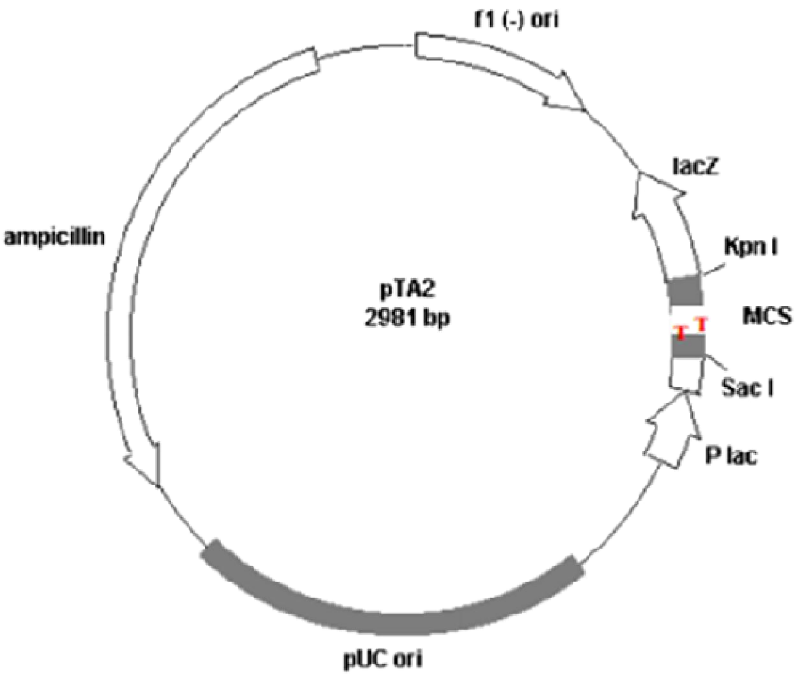
**2.1 พลาสมิด pTA2 (Toyobo, Japan)**

พลาสมิด pTA2 (Toyobo, Japan) เป็นดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการโคลนในระบบ TA cloning ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งจะมีการเติมดีออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟส (dATP) ที่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ จะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีปลาย overhang dA ที่ปลาย 3' จึงทำให้ง่ายต่อการเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pTA2 ที่มีปลาย overhang dT ที่ปลาย 5' ตรงบริเวณ multiple cloning site (MCS) นอกจากนี้พลาสมิด pTA2 ยังมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin resistance gene) และยีน *lacZ* ที่ทำหน้าที่เป็น positive selective gene ทำให้สามารถคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยเทคนิค blue-white selection ได้ และยังมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI คร่อมระหว่างตำแหน่งของ insert ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของ insert ด้วยวิธี restriction analysis ได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16

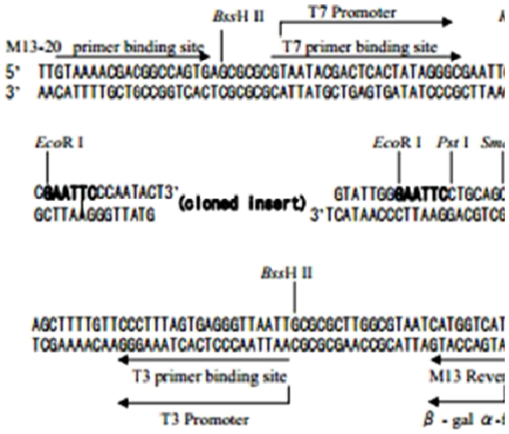
**2.2 พลาสมิด pHisFlag-1**

พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.มณฑารพ ยมาภัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งดัดแปลงมาจากพลาสมิด pFLAG-CTS โดยได้มีการเติมยีนที่สร้าง polyhistidine-tag protein ทางด้าน downstream ของ multiple cloning site (MCS) ทำให้เกิด fusion protein จากการแสดงออกของยีนที่โคลนเข้าสู่ MCS ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการแยกโปรตีนที่แสดงออกจากยีนที่ต้องการในกระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน ส่วนทางด้าน upstream ของ MCS จะเชื่อมต่ออยู่กับ outer membrane protein A (*Omp*A) signal sequence ที่สร้าง *Omp*A signal peptide ขนาด 21 amino acid ซึ่งจะช่วยนำ fusion protein ให้หลั่งออกนอกเซลล์ในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* ซึ่ง *Omp*A signal peptide นี้จะถูกตัดออกจาก fusion protein โดยเอนไซม์ signal peptidase ในระหว่างกระบวนการนำส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner-membrane) ไปยัง periplasmic space พลาสมิดนี้ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (promoter) ชนิด *tac* promoter ซึ่งโปรโมเตอร์นี้เกิดจากการรวมกันระหว่าง -35 consensus sequence ของ *trp* promoter และ -10 consensus sequence ของ *lac* promoter โดยควบคุมในส่วนของ *lac* operator, Shine-Dalgarno ribosome binding site, start codon (ATG) ซึ่งจะทำให้มีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงและสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-$\beta$-D-thiogalactopyranoside (IPTG) นอกจากนี้ภายในพลาสมิด pHisFlag-1 ยังประกอบด้วยยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker) ได้แก่ยีน $\beta$-lactamase ซึ่งเป็น

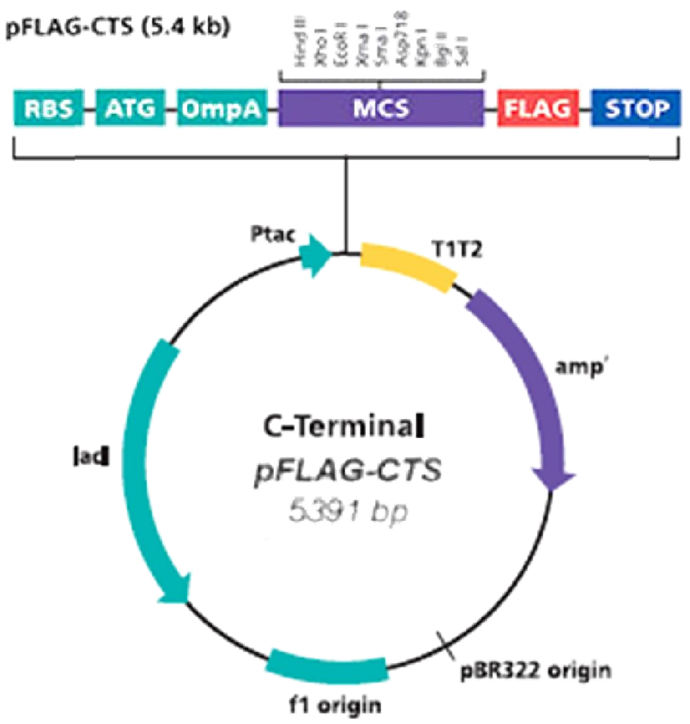
ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin resistance gene; *$amp^r$*) ที่จะผลิตเอนไซม์ $\beta$-lactamase ที่สามารถย่อยสลายยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้าน (*E. coli*) ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิดนี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 17, 18 และ 19




ภาพที่ 15 แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pTA2
ที่มา: http://www.toyobo.co.jp/e/bio




ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ multiple cloning site (MCS) ของดีเอ็นเอพาหะ pTA2
ที่มา: http://www.toyobo.co.jp/e/bio



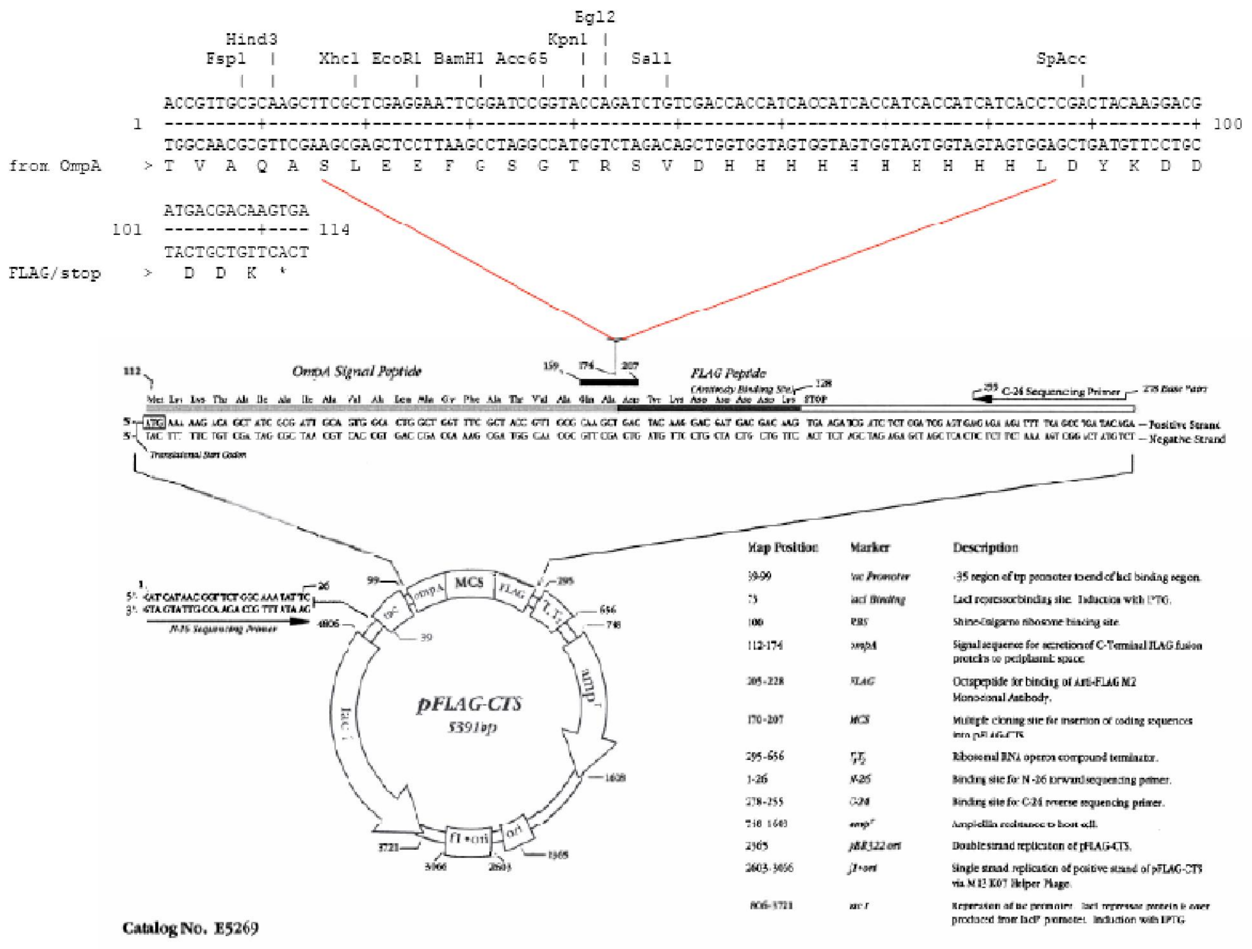

ภาพที่ 17 แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pFlag-CTS

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/cloning-and-expression/vector-systems/vector-maps.html

| Feature | Map Position |
|---|---|
| N-26 Sequencing Primer Binding Site | 1-26 |
| *tac* Promoter | 39-99 |
| *lacO* | 73-93 |
| Ribosomal Binding Site | 100-105 |
| *ompA* | 112-174 |
| MCS | 170-207 |
| FLAG tag | 205-228 |
| C-24 Sequencing Primer Binding Site | 255-278 |
| T1/T2 terminator | 286-656 |
| β-lactamase (amp$^r$) | 755-1612 |
| pBR322 ori | 1820-1939 |
| f1 ori | 2603-3066 |
| *lacI* | 3744-4826 |

ภาพที่ 18 ตำแหน่งของลักษณะพิเศษของดีเอ็นเอพาหะ pFlag-CTS

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/cloning-and-expression/feature-maps/pflag-cts.gif




**ภาพที่ 19** แผนภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pHisFlag-1

**3. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3') |
|---|---|
| *Xho*I-*mpd*_F | GATCTCGAG GCC GCA CCG CAG GTG CG |
| *Kpn*I-*mpd*_R | GATGGTACC CTT GGG GTT GAC GAC CGA G |

**4. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Standard DNA Marker)**

4.1 DNA ladder ขนาด 1 kb (Biolabs, UK)

4.2 DNA ladder ขนาด 1 kb (Fermentas, USA)

4.3 DNA ladder ขนาด 100 bp (Fermentas, USA)

**5. โปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein Marker)**

5.1 Protein Marker Broad Range 2- 212 kDa (Biolabs, UK)

5.2 Prestained SDS-PAGE Standards (BIO-RAD, USA)

**6. เอนไซม์ (Enzyme) ที่ใช้ในการวิจัย**

6.1 เอนไซม์ RNase A (Amresco, USA)

6.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ใช้ในงานวิจัย คือ *Eco*RI (Fermentas, USA), *Xho*I (New England Biolabs, USA) และ *Kpn*I (Toyobo, Japan)

6.3 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, USA)

6.4 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Biolabs, USA)

**7. ชุดทดสอบสำเร็จรูป**

7.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit (Omeka bio-tek, USA)

7.2 ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ TArget Clone™ (Toyobo, Japan)

7.3 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan)

7.4 ชุดตรวจวัดโปรตีน Bio-Rad Bradford protein assay (BIO-RAD, USA)

**8. คอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์**

8.1 HisPur™ Cobalt Chromatography Cartridges (Thermo Scientific, USA)

8.2 HisPur™ Cobalt Spin Column (Thermo Scientific, USA)

**9. สารเคมี**

| **ชื่อสารเคมี** | **บริษัทผู้ผลิต** |
|---|---|
| 9.1 absolute ethanol | Lab Scan, Thailand |
| 9.2 30% acrylamide | AppliChem, Germany |
| 9.3 agar | Scharlau, USA |
| 9.4 agarose | LAB M, UK |
| 9.5 ammonium persulfate (APS) | BIO BASIC INC., USA |
| 9.6 ammonium sulfate | QRëC, New Zealand |
| 9.7 ampicillin | Fluka, USA |
| 9.8 bovine serum albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, USA |
| 9.9 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-$\beta$-D-galactopyranoside (X-gal) | Promega, USA |
| 9.10 bromophenol blue | Fluka, USA |
| 9.11 calcium chloride | Merck, Germany |
| 9.12 chloroform | Merck, Germany |
| 9.13 coomassie brilliant blue R-250 | Fluka, UK |
| 9.14 dNTPs | Promega, USA |
| 9.15 ethanol | BHD Analar, USA |
| 9.16 ethidium bromide | Sigma, USA |
| 9.17 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) | Amresco, USA |
| 9.18 glacial acetic acid | Lab Scan, Thailand |
| 9.19 glucose | Fluka, USA |
| 9.20 glycerol | Amresco, USA |
| 9.21 glycine | Fluka, USA |
| 9.22 hydrocloric acid | Lab Scan, Thailand |
| 9.23 imidazole | Bio Basic, Canada |
| 9.24 isoamyl alcohol | Merck, Germany |

| ชื่อสารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| 9.25 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) | Amresco, USA |
| 9.26 magnesium sulfate | Merck, Germany |
| 9.27 mercaptoethanol | ACROS Organics, USA |
| 9.28 methanol | PROLABO, USA |
| 9.29 methyl parathion | Sigma-Aldrich, USA |
| 9.30 4-nitrophenol | Merck, Germany |
| 9.31 phenol:chloroform | Amresco, USA |
| 9.32 sodium acetate | Lab Scan, Thailand |
| 9.33 sodium bicarbonate | Lab Scan, Thailand |
| 9.34 sodium chloride | Fluka, USA |
| 9.35 sodium dodecyl sulfate (SDS) | Fluka, USA |
| 9.36 sodium phosphate | Riedel-de Haën, Germany |
| 9.37 sodium hydroxide | Akzo Nobel, Netherland |
| 9.38 sucrose | Fluka, USA |
| 9.39 N, N, N’, N’-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) | Fluka, USA |
| 9.40 tris-base | Sigma-Aldrich, USA |
| 9.41 99% triton X-100 | Amresco, USA |
| 9.42 tryptone | LAB M, UK |
| 9.43 tween 80 | Amresco, USA |
| 9.44 Xylene cyanal FF | Fluka, USA |
| 9.45 yeast extract | LAB M, UK |

**10. เครื่องมือ**

10.1 autoclave รุ่น Ss-325 (Tomy, Japan)

10.2 autoclave รุ่น sx-700 (Tomy, Japan)

10.3 biological safety cabinet class II type AIB3 (Nuaire, USA)

10.4 centrifuge รุ่น GS-15R centrifuge (Beckman, USA)

10.5 centrifuge รุ่น RC6 (Sorvall, USA)

10.6 centrifuge รุ่น MIKRO 120 (Hettich Zentrifugen, Germany)

10.7 centrifuge รุ่น Universal 12 (Hettich Zentrifugen, Germany)

10.8 deionizer pure UV ultrapure water system (Thermo Fisher Scientific, USA)

10.9 desicator No. 5311 (Nalgene Labware, USA)

10.10 fast protein liquid chromatography (FPLC) รุ่น ÄKTAFPLC (Amersham Pharmacia, Sweden)

10.11 gel document รุ่น Multi Genius (Syngene, UK)

10.12 geneamp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)

10.13 hot air oven Model ULM 500 (Memmert, Germany)

10.14 incubator shaker (Shel Lab, USA)

10.15 micro reader รุ่น Sunrise-Basic TECAN (TECAN, Switzerland)

10.16 mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD, USA)

10.17 mini SUB™ DNA CELL (BIO-RAD, USA)

10.18 power supply (power PAC 3000) (BIO-RAD, USA)

10.19 spectrophotometer รุ่น gensys 8 (Spectronic Instrument, UK)

