วิธีการทดลอง

การเลี้ยง *Rhodopseudomonas palustris* strain CH72 เพื่อผลิต PHA

นำแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas palustris* strain CH72 (strain NCIB8288) มาเลี้ยงในอาหาร Glutamate-malate (GM) medium ต่อ 1 ลิตร ประกอบด้วย 3.8 g sodium glutamate, 2.7 g DL-malic acid, 2.0 g yeast extract, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g KH_2PO_4, 0.8 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.053 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mg nicotinic acid, 1 mg thiamine-HCl, 0.01 mg biotin, 1.2 mg $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.0 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.5 mg ferric citrate แล้วปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 1 N NaOH สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA คือ เลี้ยง *Rps. palustris* CH12 ใน micro-aerobic condition ที่มีแสง (2,000-2,500 Lux) ในอาหาร GM ที่ใช้ butyrate แทน sodium glutamate, pH 9.0 ที่ 35°C เป็นเวลา 3 วัน

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์

ภายหลังจากเลี้ยง *Rps. palustris* CH72 เป็นเวลา 3 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (เซลล์เปียก 0.62 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล.) แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 และปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที วางตะกอนเซลล์ที่ได้บนน้ำแข็ง แล้วเติม extraction buffer (10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 10 mM EDTA, and 1 mM DTT) 1.5 มล. ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex mixer และทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยปรับเปลี่ยนช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 1, 3, 4, 5, 6 และ 10 นาที โดยให้หยุดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นจึงนำเซลล์แตกเหล่านี้ไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ 4°C เพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase ต่อไป

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase (PHA synthase assay)

วิธีการวิเคราะห์ PHA synthase เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Dai and Reusch (2008) สารตั้งต้นที่ใช้คือ 0.88 mM DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A โดยละลายใน 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.088 mM DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A, 100 mM KCl, และ 100 µl ของสารละลายส่วนใสของเซลล์ที่ได้ภายหลังการทำให้เซลล์แตก บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.44 M TCA 20 µl ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 102 µl ลงใน eppendorf tube และเติม 1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ปริมาตร 573 µl วัดปริมาณหรือความเข้มข้นของ coenzyme A concentration ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำซ้ำ 2 ครั้งและมีแบลงค์เป็นตัวเปรียบเทียบ สำหรับการเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อาศัยกราฟมาตรฐานที่ทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยเทียบ 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยน 1 µmol DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A ไปเป็น coenzyme A ในเวลา 1 นาที

การเพิ่มจำนวน PHA synthase gene **โดยวิธี** polymerase chain reaction (PCR)

การออกแบบไพรเมอร์

เพื่อเพิ่มจำนวนของ phaC gene ใน *Rhodopseudomonas palustris* CH72 จึงทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของ phaC gene โดยการหาลำดับส่วนที่เป็น conserve sequence จากกลุ่มเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* CH72 ที่สายพันธุ์ใกล้เคียงกันโดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X

การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) **เพื่อเพิ่มปริมาณ** phaC gene **จาก** *Rhodopseudomonas palustris* CH72

ส่วนผสมต่างๆ ในปฏิกิริยาการทำ PCR เป็นดังนี้ คือ

Reaction			
10x (PCR buffer + MgCl2)		5.0	ul
10 mM dNTP mix		1.0	ul
10 mM Forward primer		1.5	ul
10 mM Reverse primer		1.5	ul
250 ug/ul template (cDNA)		5.0	ul
Taq polymerase 5 U/ul		0.4	ul
DI		35.6	ul
	Total	50	ul

สิ่งที่ปรับเปลี่ยน คืออุณหภูมิที่ใช้ในการทำ annealing โดยปรับเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิที่ 50, 52.5, 55, 60 °C ในช่วงเวลา 30 นาที

การวิเคราะห์ phaC gene **ที่เพิ่มจำนวน** (PCR product) **ด้วย** electrophoresis **เทียบกับ** marker (1 kb ladder)

นำ PCR product ที่ได้ภายหลังการทำ PCR ไปทำการวิเคราะห์ บน 1% agarose gel ที่มี marker เป็น 1 kb ladder

การทำบริสุทธิ์ PCR product

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ phaC gene ที่เพิ่มจำนวนข้างต้น ได้ทำการเพิ่มเวลาในการ run gel เพื่อแยกชิ้นส่วน 538 bp ออกมาโดยใช้ใบมีดตัด แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย PureLinkTM Quick Gel Extration Kit (Invitrogen) แล้วนำมาตรวจสอบบน 1.0% agarose gel electrophoresis

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้วยวิธี dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) โดยใช้ Pfu DNA polymerase ด้วยเครื่อง automated sequencer และใช้โปรแกรมของ PC/GENE package (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA) ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน แล้วหา sequence identities โดย CLUSTAL W ผ่านเข้าไปยัง GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) ซึ่งวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเชื่อมชิ้นส่วน PHA synthase gene(s) เข้าสู่ดีเอนเอพาหะ pGEM T-easy vector (Ligation)

ligation reaction

pGEM-T easy vector (50 ng)	0.5	l
PHA synthase gene	2.0	l
2x rapid ligation buffer	5.0	l
T4 DNA ligase	1	l
DI	1.5	l
Total	10.0	l

บ่มที่ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การนำ recombinant pGEM T-easy containing PHA synthase gene เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM109 competent cell (Transformation)

นำ ligation mixture ย้ายเข้าสู่ *E. coli* JM109 competent cell ด้วยวิธี heat shock โดยนำ *E. coli* JM109 competent cell 100 l จาก deep freezer -70°C จากนั้นเติม ligate mixture ปริมาตร 10 l ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที บ่มต่อที่ 42°C เป็นเวลา 1นาที และบนน้ำแข็งอีก 2 นาที เติม LB broth ปริมาตร 800 l บ่ม 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป spread plate บน SOC medium ที่มี ampicillin, IPTG และ X-gal ปริมาตร 1000 มล. โดยเติม 25 mg/ml ampicillin ปริมาตร 1 มล. 23 mg/ml IPTG ปริมาตร 1 มล. และ 2% X-gal ปริมาตร 2 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น pick colony ที่เป็นสีขาวที่เจริญได้มาบ่มบนในอาหารดังกล่าว

การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109

เลือกโคโลนี จากการ transformation แล้วสกัด plasmid ด้วย STET buffer (5% (w/v) glucose, 5% (v/v) Triton x-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) โดยนำ E. coli JM109 ที่คาดว่าได้รับ pGEM-T-Easy containing PHA synthase gene(s) แล้วมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 100 g/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1

นาที ทิ้งส่วนใส แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย STET buffer ปริมาตร 350-400 l ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปตั้งในน้ำเดือด 40 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที ปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนออกจาก eppendorf โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้ว และตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol ปริมาตร 350-400 l ผสมให้เข้ากันแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 25 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสออกโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง นำ recombinant vector ที่สกัดได้ ไปเปรียบเทียบกับ vector ก่อนที่จะทำ ligation โดยเปรียบเทียบบน 1% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์

ภายหลังการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator พบว่า ช่วงเวลา 1, 3 และ 4 นาที เป็นช่วงเวลาที่ไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์แตก และช่วงเวลา 5 นาที ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase ที่มากกว่าที่ช่วงเวลา 6 นาที และที่ช่วงเวลา 10 นาที ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ PHA synthase

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase

ภายหลังการสกัด PHA synthase ออกจากเซลล์ *Rps. palustris* CH72 และนำไปหากิจกรรมของ PHA synthase พบว่าสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.111 หรือคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 24.57 unit/ml เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานข้างล่างนี้ (Fig. 1)

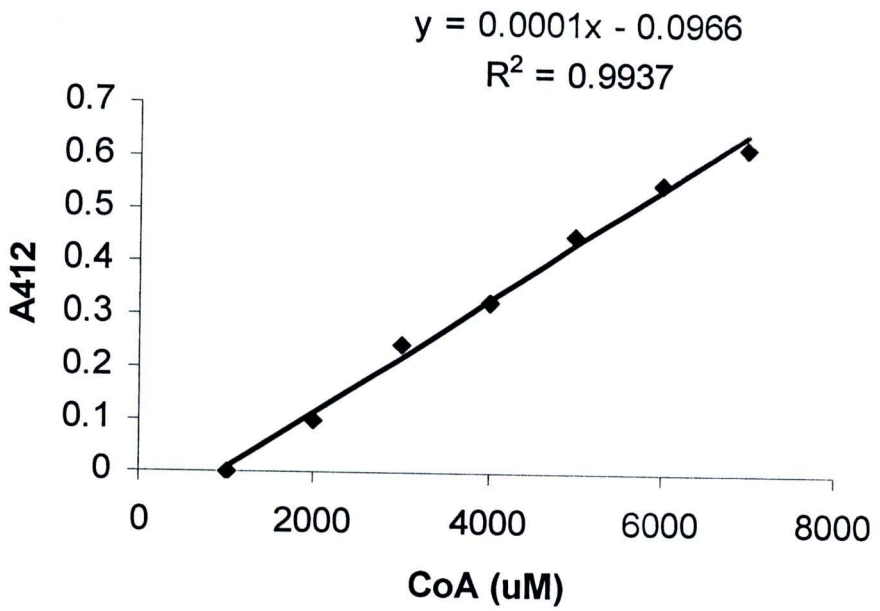


Fig. 1. Standard curve of coenzyme A (CoA)

การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์โดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณ conserve sequence มากที่สุดได้แก่ 5 กลุ่ม ดังนี้

- hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* BisA53]
- hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* TIE-1]
- phbC Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* CGA009]
- Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* HaA2]
- Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* BisB18]

โดยนำ sequences ข้างต้นไป alignment เพื่อหาบริเวณ conserve sequence โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นเลือกบริเวณที่ conserve ที่เหมาะสมที่สุดในการออกแบบไพรมอร์ เมื่อได้ตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบเรียบร้อยแล้วนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Vector NTI เพื่อตรวจสอบค่า Tm , %GC และ ค่า primer dimer

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากเชื้อแต่ละตัวแสดงให้เห็นดังนี้

```
>gi|115522030:3292637-3294439 Rhodopseudomonas palustris BisA53, complete genome
ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGGAACTTCAATCCAGACGCCTTCGCGTTGAATTTGG
CGAAGGCGATGGAGGCATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCCTATCTCAATCGCAACAAGATCGAGACGCCCGA
CAAGCCGCCCCCCGGAAATTGCCGAGGTGGTGAAGACTTTTTCGAGCGTCGCCGAGTACTGGCTGTCGGAC
CAGAAGCGGGCCGCCGACGTGCAGATGAAGCTCGGAAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACCAGGCGACGC
GGCGGTTGGCCGGGGAAAAGACCGAACCCACCATCGAGCCGCCGGCCCGCGACAAGCGCTTTGCCGATCC
GGAATGGAAGTCGAACCAGTTTTTCGATTTCCTGCTGCAGGCCTATCTCTTGACCACGCAATGGGCCCAG
GCGCTGGTGCGCGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCACACCCGCAAGAAGGCGGAGTTCTACGTCCAGCAGA
TCACCAACGCCTTGGCGCCGTCGAATTTCGTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTC
CAACGGCGACAATCTGGCGCGCGGCATGAAAATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAGGGCATGCTG
AAGATCCGGCAATCCGACCCGGGCAATCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGGCAAGGTGA
TCTTCCAGAACGAGCTGATGCAGCTCATCCAGTATCACCCGACCACCGAAACCGTGCTGCGCACGCCACT
GCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCCTTCATCAAA
TGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCGGACGAGGCGCTGCGGCACA
AATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCCGCTGACCGCGATGGATGTGATCGAAACGATCACCGGCGA
GATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTCGGCGGCACCCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGGCTGGCC
GACAAGCGCCGGGTGCGGGTCACCTCCGCGACCTTCCTGACCACGCAAGTCGACTTCACCCATGCCGGCG
ACTTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATCGCGGCGCTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGGCGTGCT
CGAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCCTACGTCGTC
AATAACTACCTGAAGGGCAAGTCGCCCTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACTCGACGCGGA
TGCCGGCGGCCAACCATTCCTATTATCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTCGGAAGGCAGCAT
GGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCCAAGGTCAAGGTGCCGGTCTACAACCTCGCCACCCGCGAG
GACCACATCGCCCCGGCGCAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATTCGTAC
TGTCCGGCTCCGGCCATATTGCCGGCGTGGTCAACCCGCCGGCCGCCGGCAAGTATCAATATTGGACCCG
CGACAGCATCGCGGCTGACAATCTCGAACAATGGCTGCAGGGGGCCGAGGAAAATCCGGGGTCGTGGTGG
CCGGACTGGCGGGCCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTCGCGGCCCGCAACGTCGGCAGCGAGG
CGATGCCGCCGATCGAGGATGCGCCCGGCAGCTATGTGCGAGTCCGCGCCTGA
```

ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/115522030/?from=3292637&to=3294439&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 249755
เลขเรียกหนังสือ

>gi|192288433:c3024368-3022563 Rhodopseudomonas palustris TIE-1, complete genome
ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCCCGCAATCTCG
CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCGCAAAACGGTGCCGTGCCACC
GGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCGAGCGTCGCCAATTACTGGCTA
TCCGACCAGGCCCGTTCTCATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGG
CCTCCAAGCGCCTCGCCGGCGAACAGGCCGAGCCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGCGACAAGCGGTTCGC
CTCACCGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTACCTGCTGACGACGCAGTGG
GCCGACGAACTGGTCAAGAACGCCGAGATCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCCGCGTTCTACGTCCAGC
AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
GGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAGTCAGGCCGCGGCCAT
CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCCGGGCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
GCTGCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCGGACAAGAGCCTCGCCG
ACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCGATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAGCGCCGCCGGGTCCGCGTTACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCG
GCGACCTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCCTACGTC
GTCAATAACTACCTGAAGGGCCAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAAGATCACATCGCGCCGGCGGAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGTGGCGAACAAGTACCTATTCTGGAC
CAACCCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGCGCCGAAGAGCACAAGGGGTCGTGG
TGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAGGTTCCCGCCCGCGCCATCGGCAACG
AAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTCAAAGTGCGATCCTGA

ที่มา:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/192288433/?from=3022563&to=3024368&strand=true&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

>gi|86747127:3380804-3382609 Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genome
ATGAGCGACATGCTACCAGAAACCAGCACGGCGAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCGCGTAATCTGG
CGCAGGCGATGGAGTGCGGCAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCGAGCGAGCCGATCGACGGTGT
CAAGCCGCCGACCGAACTGACGGAGATCGTCAAGACGCTCACCAGCGTCGCCACCTACTGGATGTCCGAC
CAGACCCGCGCCGCGGAGCTGCAGACGAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCCTCCA
AGAAGCTCGCCGGCGAGACGGCCGTCGCCCCGACCATCGAGCCGCCGGCGCGCGACAAGCGTTTCGCCGA
TCCGGACTGGCGAAAGAACCAGTTCTACGAATTCATCATGCAGGCCTATCTGTTGACCTCGCAATGGGCC
AACGAGCTGGTCGAGAAGGCCGACGGCCTCGACCCGCACACCAAGCGAAAGGCCGCATTCTACATCCAGC
AGATCACCAACGCGATGGCGCCGTCGAACTTCGTGCCGACCAATCCGGAATTGACCCGGCTGACGCTCGA
GAACAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAGATGCTCGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAAGGCCAT
CTCAAGATTCGCCAGTCCGACCCGTCCAATCTGGAAGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAACTGATCCAGTACACGCCCGCGACCGAGACGGTGCTGCGCACGCC
TCTGCTGATCGTGCCGCCATGGATCAACAAGTTCTACATTCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATACTGCGTCGACCAGGGTCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCCGACAAGCGCCTCGCCG
ACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGGCCGCTGACCGCGATGGACGTGATCGAGAAGGTCACCGG
CGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTG
GCCGAGCGCCGCCGCCAGCGCGTCACCTCGGCGACCTTCCTGACCACCCAGGTCGATTTCACCCATGCCG
GCGACCTCAGCGTGTTCGTCGACGAGGGCCAGATCTCGGCGCTGGAGCGCGACATGCAGACGACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAGGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGGTCGAACGACCTGATCTGGTCCTATGTG
GTCAGCAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCCGCCGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCTTACTATCTGCGCAACTGTTATCTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTCGAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAGGACCACATCGCGCCGGCGGAATCCGTGCTGTACGGTTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAATATCAGTACTGGAC
CAGCGAGACCATCCGCGCCGGCTCGGTCGCCGAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGTTCGTGG
TGGCCGGACTGGCGCGAATGGGTCGGCAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCCTGCCCGCGGCATCGGCAACG
AGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCCCCCGGCAGCTACGTCCGGGTGCGATCCTGA

ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/86747127/?from=3380804&to=3382609&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

