

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 μ l ของสารละลายส่วนใสของเซลล์ที่ได้ภายหลังการทำให้เซลล์แตก บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.44 M TCA 20 μ l ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 102 μ l ลงใน eppendorf tube และเติม 1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ปริมาตร 573 μ l วัดปริมาณหรือความเข้มข้นของ coenzyme A concentration ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำซ้ำ 2 ครั้งและมีเบลงค์เป็นตัวเปรียบเทียบ สำหรับการเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อาศัยกราฟมาตรฐานที่ทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยเทียบ 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยน 1 μ mol 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 + MgCl ₂)	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 PureLink™ 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) เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ 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 1 นาที และบนน้ำแข็งอีก 2 นาที เติมน้ำ 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 ที่คาดว่าจะได้รับ 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 ที่ทั้งส่วนใส 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 ที่ทั้งส่วนใส แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง นำ recombinant vector ที่สกัดได้ ไปเปรียบเทียบกับ vector ก่อนที่จะทำ ligation โดยเปรียบเทียบ บน 1% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์

ภายหลังการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator พบว่า ช่วงเวลา 1, 3 และ 4 นาที เป็นช่วงเวลาที่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์แตก 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)

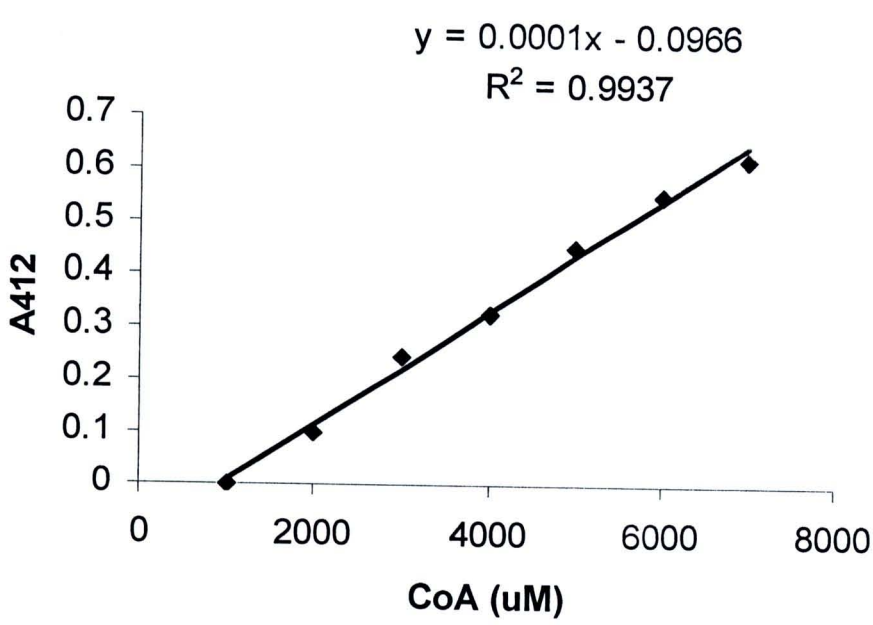


Fig. 1. Standard curve of coenzyme A (CoA)

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 ที่เหมาะสมที่สุดในการออกแบบไพรเมอร์ เมื่อได้ตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบเรียบร้อยแล้วนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Vector NTI เพื่อตรวจสอบค่า Tm , %GC และ ค่า primer dimer