10.20 sonicator (Vibra Cell, USA)

10.21 UV–transluminator (Fotodyne Incorporated, USA)

10.22 vortex (Scientific Industries, USA)

10.23 water bath (Scientific Promotion,Thailand)

10.24 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Classic C24 (New Brunswick Scientific, USA)

10.25 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)

10.26 เครื่องผลิตน้ำกลั่น รุ่น Maxima LS. Model (ELGA, UK)

10.27 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Schott, Germany)

**11. อุปกรณ์อื่นๆ**

11.1 aluminum foil

11.2 autopipette

11.3 beaker

11.4 biotech regenerated cellulose (RC) membrane (Spectrum Labs, USA)

11.5 centrifuge tube

11.6 cylinder

11.7 erlenmeyer flask

11.8 forcep

11.9 glass pipette

11.10 parafilm

11.12 loop

11.13 microplate

11.14 microtube

11.15 pastuer pipette

11.16 petridish

11.17 rack

11.18 spreader

11.19 syringe

11.20 syringe filter sterile ขนาด 0.45 micrometers (Corning, Germany)

11.21 vivaspin 6 และ 20 molecular weight cut off (MWCO) ขนาด 10 kDa (GE Healthcare, Sweden)

11.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

11.23 ถุงพลาสติก

11.24 สำลี

11.25 ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีน *mpdB* โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน

### 1.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *mpdB*

1.1.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP ด้วยวิธี rapid alkaline extraction (Sambrook และคณะ, 1989)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ BpGP (เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีน *mpdB*) ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี, 2549) มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์จนกระทั่งเซลล์หมด ล้างตะกอนเซลล์โดยการละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วทำให้เซลล์แตกโดยการเติม alkaline SDS ปริมาตรหลอดละ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบามือ ประมาณ 4-6 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบามือ ประมาณ 4-6 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการกำจัดโปรตีนและเศษเซลล์โดยการเติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบามือ ประมาณ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วทำการกำจัดสารละลาย phenol ส่วนเกินโดยการเติมสารละลาย chloroform:isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายชั้นบนที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบามือ ประมาณ 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทธานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 2 เท่าของสารละลายชั้นบนที่ได้ นำมาแช่เย็น

ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งด้วยเครื่องดูดความชื้นสุญญากาศ จากนั้นทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

1.1.2 การออกแบบไพรเมอร์ต่อยีน *mpdB*

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 หมายเลข accession number AF338729 ของ GenBank ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP (Zhongli และคณะ, 2001) ที่มี homology กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสมาจากลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminus ของเชื้อ *Burkholderia cepacia* ซึ่งมีผู้วิจัยไว้ก่อนหน้านี้ (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ บุญศรี จงเสรีจิต, 2544) โดยพิจารณาจาก open reading frame (ORF) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ MPH ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 723-1718 (Zhongli และคณะ, 2001) ซึ่งทำการออกแบบไพรเมอร์เฉพาะในส่วนของยีนที่ code ให้เอนไซม์ MPH (mature MPH) โดยไม่รวมกับ signal sequence เดิมของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 35 ตัว ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 723-827 (Fu และคณะ, 2004) รวมทั้งออกแบบให้ไม่มี stop codon (TGA) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1718 (Zhongli และคณะ, 2001; Fu และคณะ, 2004) เนื่องจากพลาสมิด pHisFlag-1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ทางด้าน upstream ของ multiple cloning site (MCS) จะมี *Omp*A signal sequence ที่ code ให้ *Omp*A signal peptide ทางด้าน N-terminus ของฟิวชั่นโปรตีน และทางด้าน downstream ของ MCS จะมี polyhistidine-tag (His-tag) sequence ที่ code ให้ His-tag ทางด้าน C-terminus (His C–terminal fusion protein) ของฟิวชั่นโปรตีน ดังนั้น การโคลนยีน *mpdB* ที่ไม่มี stop codon เข้าสู่ MCS ของพลาสมมิด pHisFlag-1 จะทำให้ได้เอนไซม์ MPH ที่ได้ ที่มี *Omp*A signal peptide ทางด้าน N-terminus และ His-tag ทางด้าน C-terminus ซึ่งจะทำให้ง่ายแก่การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH โดยใช้ metal – affinity chromatography column และออกแบบให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Xho*I ในส่วนของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) และ *Kpn*I ในส่วนของรีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) เพื่อใช้ในการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่ expression vector pHisFlag-1 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ออกแบบมาเพื่อการหลั่งโปรตีน โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ไพรเมอร์ *Xho*I-*mpd*_F มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5’ GATCTCGAG GCC GCA CCG CAG GTG CG 3’
ไพรเมอร์ *Kpn*I-*mpd*_R มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5’ GATGGTACC CTT GGG GTT GAC GAC CGA G 3’

โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Xho*I ในไพรเมอร์ *Xho*I-*mpd*_F และ *Kpn*I ในไพรเมอร์ *Kpn*I-*mpd*_R โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 หมายเลข accession number AF338729 ของ GenBank และตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบต่อยีน *mpdB* แสดงในภาพที่ 20

1.1.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

หลังจากทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีน *mpdB* นำมาทำการเพิ่มปริมาณยีน *mpdB* โดยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีองค์ประกอบดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| สารละลายบัฟเฟอร์ *Taq* ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ (10 เท่า) | ความเข้มข้น | 1 | เท่า |
| ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตผสม (dNTPs mix) | ความเข้มข้น | 0.2 | มิลลิโมลาร์ |
| ไพรเมอร์ *Xho*I-*mpd*_F | ความเข้มข้น | 0.5 | ไมโครโมลาร์ |
| ไพรเมอร์ *Kpn*I-*mpd*_R | ความเข้มข้น | 0.5 | ไมโครโมลาร์ |
| เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase | ความเข้มข้น | 1 | หน่วย |
| ดีเอ็นเอแม่แบบ (รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 1.1.1) | ความเข้มข้น | 1 | ไมโครกรัม |

แล้วปรับปริมาตรของปฏิกิริยาด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงเวลาประมาณ 3-4 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด จากนั้นนำเข้าเครื่อง GeneAmp PCR System 2400 โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 94 องศาเซลเซียส | 5 | นาที | |
| Denaturation | 94 องศาเซลเซียส | 30 | นาที | 30 รอบ |
| Annealing | 56 องศาเซลเซียส | 30 | วินาที | 30 รอบ |
| Extension | 72 องศาเซลเซียส | 1.10 | นาที | 30 รอบ |
| Final extension | 72 องศาเซลเซียส | 10 | นาที | |
| Hold | 4 องศาเซลเซียส | ∞ | | |

```
   1 ggatctgctc cagcgtcagc tccgggccca gcgggtcgcg ctcctggtac atctggccat
  61 tgaccatgag catgcgcagc gccgggttgg tggagtagct ggaaccgccg acggccactt
 121 tcggcagggc gttgcgcaca tcgggtggca ggtcggccac ggcatagacg cgcggctcgt
 181 tggccgtgag cgcgtcggtg gcggcggccc ggcggcggct gcgcgcaccg ccttcgggcg
 241 ccgaggcgtc gggtgtgctt tcgacggcgg tcacggcggt gatctgcggc accggcaggg
 301 cggcagcggg cgggggcgac accgtgggcg gcggcaggct ggcggccacc gggctgcccg
 361 cgtggatgcg caccgtgacc gggttgacca gatacagcac caccaggccg gccacagcca
 421 caccggcggt gaccaccggc cacagccaca ccggccgctc ggtgcccgcc acgtcgctgc
 481 cgggcatcac ctgctgggtg tgcagccccg gcaccgagcc gcgcccgcgg tcggactccg
 541 cgcgtttgag ggcgtcaagg atgtaggaca tggcgtcgtc ggctgggcag ggtggcggcg
 601 aaaaccggaa gcatacaggg cgccggcccg cgccggtgca ccgggcaacc ccgatgttgc
 661 aaagccgttg caatctcggt atactccggc gcgagtccat gcccacccac aaggaaatca
 721 ccatgcccct gaagaaccgc ttgctggccc gcctgtcctg tgttgcggcc gtggtggccg
 781 ccacggccgc cgttgcaccg ttgacgctgg tgtccaccgc ccacgccgcc gcaccgcagg
 841 tgcgcacctc ggcccccggc tactaccgga tgctgctggg cgacttcgaa atcaccgcgc
 901 tgtcggacgg cacggtggcg ctgccggtcg acaagcggct gaaccagccg gccccgaaga
 961 cgcagagcgc gctggccaag tccttccaga aagcgccgct cgaaacctcg gtcaccggtt
1021 acctcgtcaa caccggctcc aagctggtgc tggtggacac cggcgcggcc ggcctgttcg
1081 gccccaccct gggccggctg gcggccaacc tcaaggccgc aggctatcag cccgagcagg
1141 tcgacgagat ctacatcacc cacatgcacc ccgaccacgt gggcggcttg atggtgggtg
1201 agcaactggc gttcccgaac gcggtggtgc gtgcggacca gaaagaagcc gatttctggc
1261 tcagccagac caacctcgac aaggccccgg acgacgagag caaaggcttc ttcaaaggcg
1321 ccatggcctc gctgaacccc tatgtgaagg ccggcaagtt caagcctttc tcggggaaca
1381 ccgacctggt gcccggcatc aaagcgctgg ccagccacgg ccacaccccg ggccacacca
1441 cctacgtggt cgaaagccag gggcaaaagc tcgccctgct cggcgacctg atactcgtcg
1501 ccgcggtgca gttcgacgac cccagcgtca cgaaccagct cgacatcgac ggcaagtccg
1561 ccgcggtgga gcgcaagaag gccttcgcgg atgccgccaa gggcggctac ctgatcgcgg
1621 cgagccacct gccgttcccc ggcatcggcc acatccgcgc cgaaggcaag ggctaccgtt
1681 tcgtgccggt gaactactcg gtcgtcaacc ccaagtgact gggcagtggc cgccttgccc
1741 gcaccgttag gggtggcagg cggccgcgcg ctcgcgcagc agcgcctcct cgcggcggtt
1801 gcgcgcaagg tcggcggcaa cgaggtaggc cgcacgcgcc tcggcgcggc gacccaggcg
1861 ctgcagcagg tcggcccgca cgctgggcag caggtggtac tgctggaacc ggggctccag
1921 cgcgagcccg tccaccaggg ccagcgcctc ggccggacca cgggcctgcc ccacggccac
1981 cgcgcggttc agcgccacca ccggtgaagg catgacctgc agcagcccgt cgtacagggc
2041 cacgatgcgc gaccagtcgg tcgcgccggg cgtgacggcg cgcgcatggc aggcagcgat
2101 cgcggcctgc agcgcatagg ggccatgccc gcggtcctgc acggccagca gcccctcggc
2161 ccgcgccagg gccgccagcc cccggcggat c
```

ภาพที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 (accession number: AF338729) โดยบริเวณแถบสีเขียว แสดงตำแหน่งของ start codon, แถบสีเหลือง แสดงตำแหน่งของ signal sequence, แถบสีแดง แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ และแถบสีฟ้า แสดงตำแหน่งของ stop codon

1.1.4 การแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (Agarose Gel Electrophoresis)

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยการนำมาแยกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส โดยการเตรียมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายอะกาโรสในบัฟเฟอร์ 1X TAE พีเอช 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เทเจลลงในถาดเจล (chamber) พร้อมเสียบหวี (comb) แล้วทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที จึงดึงหวีออก เทบัฟเฟอร์ 1X TAE พีเอช 8.0 ให้ท่วมแผ่นเจลอะกาโรสที่แข็งตัว จากนั้นผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 แล้วหยอดสารละลายผสมที่ได้ ลงในหลุมของเจลอะกาโรส จากนั้นทำอิเล็กโตรโฟเรซีสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 80 โวลต์ นาน 90 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.1.5 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit

หลังจากแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส แล้ว ทำการตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นใช้ใบมีดที่สะอาดปราศจากเชื้อตัดลงบนแผ่นเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการ นำชิ้นเจลที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของชิ้นเจล ทำการสกัดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสตามวิธีในคู่มือของ E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit โดยการเติมบัฟเฟอร์ binding (XP2) ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัม ของชิ้นเจลที่ตัดได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 7 นาที โดยผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการ vortex ทุกๆ 2-3 นาที หรือจนกระทั่งชิ้นเจลละลายหมด จากนั้นดูดสารละลายผสมดีเอ็นเอและอะกาโรส ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน HiBind DNA mini column ที่บรรจุอยู่ในหลอด collection ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง แล้วนำ HiBind DNA mini column บรรจุลงในหลอด collection ตามเดิม ทำเช่นเดิมจนกว่าสารละลายจะหมด จากนั้นทำการล้างคอลัมน์โดยการเติมบัฟเฟอร์ binding (XP2) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงใน HiBind DNA mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง แล้วนำ HiBind DNA mini column ใส่ลงในหลอด collection ตามเดิม จากนั้นทำการล้างคอลัมน์โดยการเติมบัฟเฟอร์ SPW Wash ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน HiBind DNA mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที

นาน 1 นาที เทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง แล้วนำ HiBind DNA mini column ใส่ลงในหลอด collection ตามเดิม จากนั้นทำคอลัมน์ให้แห้งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เป็นองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ SPW Wash ออกจากคอลัมน์ จากนั้นย้าย HiBind DNA mini column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยการเติมบัฟเฟอร์ elution ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ลงใน HiBind DNA mini column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

**1.2 การโคลนยีน *mpdB***

1.2.1 การเชื่อมต่อยีน *mpdB* เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pTA2 โดยวิธีสำเร็จรูปโดยใช้ TArget Clone™ สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit ที่เตรียมได้จากข้อ 1.1.5 มาทำการเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pTA2 ตามวิธีที่อธิบายไว้ในคู่มือของ TArget Clone/ TArget Clone -Plus- เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะมีการเติมดีออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟส (dATP) ที่ปลาย 3’ ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ จะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีปลาย overhang dA ที่ปลาย 3’ จึงทำให้ง่ายต่อการเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pTA2 ที่มีปลาย overhang dT ที่ปลาย 5’ ตรงบริเวณ multiple cloning site (MCS) โดยปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอมีองค์ประกอบดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| สารละลายบัฟเฟอร์ ligation (2 เท่า) | ความเข้มข้น | 1 | เท่า |
| พลาสมิด pTA2:ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1:$\geq$3) | | | |
| พลาสมิด pTA2 (50 ng/μl) | ความเข้มข้น | 50 | นาโนกรัม |
| ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.1.5) | ความเข้มข้น $\geq$ | 150 | นาโนกรัม |
| เอนไซม์ T4 DNA ligase (Toyobo, Japan) | ความเข้มข้น | 1 | หน่วย |

แล้วปรับปริมาตรของปฏิกิริยาด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงเวลาประมาณ 3-4 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

1.2.2 การเตรียม Competent Cell เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนมีค่าประมาณ 0.2-0.5 จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 10 นาที แล้วทำการตกตะกอนเซลล์ โดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ลงในหลอดหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์จนกระทั่งเซลล์หมด ล้างตะกอนเซลล์โดยการละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2.3 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

หลังจากเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีในข้อ 1.2.2 แล้ว นำ competent cell ที่ได้ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ทำการเชื่อมต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ MPH เข้ากับพลาสมิด pTA2 ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วย้ายไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ X-gal ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยวิธี blue-white selection โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ต่อไป

1.2.4 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* จากทรานส์ฟอร์แมนท์

หลังจากทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α แล้ว นำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.3 มาทำการสกัดพลาสมิด โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.1 จากนั้นทำการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ต่อไป

1.2.5 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* (pTA2::*mpdB*) ด้วยวิธี Restriction Analysis

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานส์ฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกได้แล้ว ทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 1.2.4 โดยการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *mpdB* ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Xho*I และ *Kpn*I โดยผสมสารละลายในปฏิกิริยาการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสโดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.4 โดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

**1.3 การสับโคลนยีน *mpdB***

1.3.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mpdB* จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pTA::*mpdB* สำหรับการสับโคลน

หลังจากทำการคัดเลือกและตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pTA2::*mpdB* แล้ว ทำการเพาะเลี้ยงทรานส์ฟอร์แมนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pTA2::*mpdB* นี้ เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดโดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.1 จากนั้นทำการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ ด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I โดยผสมสารละลายในปฏิกิริยาการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ โดยการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *mpdB* ให้บริสุทธิ์จากเจล

อะกาโรส โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.4 และข้อ 1.1.5 ตามลำดับ

1.3.2 การเตรียมพลาสมิด pHisFlag-1 สำหรับการสับโคลน

ทำการเตรียมพลาสมิดที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mpdB* ที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.1 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5$\alpha$ ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดโดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.1 จากนั้นทำการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ ด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I โดยผสมสารละลายในปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอบริเวณพลาสมิด pHisFlag-1 ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.4 และข้อ 1.1.5 ตามลำดับ

1.3.3 การเชื่อมต่อยีน *mpdB* เข้ากับพลาสมิด pHisFlag-1

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *mpdB* ที่เตรียมได้ในข้อ 1.3.1 และชิ้นส่วนของพลาสมิด pHisFlag-1 ที่เตรียมได้ในข้อ 1.3.2 มาทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 เข้าด้วยกัน โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอมีองค์ประกอบดังนี้

| | |
|---|---|
| สารละลายบัฟเฟอร์ ligation (10 เท่า) | ปริมาตร 1 ไมโครลิตร |
| พลาสมิด pHisFlag-1:ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1:$\geq$3) | |
| พลาสมิด pHisFlag-1 (ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.3.2) | ปริมาตร 1 ไมโครลิตร |
| ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.3.1) | ปริมาตร 5 ไมโครลิตร |
| เอนไซม์ T4 DNA ligase | ปริมาตร 1 ไมโครลิตร |