>gi|39933080:c2844051-2842246 Rhodopseudomonas palustris CGA009, complete genome
ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCGCCCGCAATCTGG
CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCGCAGAACGGTGCCGTGCCACC
GGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTA
TCCGACCAGGCTCGTTCCAATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGG
CCTCCAAGCGGCTCGCCGGCGAACAGGCCGAGCCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTCGC
CTCACCGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTATCTGCTGACGACGCAGTGG
GCGGACGAGCTGGTCAAGAACGCCGAGATCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCCGCGTTCTACGTCCAGC
AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
GGCCAGCGGCGACAATCTGGTTCGCGGCATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCAC
CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCCGGCCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
GCTGCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCGGACAAGAGCCTCGCCG
ACAAGGATTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCGATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAGCGCCGCCGGGTGCGCGTCACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCG
GCGACTTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCCTACGTC
GTCAACAACTACCTGAAGGGACAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACAAGCTGTCCGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAAGACCACATCGCGCCGGCGGAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCG
TGCTGTCCGGCTCCGGTCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAGTACCAATTCTGGAC
CAACCCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGTGCCGAAGAGCACAAGGGGTCGTGG
TGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAAGTTCCCGCCCGCGCCATCGGCAACG
AAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTTAAAGTGCGATCCTGA

ที่มา:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/39933080/?from=2842246&to=2844051&strand=true&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

>gi|90421528:3061264-3063069 Rhodopseudomonas palustris BisB18, complete genome
ATGAGTGAGATGATCACCGAAACCAAGCCTGCCCCGGGCTTCGACCCCGAGGCTTTCGCGCTCAATCTGG
CGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGGCGCTGGCAACTTATTTAAAGCCGCGTGACAGCGCCGAGCCGCT
CGACAAGCCGCCGGCGGAACTCACCGAAGTGGTGAAGACGCTGTCGGCGGTGGCGAACTACTGGTTGTCC
GACAAGGACCGCGCCACCGAGATCCAGACCAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGATCTGTGGGGCGTCGCGA
TGCGGCGGATGGCCGGCGAAGACGCCGCCGCCGTCATCGAAGTGCCGCCGCGCGACAAGCGCTTCAGCGC
CCCGGAATGGAAGTCCAGCCCGTTGTTCGATTTCCTGGTGCAGGCCTATCTGTTGACCACGCAATGGGCC
TACCAGCTGGTGCGCGACGCCGAAGACATCGACCCGCATACCAAGAAGAAGGCCGAGTTCTACATCCAGC
AGATCACCAACGCGCTGGCACCGTCGAATTTCGTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGC
CTGCAACGCCGACAATCTGGTGCGCGGCATGACCATGCTGGCCGAGGACATCGCGGCGGGCAACGGCCAG
TTGCGGATCCGGCAGTCCGACCCGGCCAATCTGGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAATTGATGCAGCTGATCCAATATCAGCCGACCACCGAGAACGTGCTGCGCACGCC
GCTGTTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAAAATCCTTCGTC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCGTCACGGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCCGACAAGAGCCTCGGCC
ACAAGACCTTCGACGACTACATGAAACAGGGTCCGCTGACCGCGATGGACGTCATCGAACAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCGCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAAAAGCGCCGGGTCCGCGTCACCTCGGCGACGCTGCTCACCACCCAGGTGGATTTCACCAATGCCG
GCGATCTCTTGGTGTTCGTCGACGAGGATCAGATCGCCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAGGCCAGCGGCGT
GCTGGAAGGCTCGAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCCTATGTG
GTCAATAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCGTCGGCGTTCGACCTGTTGCACTGGAACTCCGATTCGACGC
GGATGCCGGCGGCGAACCATTCCTATTATTTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCCTGCTCGACCTTTCCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAGGACCACATCGCGCCGGCGGACTCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAACCCGCCGGCCGCGGGCAAGTATCAATATTGGAC
CAACGAGGCCAGCACGGCGTCGACCGTCGCCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGCTCGTGG
TGGCCGGACTGGCGGCAATGGCTGACCGGCATCGACCCCGAAGAAGTCCCGGCGCGCAGCGTCGGCACCG
AGGCCCTGCCGCCGCTCGAGGATGCGCCGGGCAGCTACGTCCGGGTGCGGGCCTGA

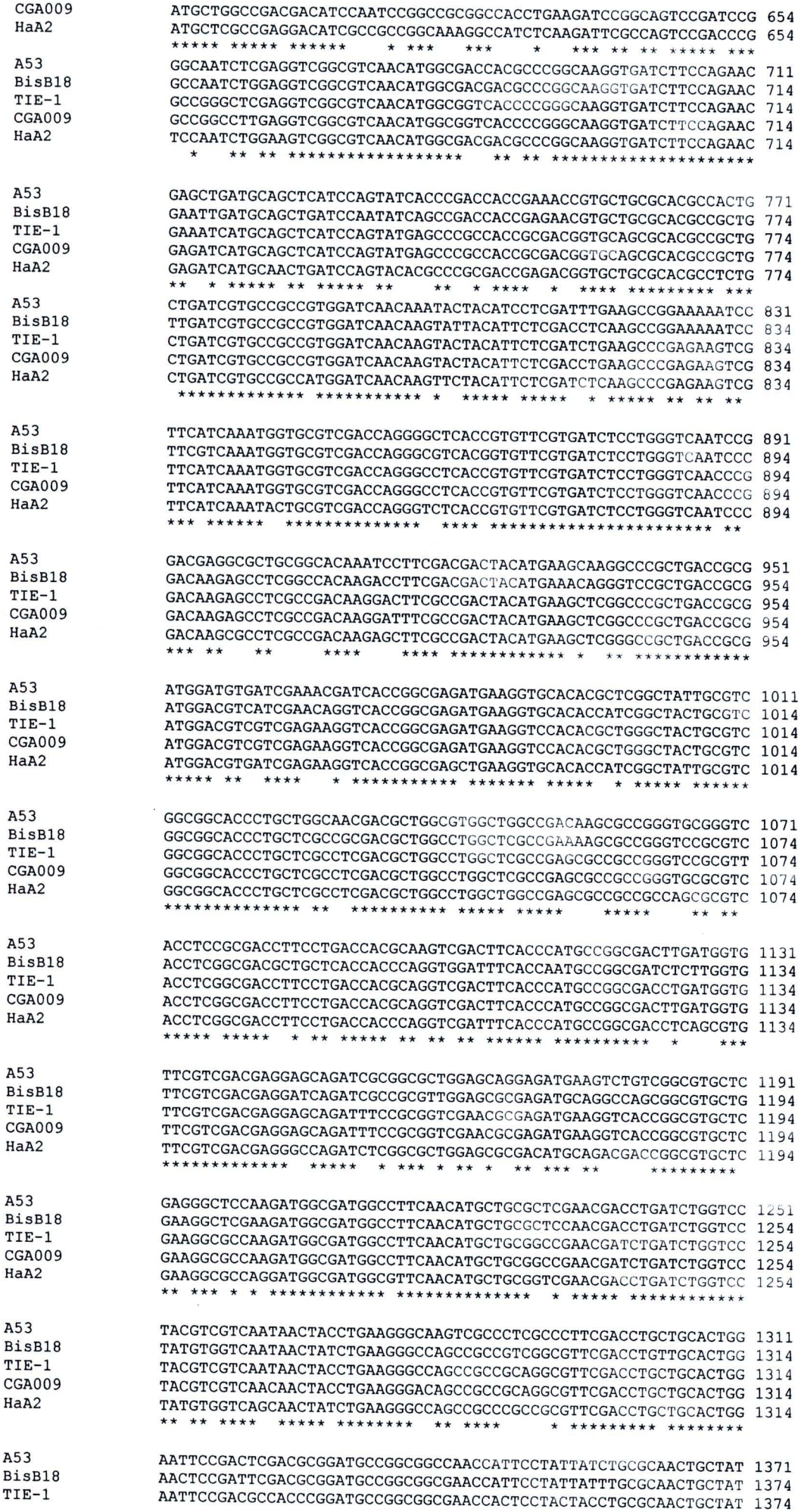
ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/90421528/?from=3061264&to=3063069&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

ผลการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X

ส่วนที่แสดงเป็น * คือบริเวณ conserve sequence

```
A53             ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGGAACTTCAATCCAGACGCCTTCGCG 60
BisB18          ATGAGTGAGATGATCACCGAAACCAAGCCTGCCCCGGGCTTCGACCCCGAGGCTTTCGCG 60
TIE-1           ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCC 60
CGA009          ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCGCC 60
HaA2            ATGAGCGACATGCTACCAGAAACCAGCACGGCGAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCG 60
                **** ** *** *  * *** *     * **   *   *** * ** ** ** *****

A53             TTGAATTTGGCGAAGGCGATGGAGGCATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCCTATCTCAATC-- 118
BisB18          CTCAATCTGGCGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGGCGCTGGCAACTTATTTAAAGCCG 120
TIE-1           CGCAATCTCGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG 120
CGA009          CGCAATCTGGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG 120
HaA2            CGTAATCTGGCGCAGGCGATGGAGTGCGGCAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCG 120
                   *** * ***   ** ******       ** ****  * **  *     * **

A53             -GCAACAAGATCGAGACGCC---CGACAAGCCGCCCCCGGAAATTGCCGAGGTGGTGAAG 174
BisB18          CGTGACAGCGCCGAGCCGCT---CGACAAGCCGCCGGCGGAACTCACCGAAGTGGTGAAG 177
TIE-1           CAAAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG 180
CGA009          CAGAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG 180
HaA2            ---AGCGA-GCCGATCGAC--GGTGTCAAGCCGCCGACCGAACTGACGGAGATCGTCAAG 174
                     *     **     *     *   * *****  * *   *  * **  * ** ***

A53             ACTTTTTCGAGCGTCGCCGAGTACTGGCTGTCGGACCAGAAGCGGGCCGCCGACGTGCAG 234
BisB18          ACGCTGTCGGCGGTGGCGAACTACTGGTTGTCCGACAAGGACCGCGCCACCGAGATCCAG 237
TIE-1           AGCTTCTCGAGCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACCAGGCCCGTTCTCATGAGCTGCAG 240
CGA009          AGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACCAGGCTCGTTCCAATGAGCTGCAG 240
HaA2            ACGCTCACCAGCGTCGCCACCTACTGGATGTCCGACCAGACCCGCGCCGCGGAGCTGCAG 234
                *   *  *    ** **    ****** * ** *** **   **  *    **  * ***

A53             ATGAAGCTCGGAAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACCAGGCGACGCGGCGGTTGGCCGGG 294
BisB18          ACCAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGATCTGTGGGGCGTCGCGATGCGGCGGATGGCCGGC 297
TIE-1           CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCTCCAAGCGCCTCGCCGGC 300
CGA009          CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCTCCAAGCGGCTCGCCGGC 300
HaA2            ACGAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCCTCCAAGAAGCTCGCCGGC 294
                     ****** ** ** ******** ** ***  *   **      *    * *****

A53             GAAAAGACCGAA---CCCACCATCGAGCCGCCGGCCCGCGACAAGCGCTTTGCCGATCCG 351
BisB18          GAAGACGCCGCC---GCCGTCATCGAAGTGCCGCCGCGCGACAAGCGCTTCAGCGCCCCG 354
TIE-1           GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGCGACAAGCGGTTCGCCTCACCG 357
CGA009          GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTCGCCTCACCG 357
HaA2            GAGACGGCCGTCGCCCCGACCATCGAGCCGCCGGCGCGCGACAAGCGTTTCGCCGATCCG 354
                **     ***      *    ****      ** * ** ******** **   *   ***

A53             GAATGGAAGTCGAACCAGTTTTTCGATTTCCTGCTGCAGGCCTATCTCTTGACCACGCAA 411
BisB18          GAATGGAAGTCCAGCCCGTTGTTCGATTTCCTGGTGCAGGCCTATCTGTTGACCACGCAA 414
TIE-1           GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTACCTGCTGACGACGCAG 417
CGA009          GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTATCTGCTGACGACGCAG 417
HaA2            GACTGGCGAAAGAACCAGTTCTACGAATTCATCATGCAGGCCTATCTGTTGACCTCGCAA 414
                ** ***      * *  *** * *** *** * *  ********** **  ****  ****

A53             TGGGCCCAGGCGCTGGTGCGCGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCACACCCGCAAGAAGGCG 471
BisB18          TGGGCCTACCAGCTGGTGCGCGACGCCGAAGACATCGACCCGCATACCAAGAAGAAGGCC 474
TIE-1           TGGGCCGACGAACTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCC 474
CGA009          TGGGCGGACGAGCTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCC 474
HaA2            TGGGCCAACGAGCTGGTCGAGAAGGCCGACGGCCTCGACCCGCACACCAAGCGAAAGGCC 474
                ***** *    *****     * *****     **** ***** ***      *****

A53             GAGTTCTACGTCCAGCAGATCACCAACGCCTTGGCGCCGTCGAATTTCGTGCTGACCAAT 531
BisB18          GAGTTCTACATCCAGCAGATCACCAACGCGCTGGCACCGTCGAATTTCGTGCTGACCAAT 534
TIE-1           GCGTTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAAT 534
CGA009          GCGTTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAAT 534
HaA2            GCATTCTACATCCAGCAGATCACCAACGCGATGGCGCCGTCGAACTTCGTGCCGACCAAT 534
                *  ****** ******** ****** ***  **** ** ** ** ******  *******

A53             CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTCCAACGGCGACAATCTGGCGCGCGGCATGAAA 591
BisB18          CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTGCAACGCCGACAATCTGGTGCGCGGCATGACC 594
TIE-1           CCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG 594
CGA009          CCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTTCGCGGCATGAAG 594
HaA2            CCGGAATTGACCCGGCTGACGCTCGAGAACAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG 594
                ***** **   **   ****** *    ** ** ***********  **********

A53             ATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAGGGCATGCTGAAGATCCGGCAATCCGACCCG 651
BisB18          ATGCTGGCCGAGGACATCGCGGCGGGCAACGGCCAGTTGCGGATCCGGCAGTCCGACCCG 654
TIE-1           ATGCTGGCCGACGACATCCAGTCAGGCCGCGGCCATCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG 654
```