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากเชื้อแต่ละตัวแสดงให้เห็ดังนี้

```
>g1|115522030:3292637-3294439 Rhodopseudomonas palustris BisA53, complete genome
ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGGAACCTTCAATCCAGACGCCCTTCGCGTTGAATTTGG
CGAAGGCGATGAGGCGATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCTATCTCAATCGCAACAGATCGAGACGCCCGGA
CAAGCGCCCCCGGAAATGCGGAGGTGGTGAAGACTTTTCGAGCGCTCGCCGAGTACTGGCTGTGGGAC
CAGAAGCGGGCCCGGACGTGCAGATGAAGCTCGGAAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACCGGCGACGC
GGCGGTGGCGGGGAAAGACCGAACCCACCATCGAGCCGCCGGCCGCGACAAGCGCTTTGCCGATCC
GGAATGGGAAGTCGAACCAATTTTTCGATTTCTGTGTCAGGCGCTATCTTTGACCAACGAATGGGCCAG
GCGCTGGTGGCGCGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCAACCCGCAAGAAGGCGGAGTTCTACGTCCAGCAGX
TCACCAACGCCCTTGGCGCGCTCGAATTTTCGTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTC
CAACGCGGACAAATCTGGCGCGCGCATGAAAATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGCAAGGGCATGCTG
AAGATCCGCGCAATCCGACCCGGGCAATCTCGAGGTGCGCGTCAACATGGCGACACGCCCGGCAAGGTGA
TCTTCCAGAACGAGCTGATGACGCTCATCCAGTATCACCAGACCCGAAACCGTGTGCGCACGCCACT
GCTGATCGTGCCCGCTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCCTTCATCAAA
TGGTGGCTCGACAGGGGCTCACCCTGTTCTGTGATCTCCTGGGTCAATCCGGACGAGGCGCTGCGGCACA
AATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCGCTGACCGCGATGGATGTGATCGAAACGATCACCAGCGA
GATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTGGCGGCGACCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGGCTGGCC
GACAAGCGCCGGGTGCGGGTCACCTCCGCGACCTTCCTGACCAACGCAAGTCACTTCACCCATGCGCGCG
ACTTGATGGTGTTCGTGACGAGGAGCAGATCGCGGCGCTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGCGCTGCT
CGAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCTCTACGTCGTC
AATAACTACCTGAAGGGCAAGTGCCTTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCGACTCGACGCGGA
TGCCGGCGGGCAACCATTCCTATTATCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTGCGAAGGCAGCAT
GGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCCAAAGGTCAAGGTGCGGGTCTACAACTTCGCCACCCGCGAG
GACCACATCGCCCCGCGCAGTGGTGTGTACGGCTCGCAATTCCTCGCGCGCCGGTGAATTCGTAC
TGTCCGGCTCCGGCCATATTGCCGGCTGGTCAACCCGCGCGCGCGCGCAAGTATCAATATTGGACCCG
CGACAGCATCGCGGCTGACAATCTGAAACAATGGCTGCAGGGGGCGAGGAAAATCCGGGGTGTGTGG
CCGACTGGCGGGGCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTGCGGGCCCGCAACGTGCGCAGCGAGG
CGATGCCCGGATCGAGATGCGCCCGGCGAGCTATGTGCGAGTCCGCGCTGA
```



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. 2552
เลขทะเบียน	249755
เลขเรียกหนังสือ	

```
>gi|192288433:c3024368-3022563 Rhodospseudomonas palustris TIE-1, complete genome
ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCAGGCGGGCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCCCGCAATCTCG
CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCGCTTAGCGACGATGATGAAGTCGCAAAACGGTGCCGTGCCACC
GGACGGTCAATCCGCCCGCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCGAGCGTTCGCCCAATTAATGGCTA
TCCGACCGAGGCGCGTTCCTCATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGG
CCTCCAAGCGCTCGCGCGCAACAGGCGGCGGATCGCCCGCTCGCGCGGACAGCGGTTTCGG
CTCACCAGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCACGATTTCCTGATGACGGCTACCTGCTGACGACGCGAGTGG
GCCGACGAATGTTCAAGAACGCCGAGATCGACCGGCACACCAAGCGCAAGGCGCGTTCACGCTCCAGC
AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACCTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
GGCCAGCGCGCAATCTGGTGCAGCGCATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAGTTCAGGCGCGGCGCAT
CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCGGGCTCGAGGTGGCGCTCAACATGGCGGTACCGGCGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
GCTGCTGATCGTGCCCGCTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAGCCCGAGAGTCTGTTTATC
AAATGGTTCGCTCGACCGAGGCGCTCACCGTGTTCGTGATCTCTGGGTCAACCCGACAGAGCGCTCGCGG
ACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCGCGCTGACCGCGATGGACGTCTGAGAGAGGTCAACCGG
CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCCGCGGCGACCCCTGCTCGCTCGACGCTGGCGCTGGCTC
GCCGAGCGCGCGCGGCTCCGCGTTACCTCGCGCACTTCTGACCCAGCGAGTTCGACTTCACCCATGCCG
GCGAGCTGATGGTGTTCGTGACGAGGAGCAGATTTCGCGGTGGAACGCGAGATGAAGGTACCGGCGGT
GCTCGAAGGCGCAAGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGCGCGAAGCATCTGATCTGGTCTACGTC
GTCAATAACTACCTGAAGGGCGAGCGCGCGCAGGCGTTGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGCGGAACCACTCTACTACCTGCGCACTGCTATCTCGAACAAGCTGTGCGCGCGCAC
CATGGTGTGCTGACACCAACGCTCGACCTCACCAAGGTCAGGTGCGGATCTACAACCTCGCCACCGCG
GAAGATCACATCGCGCGCGGAGTGGTGTGCTGACGGCTCGCAGTTCTTCGCGCGCTCGGTGAAATTCG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCGCGGTGATCAATCCGCGGTGGCGAACAGTACCTATTCTGGAC
CAACCCCGACATCTTCGCGGCTCGGTGCGCAATTGGCTGAACGCGCGCGAAGAGCACAGGGGTCTGTGG
TGCGCGGATGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAGGTTCGCCCGCGCGCATCGGCAACG
AAGCCTACCGCGCGCTGGAAGATGCGCGCGGCGAGTACGTCAAAGTGCATCTCTGA
```

ที่มา:

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

rt=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

```
>gi|86747127:3380804-3382609 Rhodospseudomonas palustris HaA2, complete genome
ATGAGCGACATGCTACCGAAGACCGACCGCGCAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCGCGTAATCTGG
CGCAGGCGATGGAGTGGCGGAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCGAGCGAGCCGATCGACGGTGT
CAAGCGCGCGGACCGAATCGACGAGATCGTCAAGACGCTCACCAGCGTCCGCCACTACTGGATGTCGGAC
CAGACCCGCGCGCGGAGCTGCAGACGAAGCTCGGCAAAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCTTCCA
AGAAGCTTCGCGCGGAGACGGCGCTCGCCCCGACCATCGAGCGCGCGCGCGGCAAGCGTTTCGCGCA
TCCGGACTGGCGAAGAAGACAGTTCACGAATTCATCATGACGCGCTATCTGTTGACCTCGCAATGGGCC
AACGAGCTGGTTCGAGAAGGCCGACGGCCTCGACCGGCACACCAAGCGAAGGCGCGCATTCATATCCAGC
AGATCACCAACCGGATGGCGCGCTCGAACTTCGTGCCGACCAATCCGGAATTGACCGCGCTGACGCTCGA
GAACAGCGCGGCAATCTGGTGGCGGCGATGAAGATGCTGCGCGAGGACATCGCGCGCGCAAGGCCAT
CTCAAGATTTCGCCAGTCCGACCCGCTCAATCTGGAAGTGGCGTCAACATGGCGACGACCGCGCGAAGG
TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAACTGATCCAGTACCGCCCGCGACCGGAGACGGTGTGCGCACGGC
TCGTGATGCTGCGCGCATGGATCAACAAGTTCATCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCTGTTTATC
AAATACTGCGTTCGACCGAGGTCTCACCGTGTTCGTGATCTCTGGGTCAATCCGCAAGCGCGCTCGCGG
ACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGGCGGCTGACCGCGATGGACGTGATCGAGAAGGTACCGGG
CGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTGGCGCGCACCCCTGCTCGCTCGACGCTGGCGTGGCTG
GCCGAGCGCGCGCGCGGCGCTCACCTCGGCGACCTTCTGACCCACCGAGTTCGATTTCACCCATGCCG
GCGACCTCAGCGTGTTCGTGACGAGGGCGAGATCTCGGCGCTGGAGCGGACATGCAGACGACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCGCAGGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGGTGGAACGACCTGATCTGGTCTATGTG
GTGAGCAACTATCTGAAGGGCGACGCGCGCGCGGCTTCGACCTGCTGCACTGGAATTTCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGCGGAACCACTCTTACTATCTGCGCACTGTTATCTCGACAAAGCTGTGCGCGCGGCA
CATGGTGTCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTGAAGGTCAAGGTGCGGATCTACAACCTCGCCACCGCG
GAGGACCATCGCGCGCGCGGATCCGTGCTGACGTTTCGCAATTCCTCGCGCGCGCGGTTGAATATCG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCGCGGTGATCAATCCGCGCGCGGCAACAAATATCAGTACTGGAC
CAGCGAGACCATCCGCGCGGCTCGGTGCGCAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAGGGTCTGTGG
TGCGCGGACTGGCGGAATGGTTCGCGAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCCTGCGCGCGCATCGGCAACG
AGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCGCGCGGAGCTACGTCGAGGTGCGATCTCTGA
```

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

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

>gi|39933080:c2844051-2842246 Rhodospseudomonas palustris CGA009, complete genome
 ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCCGCCGCAATCTGG
 CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCCTTAGCGACGATGATGAAGTGGCAGAACGGTGCCGTGCCACC
 GGACGGTCAITCCGCCCGCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTA
 TCCGACCGAGCTCGTTCCAAATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCCAAGTCTGTAICTGAACTCTGGGGCGCGG
 CCTCCAAGCGGCTCGCGGCGGAACAGGCGGAGCGCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAAGCGGTTCCG
 CTCACCGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGACGCGCTATCTGCTGACGACGCGATGG
 GCGGACGAGCTGGTCAAGAACCGCGAGATCGACCGCACACCGAGCGCAAGGCGCGTCTGATGCTCCAGC
 AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACCTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
 GGCCAGCGGCGACAATCTGGTTCCGCGGATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCAC
 CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCCGCGCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCAACCCGCGCAAGG
 TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
 GCTGCTGATCGTGCCCGCTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCTGTTTCATC
 AAATGGTGGCTCGACAGGGCCCTCACCCTGTTCTGATCTCTGGGTCAACCCGGAAGAGCTCGCCG
 ACAAGGATTTCGCGGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGGATGGAGCTCGTTCGAGAAGGTCAACGG
 CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCCGCGGCACCCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTC
 GCCGAGCGCCCGCGGGTGGCGCTCACCCTCGGCGACCTTCCTGACACGCGAGTTCGACTTCACCCATGGCG
 GCGACTTGATGGTGGTTCGTGACGAGGAGCAGATTTCGCGGTGCAACGCGAGATGAAGGTCAACCGCGT
 GCTCGAAGGCGCCAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCGCAACGATCTGATCTGGTCTTACGTC
 GTCAACAACCTACCTGAAGGGAAGCAGCCCGCGCGGCTGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
 GGATGCGCGCGCGCAACCACTCTACTACCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACAAGCTGTCGCGCGGAC
 CATGGTCTGGACAACACCGCTCGACCTCACCAGGTCAAGGTGCGGATCTACAACCTCGCCACCCGCG
 GAAGACCAATCGCGCGCGGAGTGGTGTGACGGCTCGCAGTCTCTCGCGGTCCGGTGAATTTCG
 TGCTGTCCGGTCCGGTCACTCGCGCGGCTGATCAATCCGCCGCGCGGAACAGTACCAATTCTGAC
 CAACCCGACATCTTCGCGGCTCGGTGCGCAATTGGCTGAACGGTGGCGAAGACCAAGGGGTCTGG
 TGGCCGGATTGGCGCGCTTGATTCGGCCAGTTCGACGACGAACAGTTCCCGCCCGCATGGCAACG
 AAGCTTACCCCGCTGGAAGATGGCCGCGCAGCTACGTTAAAGTGGGATCTCTGA