แล้วปรับปริมาตรของปฏิกิริยาด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงเวลาประมาณ 3-4 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

1.3.4 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน

หลังจากทำการเชื่อมต่อยีน *mpdB* เข้ากับพลาสมิด pHisFlag-1 แล้ว ทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนมีค่าประมาณ 0.2-0.5 จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 10 นาที แล้วตกตะกอนเซลล์โดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ลงในหลอดหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์จนกระทั่งเซลล์หมด ล้างตะกอนเซลล์โดยการละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเซลล์ที่เตรียมได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วย้ายไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกและตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ต่อไป

**1.4 การตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์**

หลังจากทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้โดยวิธีดังต่อไปนี้

1.4.1 การตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์โดยการทดสอบกิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ MPH ด้วยวิธี Microtiter Plate MPH Assay

ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่สามารถย่อยสลาย MP โดยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH ด้วยวิธี microtiter plate MPH assay โดยคัดเลือกโคโลนีของทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้จากข้อ 1.3.4 โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เขี่ยโคโลนีของทรานส์ฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดหมายเลขในแต่ละโคโลนี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH ของแต่ละโคโลนี โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เขี่ยโคโลนีของทรานส์ฟอร์แมนท์ในแต่ละหมายเลขที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน 96-well microtiter plate ที่มี substrate mixture (MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, Tris-HCl พีเอช 8.5 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ triton X-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองของ PNP ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย MP ที่เกิดขึ้นใน substrate mixture โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (positive control คือ microtiter plate ที่มี substrate mixture และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีน *mpdB* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP, negative control คือ microtiter plate ที่มี substrate mixture และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 และ microtiter plate ที่มีเฉพาะ substrate mixture เพียงอย่างเดียว) จากนั้นนำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ให้สีเหลืองมาทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนต่อไป

1.4.2 การตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยวิธี Restriction Analysis

ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยวิธี restriction analysis โดยนำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ มาทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.1 จากนั้นทำการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Kpn*I โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.2.5 แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.4 โดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

1.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจากข้อ 1.4.2 โดยส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทแปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

1.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม basis local alignment tool (BLAST) จากเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

1.4.5 การทดสอบกิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ MPH บน MP Agar Plate

หลังจากทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนแล้ว นำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ point inoculation ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน สังเกตสีเหลืองรอบโคโลนี (hydrolytic clear zone) โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 ซึ่งใช้เป็น negative control

**2. การแสดงออกของเอนไซม์ MPH**

หลังจากทำการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) แล้วนำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น (start culture) จากนั้นทำการถ่ายเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนมีค่าประมาณ 0.2 จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ MPH ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 20 ชั่วโมง

**3. การสกัดเอนไซม์ MPH จากส่วนต่างๆ ของเซลล์**

**3.1 การสกัดเอนไซม์ MPH จากอาหารเลี้ยงเชื้อ**

หลังจากที่ทำการแสดงออกเอนไซม์ MPH แล้ว นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 2 ไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการเก็บตะกอนเซลล์และสารละลายส่วนใส โดยสารละลายส่วนใสที่ได้ นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับค่าเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว (% saturation) ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนกรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลายเพื่อให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว (% saturation) ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปตามสมการที่แสดงการคำนวณไว้ในภาคผนวก ค โดยเติมเกลือลงในสารละลายทีละน้อย กวนสารละลายตลอดเวลาในที่เย็น นานข้ามคืน แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1-2 เท่าของตะกอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสารละลายที่ได้ในส่วนนี้จะเก็บเป็นส่วนของ culture medium fraction

**3.2 การสกัดเอนไซม์ MPH จากเพอริพลาสซึม (Neu และคณะ, 1965)**

หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.1 มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลล์ แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดเอนไซม์ โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ osmotic shock (Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์, EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, ซูโครส ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์) ที่เย็น ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลล์ จากนั้นนำมาบ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์โดยเร็วด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เย็น ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลล์ จากนั้นนำมาบ่มและเขย่าบ่อยๆ ในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอนเซลล์และสารละลายส่วนใส จากนั้นนำสารละลายโปรตีนจากส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Vivaspin 20 (molecular weight cut off: MWCO, 10 kDa polyethersulphone: PES) (GE Healthcare, Sweden) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสารละลายที่ได้ในส่วนนี้จะเก็บเป็นส่วนของ periplasmic fraction

**3.3 การสกัดเอนไซม์ MPH จากไซโตพลาสซึม (Yamabhai และคณะ, 2008)**

หลังจากทำการสกัดเอนไซม์จาก periplasmic space แล้ว นำตะกอนเซลล์ที่ได้หลังจากการสกัดเอนไซม์ในข้อ 3.2 มาละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการแตกเซลล์โดยใช้เครื่องแตกเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูง (sonicator) (Vibra Cell, USA) ที่ความถี่ 60 แอมพลิจูด, pulser 6 วินาที นาน 10 นาที แล้วกำจัดเศษเซลล์ออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสารละลายที่ได้ในส่วนนี้จะเก็บเป็นส่วนของ cytoplasmic fraction ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH ต่อไป

**4. การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH**

**4.1 การทำไดอะไลซิส (Dialysis)**

4.1.1 การเตรียมถุงไดอะไลซิส

ก่อนการทำไดอะไลซิสโปรตีนจะต้องนำถุงสำหรับทำไดอะไลซิสมาทำการเตรียม (pre-treatment) เพื่อให้มีขนาดของรูพรุนใกล้เคียงกัน และเพื่อกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับถุงไดอะไลซิส โดยนำถุงสำหรับทำไดอะไลซิส มาตัดให้ได้ความยาวตามต้องการ แล้วแช่ลงในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วย EDTA ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที โดยในระหว่างที่ต้มให้ถุงไดอะไลซิสจมอยู่ในสารละลายโดยใช้ขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำ กดอยู่ด้านบน จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปแทน ต้มต่ออีกนาน 10 นาที เปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนแล้วต้มอีกครั้งหนึ่ง ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บถุงสำหรับทำไดอะไลซิสที่เตรียมได้ในเอทานอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บได้นานประมาณ 3 เดือน

4.1.2 การกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการเปลี่ยนบัฟเฟอร์โดยวิธีไดอะไลซิส

หลังจากทำการแสดงออกและสกัดเอนไซม์ MPH จากส่วนต่างๆ แล้ว นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 มาทำไดอะไลซิส (dialysis) เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ของสารละลายโปรตีน ตามลำดับ โดยนำถุงสำหรับทำไดอะไลซิสที่ผ่านการเตรียมในข้อ 4.1.1 มาผูกปลายด้านหนึ่ง ดูดสารละลายโปรตีนใส่ลงในถุงสำหรับทำไดอะไลซิส แล้วผูกปลายด้านบนให้แน่น จากนั้นแช่ถุงสำหรับทำไดอะไลซิสที่ภายในบรรจุสารละลายโปรตีนลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เย็น โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายโปรตีนภายในถุงสำหรับทำไดอะไลซิสต่อสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0

ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตร ทำการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็วต่ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ แล้วกวนต่อไปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์อีกครั้งหนึ่ง กวนต่อไปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้นานข้ามคืน นำโปรตีนที่ทำการไดอะไลซิสแล้วไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Vivaspin 20 (MWCO, 10 kDa PES) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford, หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH และแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีต่อไป

**4.2 การแยกบริสุทธิ์โปรตีน**

หลังจากที่ทำการไดอะไลซิสโปรตีนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ แล้ว นำโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสมาทำบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH โดยใช้แอฟฟินิตี้คอลัมน์ (affinity column) คือ cobalt column โดยคอลัมน์นี้สามารถจับกับ histidine-tag protein ที่เชื่อมอยู่กับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH ได้ โดยทำการเชื่อมต่อคอลัมน์เข้ากับเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (Amersham Pharmacia, Sweden) จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 3-5 เท่าของความจุคอลัมน์ เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บคอลัมน์ (storage buffer) จากนั้นทำสมดุล (equilibrate) คอลัมน์ด้วย binding buffer (โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์, อิมิดาโซล ความเข้มข้น 5-10 มิลลิโมลาร์, พีเอช 7.4) ปริมาตรอย่างน้อย 5 เท่าของความจุคอลัมน์ โดยควบคุมอัตราการไหลของ binding buffer ให้มีอัตราเร็วประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการเตรียมสารละลายโปรตีน โดยเจือจางสารละลายโปรตีนด้วย binding buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการฉีดสารละลายโปรตีนเข้าไปในคอลัมน์โดยใช้เข็มฉีด ล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตรอย่างน้อย 10-15 เท่าของความจุคอลัมน์ หรือจนกว่า baseline เรียบ (steady baseline) แล้วทำการซะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์, อิมิดาโซล ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์, พีเอช 7.4) ปริมาตรอย่างน้อย 5 เท่าของความจุคอลัมน์ โดยควบคุมอัตราการไหลของ elution buffer ให้มีอัตราเร็วประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มารวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้น โดยใช้ Vivaspin 6 (MWCO, 10 kDa PES) เก็บเอนไซม์ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), เทคนิค zymogram analysis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH ต่อไป ส่วนคอลัมน์ที่ใช้จะเก็บไว้ในเอทานอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส

**5. การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Sambrook และคณะ 1989)**

นำโปรตีนที่ได้ในส่วนต่างๆ มาแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**5.1 การเตรียมแผ่นเจลสำหรับแยกวิเคราะห์โปรตีน**

สำหรับแผ่นเจลแบบ 12% (ชั้น separating gel) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ผสมสารต่างๆ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| สารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ | 2.0 | มิลลิลิตร |
| สารละลายบัฟเฟอร์ This HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์, พีเอช 8.8 | 1.3 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ | 50.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำปราศจากไอออน | 1.6 | มิลลิลิตร |
| จากนั้นเติม | | |
| สารละลายแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์* | 50.0 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 2.0 | ไมโครลิตร |

*เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมกระจกสำหรับการเตรียมเจลให้สะอาด และนำไปประกอบกับ electrophoresis set เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในช่องว่างของแผ่นกระจกหล่อเจลที่ได้ประกอบไว้แล้ว เติมน้ำปราศจากไอออนทับลงบนผิวเจลทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 30 นาที แล้วเทน้ำกลั่นออกและซับให้แห้ง

สำหรับแผ่นเจลแบบ 5% (ชั้น staking gel) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| สารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ | 330.0 | ไมโครลิตร |
| สารละลายบัฟเฟอร์ This HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, พีเอช 6.8 | 250.0 | ไมโครลิตร |
| สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ | 20.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำปราศจากไอออน | 1.4 | มิลลิลิตร |
| จากนั้นเติม | | |
| สารละลายแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์* | 20.0 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 2.0 | ไมโครลิตร |

*เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

ผสมให้เข้ากันและเททับลงบนเจลชั้นแรกที่แข็งตัวแล้ว สอดแผ่นกำหนดร่องเจลลงบนเจลที่ยังไม่แข็งตัวทันที ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 30 นาที ดึงแผ่นกำหนดร่องเจลออกล้างเจลด้วยน้ำปราศจากไอออนและเตรียมประกอบชุดวิเคราะห์ Mini-Protein system เติมบัฟเฟอร์ Tris-glycine running ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นเจลทั้งส่วนบนและส่วนล่าง

**5.2 การเตรียมโปรตีนเพื่อวิเคราะห์**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับสีสังเคราะห์ (4X gel loading dye) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที แล้วทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ชุดวิเคราะห์ Mini-Protein system ต่อไป

**5.3 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า**

หยอดโปรตีนที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในช่องเจล ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 60 นาที หรือจนสีของ bromphenol blue วิ่งจนชิดขอบแผ่นเจลด้านล่างสุดของกระจก ถอดขั้วไฟฟ้าออก แกะแผ่นเจลออกจากกระจก และย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย staining เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และล้างสีที่มากเกินโดยการแช่แผ่นเจลในสารละลาย destaining I ทิ้งไว้ 1.5 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลาย destaining II ทิ้งไว้ข้ามคืน สังเกตแถบโปรตีนที่ปรากฏขึ้น

**6. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Zymogram Analysis (ดัดแปลงจากวิธีของ Granelli-Piperno และคณะ, 1978; Vassalli และคณะ, 1984; Li และคณะ, 2001; Malone และคณะ, 2002)**

นำโปรตีนที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH มาทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยดำเนินการตามวิธีในข้อ 5.2 โดยใช้สีสังเคราะห์ (4X gel loading dye) ที่ปราศจากสารรีดิวซิงเอเจนต์ (reducing agent) แล้วทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยดำเนินการตามวิธีในข้อ 5.1 และ 5.3 ตามลำดับ โดยไม่ทำการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย staining จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย triton X-100 ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นเจลที่ได้วางลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี MP ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตแถบสีเหลืองของ PNP ที่ปรากฏขึ้น

**7. การหาค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford Protein Assay**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่าปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดตรวจวัดโปรตีนสำเร็จรูป Bio-Rad Bradford protein assay โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**7.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน**

ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford M., 1976) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมสารละลาย Bradford dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณเป็นกราฟมาตรฐานโปรตีน

**7.2 การวัดปริมาณของโปรตีน**

นำโปรตีนตัวอย่างที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่าปริมาณโปรตีน โดยนำโปรตีนตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมสารละลาย Bradford dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

**8. การหาค่ากิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ MPH ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี (ดัดแปลงจากวิธีของ Guoping และคณะ, 2004)**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**8.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ PNP**

เตรียม PNP ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยละลายด้วยสารละลาย assay buffer (บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นเข้มข้น 0.1 โมลาร์, Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มี assay buffer เพียงอย่างเดียว) บันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณเป็นกราฟมาตรฐาน PNP

**8.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH**

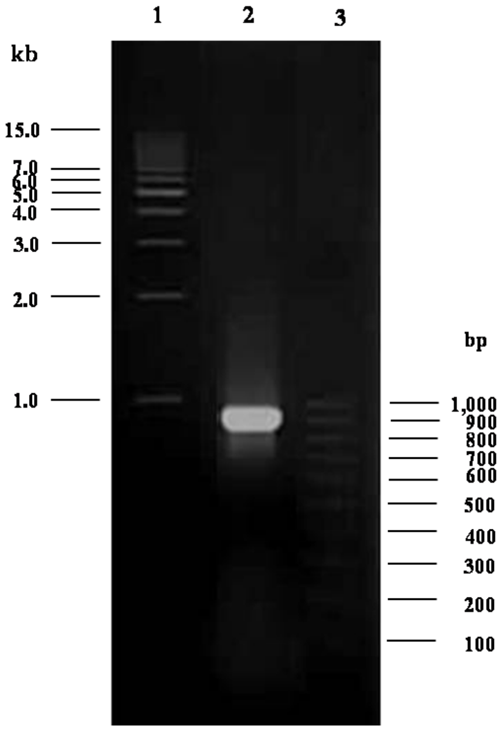
นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยนำสารละลาย assay buffer (บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้นเข้มข้น 0.1 โมลาร์, Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่มี MP ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 960 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์ MPH ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ซึ่งจะวัดสีเหลืองของ PNP โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มี assay buffer เพียงอย่างเดียว) บันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน PNP กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit, U) คือ ปริมาณของเอนไซม์ MPH ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมล ของ PNP ในเวลา 1 นาที

# บทที่ 4

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

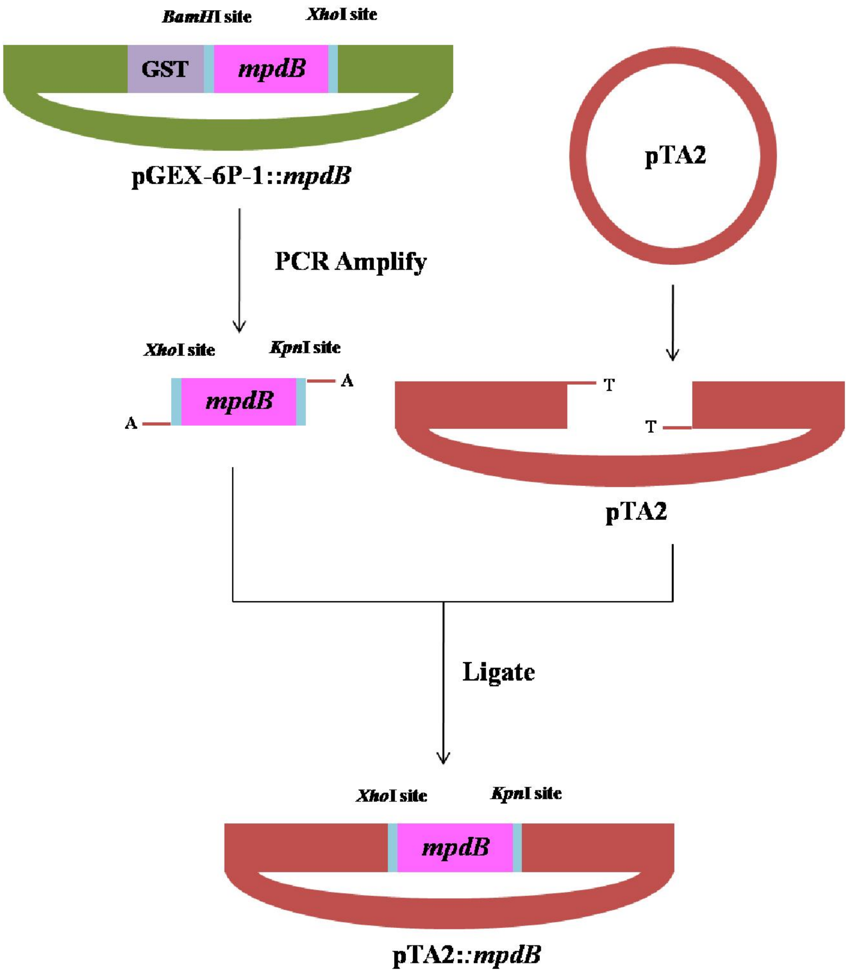
### 1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีน *mpdB* โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน

จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีน *mpdB* ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี, 2549) ตามวิธีมาตรฐานของ Sambrook และคณะ (1989) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *Xho*I-*mpd*_F และ *Kpn*I-*mpd*_R ซึ่งออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 หมายเลข accession number AF338729 ของ GenBank ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP (Zhongli และคณะ, 2001) ที่มี homology กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสมาจากลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminus ของเชื้อ *Burkholderia cepacia* ซึ่งมีผู้วิจัยไว้ก่อนหน้านี้ (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ บุญศรี จงเสรีจิต, 2544; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) โดยออกแบบเฉพาะในส่วนของยีนที่ code ให้เอนไซม์ MPH ซึ่งไม่รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ signal sequence เดิมของเอนไซม์ (mature MPH) โดยเพิ่มตำแหน่งตัดเอนไซม์ (restriction site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I เพื่อให้ง่ายต่อการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 จากผลการทดลองเมื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder และ 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *mpdB* ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ดังแสดงในภาพที่ 21 จากนั้นเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 900 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์นี้ มาทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A$^{TM}$ Gel Extraction Kit และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pTA2 โดยภาพรวมของขั้นตอนในการสร้างรีคอมบิ-แนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* แสดงในภาพที่ 22




ภาพที่ 21 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *mpdB* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์ โดยช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, ช่องที่ 2 คือ ชิ้นส่วนยีน *mpdB* ที่เพิ่มปริมาณได้ และ ช่องที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

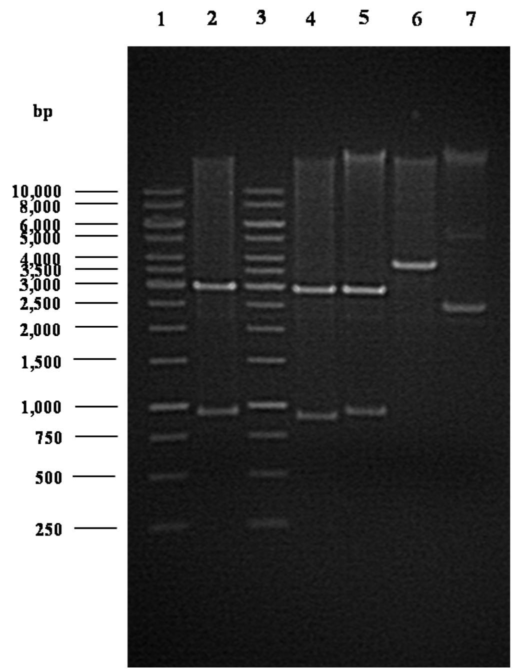
แล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยวิธี blue-white selection พบว่ามีโคโลนีสีขาวเกิดขึ้นจำนวนมาก โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวเหล่านี้ มาสกัดพลาสมิดแล้วทำการวิเคราะห์หาโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี restriction analysis




ภาพที่ 22 แผนภาพการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ MPH เข้าสู่พลาสมิด pTA2

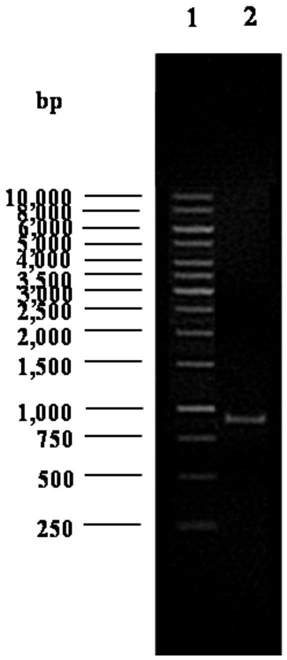
หลังจากทำการวิเคราะห์หาโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี restriction analysis โดยการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Xho*I และ *Kpn*I เพื่อตรวจสอบขนาดของ insert โดยตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, เอนไซม์ *Xho*I เพียงเอนไซม์เดียว และตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *mpdB* และขนาดประมาณ 2,900 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pTA2 โดยจากผลการทดลองที่ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงเอนไซม์เดียว จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบนั้น เนื่องจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI จะอยู่คร่อมระหว่างตำแหน่งของ insert ดังนั้นเมื่อทำการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ชนิดนี้จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ ซึ่งเป็นขนาดของยีนและขนาดของพลาดมิด

ตามลำดับ โดยให้ผลเช่นเดียวกันในการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I เพียงเอนไซม์เดียว และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I ซึ่งมีตำแหน่งตัดเอนไซม์ที่ได้ทำการออกแบบไว้บนชิ้นดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 900 bp และขนาดประมาณ 2,900 bp เช่นเดียวกันอีกด้วย และเมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I เพียงเอนไซม์เดียว พบว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3,800 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *mpdB* รวมกับพลาสมิด pTA2 จากผลการทดลองจึงเป็นการยืนยันได้ว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกได้มียีนที่สร้างเอนไซม์ MPH อยู่ และโคลนอยู่ในพลาดมิดที่ถูกต้อง ดังแสดงในภาพที่ 23

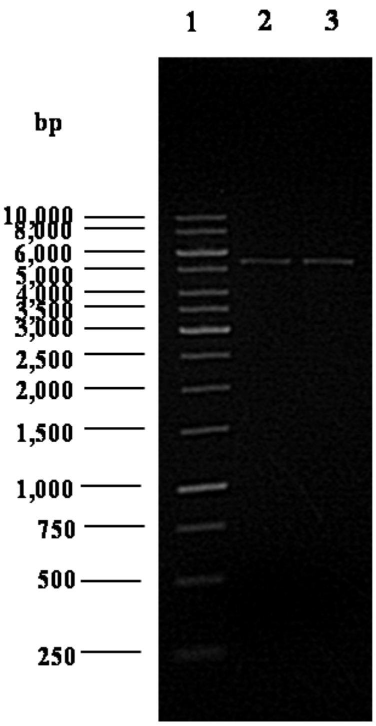



ภาพที่ 23 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Xho*I และ *Kpn*I โดยช่องที่ 1 และ 3 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I, ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I, ช่องที่ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB*

จากนั้นผู้วิจัยได้เลือกโคลน pTA2 ที่มียีน *mpdB* ที่ได้ทำการตรวจสอบยืนยันแล้วว่ามียีนดังกล่าวจริง เพื่อเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 bp ที่ใช้ในการสับโคลนเข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ MPH โดยนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTA2 ที่มียีน *mpdB* จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่คัดเลือกได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I ในการเตรียมพลาสมิด pHisFlag-1 จะเริ่มจากทำการสกัดพลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 มาตัดพลาสมิด pHisFlag-1 ด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I เช่นเดียวกับการตัด insert (*mpdB* gene) แล้วทำการแยก insert และพลาสมิดที่ผ่านการตัดแล้วแยกบริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสด้วยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 900 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *mpdB* และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 5,400 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pHisFlag-1 ดังแสดงในภาพที่ 24 และ 25 ตามลำดับ ทำให้แน่ใจได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ได้นั้นมีความถูกต้อง



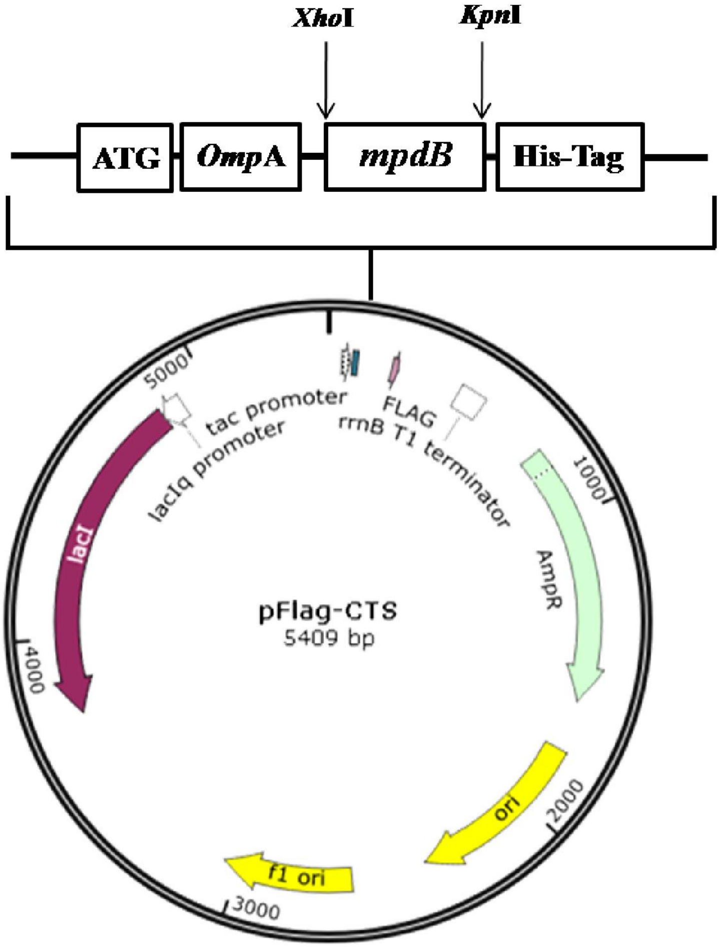

ภาพที่ 24 การแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *mpdB* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit โดยช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder และช่องที่ 2 คือ ชิ้นยีน *mpdB* ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส



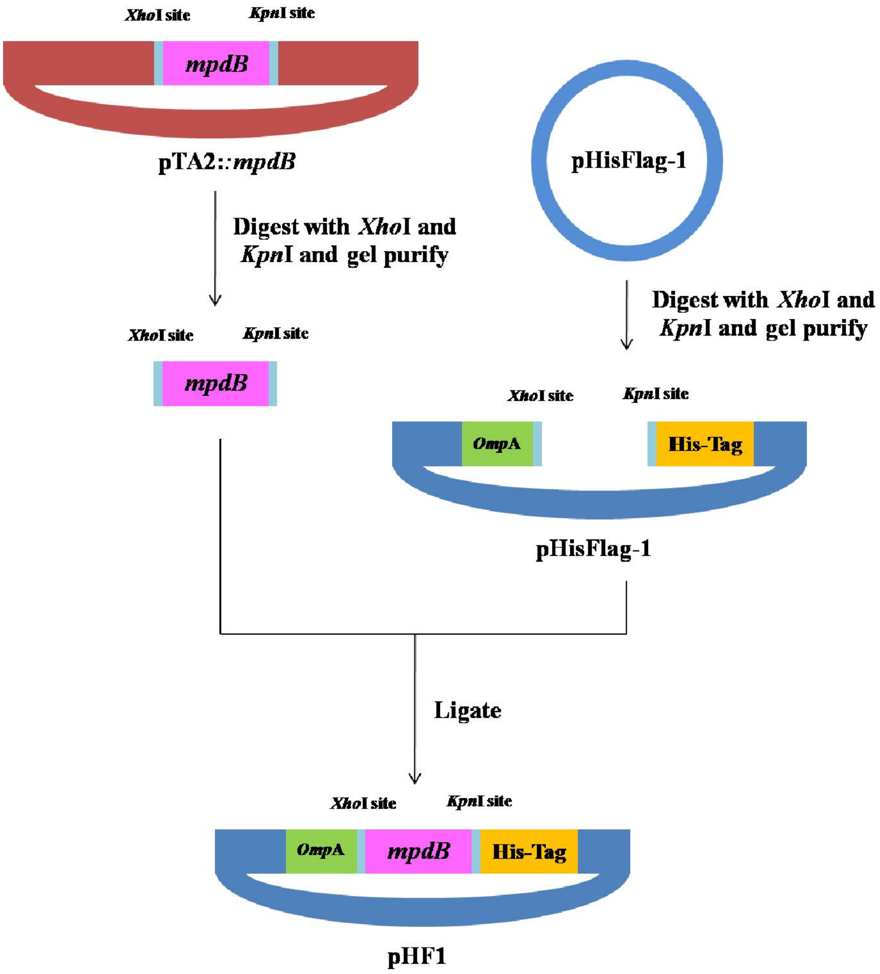

ภาพที่ 25 การแยกบริสุทธิ์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป E.Z.N.A$^{TM}$ Gel Extraction Kit โดยช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder และช่องที่ 2 และ 3 คือ พลาสมิด pHisFlag-1 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดนี้เข้าด้วยกันได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* และตั้งชื่อให้กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ โดยกำหนดให้ pHF1 คือ พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* (pHisFlag-1::*mpdB*) ดังแสดงในภาพที่ 26 โดยภาพรวมของขั้นตอนในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* แสดงในภาพที่ 27 แล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ด้วยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยวิธี microtiter plate MPH assay พบว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้สามารถแสดงออกและผลิตเอนไซม์ MPH ที่สามารถย่อยสลาย MP โดยเปลี่ยนสีของ substrate mixture ที่มี MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เป็นสีเหลืองของ PNP ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย MP เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1::*mpdB* ที่ใช้เป็น positive control จะปรากฏสีเหลืองของ PNP เช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 และ substrate

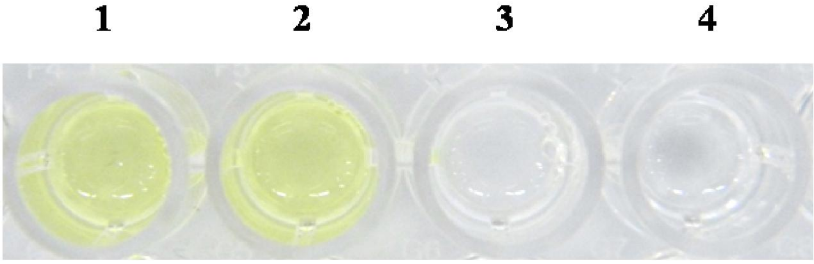
mixture เพียงอย่างเดียว ที่ใช้เป็น negative control จะเห็นได้ว่าไม่มีสีเหลืองของ PNP เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 28




ภาพที่ 26 แผนภาพรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 (พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB*)

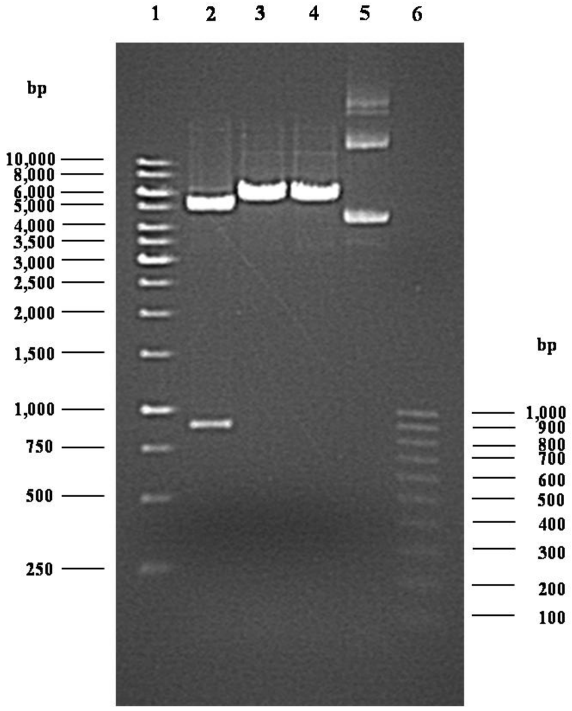



ภาพที่ 27 แผนภาพการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1




ภาพที่ 28 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH ในการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ โดยวิธี microtiter plate MPH assay โดยหลุมที่ 1 คือ microtiter well ที่มี substrate mixture และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1::*mpdB* (positive control), หลุมที่ 2 คือ microtiter well ที่มี substrate mixture และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1, หลุมที่ 3 คือ microtiter well ที่มี substrate mixture และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 และหลุมที่ 4 คือ microtiter well ที่มี substrate mixture เพียงอย่างเดียว

จากนั้นนำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่สามารถย่อยสลาย MP ได้ มาตรวจสอบเพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีน *mpdB* ด้วยวิธี restriction analysis โดยทำการสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I เพื่อตรวจสอบขนาดของ insert โดยตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 900 bp และ 5,400 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *mpdB* และพลาสมิด pHisFlag-1 ตามลำดับ และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I หรือ *Kpn*I เพียงเอนไซม์เดียว จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 6,300 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของขนาดของยีน *mpdB* รวมกับพลาสมิด pHisFlag-1 จึงเป็นการยืนยันได้ว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกได้มียีน *mpdB* อยู่ และโคลนอยู่ในพลาดมิดที่ถูกต้อง ดังแสดงในภาพที่ 29