CGA009 ATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCACCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG 654
HaA2 ATGCTCGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAAGGCCATCTCAAGATTCGCCAGTCCGACCCG 654
A53 GGCAATCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 711
BisB18 GCCAATCTGGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
TIE-1 GCCGGGCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
CGA009 GCCGGCCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
HaA2 TCCAATCTGGAAGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
A53 GAGCTGATGCAGCTCATCCAGTATCACCCGACCACCGAAACCGTGCTGCGCACGCCACTG 771
BisB18 GAATTGATGCAGCTGATCCAATATCAGCCGACCACCGAGAACGTGCTGCGCACGCCGCTG 774
TIE-1 GAAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCCGCTG 774
CGA009 GAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCCGCTG 774
HaA2 GAGATCATGCAACTGATCCAGTACACGCCCGCGACCGAGACGGTGCTGCGCACGCCTCTG 774
A53 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCC 831
BisB18 TTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAAAATCC 834
TIE-1 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
CGA009 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
HaA2 CTGATCGTGCCGCCATGGATCAACAAGTTCTACATTCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCG 834
A53 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCG 891
BisB18 TTCGTCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCGTCACGGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
TIE-1 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
CGA009 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCG 894
HaA2 TTCATCAAATACTGCGTCGACCAGGGTCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
A53 GACGAGGCGCTGCGGCACAAATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCCGCTGACCGCG 951
BisB18 GACAAGAGCCTCGGCCACAAGACCTTCGACGACTACATGAAACAGGGTCCGCTGACCGCG 954
TIE-1 GACAAGAGCCTCGCCGACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCG 954
CGA009 GACAAGAGCCTCGCCGACAAGGATTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCG 954
HaA2 GACAAGCGCCTCGCCGACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGGCCGCTGACCGCG 954
A53 ATGGATGTGATCGAAACGATCACCGGCGAGATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTC 1011
BisB18 ATGGACGTCATCGAACAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTC 1014
TIE-1 ATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
CGA009 ATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
HaA2 ATGGACGTGATCGAGAAGGTCACCGGCGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTC 1014
A53 GGCGGCACCCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGGCTGGCCGACAAGCGCCGGGTGCGGGTC 1071
BisB18 GGCGGCACCCTGCTCGCCGCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAAAAGCGCCGGGTCCGCGTC 1074
TIE-1 GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCCGGGTCCGCGTT 1074
CGA009 GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCCGGGTGCGCGTC 1074
HaA2 GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTGGCCGAGCGCCGCCAGCGCGTC 1074
A53 ACCTCCGCGACCTTCCTGACCACGCAAGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1131
BisB18 ACCTCGGCGACGCTGCTCACCACCCAGGTGGATTTCACCAATGCCGGCGATCTCTTGGTG 1134
TIE-1 ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACCTGATGGTG 1134
CGA009 ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1134
HaA2 ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACCCAGGTCGATTTCACCCATGCCGGCGACCTCAGCGTG 1134
A53 TTCGTCGACGAGGAGCAGATCGCGGCGCTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGGCGTGCTC 1191
BisB18 TTCGTCGACGAGGATCAGATCGCCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAGGCCAGCGGCGTGCTG 1194
TIE-1 TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGTGCTC 1194
CGA009 TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGTGCTC 1194
HaA2 TTCGTCGACGAGGGCCAGATCTCGGCGCTGGAGCGCGACATGCAGACGACCGGCGTGCTC 1194
A53 GAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCC 1251
BisB18 GAAGGCTCGAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCC 1254
TIE-1 GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
CGA009 GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
HaA2 GAAGGCGCCAGGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGGTCGAACGACCTGATCTGGTCC 1254
A53 TACGTCGTCAATAACTACCTGAAGGGCAAGTCGCCCTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGG 1311
BisB18 TATGTGGTCAATAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCGTCGGCGTTCGACCTGTTGCACTGG 1314
TIE-1 TACGTCGTCAATAACTACCTGAAGGGCCAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
CGA009 TACGTCGTCAACAACTACCTGAAGGGACAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
HaA2 TATGTGGTCAGCAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCCGCCGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
A53 AATTCCGACTCGACGCGGATGCCGGCGGCCAACCATTCCTATTATCTGCGCAACTGCTAT 1371
BisB18 AACTCCGATTCGACGCGGATGCCGGCGGCGAACCATTCCTATTATTTGCGCAACTGCTAT 1374
TIE-1 AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTAT 1374

```
CGA009          AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTAT 1374
HaA2            AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCTTACTATCTGCGCAACTGTTAT 1374
                ** *****  * ** ************** ***** ** ** **  ********** ***

A53             CTCGACAACCGGCTGTCGGAAGGCAGCATGGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCC 1431
BisB18          CTCGACAACCGGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCCTGCTCGACCTTTCC 1434
TIE-1           CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC 1434
CGA009          CTCGACAACAAGCTGTCCGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC 1434
HaA2            CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTCG 1434
                *********  ****** *  **** ********* **  ****   ****** **  *

A53             AAGGTCAAGGTGCCGGTCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCCCCGGCGCAG 1491
BisB18          AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAC 1494
TIE-1           AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGATCACATCGCGCCGGCGGAG 1494
CGA009          AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGACCACATCGCGCCGGCGGAG 1494
HaA2            AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAA 1494
                *************** ********************** ** ******** ****** *

A53             TCGGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATTCGTACTGTCCGGCTCC 1551
BisB18          TCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC 1554
TIE-1           TCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCGTGCTGTCCGGCTCC 1554
CGA009          TCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCGTGCTGTCCGGCTCC 1554
HaA2            TCCGTGCTGTACGGTTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC 1554
                ** *********** ***** *********** ********** *** ************

A53             GGCCATATTGCCGGCGTGGTCAACCCGCCGGCCGCCGGCAAGTATCAATATTGGACCCGC 1611
BisB18          GGCCACATCGCCGGCGTGATCAACCCGCCGGCCGCGGGCAAGTATCAATATTGGACCAAC 1614
TIE-1           GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGTGGCGAACAAGTACCTATTCTGGACCAAC 1614
CGA009          GGTCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAGTACCAATTCTGGACCAAC 1614
HaA2            GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAATATCAGTACTGGACCAGC 1614
                ** ** ** ********* **** *******  **   *** ** *  *  ******  *

A53             GACAGCATCGCGGCTGACAATCTCGAACAATGGCTGCAGGGGGCCGAGGAAAATCCGGGG 1671
BisB18          GAGGCCAGCACGGCGTCGACCGTCGCCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGC 1674
TIE-1           CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGCGCCGAAGAGCACAAGGGG 1674
CGA009          CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGTGCCGAAGAGCACAAGGGG 1674
HaA2            GAGACCATCCGCGCCGGCTCGGTCGCCGAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGT 1674
                     ** *   **         ***   * *** *  * ** **  * **  *   ***

A53             TCGTGGTGGCCGGACTGGCGGGCCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTCGCGGCC 1731
BisB18          TCGTGGTGGCCGGACTGGCGGCAATGGCTGACCGGCATCGACCCCGAAGAAGTCCCGGCG 1734
TIE-1           TCGTGGTGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAGGTTCCCGCC 1734
CGA009          TCGTGGTGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAAGTTCCCGCC 1734
HaA2            TCGTGGTGGCCGGACTGGCGCGAATGGGTCGGCAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCCTGCC 1734
                ************** *****    *** *         ***   ***  * **  * **

A53             CGCAACGTCGGCAGCGAGGCGATGCCGCCGATCGAGGATGCGCCCGGCAGCTATGTGCGA 1791
BisB18          CGCAGCGTCGGCACCGAGGCCCTGCCGCCGCTCGAGGATGCGCCGGGCAGCTACGTCCGG 1794
TIE-1           CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTCAAA 1794
CGA009          CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTTAAA 1794
HaA2            CGCGGCATCGGCAACGAGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCCCCCGGCAGCTACGTCCGG 1794
                ***  * ****** ***  *    * **** * ** ** ** ** ******** **

A53               GTCCGCGCCTGA 1803
BisB18            GTGCGGGCCTGA 1806
TIE-1             GTGCGATCCTGA 1806
CGA009            GTGCGATCCTGA 1806
HaA2              GTGCGATCCTGA 1806
                  ** **  *****
```

