



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
ปริญญา

พันธุศาสตร์	พันธุศาสตร์
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์ซินเรสชนิดที่ 1 จาก *Streptomyces rimosus* R7
ที่สร้างสาร rimocidin

Characterization of Type I Polyketide Synthase Gene Cluster from
rimocidin-producing *Streptomyces rimosus* R7

นามผู้วิจัย นางสาวกัณต์รี ธนิตไธสง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชัย พรบันลือลาภ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจองหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 24 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2548

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1
จาก *Streptomyces rimosus* R7 ที่สร้างสาร rimocidin

Characterization of Type I Polyketide Synthase Gene Cluster
from rimocidin-producing *Streptomyces rimosus* R7

โดย

นางสาวอภันตรี ธนิตไธสง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2548

ISBN 974-16-1052-1

อภันตริ ธนดิไชสง 2548: การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์จีนเซตชนิดที่ 1 จาก

Streptomyces rimosus R7 ที่สร้างสาร rimocidin ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา:

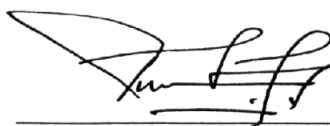
ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรณทิพย์ ธรรมชัยพินัด, Ph.D. 106 หน้า

ISBN 974-16-1052-1

Streptomyces rimosus R7 ผลิตสารต้านเชื้อรา rimocidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม polyene สังเคราะห์จากเอนไซม์ Type I Polyketide Synthase (Type I PKS) ศึกษากลุ่มยีน Type I PKS นี้โดยการโคลนยีน Type I PKS จากพลาสมิด pATT404 โดยใช้โคเอนไซม์ ketoacyl synthase (KS) เป็นโพรบ สามารถโคลนยีนขนาด 8 กิโลเบสได้เมื่อ subclone ได้ยีนดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส ให้ชื่อว่า pATT702 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นส่วนของยีน Type I PKS จึงนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย โคลนเข้าพลาสมิด pSET151 ให้ชื่อว่า pATT709 แล้วทำยีนคัสสรีปชันโดยนำเข้าสู่ *S. rimosus* R7 ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลกับ *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) พบว่าได้สายพันธุ์กลาย *S. rimosus* ATT709 ซึ่งสร้างสารต้านเชื้อราต่อ *Aspergillus niger* ได้น้อยลงมาก เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR ยีน *tsr* และยีนดีเอ็นเอเป้าหมายยืนยันว่าพลาสมิด pATT709 แทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 นำสายพันธุ์กลายและ wild type ที่เลี้ยงในอาหาร SPG มาสกัดสารแล้วตรวจสอบโดยวิธี Thin-Layer-Chromatography (TLC) โดยใช้ตัวพา คือ n-butanol: acetic acid: H₂O (4:5:1) แล้วทำ Bioautography เททับด้วยสปอร์ของ *A. niger* พบว่าเกิดวงใสบริเวณที่เป็นสารสกัดจากเส้นใยของ wild type แต่ไม่พบวงใสจากสายพันธุ์กลาย เมื่อนำสารสกัดจากเส้นใยของสายพันธุ์กลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าให้ค่า λ_{max} ที่ 255, 260 และ 266 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างจาก rimocidin เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่ามีการแทรกของพลาสมิด pATT709 เข้าไปในโครโมโซม ทำให้โคลนยีนดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส ซึ่งครอบคลุมบริเวณยีนดีเอ็นเอเป้าหมายและบริเวณถัดไป พบว่าประกอบด้วยโคเอนไซม์เรียงตามลำดับคือ ketoreductase (KR), acyl transferase (AT), KS, acyl carrier protein (ACP) และ KR โดยโคเอนไซม์ AT มีความจำเพาะต่อ malonyl-CoA โคเอนไซม์ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม polyene เมื่อวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree และน่าจะอยู่ในช่วง โมดูลที่ 8 และ 9 ของ rimocidin synthase (RMS) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ rimocidin



ลายมือชื่อนิสิต



ลายมือชื่อประธานกรรมการ

21 / 12 / 2548

Aphantree Tanittaisong 2005: Characterization of Type I Polyketide Synthase Gene Cluster from rimocidin-producing *Streptomyces rimosus* R7. Master of Science (Genetics),

Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor:

Assistant Professor Arinthip Thamchaipenet, Ph.D. 106 pages.

ISBN 974-16-1052-1

Streptomyces rimosus R7 produces an anti-fungal antibiotic, rimocidin. This polyene antibiotic is synthesized by Type I polyketide synthase (Type I PKS). This gene cluster was studied by cloning part of Type I PKS gene from pATT404 using ketoacyl synthase (KS) domain as a probe. An 8 kb DNA fragment was cloned and subsequently a 3.3 kb fragment was subcloned and analyzed. DNA sequence revealed that fragment composed of Type I PKS gene. Therefore, the 3.3 kb fragment was used as a DNA target and cloned into a mobilizable plasmid, pSET151, designated as pATT709. pATT709 was transformed into *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) and used as a donor for performing intergeneric conjugation with *S. rimosus* R7 as a recipient. A disruptant, *S. rimosus* ATT709, was obtained and showed less anti-fungal activity against *Aspergillus niger*. The integration of pATT709 was confirmed by PCR of the DNA target and *tsr* gene. Mutant and wild type were grown in SPG medium and were extracted and determined by Thin-Layer-Chromatography (TLC) using n-butanol: acetic acid: H₂O (4:5:1) as a mobile phase. Bioautography showed clear zone against *A. niger* only in the extract from wild type. Spectrophotometry of the extract from the mutant indicated λ_{max} at 255, 260 and 318 nm which are different from rimocidin. A 5.7 kb fragment was cloned from the result of Southern hybridization which contains the 3.3 kb DNA target and the adjacent DNA which orderly consists of ketoreductase (KR), acyl transferase (AT), KS, acyl carrier protein (ACP) and KR domains. Analysis of AT domain revealed specificity to malonyl-CoA. Phylogenetic analysis suggested that the 5.7 kb fragment corresponds to module 8 and 9 of rimocidin synthase (RMS) and is responsible for rimocidin production in *S. rimosus* R7.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

21 / 12 / 2005

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำแนะนำต่างๆ มาโดยตลอด ทั้งงานวิจัย ทุนสนับสนุน และการจัดทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ รศ. ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และ ผศ. ดร. สมชัย พรบันลือลาภ กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ Prof. Dr. David Hopwood, John Innes Institute, UK ที่ให้ความอนุเคราะห์ *E. coli* สายพันธุ์ ET12567 (pUZ8002) ขอขอบคุณ Dr. Mark Buttner, John Innes Institute, UK ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pIJ8671 และพลาสมิด pSET151 และขอขอบคุณ รศ. ดร. งามพ่อง คงคาทิพย์ และ ผศ. ดร. อภิสิทธิ์ สงสะเสน ภาควิชาเคมี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง Evaporator

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือมาตลอด ขอขอบคุณ คุณณัฐกานา พูลสวัสดิ์ (พี่ยุ้ย) คุณกนกกร เขียวดำ (พี่อ้อ) คุณเทพิน เชนันทรรัตน์ (พี่เหน่ง) คุณประกิตชัย โชติวุฒิมินทร์ (พี่นนท์) คุณปรภากร กระถิ่นทอง (พี่ปาร์ก) คุณศิริรัตน์ เมียนเกิด (พี่โบ) ที่ช่วยสอนเทคนิคต่างๆ และให้คำแนะนำในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณนิรินทร์ยา สุตตาชาติ (เจ๊ียบ) เพื่อนที่ร่วมทุกข์และสุขตลอดระยะเวลาเกือบ 8 ปี ขอขอบคุณ คุณสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ (พี่ยอด) และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ ที่น่ารักและเป็นกำลังใจ

ขอขอบคุณ คุณพ่อแก้วและคุณแม่รุ่งน รัตนไธสง ที่น่ารัก ให้ความรัก ความเข้าใจ ความห่วงใยและทำงานหนักเพื่อลูกคนนี้เสมอมา ขอขอบคุณ คุณปาริชาติ รัตนไธสง (พี่ไอ้) และคุณอนนท์ รัตนไธสง (พี่เบน) ที่คอยเป็นแรงผลักดันให้สำเร็จการศึกษา และเป็นที่ยะบายในยามเศร้า

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับการสนับสนุนทุนระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและทุน BIOTECH

อภันตรี รัตนไธสง
พฤษภาคม 2548

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(1)
สารบัญตาราง.....	(2)
สารบัญภาพ.....	(3)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
การตรวจเอกสาร.....	3
<i>Streptomyces</i>	3
สารโพลีไทด์.....	5
สารออกฤทธิ์ด้านเชื้อรา.....	15
การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ <i>Streptomyces</i>	22
ยีนดิสรัปชัน.....	24
อุปกรณ์และวิธีการ.....	26
ผลและวิจารณ์.....	44
สรุป.....	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene...	16
2	จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3	พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
4	ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง <i>Streptomyces</i> และ <i>E. coli</i>	28
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
6	ข้อมูล 4 อันดับแรก ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจีนดีเอ็นเอ ในพลาสมิด pATT702 ทางด้านไพรเมอร์ M13 Forward กับฐานข้อมูลโดยใช้ โปรแกรม BlastX.....	51
7	การหาลำดับเบสของ subclone และแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน.....	52
8	ข้อมูล 4 อันดับแรก ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจีนดีเอ็นเอ ในพลาสมิด pATT718 ทางด้านไพรเมอร์ M13 Forward กับฐานข้อมูลโดยใช้ โปรแกรม BlastX.....	70
9	การหาลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 และ subclone.....	70
10	กลุ่มยีน Type I PKS ที่นำมาใช้ในการทำ multiple alignment และ phylogenetic tree.....	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์และกรดไขมัน.....	6
2	การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน polyketide synthase (PKS).....	8
3	ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์.....	10
4	กระบวนการสังเคราะห์ erythromycin และการจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน <i>eryAI</i> , <i>eryAII</i> , <i>eryAIII</i> และเอนไซม์ deoxyerythronolide B (DEBS).....	12
5	โครงสร้างของ nystatin, pimaricin, amphotericin และ candidin.....	17
6	โครงสร้างโมเลกุลของ rimocidin.....	19
7	โครงสร้างสาร rimocidin, CE-108 และอนุพันธ์.....	20
8	แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ rimocidin.....	20
9	แผนที่พลาสมิด pSET151.....	39
10	แผนที่พลาสมิด pIJ8671.....	39
11	การวิเคราะห์ Southern blot hybridization ด้วยโพรบ KS.....	44
12	การคัดเลือกโคลน 9 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i>	45
13	การตรวจสอบ subclone ของ pATT404 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ...	47
14	การ subclone พลาสมิด pATT700 และการตรวจสอบโคลน.....	49
15	การ subclone พลาสมิด pATT702 และการตรวจสอบโคลน.....	50
16	แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของโคลน pATT702 ขนาด 3.3 กิโลเบส.....	53
17	การตรวจสอบพลาสมิด pATT709 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	54
18	แผนที่ของพลาสมิดสายผสมที่ใช้ในการทำยีนโคลน.....	55
19	การตรวจสอบพลาสมิด pATT711 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	56
20	การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อราโดยการเกิดวงใสของสายพันธุ์กลาย...	57
21	การตรวจสอบการแยกสารสกัดจาก <i>S. rimosus</i> R7 และ <i>S. rimosus</i> ATT709 ด้วย TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและ Bioautography.....	59
22	การทำ Spectrophotometry ของสารสกัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 200-400 nm....	61
23	การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธี PCR.....	62
24	แผนที่แสดงการเกิดยีนโคลนและการตรวจสอบผลโดยวิธี Southern blot hybridization ด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i>	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและการตรวจสอบโคลน.....	66
26	การตัดพลาสมิด pATT718 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	68
27	การตรวจสอบ subclone ของพลาสมิด pATT718.....	69
28	แผนที่ยีนของพลาสมิด pATT718 ขนาด 5.6 กิโลเบส.....	72
29	ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของพลาสมิด pATT718.....	73
30	Multiple alignment ของโดเมน KR ในบริเวณ active site.....	77
31	Multiple alignment ของโดเมน ACP ในบริเวณ active site.....	77
32	Multiple alignment ของโดเมน KS ในบริเวณ active site.....	78
33	Phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ของโดเมน KS ของพลาสมิด pATT718 เปรียบเทียบกับโดเมน KS ของสาร macrolide และ polyene.....	80
34	การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน Type I PKS ของสารกลุ่ม polyene.....	81
35	Multiple alignment ของโดเมน AT ที่จำเพาะต่อ malonyl-CoA ในบริเวณ active site.....	82
36	Phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ของโดเมน AT ของพลาสมิด pATT718 เปรียบเทียบกับโดเมน AT ของสารโพลีคีไทด์.....	83

**การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์จีนเรซชนิดที่ 1
จาก *Streptomyces rimosus* R7 ที่สร้างสาร rimocidin**

**Characterization of Type I Polyketide Synthase Gene Cluster
from rimocidin-producing *Streptomyces rimosus* R7**

คำนำ

สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรามีความสำคัญทางการแพทย์ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากเชื้อรามากขึ้น สาเหตุจากการที่ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันลดลงเนื่องจากการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหรือเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ล้วนมีโอกาสติดเชื้อจากเชื้อราทั้งสิ้น สารต้านเชื้อราที่นิยมใช้ในทางการแพทย์มีหลายชนิด แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพดี สามารถต่อต้านเชื้อราได้เกือบทุกชนิด เช่น สารในกลุ่ม polyene คือ amphotericin B เป็นสารที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราได้มากที่สุดในปัจจุบัน และเป็นสารเพียงหนึ่งในไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อราที่ระบบภายในร่างกายโดยการฉีดเข้าเส้นเลือด และ nystatin ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อราที่บริเวณภายนอกเท่านั้น