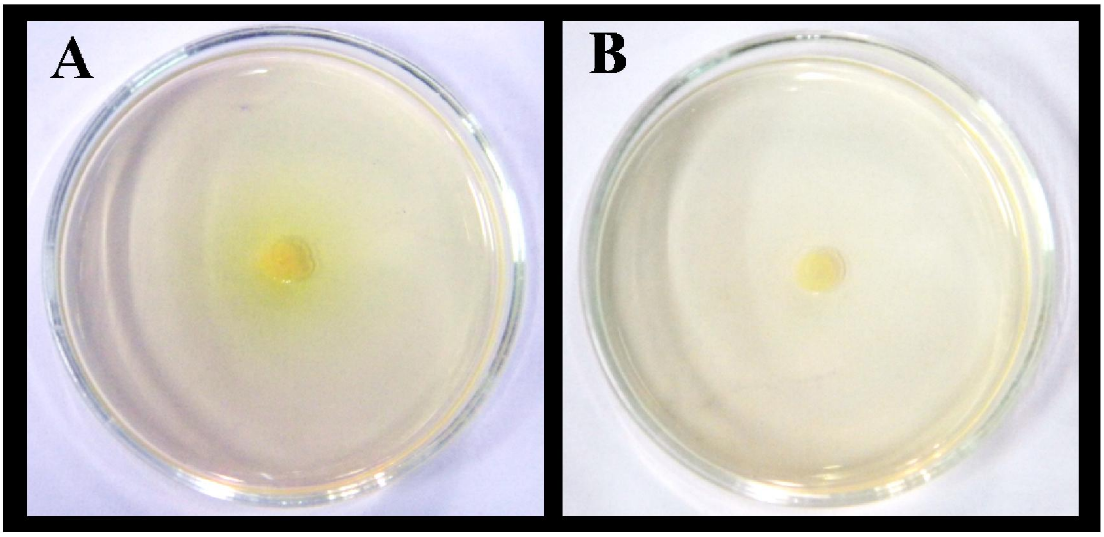

ภาพที่ 29 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I โดยช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Kpn*I, ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I เพียงเอนไซม์เดียว, ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I เพียงเอนไซม์เดียว, ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 และช่องที่ 6 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน *mpdB* มาทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ โดยส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert ที่บริษัทแปซิฟิคไซเอ็นซ์ ประเทศไทย และตรวจสอบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Burkholderia cepacia* หมายเลข accession number DQ001540 ของ GenBank โดยใช้บางส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากการส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่คัดเลือกได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* ของเชื้อ *Burkholderia cepacia* คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 30

```
Query  106   GCCGCACCGCAGGTGCGCACCTCGGCCCCCGGCTACTACCGGATGCTGCTGGGCGACTTC  165
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  865   GCCGCACCGCAGGTGCGCACCTCGGCCCCCGGCTACTACCGGATGCTGCTGGGCGACTTC  806

Query  166   GAAATCACCGCGCTGTCGGACGGCACGGTGGCGCTGCCGGTCGACAAGCGGCTGAACCAG  225
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  805   GAAATCACCGCGCTGTCGGACGGCACGGTGGCGCTGCCGGTCGACAAGCGGCTGAACCAG  746

Query  226   CCGGCCCCGAAGACGCAGAGCGCGCTGGCCAAGTCCTTCCAGAAAGCGCCGCTCGAAACC  285
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  745   CCGGCCCCGAAGACGCAGAGCGCGCTGGCCAAGTCCTTCCAGAAAGCGCCGCTCGAAACC  686

Query  286   TCGGTCACCGGTTACCTCGTCAACACCGGCTCCAAGCTGGTGCTGGTGGACACCGGCGCG  345
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  685   TCGGTCACCGGTTACCTCGTCAACACCGGCTCCAAGCTGGTGCTGGTGGACACCGGCGCG  626

Query  346   GCCGGCCTGTTCGGCCCCACCCTGGGCCGGCTGGCGGCCAACCTCAAGGCCGCAGGCTAT  405
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  625   GCCGGCCTGTTCGGCCCCACCCTGGGCCGGCTGGCGGCCAACCTCAAGGCCGCAGGCTAT  566

Query  406   CAGCCCGAGCAGGTCGACGAGATCTACATCACCCACATGCACCCCGACCACGTGGGCGGC  465
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  565   CAGCCCGAGCAGGTCGACGAGATCTACATCACCCACATGCACCCCGACCACGTGGGCGGC  506

Query  466   TTGATGGCGGGTGAGCAACTGGCGTTCCCGAACGCGGTGGTGCGTGCGGACCAGAAAGAA  525
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  505   TTGATGGCGGGTGAGCAACTGGCGTTCCCGAACGCGGTGGTGCGTGCGGACCAGAAAGAA  446

Query  526   GCCGATTTCTGGCTCAGCCAGACCAACCTCGACAAGGCCCCGGACGACGAGAGCAAAGGC  585
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  445   GCCGATTTCTGGCTCAGCCAGACCAACCTCGACAAGGCCCCGGACGACGAGAGCAAAGGC  386

Query  586   TTCTTCAAAGGCGCCATGGCCTCGCTGAACCCCTATGTGAAGGCCGGCAAGTTCAAGCCT  645
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  385   TTCTTCAAAGGCGCCATGGCCTCGCTGAACCCCTATGTGAAGGCCGGCAAGTTCAAGCCT  326

Query  646   TTCTCGGGGAACACCGACCTGGTGCCCGGCATCAAAGCGCTGGCCAGCCACGGCCACACC  705
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  325   TTCTCGGGGAACACCGACCTGGTGCCCGGCATCAAAGCGCTGGCCAGCCACGGCCACACC  266

Query  706   CCGGGCCACACCACCTACGTGGTCGAAAGCCAGGGGCAAAAGCTCGCCCTGCTCGGCGAC  765
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  265   CCGGGCCACACCACCTACGTGGTCGAAAGCCAGGGGCAAAAGCTCGCCCTGCTCGGCGAC  206

Query  766   CTGATACTCGTCGCCGCGGTGCAGTTCGACGACCCCAGCGTCACGATCCAGCTCGACAGC  825
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  205   CTGATACTCGTCGCCGCGGTGCAGTTCGACGACCCCAGCGTCACGATCCAGCTCGACAGC  146

Query  826   GACAGCAAGTCCGCCGCGGTGGAGCGCAAGAAGGCCTTCGCGGATGCCGCCAAGGGCGGC  885
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  145   GACAGCAAGTCCGCCGCGGTGGAGCGCAAGAAGGCCTTCGCGGATGCCGCCAAGGGCGGC  86

Query  886   TACCTGATCGCGGCGACCCACCTGTCGTTCCCCGGCATCGGCCACATCCGCGCCGAAGGC  945
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  85    TACCTGATCGCGGCGACCCACCTGTCGTTCCCCGGCATCGGCCACATCCGCGCCGAAGGC  26

Query  946   AAGGGCTACCGTT  958
             |||||||||||||
Sbjct  25    AAGGGCTACCGTT  13
```

ภาพที่ 30 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ทำการคัดเลือกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* (โดย Query คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ทำการคัดเลือกได้ และ Sbjct คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* จากเชื้อ *Burkholderia cepacia*)

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โคลนที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ โดยทดสอบบนอาหารแข็ง MP agar ที่มี MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน พบว่าปรากฏสีเหลืองรอบๆ รีคอมบิแนนท์โคโลนี (yellow halo) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 ที่ใช้เป็น negative control จะเห็นได้ว่าไม่ปรากฏสีเหลืองรอบๆ โคโลนี ดังแสดงในภาพที่ 31 แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โคลนมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ได้ และตั้งชื่อให้กับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ทำการตรวจสอบแล้วโดยกำหนดให้ BpHF คือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* จากนั้นผู้วิจัยได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF นี้ ไปศึกษาการแสดงออกของยีนและการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH ต่อไป

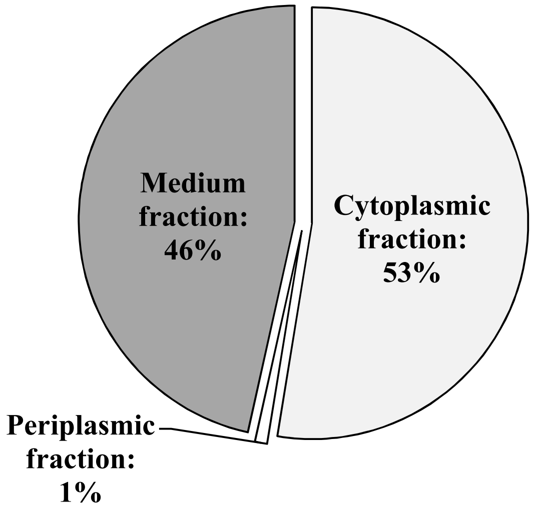



ภาพที่ 31 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH บน MP agar plate โดย A คือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 และ B คือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pHisFlag-1 (negative control)

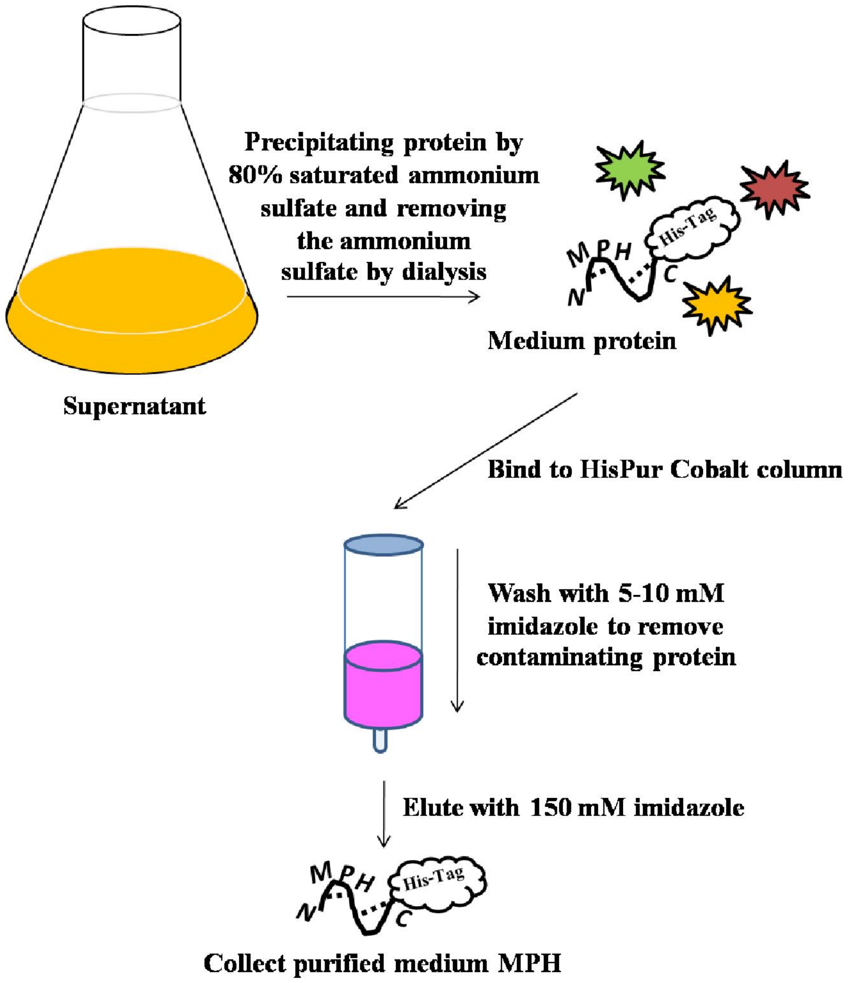
**2. การแสดงออกและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH**

ในการแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHF1 ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส หลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทำการสกัดเอนไซม์ MPH ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ, เพอริพลาสซึม และไซโตพลาสซึม พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH ที่ถูกผลิตโดยรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF เท่ากับ 2 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเอนไซม์ในส่วนของไซโตพลาสซึมมีมากที่สุด (53%) รองลงมา คือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (46%) และเพอริพลาสซึม (1%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 32 แล้วจึงเลือกเอนไซม์ MPH จากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพอริพลาสซึม ไปใช้ในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ MPH หยาบจากขั้นตอนการแสดงออกเอนไซม์ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และในส่วนของเพอริพลาสซึมที่ได้จากการสกัดเอนไซม์โดยวิธี osmotic shock มาทำการเตรียมเอนไซม์ก่อนการแยกบริสุทธิ์ โดยนำสารละลายโปรตีนมาทำให้เข้มข้นขึ้นและทำไดอะไลซิส เพื่อกำจัดเกลือและการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ แล้วนำมาแยกบริสุทธิ์โดยวิธีการที่ง่ายในขั้นตอนเดียว โดยใช้แอฟฟินิตี้คอลัมน์ HisPure cobalt column ที่จับจำเพาะกับ polyhistidine-tag protein ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยโปรตีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย elution buffer ที่มีอิมิดาโซล ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ แบบครั้งเดียว (one-step) โดยภาพรวมของขั้นตอนในการแสดงออกและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของอาหารเลี้ยง-เชื้อ และเพอริพลาสซึม แสดงในภาพที่ 33 และ 34 ตามลำดับ การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากเอนไซม์ MPH หยาบ 0.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากผ่านคอลัมน์ HisPure cobalt spin column ได้ความบริสุทธิ์ (fold) เท่ากับ 93.0 เท่า ได้ผลทั้งหมด (yield) เท่ากับ 46.2 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 3.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 12 และการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของเพอริพลาสซึม เริ่มจากเอนไซม์ MPH หยาบ 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากผ่านคอลัมน์ HisPure cobalt chromatography cartridges ได้ความบริสุทธิ์ (fold) เท่ากับ 10,777.95 เท่า ได้ผลทั้งหมด (yield) เท่ากับ 935.4 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 9.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 13 แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ MPH ที่ได้จากเชื้อ BpGT ที่ผลิตเอนไซม์ MPH ภายในเซลล์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1611.81 (อนิรุทธ เอกคุณธรรม, 2552; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทั้งจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพอริพลาสซึมที่ได้จากการทดลองนี้ มีค่ากิจกรรมจำเพาะของ

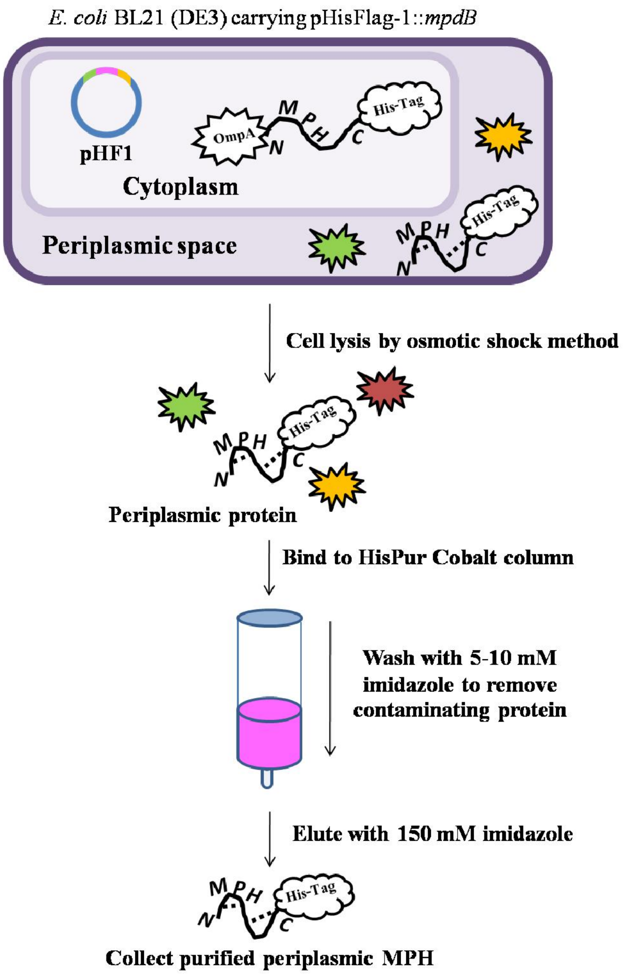
เอนไซม์น้อยกว่ามาก อาจเป็นผลมาจากการหลั่งโปรตีนออกมาในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งจัดเป็นข้อเสียหลักที่สำคัญประการหนึ่งของการผลิตเอนไซม์ให้หลั่งออกนอกเซลล์ใน *E. coli* อาจเนื่องมาจากความไม่สมบูรณ์ของการนำส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน หรืออัตราการแสดงออกที่สูงของยีนภายใต้การควบคุมของ strong promoter และการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป ซึ่งจะทำให้เกิดการผลิตโปรตีนที่มากเกินอัตราการนำส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน เนื่องจากการขาดแคลนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกลไกการหลั่งโปรตีน (transport machinery) ที่จะช่วยในการนำส่งโปรตีนที่ต้องการออกนอกเซลล์ ก่อให้เกิดการสะสมของโปรตีนภายในเซลล์ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) จึงทำให้เกิดการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ในปริมาณที่ต่ำ (Ayadi-Zouari และคณะ, 2012; Mergulhao และคณะ 2004; Mergulhao และคณะ 2005; Robben และคณะ, 2006) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสมดุลของอัตราในการแสดงออกของยีน และอัตราการนำส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องควบคุมให้เกิดความเหมาะสมเพื่อให้เกิดการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ในปริมาณที่สูง (Azaman และคณะ, 2010) ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF นี้ เพื่อผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์และให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดต่อไป




ภาพที่ 32 ปริมาณเอนไซม์ MPH ในส่วนต่างๆ ของเซลล์




ภาพที่ 33 แผนผังขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้คอลัมน์ HisPure cobalt column




ภาพที่ 34 แผนผังขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากเพอริพลาสซึมโดยใช้คอลัมน์ HisPure cobalt column

ตารางที่ 12 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ

| Purification Step | Activity (U/ml) | Total Activity (U) | Protein (mg/ml) | Total Protein (mg) | Specific Activity (U/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Crude extract | 0.31 | 0.61 | 8.28 | 16.55 | 0.04 | 1 | 100 |
| HisPur™ Cobalt spin column | 0.14 | 0.28 | 0.04 | 0.08 | 3.44 | 93.0 | 46.2 |