จากข้อมูลเบื้องต้น นำมาออกแบบ primer ผลที่ได้แสดงดังตารางข้างล่าง

Table 1 primer design of *phaC* gene

Primer Name	Primer Sequence	Tm (°C)	Length (bases)	Product Region	Product Length (bases)
Forward	GGCAAGGTGATCTTCCAGAACG	51.6	22	766 -1304	538
Reverse	CGCAGCATGTTGAASGCCATCG	53.4	22		

การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ phaC gene จาก *Rhodopseudomonas palustris* CH72

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR มีการทดลองใช้อุณหภูมิของ PCR Condition : Steps Temperature Time โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ขั้นตอนของ annealing ได้แก่ 50, 52.5, 55, 60 °C ในช่วงเวลา 30 วินาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ 52.5°C ในช่วงเวลา 30 นาที เนื่องจากที่อุณหภูมินอกเหนือจากนี้ จะไม่พบแถบดีเอนเอภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

Initial denaturing	95.0 °C	5 min	
Denaturing	95.0 °C	2 min	
Annealing	52.5 °C	30 sec	35X
Extension	72.0 °C	2 min	
Cool and hold	72.0 °C	10 min	
	8.0 °C	∞	

การวิเคราะห์ phaC gene **ที่เพิ่มจำนวน** (PCR product) **ด้วย** Electrophoresis **เทียบกับ** marker (1 kb ladder)

ชิ้นส่วนของ PCR product **ที่ได้ มี** 2 **ชิ้น ปรากฏบน** agarose gel **กล่าวคือได้ชิ้นส่วนขนาด** 538 bp **และขนาดที่ต่ำกว่า** 538 bp (Fig. 2)