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

report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

>gi|90421528:3061264-3063069 Rhodospseudomonas palustris BisB18, complete genome
 ATGAGTGAGATGATCACCAGAACCAAGCCTGCCCGGGCTTCGACCCGAGGCTTTCCGGCTCAATCTGG
 CGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGCGCTGGCAACTATTTAAAGCCGCGTGACAGCGCCGAGCCGCT
 CGACAAGCCCGCGCGGGAATCACCAGAGTGGTGAAGACGCTGTCGGCGGTGGCGAACTACTGGTTGTTC
 GACAAGGACCGCGCCACCGAGATCCAGACCAAGCTCGGCAATCTCTGATCTGCTGGGGCGTGGCGA
 TCGCGCGGATGGCCGCGGAAGACGCGCCCGCGCTCATGAAATGCGCGCGCGGACCAAGCGCTTCAGCGC
 CCGGGAATGGAAGTCCAGCCCGTTGTTGATTTCTGGTGGAGGCTATCTGTTGACCAACGAATGGGCC
 TACCAGTGGTGGCGGACCGCAAGACATCGACCCGCAACCAAGAGAGAGGCGGAGTCTCATCTCCAGC
 AGATCACCACCGCGCTGGCACCCTCGAATTTCTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGC
 CTGCAACGCGCAATCTGGTGGCGGCAATGACCATGCTGGCGGAGGACATCGCGCGGGCAACGCGCAG
 TTGCGGATCCGCGAGTCCGACCCCGCAATCTGGAGGTGCGCGCTCAACATGGCGACGCGCCGCGCAAGG
 TGATCTTCCAGAACGAATTGATGCACTGATCCAAATATCAGCCGACCCGAGAACGTGCTGCGCACGCG
 GCTGTTGATCTGCGCGCGTGGATCAACAAGTATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAGAAATCTTCTGCT
 AAATGGTGGCTCGACAGGGCGTCAAGGTGTTCTGATCTCTGGGTCAATCCCGGACCAAGAGCCTCGGCC
 ACAAGACCTTCGACGACTACATGAACAGGGTCCGCTGACCGCGATGGAGCTCATCGAACAGGTCAACGG
 CGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTCCGCGGCACCCCTGCTCGCCGCGACGCTGGCCTGGCTC
 GCCGAAAAGCGCCGGTCCGCGTCACTCGCGGACGCTGCTCAACACCCAGGTGGATTTCACCAATGCCG
 GCGATCTCTTGGTGTCTGTCAGGAGGATCAGATCGCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAAGCCAGCGCGGT
 GCTGGAAGGCTCGAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCTTATGTG
 GTCAATAACTATCTGAAGGCCAGCCCGCTCGGCGTTGACCTGTTGCACTGGAATCTCGATTTCGACGCG
 GGATGCCGCGCGGCAACCAATTCTATTATTTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTGGCGCGCAC
 CATGGTGTGGACAACACCTGCTCGACCTTTCCAAAGGTCAAGGTGCGGATCTACAACCTCGCCACCGCG
 GAGGACCAATCGCGCGCGGAGTCCGCTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCGCGGTGAAATACG
 TGCTGTCCGCTCCGCGCACATCGCGCGGTGATCAACCGCGCGCGCGCGGCAAGTATCAATATTGGAC
 CAACGAGGCCAGCGCGCGCTCGACCGTCCGCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCAAGGGCTCTGTGG
 TGGCCGAGTGGCGGCAATGGCTGACCGGCAATCGACCCGGAAGAGTCCCGCGCGCGCAGCGTGGCACCG
 AGGCCCTCGCGCGCTCGAGGATGCGCGGCGCAGTACGTTCCGGTGGCGGCTGA