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้ 2 ใน 3 ของยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้ทั้งหมดจากแบคทีเรีย โดยสารที่ผลิตนี้มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) และมีความสำคัญในด้านการแพทย์ เช่น สารต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial) สารต้านเชื้อรา (anti-fungal) สารต้านมะเร็ง (anti-cancer) สารต้านมาลาเรีย (anti-malarial) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) เป็นต้น ชนิดที่พบมากที่สุดคือ สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) สังเคราะห์โดยการทำงานของเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะเน้นศึกษาโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 ประเภท polyene ใน *Streptomyces rimosus* ซึ่งสามารถสร้างสารต้านเชื้อรา rimocidin เพื่อให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับกลุ่มยีนเหล่านี้ให้มากขึ้น แล้วสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารให้มีความเหมาะสมกับโรคมากขึ้น ใช้รักษาโรคได้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบและวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 จาก

Streptomyces rimosus R7

2. ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร rimocidin ซึ่งเป็นสารต้านเชื้อราจาก *S. rimosus* R7 โดยวิธียีนดิสรัปชัน (gene disruption)

การตรวจเอกสาร

Streptomyces

ลักษณะทั่วไป

Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบอยู่ทั่วไปในดิน ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกินซาก (saprophyte) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ จัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales วงศ์ (Family) Streptomycetaceae (Goodfellow, 1989) โดยอาศัยการจัดจำแนกทางเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) และลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ในปัจจุบันนิยมใช้ยีน 16S rDNA ร่วมวิเคราะห์กับวิธีการเดิมเพื่อระบุสายพันธุ์ (Williams *et al.*, 1989; Wellington *et al.*, 1992) *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobe) ใช้สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสร้างพลังงานและการเจริญ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส pH 6.5 – 8.0 ลักษณะการเจริญเป็นเส้นใย (mycelium) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เมื่อเจริญเต็มที่พบการสร้างสปอร์ต่อเป็นสายยาวที่ปลายของเส้นใยอากาศ แต่ในบางสปีชีส์พบการสร้างสปอร์สายสั้นๆ บนเส้นใยอาหาร ในระยะแรกของการเจริญโคโลนีสีผิวเรียบต่อมาจะมีการพัฒนาเส้นใยอากาศจนปรากฏเป็นกลุ่มก้อนคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) พบสีของสปอร์ ได้แก่ น้ำเงิน เทา เขียว แดง ม่วง ขาว และเหลือง ส่วนเส้นใยอาหารอาจสร้างรงควัตถุ (pigment) สีต่างๆ แพร่ไปในอาหาร (Williams, 1989)

จีโนม (genome) ของ *Streptomyces* มีขนาดประมาณ 7.8 – 8.0 Mb (Kieser *et al.*, 1992; Leblond *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995) ซึ่งประกอบด้วยปริมาณเบสกวานีน (guanine) และไซโทซีน (cytosine) ในอัตราสูง (high GC content) ประมาณ 70 – 74 เปอร์เซ็นต์ (Tewfik and Bradley, 1967) โดยโครโมโซมของ *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นแบบเส้นตรง (linear chromosome) (Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1993; Pandza *et al.*, 1997) ซึ่งคาดว่าทำให้โครโมโซมมีความไม่เสถียรทางพันธุกรรม (genetic instability) เกิดการขาดหาย (deletion) การเพิ่มปริมาณ (amplification) และจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของดีเอ็นเอซึ่งก่อให้เกิดลักษณะทางฟีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไปจากเดิม (Chen, 1995) ปัจจุบันมีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมครบแล้วใน *S. coelicolor* (Benley *et al.*, 2002) และ *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003)

ความสำคัญ

Streptomyces ในธรรมชาติมีความสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์สาร สามารถนำ *Streptomyces* มาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้เป็นจุลินทรีย์จัดการกับของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) เซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ที่ได้จากการเกษตรกรรมและชุมชน (Crawford, 1978) ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เช่น ใช้ *S. neyagawaensis* ในการควบคุมปริมาณ Cyanobacteria ในแหล่งน้ำจืด (Hee-jin *et al.*, 2005) ใช้ *S. lydicus* WYEC 108 เคลือบที่ผิวของเมล็ดถั่วเพื่อป้องกันเชื้อรา (Yuan and Crawford, 1995) นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังนำไปใช้เพื่อผลิตยาฆ่าโรคพืช (agricultural drug) เช่น cycloheximide เป็นยาต้านเชื้อราที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* หลายชนิด เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงแต่มีความเป็นพิษต่อพืชและมนุษย์ (Berdy, 1986) นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น cholesterol oxidase ใช้ในการตรวจสอบปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด นอกจากนั้นยังพบการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase, chitinase, endonuclease และเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม (Goodfellow *et al.*, 1988)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด พบว่า 2 ใน 3 ของยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้ในปัจจุบันมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Berdy, 1995) ได้แก่ สารปฏิชีวนะด้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารต้านมะเร็ง สารกดระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) รวมถึงยาฆ่าแมลง และสารปราบวัชพืช (Goodfellow *et al.*, 1988)

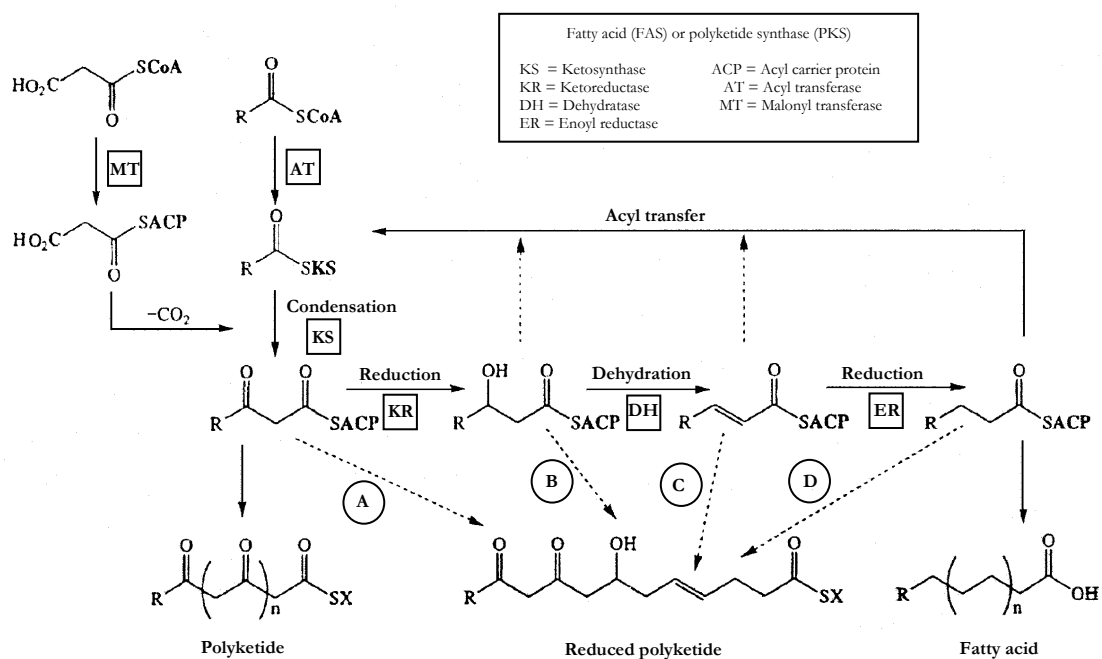
สารโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิกลุ่มสำคัญที่ *Streptomyces* สร้าง มีการศึกษาขึ้นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารนี้อย่างมากมาย สารโพลีคีไทด์นั้นมีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์ที่สำคัญ ได้แก่ erythromycin ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านแบคทีเรีย (Weber *et al.*, 1985) nystatin มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา (Hazen and Brown, 1951) avermectin มีสมบัติเป็นสารต้านปรสิต (Ikeda *et al.*, 1999) rapamycin มีสมบัติเป็นสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Melino and Sigal, 1990) และ daunorubicin มีสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง (Dimarco *et al.*, 1981) เป็นต้น

สารโพลีคีไทด์

สารโพลีคีไทด์ที่มีโครงสร้างหลากหลายทั้งแบบเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ต่อกัน หรือเป็นวงแหวนแลคโตน (lactone ring) ขนาดใหญ่ สารกลุ่มนี้สร้างโดยแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์เริ่มจากการเชื่อมต่อสายคาร์บอนของสารในกลุ่ม acyl-coenzyme A ที่ละ 2 คาร์บอนจนเป็นสายยาว โดยคาร์บอนที่เข้ามาต่อนั้นมีตำแหน่งเบตา (β -carbon) เป็นหมู่คีโต (keto) เสมอ แต่อาจเกิดกระบวนการรีดักชัน (reduction) ที่หมู่คีโตนี้ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ การเกิดหมู่คีโตต่อกันเป็นโครงสร้างหลักเช่นนี้จึงเป็นที่มาของชื่อสารโพลีคีไทด์ (Hopwood and Sherman, 1990)

กระบวนการสังเคราะห์โพลีคีไทด์

กระบวนการสังเคราะห์โพลีคีไทด์มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) (Hopwood and Sherman, 1990) (ภาพที่ 1) โดยกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันนั้นจะมีการควบคุมการทำงานโดยเอนไซม์หลัก คือ fatty acid synthase (FAS) โดยการสังเคราะห์เริ่มจากโดเมน (domain) acyltransferase (AT) นำหน่วยเริ่มต้น (starter unit) คือ acetyl-CoA ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอม ไปที่บริเวณแขน phosphopantetheine ของ acyl carrier protein (ACP) เกิดพันธะ thioester จากนั้น ACP จะส่งหน่วยเริ่มต้นไปที่เอนไซม์หลัก β -ketoacyl synthase (KS) แล้ว AT จะนำหน่วยต่อเติม (extender unit) คือ malonyl-CoA ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม ไปยัง ACP ที่ว่างลง แล้วเกิดกระบวนการ decarboxylative condensation เชื่อม acetyl-CoA เข้ากับ malonyl-CoA บน ACP ได้สายคาร์บอนที่มีความยาวเพิ่มขึ้น 2 คาร์บอนจาก malonyl-CoA โดยกำจัดคาร์บอนออกไป 1 อะตอมในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นหมู่คีโตที่ตำแหน่งเบตาจะเกิดกระบวนการรีดักชัน 3 ขั้นตอนคือ ketoreduction, dehydration และ enoyl reduction ขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเอนไซม์ ketoreductase (KR), dehydratase (DH) และ enoyl reductase (ER) ซึ่งเปลี่ยนหมู่คีโตนั้นให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล พันธะคู่ และพันธะเดี่ยว ตามลำดับ แล้วจึงกลับเข้าสู่การเชื่อม malonyl-CoA อีกตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นซ้ำกันอีกหลายรอบ จนได้สายกรดไขมันที่มีความยาวตามความเหมาะสม แล้วจึงปล่อยกรดไขมันสายยาว โดยการทำงานของเอนไซม์ thioesterase (TE) ตัวอย่างเช่น palmitic acid ซึ่งมีความยาว 16 คาร์บอน และ stearic acid มีความยาว 18 คาร์บอน เป็นต้น



ภาพที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์และกรดไขมัน FAS = fatty acid synthase, PKS = polyketide synthase, KS = β -ketosynthase, ACP = acyl carrier protein, AT = acyl transferase, MT = malonyl transferase, KR = ketoreductase, DH = dehydratase, ER = enoylreductase, TE = thioesterase; A, B, C และ D แทนวิธีการเปลี่ยนแปลงหมู่คีโตบนสายโพลีคีไทด์ คือ หมู่คีโตคงอยู่ หมู่ไฮดรอกซิล พันธะคู่และพันธะเดี่ยวตามลำดับ

ที่มา: Simpson (1995)

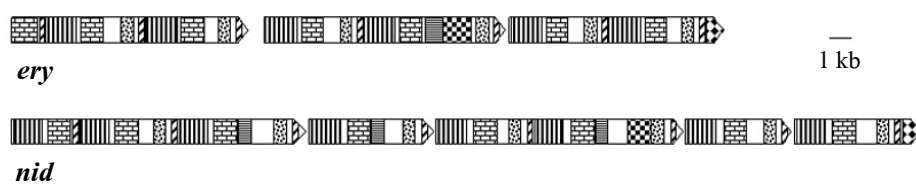
การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์จะมีกระบวนการต่างๆ คล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันดังกล่าวไปแล้วโดยอาศัยเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) แต่ในกระบวนการสร้างโพลีคีไทด์นั้นสามารถเลือกใช้หน่วยเริ่มต้นและหน่วยต่อเติมที่หลากหลายกว่า acetyl-CoA และ malonyl-CoA ที่ใช้ในการสร้างกรดไขมัน ซึ่งได้แก่ butyryl-CoA, isobutyryl-CoA, methylmalonyl-CoA, ethylmalonyl-CoA, acetoacetyl-CoA, propionyl-CoA, benzoyl-CoA และ hexanoyl-CoA เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการรีดักชันของหมู่คีโตอาจจะมีหรือไม่มีก็ได้ ถ้ามีก็อาจจะเกิดไม่ครบทั้งสามขั้นตอน ทำให้เกิดความหลากหลายทางโครงสร้างของสาร โดยหมู่คีโตอาจคงอยู่หรืออาจถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่น เช่น เปลี่ยนไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล โดย KR หรือเปลี่ยนไปเป็นพันธะคู่ โดย KR และ DH หรือเปลี่ยนไปเป็นพันธะเดี่ยวโดย KR, DH และ ER โครงสร้างของโพลีคีไทด์จึงมี side chain ที่หลากหลาย นอกจากนี้ stereochemistry ของหมู่ฟังก์ชันก็มีผลให้เกิดความแตกต่างทางโครงสร้างของโมเลกุลด้วย เมื่อสายโพลีคีไทด์สังเคราะห์เสร็จก็จะเชื่อมต่อกันเป็นวง โดยเกิดกระบวนการ lactonization ได้เป็นวงแหวนแลคโตน (lactone ring) หรือการเกิดกระบวนการ aromatization ได้เป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตนหรือโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 (Type I polyketide) ได้แก่ สารในกลุ่มแมโครไลด์ (macrolide) และโพลีอิน (polyene) สำหรับโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกหรือโพลีคีไทด์ชนิดที่ 2 (Type II polyketide) ได้แก่ tetracycline และ antracycline เป็นต้น หลังจากได้วงแหวนโพลีคีไทด์แล้ว โมเลกุลส่วนใหญ่จะมีกระบวนการดัดแปลงภายหลัง (post-modification) ได้แก่ การเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) การเติมหมู่เมทิล (methylation) หรือหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ เข้าไปในตำแหน่งต่างๆ ของสารโพลีคีไทด์เพื่อให้สารนั้นมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ที่สมบูรณ์ (Hopwood and Sherman, 1990; Simpson, 1995)