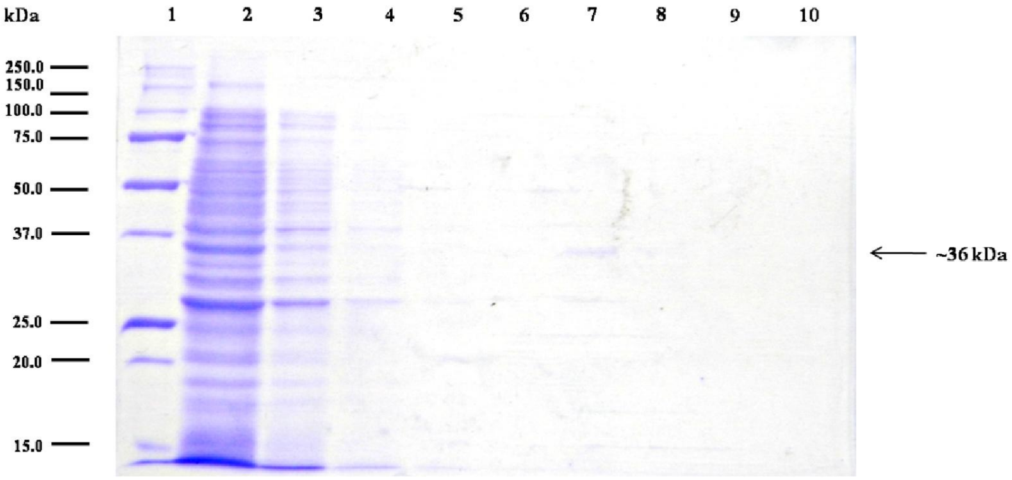
ตารางที่ 13 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ในส่วนของเพอริพลาสซึม

| Purification Step | Activity (U/ml) | Total Activity (U) | Protein (mg/ml) | Total Protein (mg) | Specific Activity (U/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Crude extract | 0.02 | 0.04 | 22.25 | 44.50 | 0.001 | 1 | 100 |
| HisPur™ Cobalt spin column + Ultrafiltation | 1.74 | 0.35 | 0.19 | 0.039 | 9.03 | 10777.95 | 935.4 |

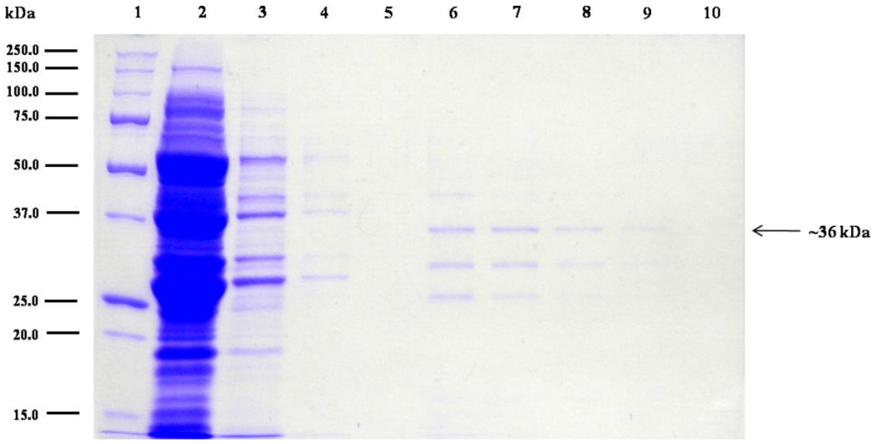
จากการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์ MPH ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ได้ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพอริพลาสซึมโดยเมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ที่เกิดขึ้นกับแถบโปรตีนมาตรฐาน พบว่าปรากฏแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ MPH ที่มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน (Zhongli และคณะ, 2001; Fu และคณะ, 2004; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) รวมอยู่กับ polyhistidine-tag ที่มีขนาดประมาณ 0.84 กิโลดาลตัน (Terpe, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 35 และ 36 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองยังพบแถบโปรตีนที่ขนาดอื่นๆ อีกหลายแถบ จึงจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ MPH บนแผ่นเจล SDS-PAGE เพื่อยืนยันแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน ที่ได้จากเอนไซม์ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพอริพลาสซึมที่ได้จากการชะออกจากคอลัมน์ด้วยเทคนิค zymogram analysis พบว่าปรากฏแถบสีเหลืองของ PNP จากการย่อยสลาย MP โดยเอนไซม์ MPH ที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตันเพียงแถบเดียว ดังแสดงในภาพที่ 37 และ 38 ตามลำดับ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน ที่ได้นี้เป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ MPH ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ที่หลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และเพอริพลาสซึม โดยอาศัยการทำงานของ *Omp*A signal peptide ที่จะนำเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกสู่ periplasmic space ตามระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของ *E. coli* ชนิด type II โดยอาศัยการทำงานของกลไกการทำงาน SecB-dependent pathway (Mergulhao และคณะ, 2005) แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการหลั่งเอนไซม์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่ทราบแน่ชัด (Mergulhao และคณะ, 2005) แต่จากผลการทดลองที่พบเอนไซม์ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น อาจเกิดจากการรั่วของเอนไซม์

MPH จากส่วนของเพอริพลาสซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในการเลี้ยงที่มีการเขย่าเป็นระยะเวลานาน (20 ชั่วโมง) หรือในระหว่างการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย (Cornelis, 2000; Marco, 2009; Yamabhai และคณะ, 2008) และจากผลการทดลองแม้ว่าจะพบโปรตีนชนิดอื่นที่ได้มาจากขั้นตอนการชะคอลัมน์นอกเหนือจากเอนไซม์ MPH ก็ตาม แต่จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่ปนเปื้อนออกมานั้นเป็นเพียงส่วนน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมดที่ผ่านคอลัมน์ (โปรตีนในส่วน flow through) ซึ่งอาจเป็นโปรตีนที่ล้างออกจากคอลัมน์ไม่หมดในขั้นตอนการล้างด้วย wash buffer เนื่องจากความเข้มข้นของอิมิดาโซลที่ใช้ใน wash buffer ยังไม่เหมาะสมในการล้างโปรตีนแหล่านี้ออกจากคอลัมน์ หรือความเข้มข้นอิมิดาโซลที่ใช้ในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ยังไม่เหมาะสมที่จะชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์โดยปราศจากโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ต้องการออกมาด้วย แต่อย่างไรก็ตามหากต้องการเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจำเป็นต้องศึกษาหาความเข้มข้นของอิมิดาโซลที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการล้างหรือชะคอลัมน์ หรืออาจนำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปแยกบริสุทธิ์เพิ่มด้วยวิธีอื่นต่อไป เพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ปราศจากโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ต้องการได้ และจากผลการทดลองยังเป็นการยืนยันได้อีกด้วยว่ารีคอมบิแนนท์โคลน BpHF ที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งเอนไซม์ออนออกนอกเซลล์ได้

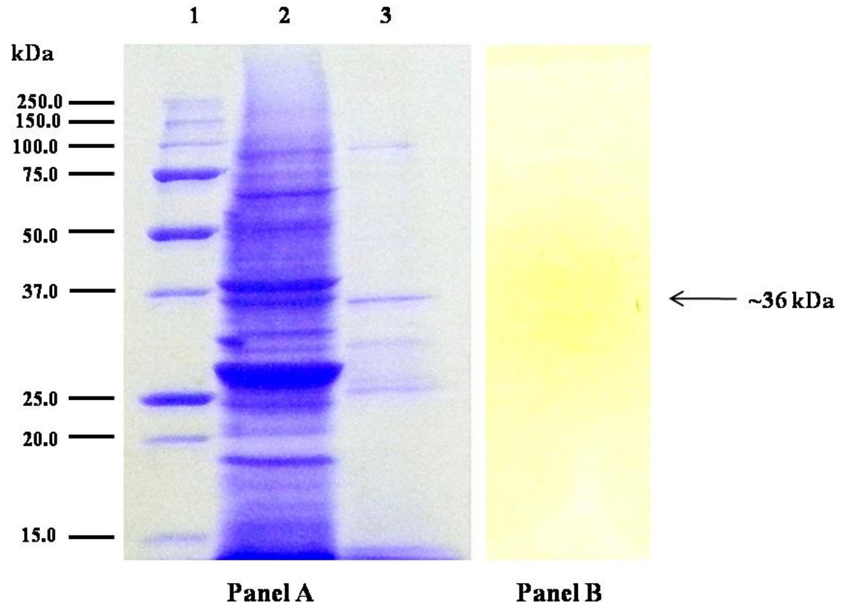
แม้ว่าเอนไซม์ MPH ที่ได้จากการทดลองนี้ยังมีการผลิตได้ในปริมาณที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ MPH ในระบบการแสดงออกภายในเซลล์ ของโคลน BpGT (วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี, 2549; อนิรุทธ เอกคุณธรรม, 2552) แต่อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งเอนไซม์จากงานวิจัยนี้ทำได้ง่ายกว่าการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ อาศัยเพียงการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ osmotic shock ในการสกัดเอนไซม์ออกจากเพอริพลาสซึม และกระบวนการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ที่ได้ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการแตกเซลล์ที่ยุ่งยาก และกระบวนการทำให้เสียสภาพของโปรตีน (denaturation) รวมทั้งกระบวนการ refold โปรตีนก่อนการทำบริสุทธิ์ เหมือนการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งวิธีการผลิตเอนไซม์ให้หลั่งออกมานอกเซลล์นี้จึงจัดเป็นวิธีการที่ง่าย ประหยัดเวลา และมีราคาถูก เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ MPH ต่อไปได้



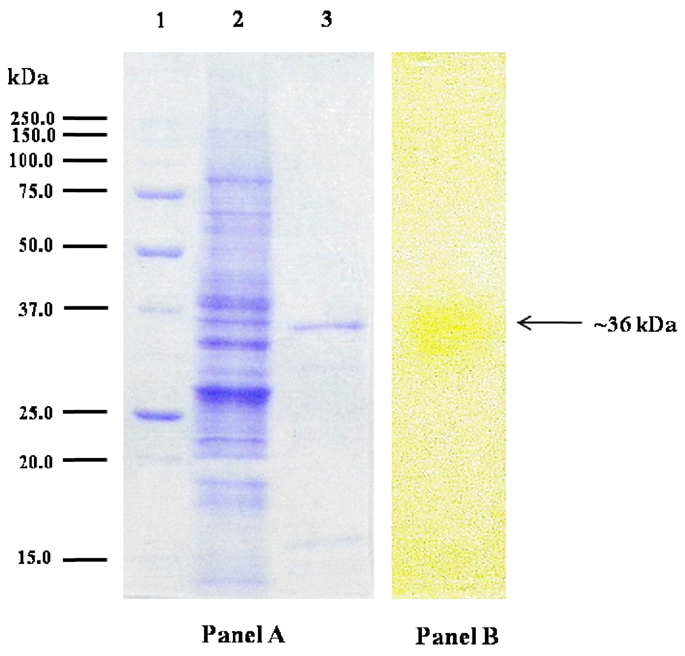

ภาพที่ 35 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ HisPure cobalt spin column โดยช่องที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, ช่องที่ 2 คือ flow through, ช่องที่ 3-6 คือ โปรตีนที่ได้จากการล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ครั้งที่ 1-4 และช่องที่ 7-10 คือ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1-4




ภาพที่ 36 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในส่วนเพอริพลาสซึม ของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ HisPure cobalt spin column โดยช่องที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, ช่องที่ 2 คือ flow through, ช่องที่ 3-5 คือ โปรตีนที่ได้จากการล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ครั้งที่ 3, 5 และ 7 และช่องที่ 6-10 คือ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1-5




ภาพที่ 37 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค zymogram analysis ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ HisPure cobalt spin column โดย panel A คือ โปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์, ช่องที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, ช่องที่ 2 คือ flow through, ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากการชะคอลัมน์ และ panel B คือ zymogram analysis ของเอนไซม์ MPH ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์




ภาพที่ 38 การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค zymogram analysis ในส่วนของเพอริพลาสซึม โดยใช้ HisPure cobalt column โดย panel A คือ โปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์, ช่องที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน, ช่องที่ 2 คือ flow through, ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากการชะคอลัมน์ และ panel B คือ zymogram analysis ของเอนไซม์ MPH ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์

# บทที่ 5

## สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลง MP โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีนใน *E. coli* รวมถึงการนำเอนไซม์ MPH ที่แสดงออกโดยการหลั่งออกนอกเซลล์ไปแยกบริสุทธิ์เอนไซม์

การศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* โดยนำยีน *mpdB* ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP ไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นยีน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ซึ่งออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 หมายเลข accession number AF338729 ของ GenBank ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP (Zhongli และคณะ, 2001) ที่มี homology กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสมาจากลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminus ของเชื้อ *Burkholderia cepacia* ซึ่งมีผู้วิจัยไว้ก่อนหน้านี้ (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ บุญศรี จงเสรีจิต, 2544; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) โดยออกแบบเฉพาะในส่วนของยีนที่ code ให้เอนไซม์ MPH ซึ่งไม่รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ signal sequence เดิมของเอนไซม์ (mature MPH) และทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ MPH นี้ เข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 โดยให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็น pHF1 ซึ่งคือ พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* (pHisFlag-1::*mpdB*) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอนี้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Burkholderia cepacia* หมายเลข accession number DQ001540 ของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mpdB* ของเชื้อ *Burkholderia cepacia* คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยให้ชื่อรีคอมบิแนนท์โคลนเป็น BpHF ซึ่งคือ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHisFlag-1 ที่มียีน *mpdB* โดยรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ โดยสามารถหลั่งเอนไซม์ MPH ออกมาย่อยสลายยาฆ่าแมลง MP ปรากฏเป็นสีเหลืองของ PNP รอบๆ โคโลนี (yellow halo) ของเชื้อ BpHF นี้ได้

การศึกษาการผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF พบว่าเชื้อ BpHF สามารถผลิตเอนไซม์ให้หลั่งออกสู่เพอริพลาสซึม และอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสามารถแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH จากโปรตีนที่ได้ใน 2 ส่วนนี้ได้ง่าย โดยใช้ HisPure cobalt column และจากผลการวิเคราะห์เอนไซม์ MPH ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค zymogram analysis พบว่าเอนไซม์ MPH ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน โดยปรากฏแถบโปรตีนและแถบสีเหลืองของ PNP ในแผ่นเจล SDS-PAGE และแผ่นเจล zymogram analysis ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ MPH ที่มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน (Zhongli และคณะ, 2001; Fu และคณะ, 2004; Ekkhunnatham และคณะ, 2012) รวมอยู่กับ polyhistidine-tag ที่มีขนาดประมาณ 0.84 กิโลดาลตัน (Terpe, 2003)

จะเห็นได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลน BpHF นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ และสามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในส่วนของเพอริพลาสซึม และอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำโคลน BpHF นี้ มาใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ MPH ที่ง่ายต่อการผลิตและการนำไปใช้ รวมทั้งเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์นี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ MPH จากรีคอมบิแนนท์โคลน BpHF นี้ยังมีปริมาณที่ต่ำ จึงจะต้องทำการศึกษาถึงรูปแบบในการแสดงออกของเอนไซม์ MPH (expression profile) ของโปรตีนที่ได้ในส่วนต่างๆ ของเซลล์ ได้แก่ โปรตีนในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพอริพลาสซึม ไซโตพลาสซึม และตะกอนเซลล์ที่ได้หลังจากการสกัดโปรตีนในส่วนของไซโตพลาสซึม รวมทั้งตะกอนเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนและหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรตีนที่แสดงออกจากรีคอมบิแนนท์โคลนอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ (soluble protein) หรืออยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) มากกว่ากัน รวมทั้งเพื่อดูระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MPH นี้อีกด้วย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์เพื่อนำมาใช้ประกอบการพิจารณาในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ และศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH ที่หลั่งออกนอกเซลล์ โดยศึกษาโปรตีนจากทุกส่วนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ MPH โดยใช้ cobalt column และศึกษาหาสภาวะในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยวิธีนี้ต่อไป เพื่อใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ MPH ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป นอกจากนี้อาจนำเอนไซม์ที่ได้จากงานวิจัยมาพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมหรือผลิตภัณฑ์ที่จะช่วยตรวจสอบหรือกำจัด/ลดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ในสภาพแวดล้อมและผลผลิตทางการเกษตรเพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าให้มีมาตรฐานเพียงพอในการส่งออก ซึ่งจะก่อให้เกิดความปลอดภัยอาหารด้านพืช และเป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรได้อีกด้วย

## บรรณานุกรม


กรมควบคุมมลพิษ. กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย. ฝ่ายสารอันตรายจากสาธารณสุข (2541) เอกสารชุดสารเคมีเฉพาะเรื่อง (monograph) เมทธิลพาราไธออน (methyl parathion); โรงพิมพ์กรมควบคุมมลพิษ, กรุงเทพมหานคร, 180.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. สำนักควบคุมวัตถุอันตราย (2547) ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2547; กรมโรงงานอุตสาหกรรม, กรุงเทพมหานคร, 8-11.

กรมวิชาการเกษตร. กองวัตถุมีพิษการเกษตร (2537) รายงานผลการค้นคว้าวิจัยฉบับเต็มประจำปี 2537; กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 35.

กรมวิชาการเกษตร. กองวัตถุมีพิษการเกษตร (2538) การประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษการเกษตร ครั้งที่ 1; กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 100-102.

กรมวิชาการเกษตร. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2556) ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556; กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 12.

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, บุญศรี จงเสรีจิตต์ และ วันเพ็ญ แย้มขุนทอง (2543) การศึกษาขั้นต้นของการวิเคราะห์ในระดับยีนของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 26, กรุงเทพมหานคร.

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และบุญศรี จงเสรีจิตต์ (2544) การศึกษาขั้นต้นของการวิเคราะห์ในระดับยีนของเชื้อ *Pseudomonase* sp. ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน; รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ ที่เสนอต่อสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, นครปฐม, 30-34.