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	ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGAACTTCAATCCAGACGCCTTCGCG	60
BisB18	ATGAGTGAGATGATCACCGAAACCAAGCCTGCCCGGGCTTCGACCCCGAGGCTTTCGCG	60
TIE-1	ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCAGGCGGCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCC	60
CGA009	ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCAGGCGGCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCGCC	60
HaA2	ATGAGCGACATGCTACCAGAAACAGCACGGCGAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCG	60
	**** *	
A53	TTGAATTTGGCGAAGGCGATGGAGGCATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCCTATCTCAATC--	118
BisB18	CTCAATCTGGCGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGGCGCTGGCAACTTATTTAAAGCCG	120
TIE-1	CGCAATCTCGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG	120
CGA009	CGCAATCTGGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG	120
HaA2	CGTAATCTGGCGCAGGCGATGGAGTGGCGCAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCG	120
	*** *	
A53	-GCAACAAGATCGAGACGCC--CGACAAGCCGCCCGCGAAATGCGGAGGTGGTGAAG	174
BisB18	CGTGACAGCGCCGAGCCGCT---CGACAAGCCGCCCGCGGAACTCACCGAAGTGGTGAAG	177
TIE-1	CAAAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG	180
CGA009	CAGAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG	180
HaA2	---AGCGA-GCCGATCGAC--GGTGTCAAGCCGCCGACCGAACTGACGGAGATCGTCAAG	174
	* ** *	
A53	ACTTTTTCGAGCGTCGCCGAGTACTGGCTGTGCGACAGAGCGGGCCGCCGACGTGCAG	234
BisB18	ACGCTGTGCGGCGTGGCGAACTACTGGTGTGCCGACAAGGACCGGCCACCGAGATCCAG	237
TIE-1	AGCTTCTCGAGCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACAGGCCGCTTCTCATGAGCTGCAG	240
CGA009	AGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACAGGCTCGTTCCAATGAGCTGCAG	240
HaA2	ACGCTCACCAGCGTCGCCACCTACTGGATGTCCGACAGACCCGCGCCGCGGAGCTGCAG	234
	* *	
A53	ATGAAGCTCGGAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACAGGCGACGCGGCGGTGGCCGGG	294
BisB18	ACCAAGCTCGGCAATCCTATCTCGATCTGTGGGGCTCGCGATGCGGCGGATGGCCGGC	297
TIE-1	CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCCTCCAAGCGCCTCGCCGGC	300
CGA009	CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCCTCCAAGCGGCTCGCCGGC	300
HaA2	ACGAAGCTCGGCAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCCTCCAAGAAGCTCGCCGGC	294
	***** *	
A53	GAAAGACCGAA---CCCACCATCGAGCCGCCCGCGGCGACAAGCGCTTTCGCCATCCG	351
BisB18	GAAGACGCCGCC---GCCGTCATCGAAGTGCCGCGCGCGACAAGCGCTTCAGCGCCCCG	354
TIE-1	GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGCGACAAGCGGTTTCGCCTCACCG	357
CGA009	GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTTCGCCTCACCG	357
HaA2	GAGACGGCGCTCGCCCGACCATCGAGCCGCCGCGCGCGACAAGGTTTCGCCGATCCG	354
	* *	
A53	GAATGGAAGTCGAACCAAGTTTTTCGATTTCTGCTGCAGGCCTATCTCTTGACCACGCAA	411
BisB18	GAATGGAAGTCCAGCCGTTGTTTCGATTTCTGGTGACGGCTATCTGTTGACCACGCAA	414
TIE-1	GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCTGATGCAGGCCTACCTGCTGACGACGAG	417
CGA009	GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCTGATGCAGGCCTATCTGCTGACGACGAG	417
HaA2	GACTGGCGAAGAACCAGTTCTACGAATTCATGACAGGCCTATCTGTTGACCTCGCAA	414
	* *	
A53	TGGGCCAGGCGCTGGTGCGGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCACACCCGCAAGAAGGCG	471
BisB18	TGGGCCTACCAGCTGGTGCGGACGCCGAAGACATCGACCCGATACCAAGAAGAAGGCC	474
TIE-1	TGGGCGGACGAAGTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACCAAGCGCAAGGCC	474
CGA009	TGGGCGGACGAGCTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACCAAGCGCAAGGCC	474
HaA2	TGGGCCAACGAGCTGGTGCAGAAGGCCGACGGCCTCGACCCGCACCAAGCGAAAGGCC	474
	***** *	
A53	GAGTCTACGTCCAGCAGATACCAACGCCTTGGCGCCGTGCAATTTCTGCTGACCAAT	531
BisB18	GAGTCTACATCCAGCAGATACCAACGCCTGGCACCGCTCGAATTTCTGCTGACCAAT	534
TIE-1	GCGTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTGGCGCCCTCCAACCTCGTGATGACCAAT	534
CGA009	GCGTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTGGCGCCCTCCAACCTCGTGATGACCAAT	534
HaA2	GCATTCTACATCCAGCAGATGCAACGCAGTGGCGCCGTGCAACTTCGTGCCGACCAAT	534
	* *	
A53	CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTCCAACGGCGACAATCTGGCGCGCGGCATGAAA	591
BisB18	CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTGCAACGCCGACAATCTGGTGCGCGGCATGACC	594
TIE-1	CCGGAGGTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG	594
CGA009	CCGGAGGTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG	594
HaA2	CCGAATTGACCCGGCTGACGCTCGAGAACAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG	594
	***** *	
A53	ATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAGGGCATGCTGAAGATCCGGCAATCCGACCCG	651
BisB18	ATGCTGGCCGAGGACATCGCGGCGGGCAACGGCCAGTTGCGGATCCGGCAGTCCGACCCG	654
TIE-1	ATGCTGGCCGACGACATCCAGTCAGGCCGCGGCCATCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG	654