ชนิดของเอนไซม์ polyketide synthase (PKS)

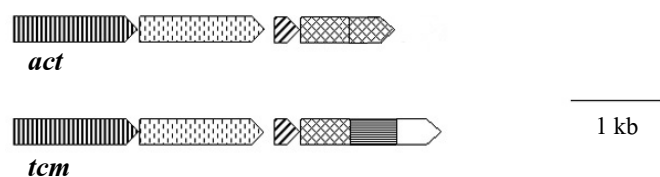
เอนไซม์ PKS ในแบคทีเรียแบ่งเป็น 3 ชนิด โดยมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของยีนและของเอนไซม์ที่สร้างแตกต่างกันดังนี้

Type I polyketide synthase (Type I PKS) เป็นเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่และมีหลายหน้าที่ (multifunctional enzyme) โดเมนที่เกี่ยวข้องเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด เรียกว่า โมดูล (module) ซึ่งจำนวนโมดูลนั้นบอกถึงจำนวนหน่วยต่อเติมที่เป็นองค์ประกอบของสารโพลีคีไทด์ชนิดนั้นๆ และบอกจำนวนรอบของการเกิดกระบวนการ decarboxylative condensation (ภาพที่ 2 ก) ในแต่ละ

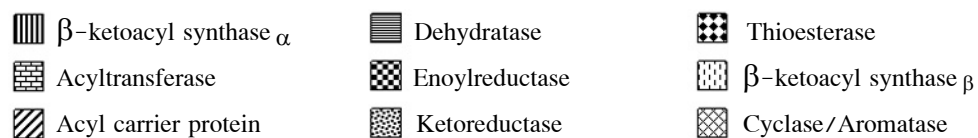
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 2 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน polyketide synthase (PKS)

- (ก) ยีน Type I PKS ของการสังเคราะห์ erythromycin (*ery*) และ niddamycin (*nid*)
- (ข) ยีน Type II PKS ของการสังเคราะห์ actinorhodin (*act*) และ tetracenomycin (*tcm*)
- (ค) ยีน Type III PKS ของการสังเคราะห์ 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (*rpp*) และ monoacetylphloroglucinol (*phl*)

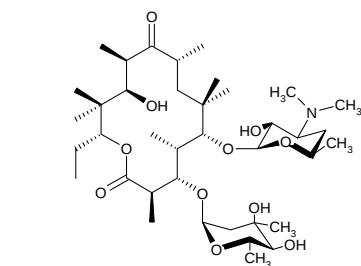
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Hopwood (1997)

โมดูลประกอบด้วยโดเมนที่ทำหน้าที่หลัก ได้แก่ KS, AT และ ACP นอกจากนี้ในแต่ละโมดูลยังประกอบด้วยโดเมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดักชันของหมู่คีโต คือ KR, DH และ ER ซึ่งอาจมีหรือไม่มีโดเมนเหล่านี้ก็ได้ สำหรับสารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 ที่ Type I PKS สังเคราะห์มีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตน ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 (ภาพที่ 3 ก) ได้แก่ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มแมโครไลด์ เช่น erythromycin จาก *Saccharopolyspora erythraea* (Weber *et al.*, 1985) และ tylosin จาก *S. fradiae* (DeHoff *et al.*, 1996) ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม polyene เช่น pimarinin จาก *S. natalensis* (Aparicio *et al.*, 2000) และ nystatin จาก *S. noursei* (Brautaset *et al.*, 2000)

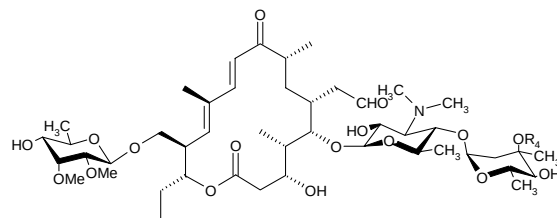
Type II polyketide synthase (Type II PKS) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานแบบ monofunctional unit คือเป็นเอนไซม์เดี่ยวทำงานแต่ละหน้าที่แยกออกจากกัน โดยมีเอนไซม์หลักคือ KS และ ACP เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2 ข) สำหรับ KS จะมีสองหน่วยคือ KS_α และ KS_β โดย KS_α ทำหน้าที่ condensation ขณะที่ KS_β ทำหน้าที่เป็น chain length determination factor นอกจากนี้ยังประกอบด้วย KR และ cyclase/aromatase เพื่อสร้างวงแหวนอะโรมาติก ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 2 (ภาพที่ 3 ข) ได้แก่ actinorhodin จาก *S. coelicolor* (Fernandes-Moreno *et al.*, 1992) tetracenomycin จาก *S. glaucescens* (Hutchinson *et al.*, 1993) และ oxytetracycline จาก *S. rimosus* (Rhodes *et al.*, 1981) เป็นต้น

Type III polyketide synthase (Type III PKS) (ภาพที่ 2 ค) ประกอบด้วยยีนหลักคือ KS เพียงยีนเดียวทำหน้าที่ condensation โดยไม่ต้องอาศัย ACP เอนไซม์ประเภทนี้คล้ายกับเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารตั้งต้นของ flavonoid ในพืช สำหรับในแบคทีเรียจะพบการสร้างสาร polyhydroxy phenol (Hopwood and Sherman, 1990) เช่น 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) จาก *S. coelicolor* A3(2) (Izumikawa *et al.*, 2003) 3,5-dihydroxyphenylacetic acid (DHPA) จาก *Amycolatopsis mediterranei* และ *A. orientalis* (Li *et al.*, 2001) และ monoacetylphloroglucinol (MAPG) จาก *Pseudomonas fluorescens* (Bangera and Thomashow, 1999) (ภาพที่ 3 ค)

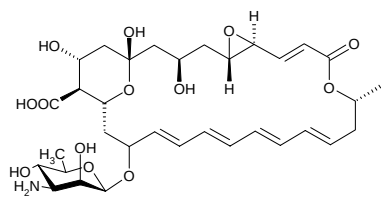
(ก)



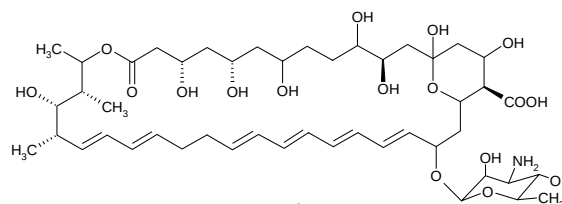
Erythromycin



Tylosin

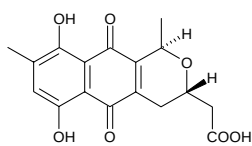


Pimaricin

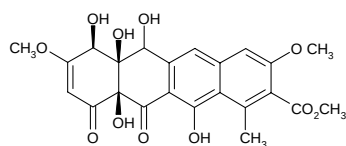


Nystatin

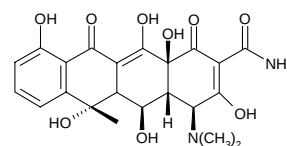
(ข)



Actinorhodin

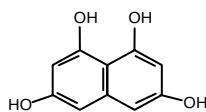


Tetracenomycin C

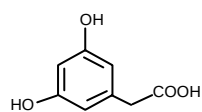


Oxytetracycline

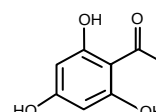
(ค)



THN



DHPA



MAPG

ภาพที่ 3 ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์

(ก) สารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 : erythromycin, tylosin, pimaricin และ nystatin

(ข) สารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 2 : actinorhodin, tetracenomycin C และ oxytetracycline

(ค) สารโพลีคีไทด์ชนิดที่ 3 : 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN),

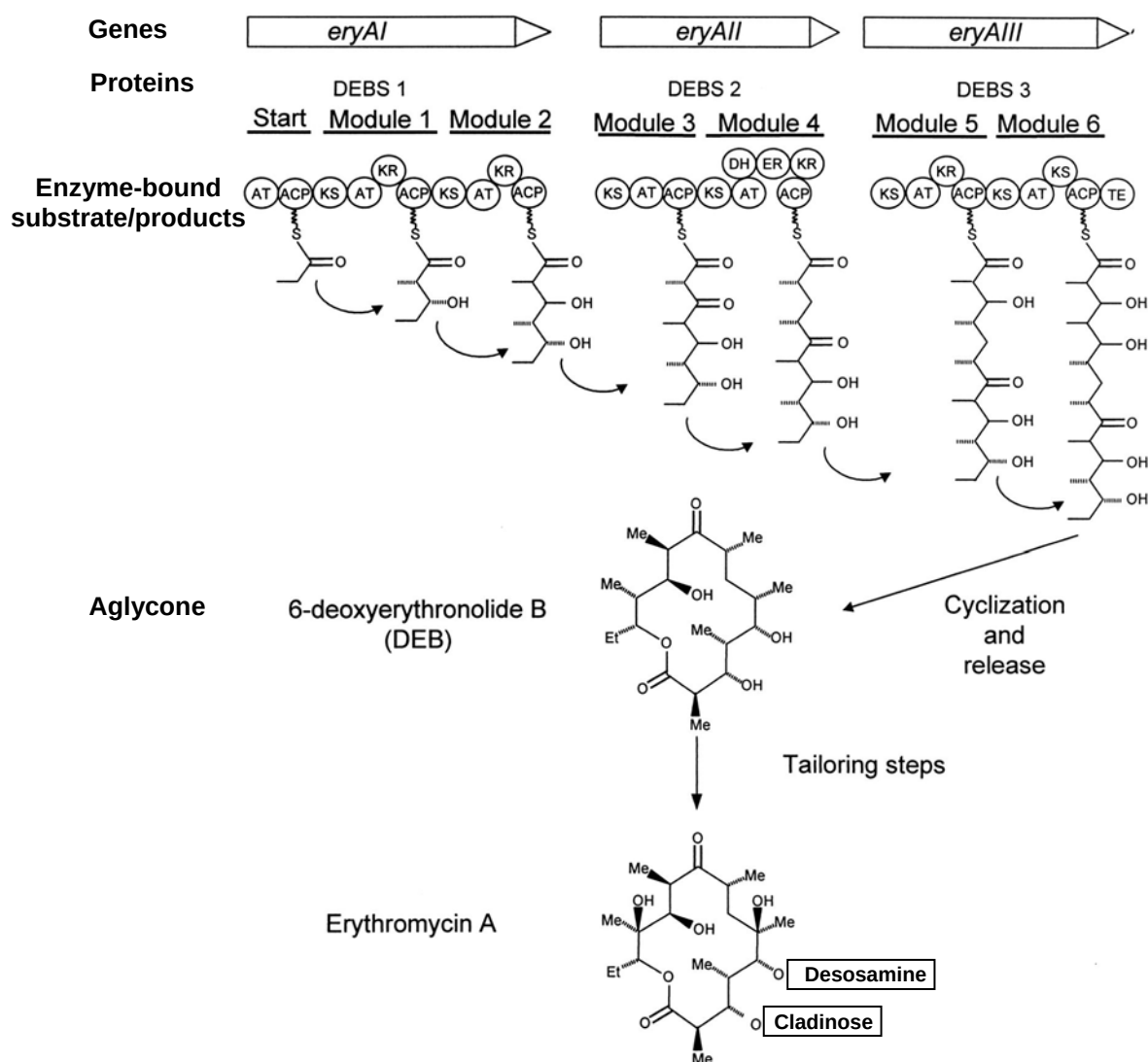
3,5-dihydroxyphenylacetic acid (DHPA) และ monoacetylphloroglucino (MAPG)

กลุ่มยีน Type I PKS ที่สังเคราะห์ erythromycin

Erythromycin เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มมาโครไลด์ ผลิตโดย *Saccharopolyspora erythraea* (Weber *et al.*, 1985) เป็นยีน Type I PKS กลุ่มแรกที่ถูกศึกษาว่ามีการจัดเรียงตัวของยีนเป็นระบบโมดูล (Cortes *et al.*, 1990; Donadio *et al.*, 1991) จึงเป็นต้นแบบในการศึกษายีนในกลุ่มโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1

Erythromycin ประกอบด้วย propionyl-CoA เป็นหน่วยเริ่มต้นและ methylmalonyl-CoA จำนวน 6 โมเลกุลเป็นหน่วยต่อเติม โดยสายโพลีคีไทด์จะเชื่อมกันเป็นวงแลคโตนเรียกว่า 6-deoxyerythronolide B (6dEB) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงในตอนที่ท้าย (post-modification) โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล และน้ำตาลเพื่อให้มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะคือ erythromycin A (Donadio *et al.*, 1991)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง 6dEB จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า deoxyerythronolide B synthase (DEBS) (Cortes *et al.*, 1990; Donadio and Katz, 1992) โดยมีการลอกรหัสอย่างต่อเนื่อง และมีการแปลรหัสเป็น 3 open reading frame (ORF) คือ *eryAI*, *eryAII* และ *eryAIII* ได้โพลีเปปไทด์ 3 ชนิด เรียกว่า DEBS1, DEBS2 และ DEBS3 (ภาพที่ 4) ในแต่ละ ORF ประกอบด้วย 2 โมดูล โดยกลุ่มยีน DEBS มีทั้งหมด 6 โมดูล ในแต่ละโมดูลจะมีโดเมนหลัก คือ KS, AT และ ACP นอกจากโดเมนหลักนี้แล้วในโมดูลที่ 1, 2, 5 และ 6 ยังมีโดเมน KR ซึ่งทำหน้าที่รีดิวซ์หมู่คีโตนไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ขณะที่โมดูลที่ 4 มีโดเมน DH/ER/KR ทำหน้าที่รีดิวซ์หมู่คีโตนไปเป็นพันธะเดี่ยวตามตำแหน่งนั้น สำหรับโมดูลที่ 3 ไม่มีโดเมน KR ทำให้มีหมู่คีโตนอยู่ส่วนต้นของโมดูลที่ 1 เป็นโดเมนเริ่มบรรจุ (loading domain) ทำหน้าที่ส่งหน่วยเริ่มต้นและหน่วยต่อเติมตัวแรกเข้ามาที่ DEBS ส่วนที่ปลายของโมดูลที่ 6 มีโดเมน TE ทำหน้าที่ปล่อยสายโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์เสร็จสมบูรณ์แล้วเชื่อมกันเป็นวงแลคโตนของ 6dEB