พาลาภ สิงหเสนี (2531) พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม; สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 25-65.

พรพิมล เจริญส่ง (2533) เมทธิลพาราไธออน; เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ, สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 14.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (2527) ยาฆ่าแมลง; ชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการ เกษตร มก. บางเขน, กรุงเทพมหานคร, 55-71.

นวลศรี ทยาพัชร (2541) ปัญหาสารพิษทางการเกษตรในประเทศไทย; รายงานวิชาการ, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 13-41.

วิรุฬห์ ศุภลักษณ์นารี (2549) การบ่งชี้ การศึกษาลักษณะ และการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนของเชื้อ *Burkholderia cepacia*; วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยศิลปากรม, นครปฐม.

สุนีย์ นิเทศพัตรพงศ์ (2552) ตรวจสอบสารพิษตกค้างในตัวอย่างพืชแปลง; จดหมายข่าวผลิใบ, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 12(1):12-15.

เสาวลักษณ์ วงค์เทียนหลาย (2547) การบ่งชี้และการศึกษาคุณลักษณะของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากเชื้อ *Burkholderia cepacia*; วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2554) เอกสารสถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2554; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 153-165.

Ausubel, Frederick A. (1997) Current Protocols in Molecular Biology; John Wiley & Sons Inc., New York

Anh, D.H., Cheunrungsikul, K., Wichitwechkarn, J. and Surareungchai, W. (2011) A Colorimetric Assay for Determination of Methyl Parathion Using Recombinant Methyl Parathion Hydrolase. Biotechnology Journal, 6(5):565-571.

Ayadi-Zouari, D., Kammoun, R., Jemli, S., Chouayekh, H. and Bejar, S. (2012) Secretion of Cyclodextrin Glucanotransferase in *E. coli* Using *Bacillus subtilis* Lipase Signal Peptide and Optimization of Culture Medium. Indian Journal of Experimental Biology, 50:72-79.

Azaman, S.N.A., Ramanan, R.N., Tan, J.S., Rahim, R.A., Abdullah, M.P. and Ariff, A.B. (2010) Screening for the Optimal Induction Parameters for Periplasmic Producing Interferon-$\alpha$2b in *Escherichia coli.* African Journal of Biotechnology, 9(38):6345-6354.

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Chaudhry, G. R. (1994) Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals; Colorcarft Ltd., Hong Kong, 203.

Chen, Y., Zhang, X., Liu, H., Wang, Y. and Xia, X. (2002) Study on *Pseudomonas sp.* WBC-3 Capable of Complete Degradation of Methyl Parathion. Wei Sheng Wu Xue Bao 42, 490–497.

Cheng, T.C., Harvey, S.P. and Chen, G.L. (1996) Cloning and Expression of a Gene Encoding a Bacterial Enzyme for Decontamination of Organophosphorus Nerve Agents and Nucleotide Sequence of the Enzyme. Applied and Environmental Microbiology, 62(5):1636-41.

Choi, J.H. and Lee, S.Y. (2004) Secretory and Extracellular Production of Recombinant Proteins Using *Escherichia coli.* Applied Microbiology and Biotechnology, 64(5):625-635.

Cornelis, P. (2000) Expressing Genes in Different *Escherichia coli* Compartments. Current Opinion in Biotechnology, 11:450–454.

Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W. and Wichitwechkarn, J. (2012) Purification and Characterization of Methyl Parathion Hydrolase from *Burkholderia cepacia* Capable of Degrading Organophosphate Insecticides. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28:1739-1746.

Ekkhunnatham, A., Wichitwechkarn, J. and Surareungchai, W. (2010) Development of Biosensor for Pesticide Detection Using Methyl Parathion Hydrolase from Recombinant MPD Clone. Proceedings of Pure and Applied Chemistry Conference 2010. Ubonratchathani.

Elashvili, I., DeFrank, J.J. and Culotta,V.C. (1998) *phnE* and *glpT* Genes Enhance Utilization of Organophosphates in *Escherichia coli* K-12. Applied Microbiology and Biotechnology, 64:2601-2608.

Fu, G., Cui, Z., Huang, T. and Li, S. (2004) Expression, Purification, and Characterization of a Novel Methyl Parathion Hydrolase. Protein Expression and Purification, 36(2):170-176.

Granelli-Piperno, A. and Reich, E. (1978) A Study of Proteases and Protease–Inhibitor Complexes in Biological Xuids. Journal of Experimental Medicine, 148:223–234.

Guoping, F., Zhongli, C., Tingting, H. and Shunpeng, L. (2004) Expression, Purification and Characterization of Novel Methyl Parathion Hydrolase. Protein Expression and Purification, 36:170-176

Horne, I., Sutherland, T.D., Harcourt, R.L., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (2002) Identification of an *opd* (Organophosphate Degradation) Gene in an *Agrobacterium* Isolate. Applied and Environmental Microbiology, 68(7):3371-3376.

Kang, D.G., Choi, S.S. and Cha, H.J. (2006) Enhanced Biodegradation of Toxic Organophosphate Compounds Using Recombinant *Escherichia coli* with Sec Pathway-Driven Periplasmic Secretion of Organophosphorus Hydrolase. Journal of Biotechnology, 22:406-410.

Kang, D.G., Lim, G. and Cha, H.J. (2005) Functional Periplasmic Secretion of Organophosphorous Hydrolase Using the Twin-Arginine Translocation Pathway in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 118:379-385.

Keprasertsup, C. (1995) Degradation of Methyl Parathion in an Aqueous Medium by Soil Bacteria; Master Degree of Science (Environmental Biology), Mahidol University, 45.

Keprasertsup, C., Upatham, S., Sukhapanth, N. and Prempree, P. (2001) Degradation of Methyl Parathion in an Aqueous Medium by Soil Bacteria. Science Asia, 27:261-270.

Konstantinou, I.K., Hela, D.G. and Albanis, T.A. (2006) The Status of Pesticide Pollution in Surface Waters (Rivers and Lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. Environmental Pollution, 141(3):555-570.

Laurie, A.D. and Lloyd-Jones, G. (1999) The *phn* Genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 Constitute a Divergent Gene Cluster for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Catabolism. Journal of Bacteriology, 181(2):531-540.

Li, C., Zhang, J., Jiang, Y., Gurewich, V., Chen, Y. and Liu, J.N. (2001) Urokinase-Type Plasminogen Activator Up-Regulates. Its Own Expression by Endothelial Cells and Monocytes via the u-PAR Pathway. Thrombosis Research, 103:221–232.

Malone, A.S., Shellhammer, T.H. and Courtney, P.D. (2002) Effects of High Pressure on the Viability, Morphology, Lysis, and Cell Wall Hydrolase Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*. Applied and Environmental Microbiology, 68:4357–4363.

Marco, A.D. (2009) Strategies for Successful Recombinant Expression of Disulfide Bond-Dependent Proteins in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 8:26.

Mergulhao, F.J.M., Summers, D.K. and Monteiro, G.A. (2005) Recombinant Protein Secretion in *Escherichia coli.* Biotechnology Advances, 23(3):177-202.

Mergulhao, F.J.M., Taipa, M.A., Cabral, J.M.S. and Monteiro, G.A. (2004) Evaluation of Bottlenecks in Proinsulin Secretion by *Escherichia coli.* Journal of Biotechnology, 109:31-43.

Methyl parathion Structure [Online], accessed 1 May 2011. Available from http://www.pesticideinfo.org/ChemGifs/PC35110.gif

Munnecke, D.M. and Hsieh, D.P.H. (1974) Microbial Decontamination of Parathion and *p*-Nitrophenol in Aqueous Media. Applied and Environmental Microbiology, 2(28): 2212-2217.

Neu, H.C. and Heppel, L.A. (1965) The Release of Enzymes from *Escherichia coli* by Osmotic Shock and During the Formation of Spheroplasts. Journal of Biological Chemistry, 240:3685-3692.

Organophosphate Structure [Online], accessed 1 May 2011. Available from http://www.ams.ac.ir/AIM/08111/0015.html

Perry, A.S., Yamamoto, I., Ishaaya, I. and Perry, R.Y. (1998) Insecticides in Agriculture and Environment Retrospects and Prospects; Narosa Publishing House, New Dehli, 61.

pFlag-CTS [Online], accessed 11 April 2014. Available from http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/cloning-and-expression/vector-systems/vector-maps.html

pFlag-CTS Features [Online], accessed 11 April 2014. Available from http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/cloning-and-expression/feature-maps/pflag-cts.gif

Pines, O. and Inouye, M. (1999) Expression and Secretion of Protein in *E. coli*. Molecular Biotechnology, 12:25-33.

Ramanathan, M. and Lalithakumari, D. (1999) Complete Mineralization of Methyl Parathion by *Pseudomonas* sp. A3. Applied Biochemistry and Biotechnology, 80(1):1-12.

Robbens, J., De Coen, W., Fiers, W. and Remaut, E. (2006) Improved Periplasmic Production of Biologically Active Murine Interleukin-2 in *Escherichia coli* through a Single Amino Acid Change at the Cleavage Site. Process Biochemistry, 41:1343-1346.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S.B. and Merrick, M. (2003) Transposon-Like Organization of the Plasmid-Borne Organophosphate Degradation (*opd*) Gene Cluster Found in *Flavobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology, 69(5):2533-39.

Siddavattam, D., Raju, E.R., Paul, P.V.E. and Merrick, M. (2006) Overexpression of Parathion Hydrolase in *Escherichia coli* Stimulates the Synthesis of Outer Membrane Porin OmpF. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86:146-150.

Songsiriritthigul, C., Buranabanyat, B., Haltrich, D. and Yamabhai, M. (2010) Efficcient Recombinant Expression and Secretion of a Thermostable GH26 Mannan Endo-1,4-$\beta$-Mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 9:20.

Suppaluknaree, W., Ekkunatham, A. and Wichitwechkarn, J. (2007) Purification and Characterization of Methyl Parathion Hydrolase from Cloned *mpd* Gene. Proceedings in 33$^{th}$ Congress on Science and Technology of Thailand. Nakhon Si Thammarat.

TArget Clone/ Target Clone-Plus- [Online], accessed 11 April 2014. Available from http://www.toyobo.co.jp/e/bio

Terpe, K. (2003) Overview of Tag Protein Fusions: from Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems. Microbiol Biotechnol, 60:523-533.

Thanassi, D.G. and Hultgren, S.J. (2000) Multiple Pathways Allow Protein Secretion Across the Bacterial Outer Membrane. Cell Biology, 12:420-430.

Vassalli, J.D., Dayer, J.M. and Wohlwen, A. (1984) Concomitant Secretion of Prourokinase and of a Plasminogen Activator Inhibitor by Cultured Human Monocytes Macrophages. Journal of Experimental Medicine, 159:1653–1658.

Wikipedia the free encyclopedia. Signal Peptide Sequence Structure [Online], accessed 1 May 2011. Available from http://commons.wikimedia.org/wiki/ File:Signal_sequence.svg?uselang=de

Wongthianlai, S., Chimthong, S., Srirattana, K. and Wichitwechkarn, J. (2007) Identification, Cloning, and Expression of *mpd* Gene Coding for Methyl Parathion Hydrolase from *Burkholderia cepacia.* Proceedings in 33$^{th}$ Congress on Science and Technology of Thailand. Nakhon Si Thammarat.

Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N. and Buranabanyat, B. (2008) Secretion of Recombinant *Bacillus* Hydrolytic Enzymes Using *Escherichia coli* Expression Systems. Journal of Biotechnology, 133(1):50-57.

Yang, C., Freudl, R., Qiao, C. and Mulchandani, A. (2010) Cotranslocation of Methyl Parathion Hydrolase to the Periplasm and of Organophosphorus Hydrolase to the Cell Surface of *Escherichia coli* by the Tat Pathway and Ice Nucleation Protein Display System. Applied and Environmental Microbiology, 76(2):434-440.

Yang, W., Zhou, Y.F., Dai, H.P., Bi, L.J., Zhang, Z.P., Zhang, H.X., Leng, Y. and Zhang, X.E. (2008) Application of Methyl Parathion Hydrolase (MPH) as a Labeling Enzyme. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390:2133-2140.

Yoon, S.H., Kim, S.K. and Kim, J.F. (2010) Secretory Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli.* Biotechnology, 4:23-29.

Zhang, X.Z., Cui, Z.L., Hong, Q. and Li, S.P. (2005) High-Level Expression and Secretion of Methyl Parathion Hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. Applied and Environmental Microbiology, 71(7):4101-4103.

Zhongli, C., Shupeng, L. and Guoping, F. (2001) Isolation of Methyl Parathion-Degrading Strain M6 and Cloning of the Methyl Parathion Hydrolase Gene. Applied and Environmental Microbiology, 10(67):4922-4925.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

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

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

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

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |
| Agar | 14 | กรัม |

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**3. อาหารเหลว Luria-Bertani ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LB+ampicillin broth)**

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |
| Ampicillin (10 mg/ml) | 10 | มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน

15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ทำการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**4. อาหารแข็ง Luria-Bertani ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LB+ampicillin agar)**

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | |
|---|---|
| Tryptone | 10 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |
| Sodium chloride | 10 กรัม |
| Agar | 14 กรัม |
| Ampicillin (10 mg/ml) | 10 มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ทำการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**5. อาหารแข็ง Luria-Bertani ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (LB+ampicillin+IPTG agar)**

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | |
|---|---|
| Tryptone | 10 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |
| Sodium chloride | 10 กรัม |
| Agar | 14 กรัม |
| Ampicillin (10 mg/ml) | 10 มิลลิลิตร |
| IPTG (0.4 M) | 2.5 มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) และ IPTG มาละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ

55-60 องศาเซลเซียส ทำการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**6. อาหารแข็ง Luria-Bertani ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ X-gal ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LB+ampicillin+IPTG+X-gal agar)**

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | |
|---|---|
| Tryptone | 10 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |
| Sodium chloride | 10 กรัม |
| Agar | 14 กรัม |
| Ampicillin (10 mg/ml) | 10 มิลลิลิตร |
| IPTG (0.4 M) | 2.5 มิลลิลิตร |
| X-gal (20 mg/ml) | 5 มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin), IPTG และ X-gal มาละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ทำการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**7. อาหารแข็ง Luria-Bertani ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ MP ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MP agar)**

เตรียมสารเคมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |
| Agar | 14 | กรัม |
| Ampicillin (10 mg/ml) | 10 | มิลลิลิตร |
| IPTG (0.4 M) | 2.5 | มิลลิลิตร |
| Filter sterile MP (26.32 mg/ml) | 1.9 | มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin), IPTG และ MP มาละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ทำการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, IPTG ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ methyl parathion ความเข้มข้น 26.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

# ภาคผนวก ข

# สารเคมี

**1. สารละลาย Glucose/Tris/EDTA พีเอช 8.0 (GTE buffer)**

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | |
|---|---|
| Glucose | 9.01 กรัม |
| Tris base | 3.03 กรัม |
| EDTA | 2.92 กรัม |

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมให้เข้ากันในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (2 N NaOH)**

ละลายสาร NaOH 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ต่อโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (0.2 N NaOH:1%SDS)**

ผสมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์มอล และ SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนสารละลายมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น NaOH ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล และ SDS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ควรทำการเตรียมสารละลายผสมนี้ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

**4. สารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 4.8 (3 M sodium acetate, pH 4.8)**

ละลาย sodium acetate 24.6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยกรด glacial acetate จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (5 M NaCl)**

ละลาย NaCl 29.2 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. **สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8.0**

ละลาย Tris base 121.14 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั้งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**7. สารละลาย 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0**

ละลาย EDTA 181.64 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนจนละลาย เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ EDTA ละลายหมดพอดี แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**8. สารละลาย Tris/EDTA พีเอช 7.8 (TE buffer, pH 8.0; 10 mM Tris และ 1 mM EDTA)**

ละลาย Tris base 1.21 กรัม และ EDTA 0.29 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**9. สารละลายยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

**(10 mg/ml ampicillin)**

ละลายยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ทำการปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงสู่ภาชนะที่ปลอดเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**10. สารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 10 เท่า (10X TAE buffer)**

ละลาย Tris base 242 กรัม แล้วตวงสารต่างๆ ให้ได้ปริมาตรดังต่อไปนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| glacial acetic acid | ปริมาตร | 57.1 | มิลลิลิตร |
| 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0 | ปริมาตร | 100 | มิลลิลิตร |

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับพีเอชของสารละลายด้วยกรด glacial acetic จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 นำสารละลายที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**11. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (10 mg/ml ethidium bromide)**

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร และใช้เครื่องแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กวนจนละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชาหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ และเก็บให้พ้นแสง (ในระหว่างการเตรียม สวมถุงมือและระวังอย่าหายใจเอาผงเอธิเดียมโบรไมด์เข้าไปในระหว่างการชั่ง เนื่องจากผงของสารนี้ค่อนข้างละเอียดและเบา และสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen)

**12. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M $CaCl_2$)**

ละลาย $CaCl_2.2H_2O$ 1.47 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**13. สารละลาย Isopropylthio-$\beta$-D-Galactoside ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ (0.4 M IPTG)**

ละลาย IPTG 0.954 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ทำการปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงสู่ภาชนะที่ปลอดเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**14. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M HCl)**

เติมกรด concentrated HCl ปริมตร 86.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 913.18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ควรทำในตู้ดูดควัน เพราะไอกรดของกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเป็นควันฟุ้งกระจาย ซึ่งเป็นอันตรายเมื่อสูดดมเข้าไป)

**15. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M NaOH)**

ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่น ในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

**16. สารละลายบัฟเฟอร์ Osmotic Shock (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA และ 500 mM sucrose)**

ละลาย Tris-HCl 3.63 กรัม, EDTA 0.29 กรัม และ sucrose 171.15 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**17. สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 (50 mM phosphate buffer, pH 6.0)**