CGA009 ATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCACCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG 654
HaA2 ATGCTCGCCGAGGACATCGCCGCCGCAAAGGCCATCTCAAGATTGCCAGTCCGACCCG 654

A53 GGCAATCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 711
BisB18 GCCAATCTGGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
TIE-1 GCCGGGTCGAGGTCGGCGTCAACATGAGCGGCCACCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
CGA009 GCCGGCCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTACCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
HaA2 TCCAATCTGGAAGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
* **

A53 GAGCTGATGCAGCTCATCCAGTATCACCCGACCACCGAAACCGTGCTGCGCACGCCACTG 771
BisB18 GAATTGATGCAGCTGATCCAATATCAGCCGACCACCGAGAACGTGCTGCGCACGCCGCTG 774
TIE-1 GAAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGACGCGCACGCCGCTG 774
CGA009 GAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGACGCGCACGCCGCTG 774
HaA2 GAGATCATGCAACTGATCCAGTACACGCCCGCGACCGAGACGGTGCTGCGCACGCCCTTG 774
* * *****

A53 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCC 831
BisB18 TTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAAAATCC 834
TIE-1 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
CGA009 CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
HaA2 CTGATCGTGCCGCCATGGATCAACAAGTTCTACATTCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCG 834

A53 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCTGATCTCCTGGGTCAATCCG 891
BisB18 TTCGTCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
TIE-1 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCTGATCTCCTGGGTCAACCCG 894
CGA009 TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCTGATCTCCTGGGTCAACCCG 894
HaA2 TTCATCAAATACTGCGTCGACCAGGGTCTCACCGTGTTCTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894

A53 GACGAGGCGCTGCGGCACAATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCGCTGACCGCG 951
BisB18 GACAAGAGCCTCGGCCACAAGACCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGTCGCGTACCGCG 954
TIE-1 GACAAGAGCCTCGGCCACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCGCTGACCGCG 954
CGA009 GACAAGAGCCTCGGCCACAAGGATTTCCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCGCTGACCGCG 954
HaA2 GACAAGCGCCTCGGCCACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCGCTGACCGCG 954

A53 ATGGATGTGATCGAAACGATCACCGGCGAGATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTC 1011
BisB18 ATGGACGTCATCGAACAGGTACCGGCGGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTC 1014
TIE-1 ATGGACGTCGTCGAGAGGTACCGGCGGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
CGA009 ATGGACGTCGTCGAGAGGTACCGGCGGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
HaA2 ATGGACGTGATCGAACAGGTACCGGCGGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTC 1014

A53 GGCGGCACCCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGCTGGCCGACAAGCGCCGGGTGCGGGTC 1071
BisB18 GGCGGCACCCTGCTGGCGCGCAGCTGGCCTGGCTCGCCGAAAAGCGCCGGGTCCGCGTC 1074
TIE-1 GGCGGCACCCTGCTGGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCGGGTCCGCGTT 1074
CGA009 GGCGGCACCCTGCTGGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCGGGGTGCGCGTC 1074
HaA2 GGCGGCACCCTGCTGGCCTCGACGCTGGCCTGGCTGGCCGAGCGCCGCGCCAGCGCGTC 1074

A53 ACCTCCGCGACCTTCTGACCACGCAAGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1131
BisB18 ACCTCGGCGACGCTGCTCACCACCCAGGTGGATTTACCAATGCCGGCGATCTCTTGGTG 1134
TIE-1 ACCTCGGCGACCTTCTGACCACGCGAGGTGACTTCACCCATGCCGGCGACCTGATGGTG 1134
CGA009 ACCTCGGCGACCTTCTGACCACCCAGGTGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1134
HaA2 ACCTCGGCGACCTTCTGACCACCCAGGTGATTTACCCATGCCGGCGACCTCAGCGTG 1134

A53 TTCGTCGACGAGGAGCAGATCGCGGCGTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGGCGTGCTC 1191
BisB18 TTCGTCGACGAGGATCAGATCGCCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAGGCCAGCGCGTGCTG 1194
TIE-1 TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTGCAACGCGAGATGAAGGTACCGGCGTGCTC 1194
CGA009 TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTGCAACGCGAGATGAAGGTACCGGCGTGCTC 1194
HaA2 TTCGTCGACGAGGATCTCGGCGCTGGAGCGCGACATGCAGACGACCGCGTGCTC 1194