ภาพที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์ erythromycin และการจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน *eryAI*, *eryAII* และ *eryAIII* และเอนไซม์ deoxyerythronolide B (DEBS)

ที่มา: Hopwood (1997)

การดัดแปลงโดเมนในกลุ่มยีน Type I PKS ที่สังเคราะห์ erythromycin

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวงแลคโตน โดยการทำให้โดเมนบางส่วนหายไป (deletion) เช่น โดเมน KR ในโมดูลที่ 5 (Donadio *et al.*, 1991) และโดเมน ER ในโมดูลที่ 4 (Donadio *et al.*, 1993) พบว่าได้สารใหม่ คือ 5-keto-6dEB และ 6,7-dehydro-6dEB ตามลำดับ เป็นผลให้เกิดแนวคิดการดัดแปลงโดเมนต่างๆ ในกลุ่มยีนนี้เพื่อให้สร้างสารใหม่ๆ

มีการนำโดเมน AT จากโมดูลที่ 2 ของกลุ่มยีน Type I PKS ที่สังเคราะห์ rapamycin (*rapAT2*) จาก *S. hygroscopicus* (Schwecke *et al.*, 1995) ซึ่งทำหน้าที่ส่ง malonyl-CoA มาแทนที่โดเมน AT ในโมดูลที่ 1 ของ DEBS (*eryAT1*) พบว่า *rapAT2* จะเลือกส่ง malonyl-CoA แทน methylmalonyl-CoA ซึ่งเลือกโดย *eryAT1* ทำให้ได้วงแลคโตนขนาดเล็กแบบ triketide โมเลกุลใหม่ซึ่งขาดหมู่เมทิลที่ตำแหน่งที่ 4 (Oliynyk *et al.*, 1996) ต่อมา *rapAT2* ถูกนำไปแทนที่โดเมน AT ในโมดูลที่ 2, 5 และ 6 ของ DEBS โดยคาดว่าจะเลือกใช้ acetyl-CoA เป็นหน่วยต่อเติมมากกว่าใช้ propionyl-CoA ซึ่งทำให้ได้สารที่เป็นอนุพันธ์ของ 6dEB (Oliynyk *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997) การนำเอาส่วนของโดเมน *rapDH/KR4* มาแทนที่โดเมน KR ในโมดูลที่ 2, 5 และ 6 ของ DEBS ได้สารที่เป็นอนุพันธ์ของ 6dEB ที่มีพันธะคู่จากกระบวนการ dehydration ที่ตำแหน่งของแอลกอฮอล์เดิมได้เป็นพันธะคู่ และยังมีการแทนที่โดเมน KR ในโมดูลที่ 2, 5 และ 6 ของ DEBS ด้วย *rapDH/ER/KR1* ได้สารที่เป็นอนุพันธ์ของ 6dEB โดยตำแหน่งเดิมของแอลกอฮอล์จะเปลี่ยนเป็นพันธะเดี่ยว (Kao *et al.*, 1997; McDaniel *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังมีการแทนที่โดเมน AT และ KR ของ DEBS ภายในโมดูลเดียวกัน ซึ่งก็ทำให้ได้อนุพันธ์ของ 6dEB ที่มีโครงสร้างต่างออกไป (McDaniel *et al.*, 1999) จากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า สามารถสังเคราะห์สารโพลีลิไทด์ให้มีโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ได้ ด้วยการแทนที่โดเมนในตำแหน่งที่ต้องการเปลี่ยนแปลงเพียงตำแหน่งเดียว (single mutation) สองตำแหน่ง (double mutation) หรือสามตำแหน่ง (triple mutation) ทำให้ได้สารที่มีโครงสร้างใหม่มากมายที่คล้ายกับโครงสร้างเดิม (Thamchaipenet, 1999; McDaniel *et al.*, 1999)

มีการดัดแปลงพันธุกรรมของ *E. coli* เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการสังเคราะห์ 6dEB ทำให้มีการสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่มากขึ้น และง่ายต่อการดัดแปลงทางพันธุกรรม (Murli *et al.*, 2002) ต่อมาการศึกษาการสับเปลี่ยนโมดูลของกลุ่มยีน Type I PKS จึงนิยมทำใน *E. coli* เช่น การศึกษาการขาดหายไปบางส่วนของโดเมน AT ซึ่งจะเป็นตัวคัดเลือกหน่วยต่อเติมที่จะเข้ามาต่อ

ในโครงสร้างหลักของโมดูลที่ 6 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ acyl transferase จาก *S. coelicolor* และให้เกิดการแสดงออกในเซลล์ของ *E. coli* (Kumar *et al.*, 2003) พบว่าได้สารใหม่คือ 2-desmethyl-6dEB การทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโดเมน AT สามารถรับหน่วยต่อเติมชนิดอื่นๆ ได้อีก คือ malonyl-CoA เนื่องจากเอนไซม์ acyl transferase จาก *S. coelicolor* เป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อ malonyl-CoA

การศึกษาในกลุ่มยีน Type I PKS อื่นๆ นอกเหนือไปจาก DEBS เช่น กลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง avermectin ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านปรสิต จาก *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 1999) โดยมีหน่วยเริ่มต้น คือ isobutyryl-CoA หรือ 2-methylbutyryl-CoA ส่วนหน่วยต่อเติม คือ acetyl-CoA และ propionyl-CoA กลุ่มยีน Type I PKS ประกอบด้วย 4 ORF คือ *aveA1*, *aveA2*, *aveA3* และ *aveA4* แปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ 4 ชนิด คือ AVES1, AVES2, AVES3 และ AVES4 โดยกลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง avermectin จัดเรียงตัวเป็น 12 โมดูล (Ikeda *et al.*, 1999) การศึกษาในกลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง rapamycin ซึ่งเป็นสารก่อกวนภูมิคุ้มกัน จาก *S. hygroscopicus* (Melino and Sigal, 1990) rapamycin มีหน่วยเริ่มต้น คือ cyclohexanecarboxylic acid ซึ่งได้มาจาก shikimate pathway (Paiva *et al.*, 1993) และหน่วยต่อเติม คือ acetyl-CoA และ propionyl-CoA กลุ่มยีน Type I PKS ประกอบด้วย 3 ORF คือ *rapA*, *rapB* และ *rapC* แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ 3 ชนิด คือ RAPS1, RAPS2 และ RAPS3 โดยมีการเรียงตัวของยีนเป็น 14 โมดูล (Schwecke *et al.*, 1995)

การศึกษาเกี่ยวกับการเรียงตัวและการทำงานของกลุ่มยีน Type I PKS ทำให้เกิดความเข้าใจในการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเปลี่ยนโครงสร้างสารที่มีอยู่เดิมเป็นโครงสร้างใหม่ให้มีความหลากหลายมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ดีกว่าเดิมหรือการออกฤทธิ์แตกต่างออกไป โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาเปลี่ยนแปลงหรือสับเปลี่ยนโครงสร้างยีนและโดเมน เช่น การเปลี่ยนแปลงจำนวนโมดูล หรือการทำ inactivation/insertion ของบางโดเมน

สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรามีความสำคัญทางการแพทย์ในปัจจุบันอย่างมาก จากสถิติพบว่าผู้ป่วยได้รับการติดเชื้อจากเชื้อราเพิ่มมากขึ้น (Walsh, 1992) สาเหตุมาจากการที่ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันลดลงจากการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่รับการรักษาด้วยการให้สารเคมี ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก และผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ล้วนแล้วแต่มีโอกาสติดเชื้อจากเชื้อราได้ทั้งสิ้น ซึ่งเชื้อราที่พบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมามากที่สุด คือ *Candida* และ *Aspergillus* (Walsh, 1992) ด้วยเหตุนี้สารต้านเชื้อราจึงมีความจำเป็นในการรักษาผู้ป่วย

สำหรับทางด้านการเกษตร สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อผลผลิตทางการเกษตรก็มีความสำคัญมาก เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีพืชผลทางการเกษตรมากมายเพื่อการส่งออกและเป็นรายได้สำคัญของประเทศ เมื่อเกิดการติดเชื้อจากเชื้อราทำให้ผลผลิตลดลง ส่งผลต่อเกษตรกรและการส่งออก จึงได้มีการนำสารต้านเชื้อราบางชนิดมาทดลองใช้กับพืช เช่น cycloheximide, griseofulvin และ kasugamycin เป็นต้น (Hamilton-Miller, 1973)

สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิดพบว่ายังมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง ถึงแม้จะมีประสิทธิภาพดีในการต้านเชื้อรา แต่ก็ยังเป็นอันตรายเกินไปสำหรับนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากเชื้อรา จากข้อจำกัดนี้จึงจำเป็นต้องหาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราตัวใหม่ที่มีพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษต่อผู้ป่วยเลย แต่การพัฒนาสารดังกล่าวเป็นไปได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อราเป็นยูคาริโอต ซึ่งมี metabolic pathway ไม่แตกต่างจากมนุษย์มากนัก สารต้านเชื้อราที่มีอยู่ในปัจจุบันและพบว่ามีประสิทธิภาพดี ได้แก่ สารในกลุ่ม polyene (amphotericin B และ nystatin) กลุ่ม azole (fluconazole, ketoconazole และ itraconazole) กลุ่ม allylamine (naftifine และ terbinafine), flucytosine (5-FC), echinocandins (caspofungin) และ griseofulvin (Ryan *et al.*, 2004)

สารโพลีคีไทด์ที่มีสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

สารโพลีคีไทด์ที่มีสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อราเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม polyene โดยสารในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตนขนาดใหญ่มากกว่า 26 membered และมีพันธะคู่ภายในโครงสร้างตั้งแต่ 3-7 คู่ ซึ่งจากลักษณะการมีพันธะคู่ภายในโครงสร้างนี้ ทำให้สาร polyene สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 280-410 นาโนเมตร และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) 3 หรือ 4 ค่า ซึ่งค่าดังกล่าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ในโครงสร้างสาร (ตารางที่ 1) โดยแบ่งเป็น triene, tetraene, pentaene, hexaene และ heptaene

ตารางที่ 1 ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene

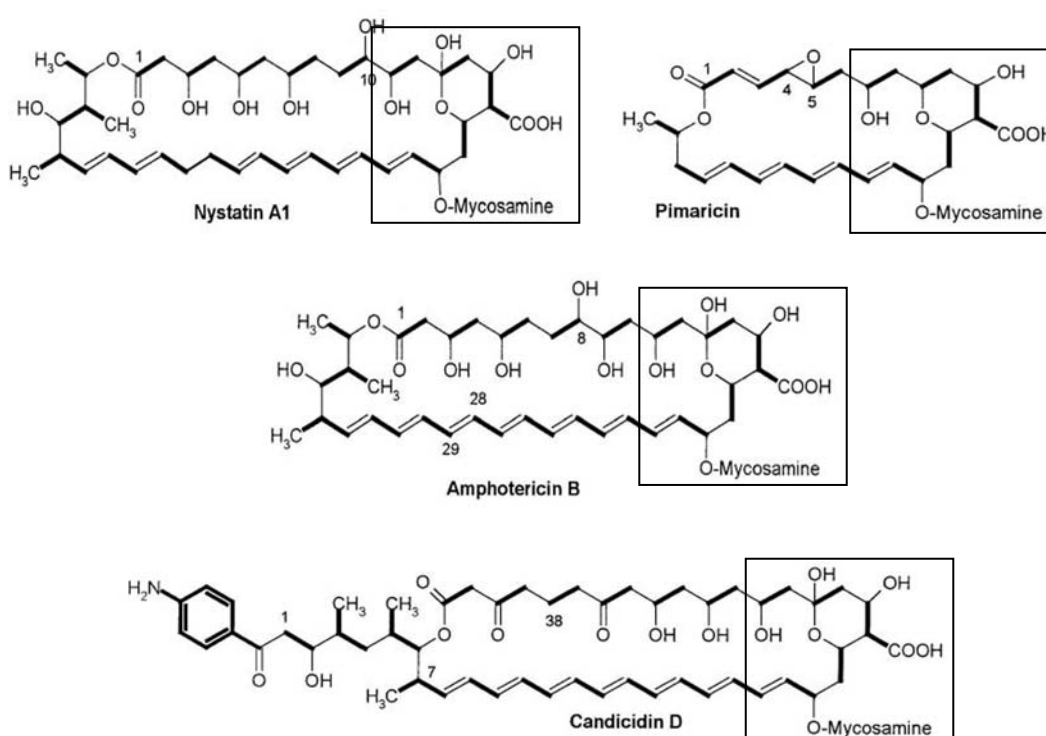
กลุ่มสารโพลีอิน	$\lambda_{\max}$ (nm)		
	1	2	3
Tetraenes	291	305	319
Pentaenes	318	333	351
Hexaenes	340	358	379
Heptaenes	362	381	405

ที่มา: Dinya and Sztaricskai (1986)

ซึ่งมีจำนวนพันธะคู่ 3, 4, 5, 6 และ 7 คู่ตามลำดับ นอกจากนี้สาร polyene ส่วนใหญ่จะมีหมู่น้ำตาลประเภท aminosugar ต่ออยู่กับวงแหวนแลคโตนด้วย β -glycosidic bond โดยน้ำตาลที่พบในสาร polyene ส่วนใหญ่ คือ mycosamine (3-amino-3,6-dideoxy-D-mannose) (Martin, 1985) สารในกลุ่ม polyene จะมีลักษณะทางโครงสร้างที่สัมพันธ์กันอย่างชัดเจน คือบริเวณ conserved region (Kadota *et al.*, 2004) ประกอบด้วย hemiacetal ring และ exocyclic carboxyl group (ภาพที่ 5) ซึ่งบริเวณ conserved region นี้มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่ม polyene (Aparicio *et al.*, 2003) สารที่สำคัญในกลุ่ม polyene ได้แก่ amphotericin B ซึ่งผลิตจากเชื้อ *S. nodosus* (Dutcher, 1968) และ nystatin ผลิตจากเชื้อ *S. noursei* (Hazen and Brown, 1951) (ภาพที่ 5) โดยสารเหล่านี้จะจับตัวกับ ergosterol ซึ่งเป็นสาร sterol ที่พบทั่วไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราได้ดีกว่าสารคอเลสเตอรอลซึ่งเป็นสาร sterol ที่พบทั่วไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ โดยจะจับตัว