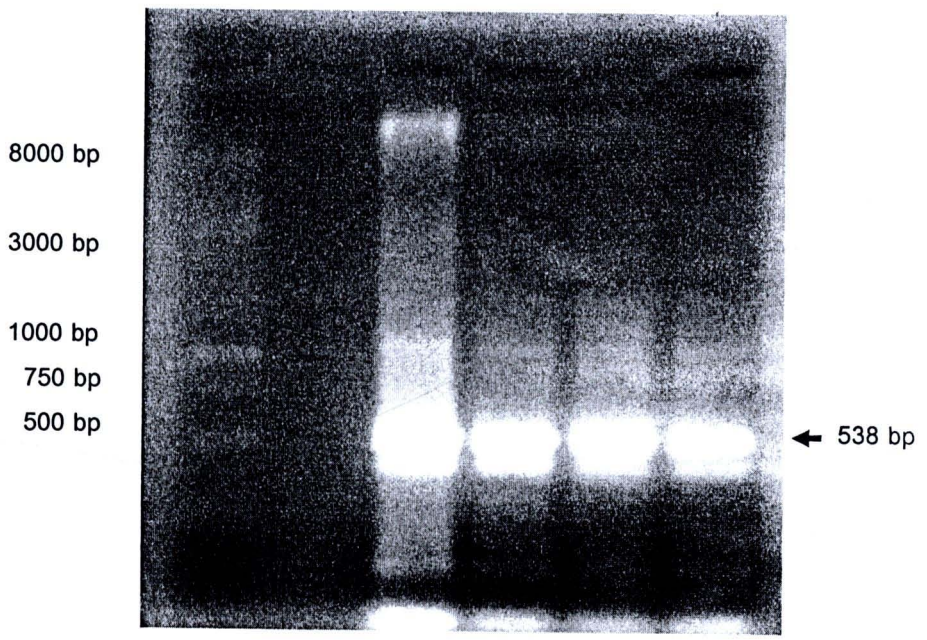
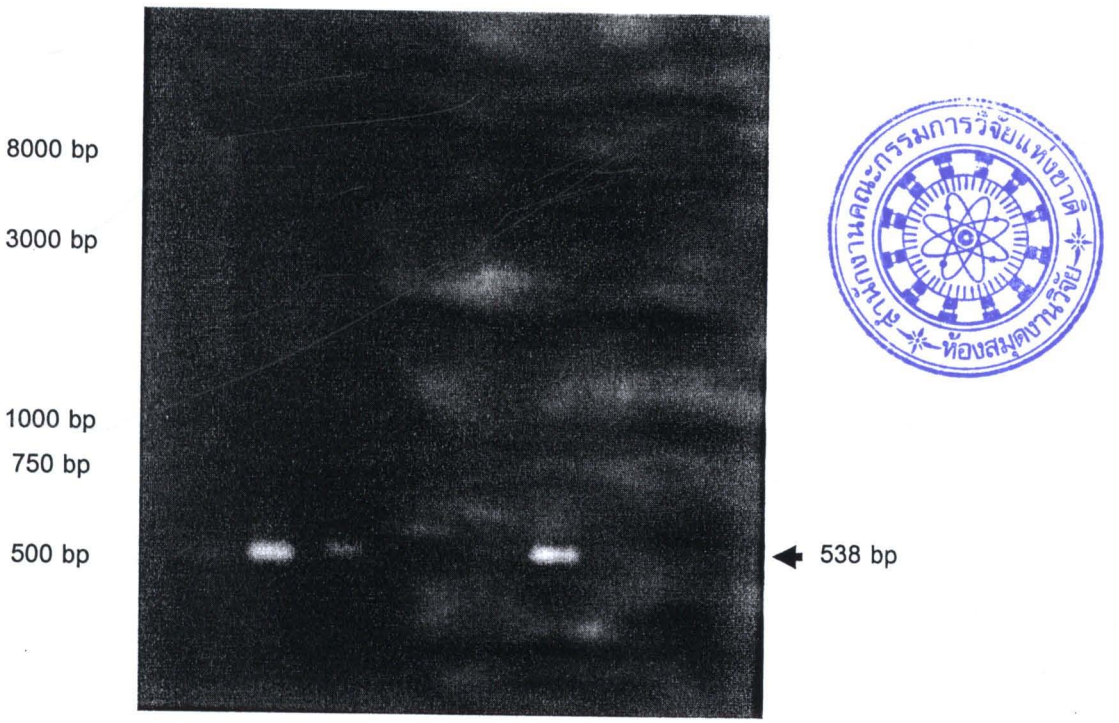


Fig. 2 *phaC* gene amplified by PCR

การทำบริสุทธิ์ PCR product

ภายหลังการทำ agarose gel electrophoresis พบว่าชิ้นส่วนที่แยกได้และภายหลังการทำให้บริสุทธิ์มีขนาด 538 bp โดยไม่มีชิ้นส่วนอื่นปนเปื้อน ดังรูปข้างล่าง (Fig. 3)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Fig. 3 amplified *phaC* gene after purification by PureLinkTM Quick Gel Extration Kit (Invitrogen)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

พบว่าไม่สามารถอ่านนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวได้ชัดเจน แต่ไม่แน่ใจว่าเกิดจากความผิดพลาดของการทดลองหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองต่อ เพื่อจะตัดชิ้นส่วนภายหลังการ ligation และ transformation มาทดลองซ้ำในขั้นตอนนี้

การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109 ภายหลังการทำ ligation และ transformation

ภายหลังจากการทำ ligation และ transformation ได้ทำการ pick colony ที่เป็นสีขาวทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่หลายโคโลนีที่เจริญ มาแยกเลี้ยงเพื่อสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109 พบว่า ไม่ปรากฏความแตกต่างของชิ้นส่วนของ vectors ทั้งหมดดังกล่าว