A53 GAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCC 1251
BisB18 GAAGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCC 1254
TIE-1 GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
CGA009 GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
HaA2 GAAGGCGCCAGGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGTGCAACGACCTGATCTGGTCC 1254
**

A53 TACGTCGTCATAACTACCTGAAGGGCAAGTCGCCCTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGG 1311
BisB18 TATGTGGTCAATAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCGCTCGGCGTTTCGACCTGTTGCACTGG 1314
TIE-1 TACGTCGTCATAACTACCTGAAGGGCAGCCGCGCGAGCGGTTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
CGA009 TACGTCGTCATAACTACCTGAAGGGCAGCCGCGCGAGCGGTTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
HaA2 TATGTGGTCAGCAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCGCGCGGTTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
**

A53 AATTCCGACTCGACGCGGATGCCGGCGGCCAACCATTCTATTATCTGCGCAACTGCTAT 1371
BisB18 AACTCCGATTTCGACGCGGATGCCGGCGGCCAACCATTCTATTATTTGCGCAACTGCTAT 1374
TIE-1 AATTCCGACGCCACCCGATGCCGGCGGCCAACCATTCTACTACCTGCGCAACTGCTAT 1374

CGA009	AATTCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCCTCTACTACCTGCGCAACTGCTAT	1374
HaA2	AATTCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCCTCTACTATCTGCGCAACTGTTAT	1374
	** ***** * ** ***** ** * * * * *	
A53	CTCGACAACCGGCTGTCGGAAGGCAGCATGGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCC	1431
BisB18	CTCGACAACCGGCTGTCGCGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCCTGCTCGACCTTTC	1434
TIE-1	CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC	1434
CGA009	CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC	1434
HaA2	CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTCTG	1434
	***** * * * * ***** * * * * *	
A53	AAGGTCAAGGTGCCGCTCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCCCGGCGCAG	1491
BisB18	AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAC	1494
TIE-1	AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGATCACATCGCGCCGGCGGAG	1494
CGA009	AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGACCACATCGCGCCGGCGGAG	1494
HaA2	AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAA	1494
	***** ***** * * * * ***** *	
A53	TCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATTCTGTACTGTCCGGCTCC	1551
BisB18	TCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC	1554
TIE-1	TCCGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCTGTGTCTGTCCGGCTCC	1554
CGA009	TCCGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCTGTGTCTGTCCGGCTCC	1554
HaA2	TCCGTGCTGTACGGTTTCGAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC	1554
	** ***** ***** ***** ***** *	
A53	GGCCATATTGCCGGCGTGGTCAACCCGCCGGCCGCCGGAAGTATCAATATTGGACCCGC	1611
BisB18	GGCCACATCGCCGGCGTGATCAACCCGCCGGCCGCCGGAAGTATCAATATTGGACCAAC	1614
TIE-1	GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGTGGCGAACAAGTACCTATTCTGGACCAAC	1614
CGA009	GGTCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAGTACCAATTCTGGACCAAC	1614
HaA2	GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAATATCAGTACTGGACCAGC	1614
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
A53	GACAGCATCGCGGCTGACAACTCTCGAACAATGGCTGCAGGGGGCCGAGGAAATCCGGGG	1671
BisB18	GAGGCCAGCACGGCGTCGACCGTCGCCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGC	1674
TIE-1	CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGCGCCGAAGAGCACAAGGGG	1674
CGA009	CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGTGCCTGAAGAGCACAAGGGG	1674
HaA2	GAGACCATCCGCCGGCTCGGTCGCCGAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGT	1674
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
A53	TCGTGGTGCCGGGACTGGCGGGCCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTCCGCGGC	1731
BisB18	TCGTGGTGCCGGGACTGGCGGCAATGGCTGACCGGCATCGACCCCGAAGAAGTCCCGGCG	1734
TIE-1	TCGTGGTGCCGGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTTCGACGACGAACAGGTTCCCGCC	1734
CGA009	TCGTGGTGCCGGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTTCGACGACGAACAAGTTCCCGCC	1734
HaA2	TCGTGGTGCCGGGACTGGCGGCAATGGGTCGGCAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCTGCC	1734
	***** ***** * * * * * * * * * * *	
A53	CGCAACGTCCGGCAGCGAGGCGATGCCGCCGATCGAGGATGCGCCCGGCAGCTATGTGCGA	1791
BisB18	CGCAGCGTCGGCACCGAGGCGCTGCCGCCGCTCGAGGATGCGCCGGGCAGCTACGTCCGG	1794
TIE-1	CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTCAA	1794
CGA009	CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTTAA	1794
HaA2	CGCGGCATCGGCAACGAGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCCCGCGCAGCTACGTCCGG	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 เนื่องจากที่อุณหภูมิ นอกเหนือจากนี้ จะไม่พบแถบดีเอ็นเอภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

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)