กันเป็น complex ทำให้เชื้อหุ้มเซลล์รั่ว และไม่สามารถคัดเลือกสารที่จะผ่านเข้า-ออกในเซลล์ได้ตามปกติ เกิดการเสียสมดุลของประจุภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Imada and Hotta, 1992; McGinnis and Rinaldi, 1996) จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ amphotericin B (heptaene) กับ nystatin (hexaene) ที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่า amphotericin B ให้ผลการรักษาที่ดีกว่า จึงสรุปได้ว่าจำนวนพันธะคู่มีผลต่อระดับความรุนแรงของสารต้านเชื้อรา (McGinnis and Rinaldi, 1996) นอกจากนี้ยังมีสาร polyene อื่นอีกที่เป็นสารต้านเชื้อรา เช่น candicidin ผลิตจากเชื้อ *S. griseus* (Lechevalier *et al.*, 1953), pimaricin ผลิตจากเชื้อ *S. natalensis* (Stryuk *et al.*, 1958) (ภาพที่ 5)

การสังเคราะห์ polyene อาศัยเอนไซม์ Type I PKS มีการศึกษากลุ่มยีนนี้ในการสังเคราะห์ nystatin (Brautaset *et al.*, 2000), pimaricin (Aparicio *et al.*, 1999, 2000), amphotericin (Caffrey *et al.*, 2001) และ candicidin (Campelo and Gil, 2002) พบว่ากลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง nystatin ประกอบด้วย 6 ORF คือ *nysA*, *nysB*, *nysC*, *nysI*, *nysJ* และ *nysK*



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ nystatin, pimaricin, amphotericin และ candicidin D

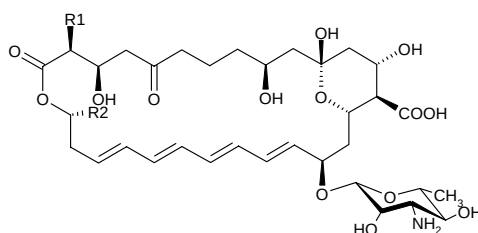
กรอบสี่เหลี่ยม = conserved region (hemiacetal ring)

ที่มา: Aparicio *et al.* (2003)

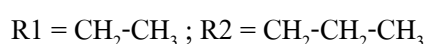
ซึ่งแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ 6 ชนิด คือ NysA, NysB, NysC, NysI, NysJ และ NysK ซึ่งมีการเรียงตัวของยีนเป็น 18 โมดูล โดยมีหน่วยเริ่มต้น คือ acetyl-CoA และหน่วยต่อเติม คือ malonyl-CoA และ methylmalonyl-CoA (Brautaset *et al.*, 2000) กลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง pimarinic ประกอบด้วย 5 ORF คือ *pimS0*, *pimS1*, *pimS2*, *pimS3* และ *pimS4* ซึ่งแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ 5 ชนิด คือ PIMS0, PIMS1, PIMS2, PIMS3 และ PIMS4 ซึ่งมีการเรียงตัวของยีนเป็น 12 โมดูล โดยมีหน่วยเริ่มต้น คือ acetyl-CoA และหน่วยต่อเติม คือ acetyl-CoA และ propionyl-CoA (Aparicio *et al.*, 2000) กลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง amphotericin ประกอบด้วย 6 ORF คือ *amphA*, *amphB* และ *amphC*, *amphI*, *amphJ* และ *amphK* ซึ่งแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ 6 ชนิด คือ AmphA, AmphB, AmphC, AmphI, AmphJ และ AmphK โดยมีการเรียงตัวของยีนเป็น 18 โมดูล มีหน่วยเริ่มต้น คือ acetyl-CoA และหน่วยต่อเติม คือ acetyl-CoA และ propionyl-CoA (Caffrey *et al.*, 2001) การศึกษาบางส่วนของกลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง candididin ประกอบด้วย 4 ORF คือ *canP1*, *canP2*, *canP3* และ *canPF* แปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ได้ 4 ชนิด คือ CanP1, CanP2, CanP3 และ CanPF โดยคาดว่ามีการเรียงตัวของยีนเป็น 10 โมดูล การสังเคราะห์ candididin พบว่ามีหน่วยเริ่มต้น คือ PABA (*p*-aminobenzoic acid) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก ส่วนหน่วยต่อเติม คือ methylmalonyl-CoA (Campelo and Gil, 2002)

Rimocidin

Rimocidin มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา ผลิตโดย *S. rimosus* มีการรายงานครั้งแรกในปี 1951 (Davisson *et al.*) เริ่มมีรายงานการศึกษาโครงสร้าง aglycone บางส่วนของสาร rimocidin ในปี 1965 (Cope *et al.*) และมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกในปี 1966 (Cope *et al.*) จนกระทั่งทราบโครงสร้าง aglycone สมบูรณ์เมื่อปี 1977 (Pandey and Rinehart, 1977; Folkowski *et al.*, 1978) หลังจากนั้นเริ่มมีการศึกษา stereostructure ของสาร rimocidin ในปี 1995 (Sowinski *et al.*) และ 2002 (Volpon and Lancelin) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่า rimocidin มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 279, 291, 304 และ 318 (Cope *et al.*, 1965) มีจำนวนพันธะคู่ 4 คู่ จัดอยู่ในกลุ่ม tetraene (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของ rimocidin

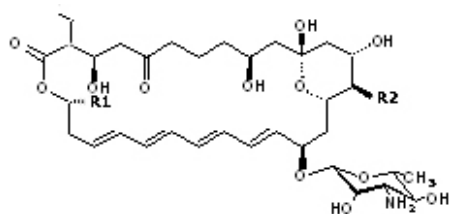


ที่มา: Volpon and Lancelin (2002)

นอกเหนือจาก *S. rimosus* ที่ผลิต rimocidin แล้วยังพบรายงานเร็ว ๆ นี้ว่า *S. diastaticus* var. 108 สามารถสร้างสาร polyene ที่จัดอยู่ในกลุ่ม tetraene ได้ 2 ชนิด คือ rimocidin และ CE-108 นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง oxytetracycline ได้ด้วย (Seco *et al.*, 2004) จากการศึกษาโครงสร้างของสาร polyene ทั้งสองชนิดที่สายพันธุ์นี้ผลิตได้ พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยที่บริเวณ side chain ของ aglycone โดย rimocidin มี side chain เป็นหมู่ propyl ในขณะที่ CE-108 มี side chain เป็นหมู่ methyl ความแตกต่างนี้เกิดจากการเลือกใช้หน่วยเริ่มต้นที่ต่างกัน โดยหน่วยเริ่มต้นของการสังเคราะห์ rimocidin คือ butyryl-CoA และของ CE-108 คือ acetyl-CoA (ภาพที่ 7) โดย tetraene ทั้งสองชนิดนี้ได้มาจากระบวนการสังเคราะห์เดียวกัน ในรูปแบบการแข่งขัน การสังเคราะห์สารใดสารหนึ่งนั้นขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Seco *et al.*, 2004)

เมื่อศึกษาบางส่วนของกลุ่มยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร tetraene ทั้งสองชนิดพบว่าประกอบด้วยยีน *rimA*, *rimB*, *rimC*, *rimD*, *rimE*, *rimF*, *rimG*, *rimH*, *rimJ* และ *rimK* โดยยีน *rimA* และ *rimB* เป็นส่วนของกลุ่มยีน Type I PKS ซึ่งยีน *rimA* แปลรหัสเป็น RimA ซึ่งคือ loading module สำหรับการสังเคราะห์ rimocidin และ CE-108 ยีน *rimJ* แปลรหัสเป็น RimJ ซึ่งมีความคล้ายกับเอนไซม์ crotonyl-CoA reductase น่าจะมีบทบาทสำคัญในการสร้าง butyryl-CoA จาก acetyl-CoA 2 โมเลกุล เนื่องจาก butyryl-CoA และ acetyl-CoA เป็นหน่วยเริ่มต้นของสารสังเคราะห์ rimocidin และ CE-108 ตามลำดับ ส่วนยีนที่เหลือทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ post-modification ได้แก่ RimE เป็น glycosyl transferase ทำหน้าที่ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับ rimocidin และ CE-108 RimF เป็น aminotransferase ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างโมเลกุลน้ำตาล เป็นต้น

(Seco *et al.*, 2004, 2005) จากการศึกษาทำให้สามารถเขียนแบบจำลองการสังเคราะห์ rimocidin และ CE-108 ได้ (Seco *et al.*, 2004) (ภาพที่ 8)



Rimocidin : $R1 = CH_2-CH_2-CH_3$; $R2 = COOH$

CE-108 : $R1 = CH_3$; $R2 = COOH$

Rimocodin B : $R1 = CH_2-CH_2-CH_3$; $R2 = CONH_2$

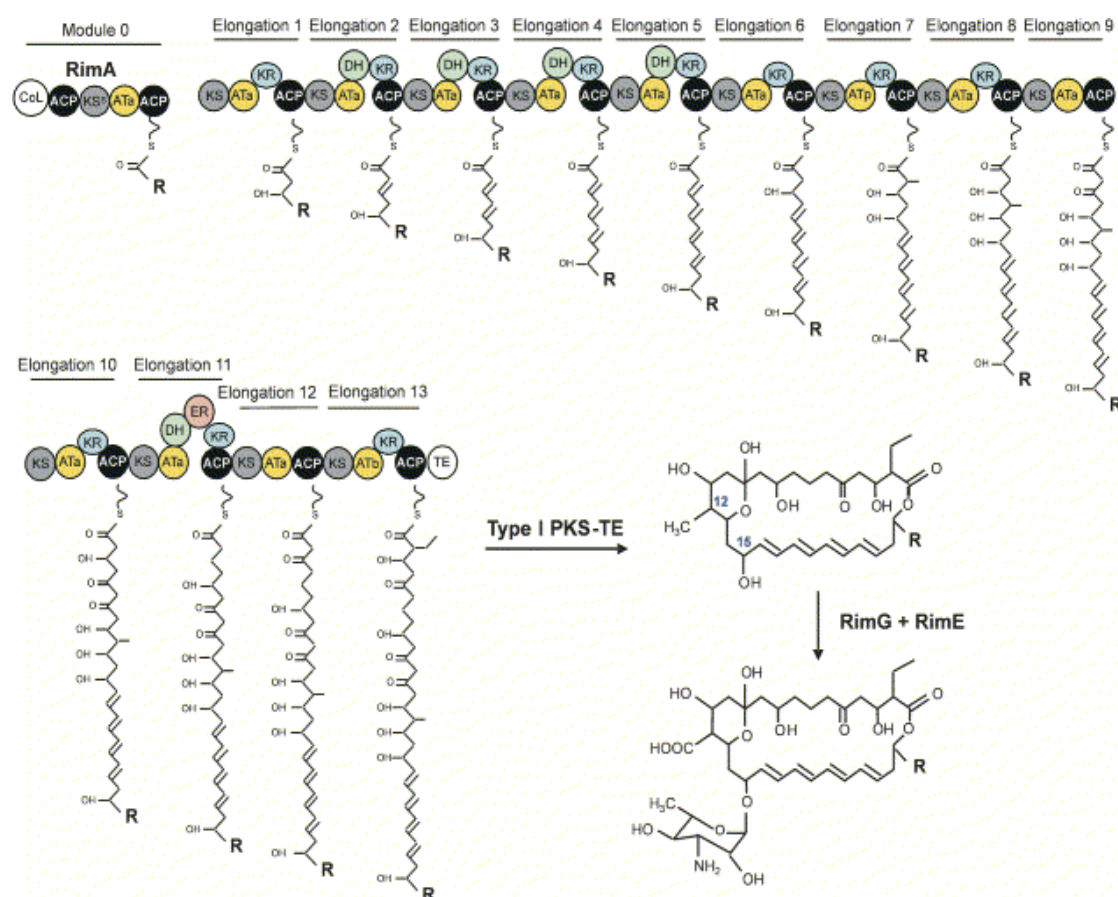
CE-108B : $R1 = CH_3$; $R2 = CONH_2$

Rimocidin C : $R1 = CH_2-CH_2-CH_3$; $R2 = CH_3$

CE-108C : $R1 = CH_3$; $R2 = CH_3$

ภาพที่ 7 โครงสร้างของสาร rimocidin, CE-108 และอนุพันธ์

ที่มา: Seco *et al.* (2004)



ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ rimocidin

ที่มา: Seco *et al.* (2004)

จากการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ rimocidin และ CE-108 ได้นำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาศึกษาหน้าที่ของยีน โดยการทำยีนดิสรัปชันที่บริเวณยีน *rimA* พบว่าได้สาร amide ของ tetraene ทั้งสองชนิด คือ rimocidin B และ CE-108B (ภาพที่ 7) มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมเพียงเล็กน้อยคือเปลี่ยน side chain จากหมู่ carboxyl ไปเป็นหมู่ amide ซึ่งสาร amide ทั้งสองชนิดนี้มีสมบัติต่างไปจากสารเดิมคือมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรามากขึ้น และมีความเป็นพิษน้อยลงแสดงว่า *RimA* เกี่ยวข้องกับการเลือกใช้หน่วยเริ่มต้น (Seco *et al.*, 2005a) ต่อมาจึงมีการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่า rimocidin B และ CE-108B ที่ได้จาก rimocidin และ CE-108 ที่ผ่านการต่อเติมหมู่ฟังก์ชันบางอย่างโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ amidotransferase ซึ่งจะเปลี่ยนหมู่ carboxyl ไปเป็นหมู่ amide โดยทำดิสรัปชันที่ยีน *rimG* เนื่องจากยีน *rimG* แปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ที่ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ carboxyl ให้กับ aglycone ของ rimocidin และ CE-108 เมื่อทำยีนดิสรัปชันของ *rimG* แล้ว ทำให้ได้ rimocidin และ CE-108 ที่ไม่มีหมู่ carboxyl และคาดว่าจะได้สาร amide ของ tetraene ทั้งสองชนิด แต่ปรากฏว่าพบสารชนิดใหม่ คือ rimocidin C และ CE-108C ซึ่งที่บริเวณหมู่ carboxyl เปลี่ยนไปเป็นหมู่ methyl (ภาพที่ 7) rimocidin C และ CE-108C มีสมบัติการต้านเชื้อราไม่ต่างไปจากสารเดิม คือ rimocidin และ CE-108 แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า (Seco *et al.*, 2005b)

การตรวจหาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

การตรวจหาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้น ใช้วิธี agar diffusion method (Brewer and Platt, 1967) โดยเกลี่ยเชื้อราหรือผสมเชื้อรา เช่น *Candida* หรือ *Aspergillus* ลงในอาหาร จากนั้นใช้ paper disc จุ่มสารตัวอย่างแล้ววางบนผิวหน้าของอาหาร หรือวางท่อทรงกระบอกขนาดเล็กลงบนผิวอาหารแล้วหยดสารตัวอย่างลงในท่อทรงกระบอก หรือเจาะอาหารแข็งในจานอาหารให้เป็นช่องทรงกระบอกแล้วหยดสารตัวอย่างลงในช่อง จากนั้นบ่มเชื้อรา และดูการเกิดวงใส (clear zone)

การตรวจสอบสารต้านเชื้อราโดยวิธีทางเคมี ได้แก่ การทำ Thin-Layer Chromatography (TLC) และ spectrophotometry โดยการสกัดสารจากเซลล์ด้วยบิวทานอล (n-butanol) หรือน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate นำสารสกัดไประเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศแล้วละลายตะกอนด้วยเมทานอล นำไปทำ TLC และ spectrophotometry เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (Brewer and Platt, 1967) การแยกสารในกลุ่ม polyene โดยวิธี TLC สามารถใช้ตัวพา (mobile phase) ได้หลายชนิดเช่น chloroform : methanol (85:15), butanol : acetic acid : H₂O (4:1:5) และ butanol : ethanol : H₂O

(1:1:1) (Pandey and Rinehart, 1977; Pandey *et al.*, 1982) เป็นต้น สามารถตรวจสอบการแยกของสารได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต การพ่นด้วยไอของไอโอดีน (iodine vapor) การพ่นด้วยกรดซัลฟูริก (sulfuric acid spray) การพ่นด้วย ninhydrin spray เป็นต้น หรืออาจทำ Bioautography โดยการเททับแผ่น TLC ด้วยอาหารที่มีเชื้อรา เพื่อตรวจสอบบริเวณวงใส (Ciftci *et al.*, 1984)

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces*

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ทรานสดักชัน (transduction) และคอนจูเกชัน (conjugation) ซึ่งวิธีทรานสฟอร์เมชันนั้นต้องเตรียมไมซีเลียมของ *Streptomyces* ให้อยู่ในรูปโพรโทพลาสต์ (protoplast) โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วย lysozyme ซึ่งต้องมีการพัฒนาวิธีการเตรียมโพรโทพลาสต์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิด regeneration ของโพรโทพลาสต์ของ *Streptomyces* ในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามวิธี transformation นำพลาสมิดเข้าสู่โพรโทพลาสต์ของ *Streptomyces* ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอยู่ ในปี 1978 Bibb *et al.* พบว่าประสิทธิภาพของการ transformation จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Polyethylene glycol (PEG) เข้าไปในสายละลายด้วย ใน *Streptomyces* บางสายพันธุ์พบว่าความถี่ในการเกิด transformation จะเท่ากับ 10^6 - 10^7 transformant/ μ g ของดีเอ็นเอ (Matsushima and Baltz, 1985) เนื่องจากความจำกัดในการเตรียมโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมในการทำ transformation จึงได้มีการพัฒนาวิธีการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ไมซีเลียมของ *Streptomyces* ด้วยวิธี electroporation (Pigac and Schremppf, 1995) ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้ผนังเซลล์ของ *Streptomyces* เกิดรู สามารถรับดีเอ็นเอเข้าไปได้

สำหรับวิธีทรานสดักชันนั้นไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักเพราะ actinophage ที่มีอยู่ในปัจจุบันมีอยู่สายพันธุ์เดียว คือ ϕ C31 ซึ่งมีความจำเพาะกับ *Streptomyces* เพียงบางสายพันธุ์ (Kieser *et al.*, 2000)

Streptomyces มีระบบป้องกันเมื่อมีดีเอ็นเอแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ (restriction modification system) โดยจะทำลายดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมธิล ทำให้ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชันลดลง จึงนิยมนำดีเอ็นเอที่ต้องการส่งถ่ายเข้าสู่ *Streptomyces* ไปถ่ายผ่าน *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลเสียก่อน เช่น *E. coli* ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992) เนื่องจากมีจีโนมไทป์เป็น

dam⁻ และ *dcm*⁻ ทำให้ดีเอ็นเอที่ไม่ถูกเติมหมู่เมธิลจึงไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายน้อยลงเมื่อนำเข้าสู่ *Streptomyces* ทำให้มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอสูงขึ้น

คอนจูเกชันต่างสกุล (Intergeneric conjugation)

Mazodier *et al.* (1989) ได้เสนอวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* โดยมี *E. coli* เป็นผู้ให้ (donor) และ *Streptomyces* เป็นผู้รับ (recipient) วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง โดยการคอนจูเกชันนั้นต้องอาศัยพลาสมิดที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (mobilisable plasmid) ซึ่งประกอบด้วย *oriT* (origin of transfer) โดยมีกลุ่มยีน *tra* ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายพลาสมิดนั้น สายพันธุ์ *E. coli* ที่ใช้ในการคอนจูเกชัน ได้แก่ S17-1 (Simon *et al.*, 1983) ที่มียีน *tra* จากพลาสมิด RP4 อยู่บนโครโมโซม สายพันธุ์ ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992) ที่มีพลาสมิด pUB307 ซึ่งเป็น self-transmissible plasmid (Flett *et al.*, 1997) และสายพันธุ์ ET12567 ที่มีพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็น non-transmissible plasmid (Sia *et al.*, 1996) โดยสายพันธุ์ S17-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเติมหมู่เมธิลในดีเอ็นเอ ส่วนสายพันธุ์ ET12567 จะขาดการเติมหมู่เมธิลเนื่องจากมีจีโนไทป์เป็น *dam*⁻, *dcm*⁻ จึงทำให้ ET12567 มีประสิทธิภาพสูงในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces* ที่มีระบบป้องกัน (Flett *et al.*, 1997)

พลาสมิดที่ใช้ในการทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* อาจเป็น shuttle plasmid คือมี origin of replication ของแบคทีเรียทั้งสอง สามารถเพิ่มปริมาณของพลาสมิดได้เมื่ออยู่ในจุลินทรีย์ใดจุลินทรีย์หนึ่ง หรืออาจเป็น non-replicative plasmid คือ มี *ori* สำหรับ *E. coli* แต่ไม่มี *ori* สำหรับเพิ่มจำนวนใน *Streptomyces* จึงเป็นพลาสมิดที่สามารถเกิด recombination แทรกเข้าไปอยู่ในจีโนมของ *Streptomyces* ได้ โดยบริเวณที่เกิด recombination นี้ ได้แก่ บริเวณที่เป็น *attP* ของ actinophage ϕ C31 ซึ่งสามารถเกิด recombination ที่ *attB* บนโครโมโซม หรืออาจเกิดการแทรกเข้าไปที่ตำแหน่งจำเพาะของพลาสมิดสายผสมซึ่งมียีนที่เหมือนกันกับยีนในจีโนม โดยเกิด homologous recombination (Bierman *et al.*, 1992)

วิธีคอนจูเกชันระหว่าง *E. coli* กับ *Streptomyces* ทำโดยการเตรียมสปอร์หรือไม่ซีเลียมของ *Streptomyces* แล้วผสมรวมกับเซลล์ของ *E. coli* ที่มีดีเอ็นเอพาหะที่ต้องการส่งผ่าน แล้วคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะตามชนิดของยีนเครื่องหมายบนพลาสมิดนั้นๆ ขนาดของพลาสมิดที่ใช้ส่งผ่านนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพของการเกิดคอนจูเกชัน โดยทั่วไปพลาสมิดขนาดเล็ก (ประมาณ 5.5 กิโลเบส) มีความถี่

ของการเกิดคอนจูกันสูงมาก (100-1,000) ขณะที่พลาสมิดขนาดใหญ่ (ประมาณ 20 กิโลเบส) หรือ คอสมิด (45-50 กิโลเบส) จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า อย่างไรก็ตามจำนวนความถี่สามารถแปรผันตาม ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ ขนาดของพลาสมิดและแหล่งของดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไปด้วย (Sia *et al.*, 1996)

ยีนดิสรัปชัน

ยีนดิสรัปชัน (gene disruption) เป็นวิธีการทำให้เกิดการกลายที่บริเวณยีนที่ต้องการศึกษา เพื่อใช้ศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนนั้น หรือเรียกว่า gene knockout โดยการใช้เวกเตอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Streptomyces* (non-replicative vector) เชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจ เมื่อนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *Streptomyces* แล้ว ชิ้นดีเอ็นเอจะเกิด homologous recombination กับบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกันกับบนโครโมโซม ทำให้เวกเตอร์เข้าไปแทรกอยู่บนโครโมโซมของ *Streptomyces* ไปขัดขวางการทำงานของยีนที่อยู่ในตำแหน่ง downstream ซึ่งวิธีนี้เกิดได้โดย single crossover สำหรับการทำยีนดิสรัปชันเฉพาะตำแหน่งยีนที่เราสนใจ จะใช้วิธีแทรกยีนต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปขัดขวางการทำงานของยีนโดยทำให้เกิด double crossover แลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนกลายบนเวกเตอร์กับยีนปกติบนโครโมโซม ทำให้ *Streptomyces* ไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นๆ ได้

วิธียีนดิสรัปชันนิยมใช้ศึกษาหน้าที่และหาหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยาปฏิชีวนะใน *Streptomyces* พบว่าวิธีนี้ใช้หากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ polyene ด้วย การศึกษากลุ่มยีนที่สร้างสาร candicidin ใน *S. griseus* IMRU 3570 โดยวิธียีนดิสรัปชันด้วยวิธี double crossover ที่ยีน *pabAB* ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องในการสร้าง PABA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร candicidin เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี spectrophotometry และ TLC พบว่าสายพันธุ์กลาย ABC28 ไม่สร้าง candicidin และเมื่อให้สาร PABA กับสายพันธุ์กลาย ตรวจสอบพบว่าสามารถกลับมาสร้าง candicidin ได้ แสดงว่ายีน *pabAB* เป็นยีนสังเคราะห์ PABA ในการสร้างสาร candicidin (Campelo and Gil, 2002)

การทำยีนดิสรัปชันในการหากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต่อต้านแบคทีเรียใน *S. noursei* ATCC 11455 ด้วยการทำคอนจูกันต่างสกุล โดยใช้ suicide vector คือ pND2 ซึ่งมี *oriT* และยีนต้านยา ampicillin ใช้ *E. coli* ET12567(pUZ8002) เป็นเซลล์ผู้ให้ ในการทดลองนี้ได้ทำยีนดิสรัปชันที่บริเวณ ORF11 จากการวิเคราะห์สารต้านแบคทีเรียที่สกัดได้จากสายพันธุ์กลาย

นำมาทำ TLC และ bioassay ต่อ *Microbacterium luteus* ไม่พบวงใสต่อ *M. luteus* จากสารสกัดที่ได้จากสายพันธุ์กลาย แต่พบวงใสจากสารสกัดที่ได้จาก wild type (Zotchev *et al.*, 2000)

การศึกษาคลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง amphotericin B โดยอาศัยฟาจ KC515 ในการทำยีนดิสรัปชัน ที่บริเวณยีน *amphC* และ *amphI* เพื่อพิสูจน์ว่ายีนนี้เป็นยีน Type I PKS ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง amphotericin จากการวิเคราะห์สายพันธุ์กลายพบว่าไม่สามารถสร้าง amphotericin ได้ (Caffrey *et al.*, 2001)

การศึกษาการทำงานของยีน *pimD* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างหมู่ epoxide ในโครงสร้างของ pimaricin โดยอาศัยฟาจ KC515 พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถสังเคราะห์สารใหม่ได้คือ 4,5-deepoxypimaricin ซึ่งสารนี้จะไม่มีหมู่ epoxide ในโครงสร้างที่บริเวณ C4-C5 จึงสรุปได้ว่ายีน *pimD* ทำหน้าที่เติมหมู่ epoxide ให้กับโครงสร้างของ pimaricin ในตำแหน่งที่ C4-C5 และพบว่า 4,5-deepoxypimaricin มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราต่ำกว่า pimaricin (Mendes *et al.*, 2001)

นอกจากนี้ยังมีการทำยีนดิสรัปชันของ *pimR* ซึ่งเป็น regulator ในกระบวนการสังเคราะห์สาร pimaricin ใน *S. natalensis* (Aparicio *et al.* 2000) โดยอาศัยฟาจ KC515 ซึ่งมีบริเวณ *attP* จากฟาจ ϕ C31 ไม่สมบูรณ์ เมื่อทำ transduction ได้สายพันธุ์กลาย (Δ *pimR*) ที่ไม่สามารถสร้างสาร pimaricin ได้ (Anton *et al.*, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัยสรุปไว้ในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	wild-type	ATCC6275
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lac1^qZΔM15Tn10(TetI)]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS Km^r Cm^r</i>	MacNeil <i>et al.</i> (1992); Sia <i>et al.</i> (1996)
<i>S. rimosus</i> R7	rimocidin producer	ATCC 10970

ตารางที่ 3 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด	สมบัติ	เอกสารอ้างอิง
Litmus28	Amp ^r <i>lacZα</i>	Evan <i>et al.</i> (1995)
pIJ8671	ColE1 replicon <i>oriT</i> Apr ^r Thio ^r	Sun <i>et al.</i> (1999)
pSET151	ColE1 replicon <i>oriT</i> Amp ^r Thio ^r <i>lacZα</i>	Bierman <i>et al.</i> (1992)
pUC18	Amp ^r <i>lacZα</i>	Norrandar <i>et al.</i> (1983)
pATT404	12 kb <i>PstI</i> จาก <i>S. rimosus</i> R7 ใน pUC18	ประกิตชัย (2547)