17.1 ละลาย dibasic sodium phosphate (MW 174.18) 1.7418 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร

17.2 ละลาย monobasic sodium phosphate (MW 136.09) 1.3609 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ตามอัตราส่วนที่แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 อัตราส่วนของสารในการเตรียม phosphate buffer

| pH | $K_2HPO_4$ (ml) | $KH_2PO_4$ (ml) | Total volume (ml) |
|---|---|---|---|
| 6 | 12.3 | 87.7 | 100 |

**18. สารละลาย Binding Buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride และ 10 mM imidazole, pH 7.4)**

ละลาย $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$ 3.90 กรัม, NaCl 8.77 กรัม และ imidazole 0.34 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 1 N NaOH จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

**19. สารละลาย Elution Buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride และ 150 mM imidazole, pH 7.4)**

ละลาย $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$ 3.90 กรัม, NaCl 8.77 กรัม และ imidazole 5.11 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 2 N HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

**20. สารละลาย Bis-Acrylamide ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร**

เตรียมสารเคมีดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Acrylamide | 29 | กรัม |
| Bis-Acrylamide | 1 | กรัม |

ละลายสารเคมีดังกล่าวด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บสารละลายใส่ขวดสีชาหรือขวดที่ห่อด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (สารละลายสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน)

**21. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8**

ละลาย Tris base 6.06 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั้งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

**22. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8**

ละลาย Tris base 18.17 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั้งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

**23. สารละลาย Electrophoresis Buffer ความเข้มข้น 10 เท่า พีเอช 8.3**

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Tris base | 30.29 | กรัม |
| Glycine | 144 | กรัม |
| SDS | 10 | กรัม |

ละลายสารเคมีทั้งหมดด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ตรวจสอบวัดค่าพีเอชของสารละลาย โดยค่าพีเอชของสารละลายควรมีค่าเท่ากับ 8.3 (หรืออยู่ในช่วง 8.1-8.5) ห้ามปรับค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างโดยเด็ดขาด

**24. สารละลาย Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร**

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร อุ่นด้วยความร้อนเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

**25. สารละลาย Ammonium Persulphate ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร**

ละลาย ammonium persulphate 0.1 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น (ควรเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

**26. สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (Staining Solution)**

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Coomassie brilliant blue R-250 | 0.25 | กรัม |
| Methanol | 100 | มิลลิลิตร |
| Acetic acid | 25 | มิลลิลิตร |

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

**27. สารละลายสำหรับล้างสีย้อม**

27.1 Destain solution I

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Methanol | 125 | มิลลิลิตร |
| Acetic acid | 25 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

27.2 Destain solution II

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Methanol | 12.5 | มิลลิลิตร |
| Acetic acid | 17.5 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

**28. สารละลายสีสังเคราะห์สำหรับผสมกับโปรตีน ความเข้มข้น 4 เท่า (4X gel loading dye)**

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| น้ำปราศจากไอออน | 4.6 | มิลลิลิตร |
| 10% (w/v) SDS | 4.8 | มิลลิลิตร |
| Glycerol | 2.4 | มิลลิลิตร |
| $\beta$-Mercaptoethanol | 1.2 | มิลลิลิตร |
| 0.05% (w/v) Bromophenol blue | 0.006 | กรัม |
| 0.5 M Tris-HCl พีเอช 6.8 | 3.0 | มิลลิลิตร |

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 16 มิลลิลิตร

# ภาคผนวก ค

# การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

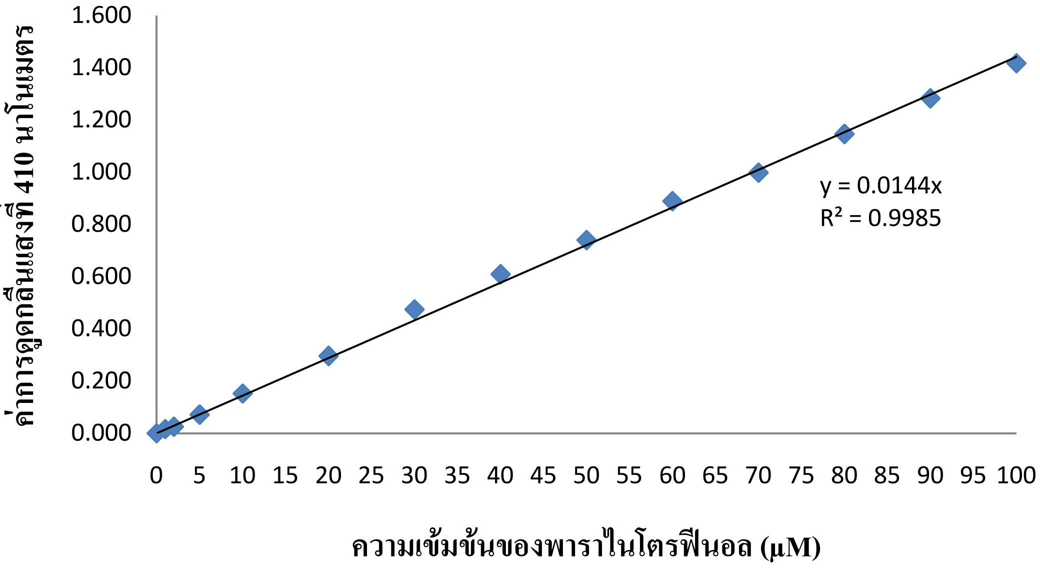
**1. กราฟมาตรฐานของ PNP จากวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี**

1.1 เตรียม PNP ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยละลายด้วยสารละลาย assay buffer (บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นเข้มข้น 0.1 โมลาร์, Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณเป็นกราฟมาตรฐาน PNP ดังตารางที่ 15 และภาพที่ 39 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PNP กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 นาโนเมตร

| ความเข้มข้นของ PNP (µM) | $OD_{410}$ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0.000 |
| 1.0 | 0.016 | 0.018 | 0.014 | 0.016 |
| 2.0 | 0.033 | 0.023 | 0.019 | 0.025 |
| 5.0 | 0.076 | 0.071 | 0.067 | 0.071 |
| 10 | 0.148 | 0.149 | 0.159 | 0.152 |
| 20 | 0.294 | 0.295 | 0.299 | 0.296 |
| 30 | 0.465 | 0.484 | 0.473 | 0.474 |
| 40 | 0.617 | 0.598 | 0.612 | 0.609 |
| 50 | 0.739 | 0.751 | 0.73 | 0.740 |
| 60 | 0.893 | 0.872 | 0.902 | 0.889 |
| 70 | 0.982 | 0.991 | 1.021 | 0.998 |
| 80 | 1.146 | 1.14 | 1.153 | 1.146 |
| 90 | 1.274 | 1.303 | 1.271 | 1.283 |
| 100 | 1.412 | 1.421 | 1.418 | 1.417 |




ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานของ PNP

1.3 การคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์} = \left[\frac{A_{410}\ \text{of sample}}{\text{slope}} \times \frac{10^{-3} \times 1000\ (\mu l)}{\text{amount of sample}}\right]$$

**2. กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน (Bovine Serum Albumin)**

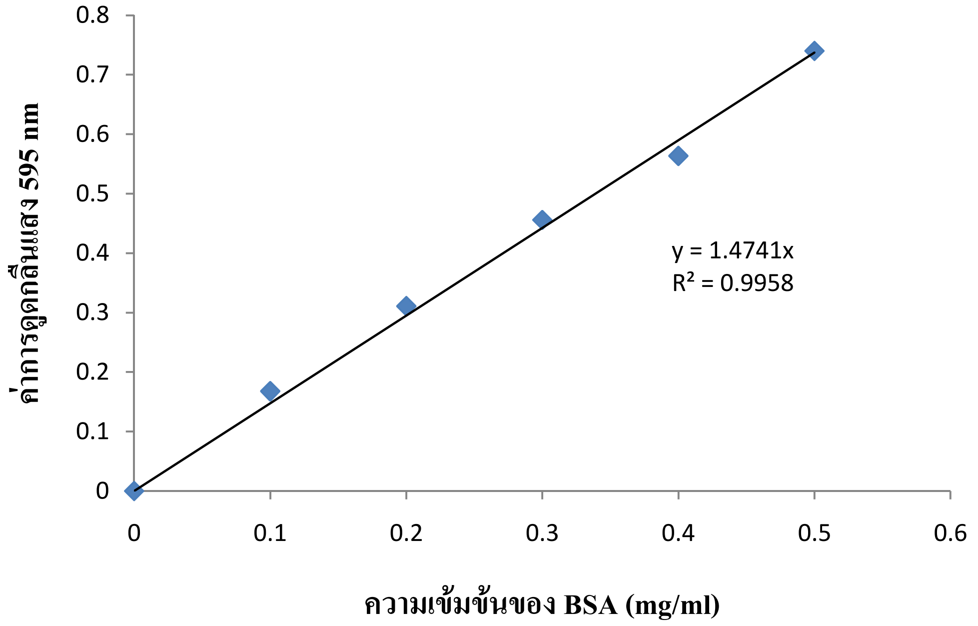
2.1 เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น

2.2 ปิเปตสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้นใส่ 96 wells plate หลุมละ 10 ไมโครลิตร และเติม Bradford dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณเป็นกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง ดังตารางที่ 16 และภาพที่ 40 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร

| ความเข้มข้น BSA (mg/ml) | $OD_{595}$ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.1 | 0.165 | 0.188 | 0.150 | 0.168 |
| 0.2 | 0.333 | 0.277 | 0.322 | 0.311 |
| 0.3 | 0.447 | 0.453 | 0.467 | 0.456 |
| 0.4 | 0.560 | 0.569 | 0.561 | 0.563 |
| 0.5 | 0.755 | 0.745 | 0.719 | 0.740 |




ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford method

2.4 การหาปริมาณโปรตีน

จากกราฟมาตรฐานของโปรตีน จะได้สมการ y = 1.4741x

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังนี้

$$\text{protein (mg/ml)} = \frac{OD_{595}}{1.4741} \times \text{dilution factor}$$

**3. กราฟโปรตีนมาตรฐานของ SDS-PAGE**

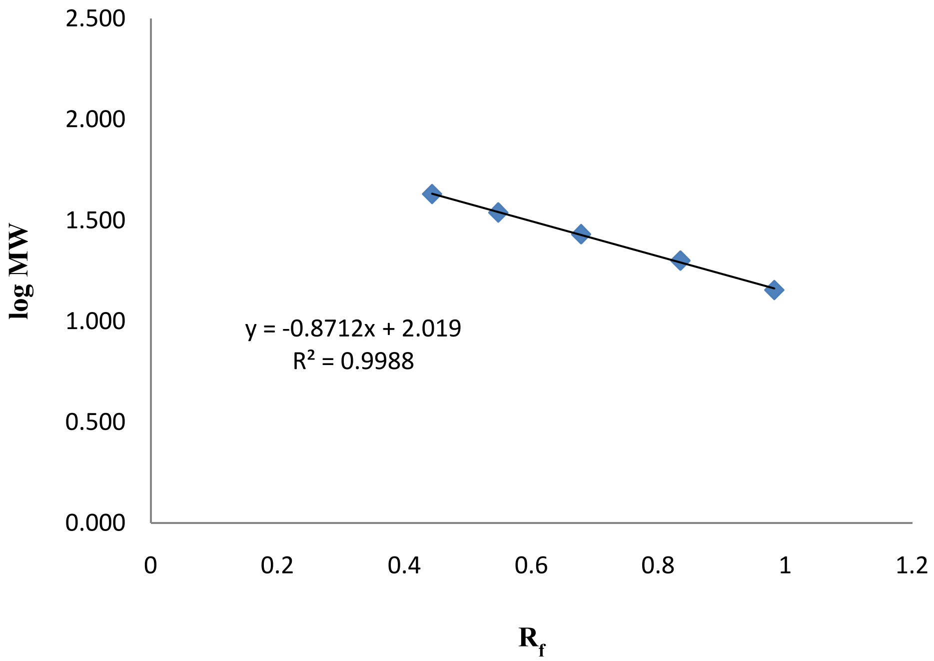
3.1 จากผลการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE สามารถวัดหาระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด และระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye เพื่อหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ($R_f$) ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye}}$$

3.2 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า $R_f$ โดยใช้ตารางที่ 17 เพื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า $R_f$

| **Protein marker** | **MW (kDa)** | **log MW** | **ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (cm)** | **ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye (cm)** | **$R_f$** |
|---|---|---|---|---|---|
| Maltose-binding protein | 42.7 | 1.630 | 2.55 | 5.75 | 0.443 |
| Thioredoxin reductase | 34.6 | 1.539 | 3.15 | 5.75 | 0.548 |
| Triosephosphate isomerase | 27.0 | 1.431 | 3.9 | 5.75 | 0.678 |
| Trypsin inhibitor | 20.0 | 1.301 | 4.8 | 5.75 | 0.835 |
| Lysozyme | 14.3 | 1.155 | 5.65 | 5.75 | 0.983 |




ภาพที่ 41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ($R_f$) ใน 12 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE

จากกราฟกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ($R_f$) ที่แสดงในภาพที่ 40 จะได้สมการ $y = -0.8712x + 2.019$

| | | | |
|---|---|---|---|
| โดย | y | คือ | ค่า log Molecular Weight |
| | x | คือ | ค่า $R_f$ |

วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ได้ 3.05 เซนติเมตร และระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye ได้ 5.75 เซนติเมตร

$$R_f = \frac{3.05 \text{ cm}}{5.75 \text{ cm}} = 0.5304$$

ค่า $R_f$ ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 0.5304

คำนวณหาค่า MW จากสมการจจะได้

$$\log MW = -0.8712(0.5304) + 2.019$$

$$MW = 10^{(1.557)}$$

$$= 36.05$$

ดังนั้น โปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36.05 กิโลดาลตัน

**4. การคำนวณปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน**

ค่าความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนนิยมแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว (% saturation) โดยจำนวนกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (g) ที่เติมลงในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{จำนวนกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (g)} = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0.3S_2}$$

เมื่อ $S_1$ คือ ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (% saturation) เริ่มต้น

$S_2$ คือ ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (% saturation) สุดท้าย

**การคำนวณจำนวนกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต**

ต้องการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาตรสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร คำนวณโดยแทนค่าในสมการดังนี้

$S_1$ ในกรณีนี้ยังไม่มีการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารตัวอย่างมาก่อน ดังนั้นความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในสารละลายตัวอย่างจึงมีค่าเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์

$S_2$ ในกรณีนี้ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตสุดท้ายที่ต้องการคือ 80 เปอร์เซ็นต์ แทนค่าในสมการ

$$\text{จำนวนกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (g)} = \frac{533(80-0)}{100-0.3(80)} = 561.05 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นต้องชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 561.05 กรัม เติมลงในสารตัวอย่าง ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

# ภาคผนวก ง

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|---|---|
| AchE | acetyl cholinesterase |
| *amp*$^r$ | ampicillin resistance gene |
| APS | ammonium persulfate |
| bp | base pair |
| BSA | bovine serum albumin |
| EDTA | ethylene diamine tetraacetic acid |
| FPLC | fast protein in liquid chromatography |
| His-tag | polyhistidin-tag |
| IPTG | isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside |
| kb | kilobase |
| kDa | kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LD | lethal dose |
| MCS | multiple cloning site |
| MP | methyl parathion |
| *mpdB* | methyl parathion-degrading gene |
| MPH | methy parathion hydrolase |
| MWCO | molecular weight cut off |
| *opa* | organophosphorus acid anhydrolase gene |
| *opd* | organophosphate- degrading gene |
| OPH | organophosphorus hydrolase |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PES | polyethersulphone |
| PNP | para-nitrophenol |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| TEMED | N, N, N’, N’-tetramethyl ethylenediamine |
| U | Unit |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-$\beta$-D-galactopyranoside |

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| ชื่อ-สกุล | นายเมธัส สวนจันทร์ |
| | Mr. Mathus Suanchan |
| วัน เดือน ปีเกิด | 5 สิงหาคม 2530 |
| ที่อยู่ | 15 หมู่ที่ 4 ตำบลจอมปลวก อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม 75120 |

ประวัติการศึกษา

| | |
|---|---|
| พ.ศ. 2548 | สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนถาวรานุกูล อำเภอเมืองฯ จังหวัดสมุทรสงคราม |
| พ.ศ. 2552 | สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร |
| พ.ศ. 2553 | ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร |

งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

| | |
|---|---|
| ระดับปริญญาตรี | การโคลนยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน |
| ระดับปริญญาโท | การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยยาฆ่า-แมลงเมทธิลพาราไธออน โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน |

การเสนอผลงานวิจัย

Poster presentation and Proceeding

| | |
|---|---|
| พ.ศ. 2553 | Wisoot Kaewmaha, Methus Suanchan and Jesdawan Wichitwechkarn. Cloning and expression of *mpdB* gene responsible for methyl parathion degradation using a vector designed for periplasmic secretion. The 22$^{th}$ Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB2010), 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand. |

พ.ศ. 2555 Methus Suanchan and Jesdawan Wichitwechkarn. Periplasmic secretion of recombinant *mpdB* gene responsible for methyl parathion degradation. The 24$^{th}$ Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB2012), 29-30 November 2012, Ubonratchathani, Thailand.

Oral presentation and Proceeding

พ.ศ. 2556 เมธัส สวนจันทร์ และเจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ. การหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ และการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ใน *Escherichia coli*. การประชุมวิชาการระดับชาติทางด้านวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี, 2-3 ธันวาคม 2556, คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยศิลปากร, วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์, ประเทศไทย.