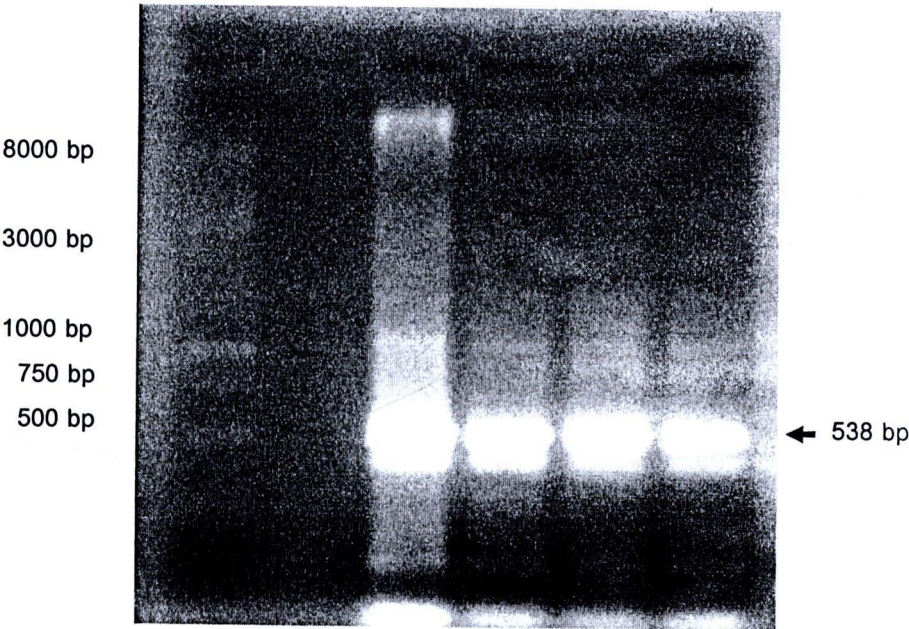


Fig. 2 *phaC* gene amplified by PCR

การทำบริสุทธิ์ PCR product

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

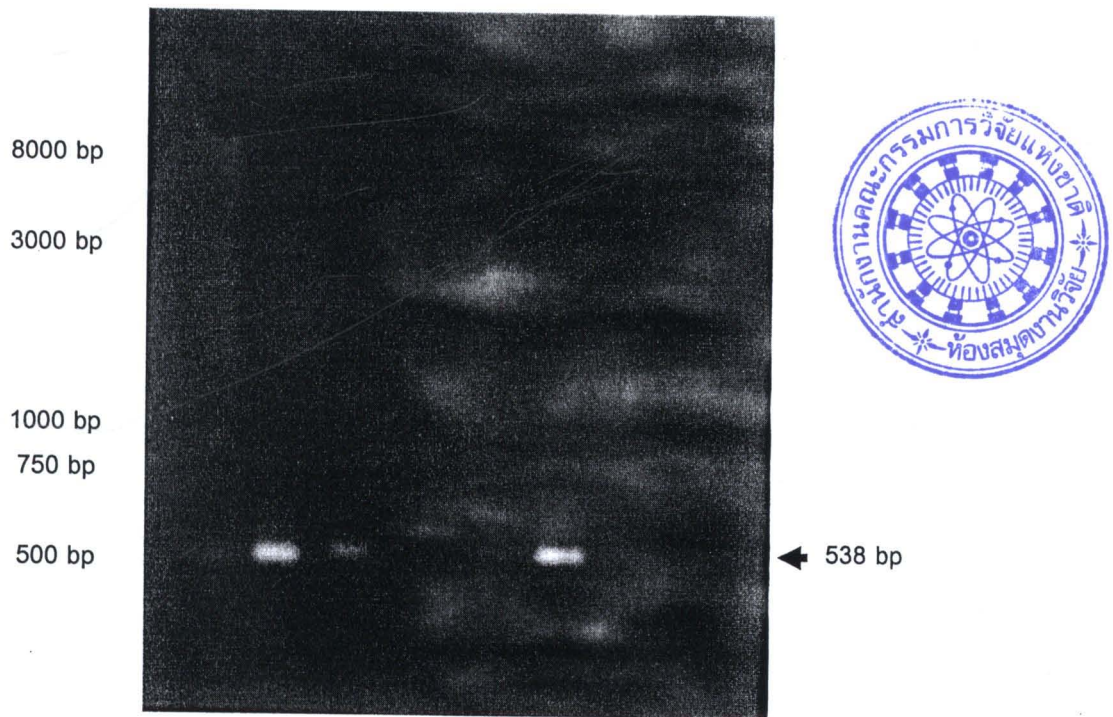


Fig. 3 amplified *phaC* gene after purification by PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)

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 ที่เป็นสีขาวทั้งขนาดเล็ก และขนาดใหญ่หลายโคโลนีที่เจริญ มาแยกเลี้ยงเพื่อสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109 พบว่า ไม่ปรากฏความแตกต่างของชิ้นส่วนของ vectors ทั้งหมดดังกล่าว