หมายเหตุ Amp = Ampicilin, Apr = Apramycin, Cm = Chloramphenicol,
Km = Kanamycin, Thio = Thiostrepton

2. สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท Amersco (USA), Becton Dickinson (USA), Fluka (Switzerland), Himedia (India), Hispanlab (Spain), Macherey-Nagel (Germany), Merck (Germany), Scharlau (Spain), Sigma (Germany)

ชุด kit และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานพันธุวิศวกรรมจากบริษัท Amersham Pharmacia Biotech (UK), FMC bioproduct (USA), Qiagen (Germany), Promega (USA), ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA Ladder) จากบริษัท Gibco BRL (USA) และ Fermentas (USA)

เอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริษัท Gibco BRL (USA), Fermentas (USA) และ New England BioLabs (USA) เอนไซม์ Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) จากบริษัท Amersham Pharmacia Biotech (UK) เอนไซม์ T4 DNA ligase จากบริษัท Gibco BRL (USA) และ Fermentas (USA) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Fermentas (USA)

3. วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *Streptomyces*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *Streptomyces* ใช้วิธีการตาม Kieser *et al.* (2000)

3.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

ใช้ก้านไม้พันสำลีปลอดเชื้อแช่สปอร์จาก stock culture มาเกลี่ยให้ทั่วบนจานอาหารแข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน อาหารที่ใช้ได้แก่ อาหาร Manitol Soya flour (MS, 1L: 20 g manitol, 20 g soya flour, 20 g agar; Hobbs *et al.*, 1989)

เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีขวดสปริงวางที่ก้นขวด เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใส่แขวนลอยในอาหารเหลวในอัตราส่วน 1 : 100 อาหารเหลวที่ใช้ได้แก่ Tryptone Soya Broth (TSB สำเร็จรูป)

เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ จะเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในอาหาร ให้มีความเข้มข้นดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง *Streptomyces* และ *E. coli*

Antibiotic stock solution (mg/ml)	Final concentration in media					
	<i>S. rimosus</i> R7			<i>E. coli</i>		
	(µg/ml)			(µg/ml)		
	Agar	Broth	Overlay (µg/plate)	Agar	Broth	Overlay (µg/plate)
Ampicillin (100)	-	-	-	100	50	-
Apramycin (50)	-	-	-	100	50	-
Chloramphenicol (200 in ethanol)	-	-	-	50	25	-
Kanamycin (50)	-	-	-	50	25	-
Nalidixic acid (25)	-	-	-	25	-	500
Thiostrepton (50 in DMSO)	50	5	1000	-	-	-

3.2 การเก็บสปอร์ของ *Streptomyces*

เก็บจากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน โดยเติมน้ำกลั่นหรือสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็งแล้วใช้ก้านไม้พันสำลีสปอร์เบาๆ จากนั้นนำก้อนสำลีสางลงให้จับสารละลายสปอร์ไว้ แล้วใช้หลอดฉีดยาคูดสารละลายสปอร์ผ่านก้อนสำลี เพื่อเป็นการกรองเส้นใยออกจากสปอร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วละลายสปอร์ในสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้งนำเส้นใยที่ได้ไปสกัด

ดีเอ็นเอตามวิธีของ Hopwood *et al.* (1985) โดยเติม Lysis solution (0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, pH 8.0) ที่มี lysozyme 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ RNase A 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลงเพื่อให้เส้นใยกระจายตัว นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 นาที โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลงเป็นครั้งคราว จากนั้นเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้ของเหลวผสมกันทันที เติมน้ำตาลละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (อาจทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ถ้ามีปริมาณโปรตีนมาก) เติม 3M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดได้ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดได้ ผสมโดยการพลิกหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงทั้งหมดทำที่ 4 องศาเซลเซียส)

4. วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli* ใช้วิธีการตาม Sambrook and Russell (2001)

4.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

เชื้อเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง Luria-Bertani (LA, 1L: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar, pH 7.2) ปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง

การเลี้ยงในอาหารเหลวจะเติมเชื้อ *E. coli* ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร ในอัตราส่วน 1 : 100 โดยใช้อาหารเหลว Luria-Bertani (LB, สูตรเหมือน LA แต่ไม่เติม agar) นำไปเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยง *E. coli* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ จะเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ในความเข้มข้นดังตารางที่ 4

4.2 การสกัดพลาสมิด

ใช้วิธี alkaline lysis ของ Sambrook and Russell (2001) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง จากนั้นแขวนลอยตะกอนที่ได้ด้วย Solution I (50 mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที เติม Solution II [0.2 M NaOH, 1%(w/v) SDS] ที่เตรียมสำหรับใช้ทันที 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาจนสารละลายใสและหนืด แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม Solution III (3M potassium acetate, 5M glacial acetic acid) ที่เย็นจัด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมทันทีโดยใช้เครื่อง vortex แช่ในน้ำแข็งนาน 3-5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสหลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเพื่อให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใสหลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอลสมบูร์น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ที่มี RNase A 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (ขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงทั้งหมดทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

4.3 การสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปหาลำดับเบส

ใช้ชุดอุปกรณ์ QIAprep Miniprep (QIAGEN, Germany) ทำตามวิธีการในคู่มือ โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวข้ามคืน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วแขวนลอยตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา

เด็มบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมทันทีโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ลงใน QIAprep spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เด็มบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เด็มบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดของเหลวทั้งหมด จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เด็มบัฟเฟอร์ EB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตามความเหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที หรืออาจนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.4 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell) ของ *E. coli*

ทำตามวิธีของ Chung *et al.* (1989) นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เป็น 0.3-0.4 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำแข็งนาน 15-20 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติม transformation and storage solution [TSS: 10% (w/v) polyethylene glycol (PEG) MW=8000, 10% dimethylsulphoxide (DMSO), 100 mM $MgCl_2$, pH 6.5] ที่เย็นจัด ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ขนาด 1000 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ ให้เซลล์ละลายได้ดีในสารละลาย แบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร ที่ -80 องศาเซลเซียส

4.5 การทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

ใช้วิธี heat-shock (Sambrook and Russell, 2001) เด็มพลาสมิด ปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร ในคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ผสมเบาๆ แล้วแช่น้ำแข็ง 15 นาที จึงบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที เด็ม LB 900 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วแบ่งเซลล์ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร LA (ที่มียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสม) ที่เคลือบด้วย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน dimethylformamide)

ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม จะมีสีขาว ขณะที่โคโลนีที่มีพลาสมิดจะมีสีฟ้า

5. เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer [0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% glycerol] ในอัตราส่วน 5 : 1 แล้วทำอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส เทียบ กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder; Gibco, USA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้ อะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอด้วยการย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ตรวจสอบภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง BioDoc-It System (UVP, USA)

5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเจล

ใช้ชุดอุปกรณ์ QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Germany) และทำตามขั้นตอนใน คู่มือ โดยตัดเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม บัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของชิ้นเจล นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จนเจล ละลายหมด ดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ใน collection tubeทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง แล้วนำ QIAquick spin column วางที่เดิม ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที อีก 1 รอบ จากนั้นย้าย QIAquick spin column มาวางบนหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5.3 การทำสารละลายดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดอุปกรณ์ QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนในคู่มือ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column ที่วางอยู่ใน Collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดของเหลวทั้งหมด จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที หรืออาจนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ เป็นเวลา 1 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การทำ PCR ใช้ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และไพรเมอร์อย่างละ 0.05 พิโคโมล ในปฏิกิริยาที่มี 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 10% DMSO, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร โดยใช้รอบ PCR ดังนี้

รอบที่ 1	94 องศาเซลเซียส	4 นาที
รอบที่ 2-29	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	อุณหภูมิ annealing (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์)	1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที
รอบที่ 30	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	อุณหภูมิ annealing (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์)	1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	4 นาที

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	เอกสารอ้างอิง
ATT010 5' TTGAATTCGAGCCGWTSGCGATCGTSGGYATG 3'	ณัฐิกาและอรินทิพย์ (2544)
ATT011 5' TTTCTGCAGGATSACGTGSGCGTTGGTGCC 3'	
ATT012 5' TGA CTGAGTTGGACACCATCGC 3'	CAC93942.1, Takano <i>et al.</i> (1995)
ATT013 5' CCTGTCGATCCTCTCGTGAC 3'	
M13 Forward 5' CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC 3'	Messing (1983)
M13 Reverse 5' GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA 3'	

หมายเหตุ W = A/T, S = G/C, Y = C/T

5.5 การหาลำดับเบส

สกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดอุปกรณ์ QIAprep Miniprep (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการในข้อ 4.3 และส่งไปหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

5.6 การตัดและเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

กรณีที่ตัดพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอที่จะนำมาเชื่อมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ต้องกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของพลาสมิดด้วยเอนไซม์ calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) การเชื่อมใช้อัตราส่วนของพลาสมิด : ดีเอ็นเอ เท่ากับ 1 : 3 โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase 1 unit เติม 5x ligation buffer 4 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.7 Southern blot hybridization

5.7.1 Southern blot

ทำ Southern blot (Southern, 1975) โดยนำเจลที่ผ่านการทำอะกาโรส อิเล็กโทรโฟริซิสแล้วมาทำ depurination (ในกรณีที่เป็นโครโมโซมหรือชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่) โดยแช่ใน 0.25 M HCl นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน Denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นทำ Southern blot โดยใช้ Alkaline transfer buffer (0.25 M NaOH, 1.5 M NaCl) ย้ายดีเอ็นเอไปอยู่บนเมมเบรน Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, UK) ด้วยวิธี capillary transfer เป็นเวลาข้ามคืน

5.7.2 การติดฉลากดีเอ็นเอที่ใช้เป็นโพรบ

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gene Image random prime labeling module (Amersham Pharmacia Biotech, UK) โดยนำดีเอ็นเอโพรบ 50 นาโนกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 34 ไมโครลิตร ไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติม nucleotide mix 10 ไมโครลิตร random primer 5 ไมโครลิตร Klenow 1 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.7.3 Hybridization และการตรวจสอบผล

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gene Image CDP-star detection module (Amersham Pharmacia Biotech, UK) โดยบ่มเมมเบรนใน hybridization buffer [1 L: 5% liquid block, 5x SSC (20x SSC; 1L: 175.3 g NaCl, 88.2 g sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, 2.5% (w/v) PEG (MW=8000)] ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เติมโพรบ 5-10 ไมโครลิตร ใน hybridization buffer 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที ก่อนนำไปบ่มกับเมมเบรนที่อุณหภูมิเดิมข้ามคืน จากนั้นนำเมมเบรนมาล้างแบบ low stringency ด้วย 2x SSC, 0.1 % SDS (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 50 รอบต่อนาที นาน 20 นาที 2 ครั้ง แล้วล้างแบบ high stringency ด้วย 0.1x SSC, 0.1 % SDS ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที 2 ครั้ง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำไปล้างใน washing buffer [0.3% tween 20 ใน buffer A (10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH

9.5)] นาน 1-5 นาที จึงนำไปป้อนใน blocking solution (10% liquid block ใน buffer A) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปป้อนใน Antibody solution [anti-fluorescein alkaline phosphatase conjugate 1: 5000 ใน buffer A ที่มี 0.5% bovine serum albumin (BSA)] เขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนไปล้างใน washing buffer โดยเขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำเมมเบรนวางบนแผ่นพลาสติก หยด CDP-star detection agent จนท่วมแผ่นเมมเบรน นำพลาสติกอีกแผ่นปิดทับโดยไม่ให้มีฟองอากาศทิ้งไว้ 5 นาที ริดของเหลวส่วนเกินออก แล้วนำไปทาบกัฟฟิล์ม Kodak Medical X-ray Film (Kodak, Japan) ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำฟิล์มไปล้างด้วยสารละลาย Kodak Developer and Replenisher (Kodak, Australia) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วล้างฟิล์มใน Kodak Fixer and Replenisher อีก 1 นาที จากนั้นล้างฟิล์มด้วยน้ำแล้วตากฟิล์มให้แห้ง

5.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน

การแปลรหัสลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Six-Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>) เปลี่ยนลำดับเบสเป็นสายคู่สมโดยโปรแกรม Reverse Complement (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/revcomp.html>) การหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับเบสอาศัยโปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) การค้นหาลำดับที่มีความคล้ายกันในฐานะข้อมูลใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.*, 1990) เมื่อต้องการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทำได้โดยการคัดเลือกข้อมูลในฐานะข้อมูลจำนวนหนึ่งมาทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalX1.81 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalx.html>; Thompson *et al.*, 1994) เลือกทำ bootstrapping สุ่มเป็นจำนวน 1,000 ครั้ง วาด phylogenetic tree ใช้โปรแกรม TreeView 1.6.6 (Page, 1996)

6. การตรวจหาและโคลนยีน Type I PKS ในพลาสมิด pATT404

ตรวจหากลุ่มยีน Type I PKS โดยการใช้โพรบที่จำเพาะต่อยีน Type I PKS ตรวจสอบชิ้นส่วนโครโมโซมของพลาสมิด pATT404 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมด้วยวิธี Southern hybridization แล้วจึง subclone และวิเคราะห์โคลนต่อไป

6.1 การเตรียมดีเอ็นเอโพรบ

โพรบที่ใช้ในการทดลองเป็นส่วนของโดเมน KS ที่ได้จากพลาสมิด pATT401 (Chotewutmontri and Thamchaipenet, 2002) ตัดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นโดเมน KS ออกจากพลาสมิด pATT401 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมและแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปติดฉลาก ตามวิธีข้อ 5.7.2

6.2 การตรวจสอบด้วย Southern Blot Hybridization

นำพลาสมิด pATT404 (ประกิตชัย, 2547) ซึ่งมีส่วนของกลุ่มยีน Type I PKS ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม และแยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำ Southern blot hybridization ตามวิธีการในข้อ 5.7 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีกลุ่มยีน Type I PKS ด้วยโพรบจากข้อ 6.1

6.3 การโคลนยีน

เลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอจากผลการทำ Southern blot hybridization ในข้อ 6.2 โดยตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจากอะกาโรสเจลและสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.3 จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไป subclone และหาลำดับเบสเพื่อทำแผนที่ของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้กับฐานข้อมูล

6.4 การทำแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน Type I PKS มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ แล้วแยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้ววิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เพื่อวาดแผนที่ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ต่างๆ ที่อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอนั้น

7. การศึกษาหน้าที่ของยีน Type I PKS จากพลาสมิด pATT404

นำชิ้นดีเอ็นเอที่หาลำดับเบสแล้วคาดว่าจะจะเป็น Type I PKS ได้แก่ ชิ้นที่ได้จากการ subclone พลาสมิด pATT404 (ข้อ 6.3) ไปทำยีนคิสรูปชั้นเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน โดยตรวจสอบผลจากการสังเคราะห์สารด้านเชื้อราของสายพันธุ์กลายที่ได้

7.1 การเตรียมพลาสมิดสำหรับการทำยีนคิสรูปชั้น

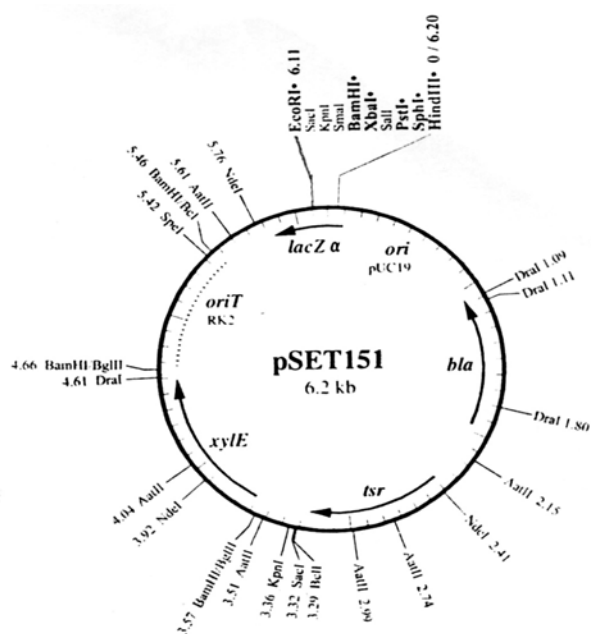
นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการ subclone พลาสมิด pATT404 จากข้อ 6.3 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของยีน Type I PKS โคลนเข้าสู่พลาสมิด pSET151 (ภาพที่ 9) และ pIJ8671 (ภาพที่ 10) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม แล้วทำทรานสฟอร์มเมชันเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ตามวิธีการข้อ 4.5 จากนั้นนำไปทำคอนจูเกชันเข้าสู่ *S. rimosus* R7

7.2 การคอนจูเกชันต่างสกุล (Intergeneric conjugation)

การทำคอนจูเกชันต่างสกุล อาศัยวิธีการของ ประกิตชัย (2547)

7.2.1 การเตรียม *E. coli* (donor)

เลี้ยง *E. coli* ข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิมจนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จึงนำเชื้อที่ได้ 5 มิลลิลิตร ไปล้าง 2 ครั้งด้วยอาหาร LB ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที แล้วละลายในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

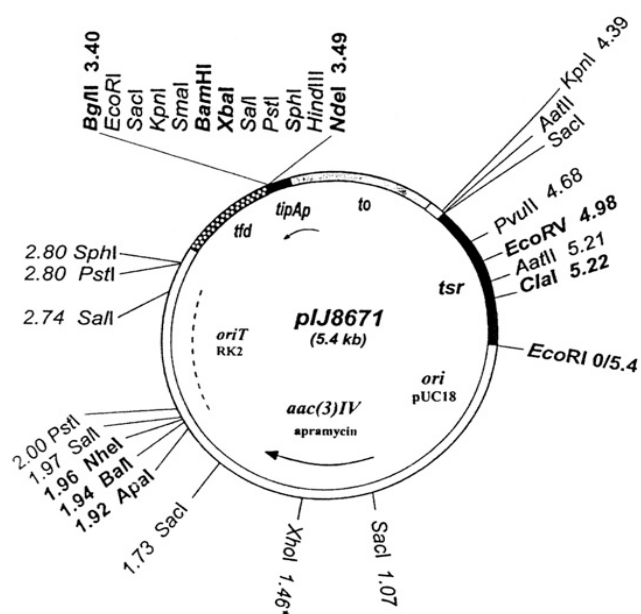


ภาพที่ 9 แผนที่พลาสมิด pSET151

tsr = Thiostrepton resistance gene, *bla* = Ampicillin resistance gene,

xylE = Catechol-2,3-dioxygenase

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)



ภาพที่ 10 แผนที่พลาสมิด pIJ8671

tsr = Thiostrepton resistance gene, *aac(3)IV* = Apramycin resistance gene

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

7.2.2 การเตรียม *S. rimosus* R7 (recipient)

เลี้ยงเชื้อ *S. rimosus* R7 บนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เก็บสปอร์ตามข้อ 3.2 แล้วเตรียมสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^8 - 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น คูดสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง แล้วแขวนลอยสปอร์ในอาหาร 2x YT (1L: 16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 10 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

7.2.3 การทำคอนจูเกชัน

ผสม donor และ recipient เข้าด้วยกัน ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหาร 2x YT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยอาหาร 2x YT แล้วเกลี่ยส่วนผสมดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อจานอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

เมื่อส่งถ่ายพลาสมิดที่ต้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton จะเททับจานอาหารที่บ่มแล้วด้วยสารละลาย 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย thiostrepton 1,000 ไมโครกรัม และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัม เพื่อคัดเลือก *Streptomyces* ที่ได้รับพลาสมิดหรือสายพันธุ์กลาย (ex-conjugant) และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 3-5 วัน จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นไปเกลี่ยลงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะ thiostrepton และ nalidixic acid ความเข้มข้นตามตารางที่ 4 อีก 1-2 รอบ เพื่อตรวจสอบยืนยันผลการต้านยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดที่ได้รับรวมทั้งกำจัด *E. coli*

8. การตรวจสอบสายพันธุ์กลาย

8.1 ตรวจสอบการเกิดวงใส (clear zone) ด้วยวิธี agar plug assay (Brewer and Platt, 1967)

นำสายพันธุ์กลายเกลี่ยลงบนอาหาร MS ซึ่งมียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสม เลี้ยงโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เจาะอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

เกลี่ยสปอร์ของ *A. niger* บนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA; 1L: 200 g potato, 20 g dextrose, 20 g agar, pH 7.2) แล้วนำชิ้นอาหารที่เจาะออกมา วางลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการเกิดวงใส เทียบกับ *S. rimosus* R7 สายพันธุ์ wild type

8.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธี PCR

สกัดโครโมโซมของสายพันธุ์กลายตามวิธีการในข้อ 3.3 แล้วทำ PCR ตามวิธีข้อ 5.4 ด้วยไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 หรือ ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse (ตารางที่ 5) เพื่อตรวจสอบยีนต้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton (*tsr*) หรือตรวจสอบจีนดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 ตามลำดับ แล้วตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

8.3 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธี Southern Blot Hybridization

ตรวจสอบโดยนำสายพันธุ์กลาย ที่ขึ้นบนจานอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสม ไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มียาปฏิชีวนะ ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แล้วสกัดโครโมโซมตามวิธีการในข้อ 3.3 นำไปทำ Southern blot hybridization ตามวิธีการข้อ 5.7 โดยใช้โพรบที่เหมาะสม

9. การตรวจสอบการผลิตสารต้านเชื้อ rimocidin

9.1 การสกัดสาร rimocidin

เลี้ยงสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว SPG [2.5%(w/v) soya peptone, 0.5 mM ZnSO₄, 2% (w/v) glucose, pH 7.5; Martin and Demain, 1976] ปริมาตร 1 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมีขวดสปริงวางที่ก้นขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน แยกสารที่ต้องการสกัดเป็น 2 ส่วน คือ น้ำเลี้ยงและเส้นใยโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใย

สกัดสาร rimocidin จากน้ำเลี้ยงในกรวยแยก โดยเติมเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ปริมาตรเท่าตัว เขย่าแล้วตั้งทิ้งให้แยกชั้น เก็บสารละลายส่วนบนมาทำเจนน้าออกโดยการเติม sodium sulfate anhydrous จนอิ่มตัว (ตกตะกอนได้ดี) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซ้ำมกั้น กรอง sodium sulfate ออก โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไประเหย ethyl acetate ออกโดยการทำให้ evaporation จนแห้ง ละลายตะกอนด้วยเมธานอล 5-10 มิลลิลิตร ตามความเหมาะสม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดสาร rimocidin จากเส้นใย โดยการเติมบิวทานอล (n-butanol) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำที่หนักเปียก ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่แยกได้ไประเหยบิวทานอลออก โดยการทำให้ evaporation จนแห้ง ละลายตะกอนในเมธานอล 5-10 มิลลิลิตร ตามความเหมาะสม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9.2 การตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin-Layer Chromatography; TLC) และ Bioautography

นำสารสกัดที่ต้องการตรวจสอบ จุ่มบนแผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ขนาด 20x20 เซนติเมตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร สูงจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับ nystatin 250 ไมโครกรัม ทำ TLC โดยใช้ตัวพา คือ n-butanol : acetic acid : H₂O (4:5:1) ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ทำ bioautography โดยนำแผ่น TLC ที่ระเหยตัวพาดีแล้ว วางลงในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท แล้วเททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่ผสมสปอร์ของ *A. niger* ให้ทั่วทั้งแผ่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการเกิดวงใส (Brautaset *et al.*, 2000)

9.3 ตรวจสอบโดย Spectrophotometry

ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากข้อ 9.1 ในช่วงแสง 200-400 นาโนเมตร (UV scan) โดยเครื่อง DU[®] 800 UV/Visible Spectrophotometry (Beckman Coulter, USA) ซึ่งต้องเจือจางสารสกัดด้วยเอทานอลตามความเหมาะสมให้มีค่าดูดแสง (Absorbance) ในช่วง 0-2 เก็บข้อมูลในรูปแบบกราฟ

10. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2545- กันยายน 2548

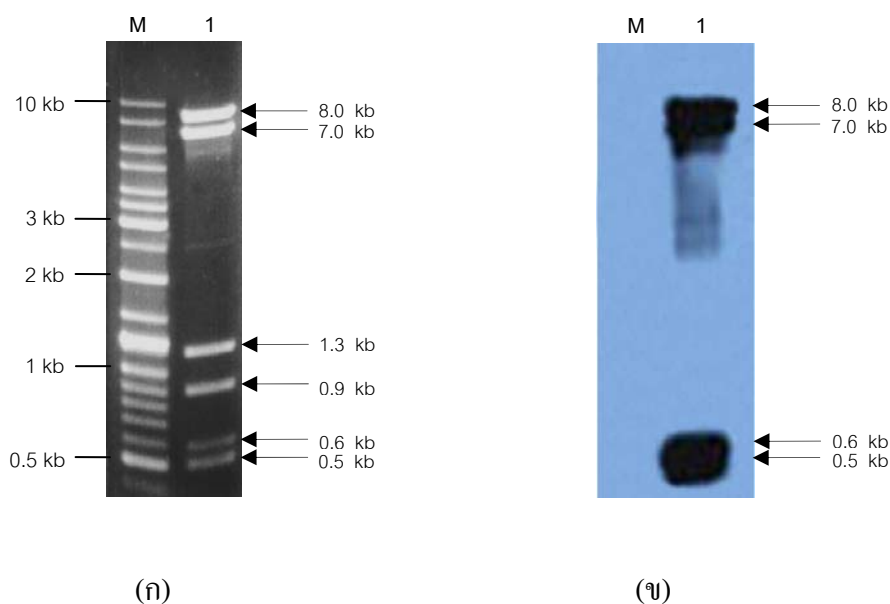
ผลและวิจารณ์

1. การโคลนกลุ่มยีน Type I Polyketide Synthase (Type I PKS) จาก *S. rimosus* R7

จากรายงานของประกิจชัย (2547) ได้โคลนยีน Type I PKS จาก *S. rimosus* R7 ด้วยวิธี Southern blot hybridization ได้ 2 โคลนคือ พลาสมิด pATT403 และ pATT404 ซึ่งประกอบด้วย ซีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส จากการตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* และซีนดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 12 กิโลเบส จากการตัดด้วยเอนไซม์ *PstI* ตามลำดับ (ประกิจชัย, 2547) ซึ่งพลาสมิด pATT403 ได้ถูกวิเคราะห์ลำดับเบสแล้ว จึงเลือกพลาสมิด pATT404 มาวิเคราะห์ต่อในงานวิจัยนี้

1.1 การตรวจสอบยีน Type I PKS ด้วย Southern blot hybridization

ตัด pATT404 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* แล้วนำไปทำ Southern blot hybridization ด้วยโพรบของโดเมน KS จากพลาสมิด pATT401 (ประกิจชัย, 2547) ใช้อุณหภูมิ hybridize ที่ 68 °C ตรวจพบแถบซีนีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน คือ 0.5, 0.6, 7 และ 8 กิโลเบส ดังภาพที่ 12

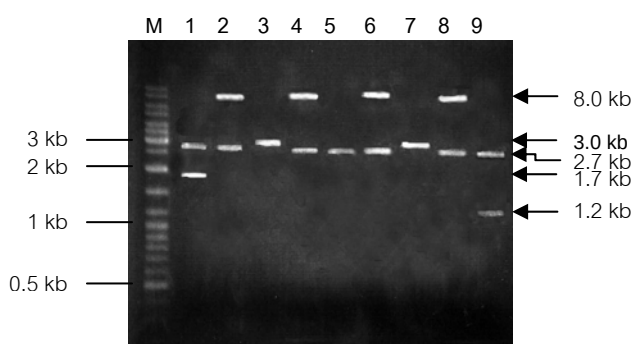


ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ Southern blot hybridization ด้วยโพรบ KS (ก) agarose gel electrophoresis

(ข) Southern blot hybridization ; 1 = pATT404/ *SacI*; M = 1 kb ladder

1.2 การ subclone พลาสมิด pATT404

โคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 7 และ 8 กิโลเบส จากพลาสมิด pATT404 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* (ภาพที่ 11) เข้าสู่พลาสมิด pUC18 และตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* พบว่าโคลนในแถวที่ 2, 4, 6 และ 8 ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส (ภาพที่ 12)

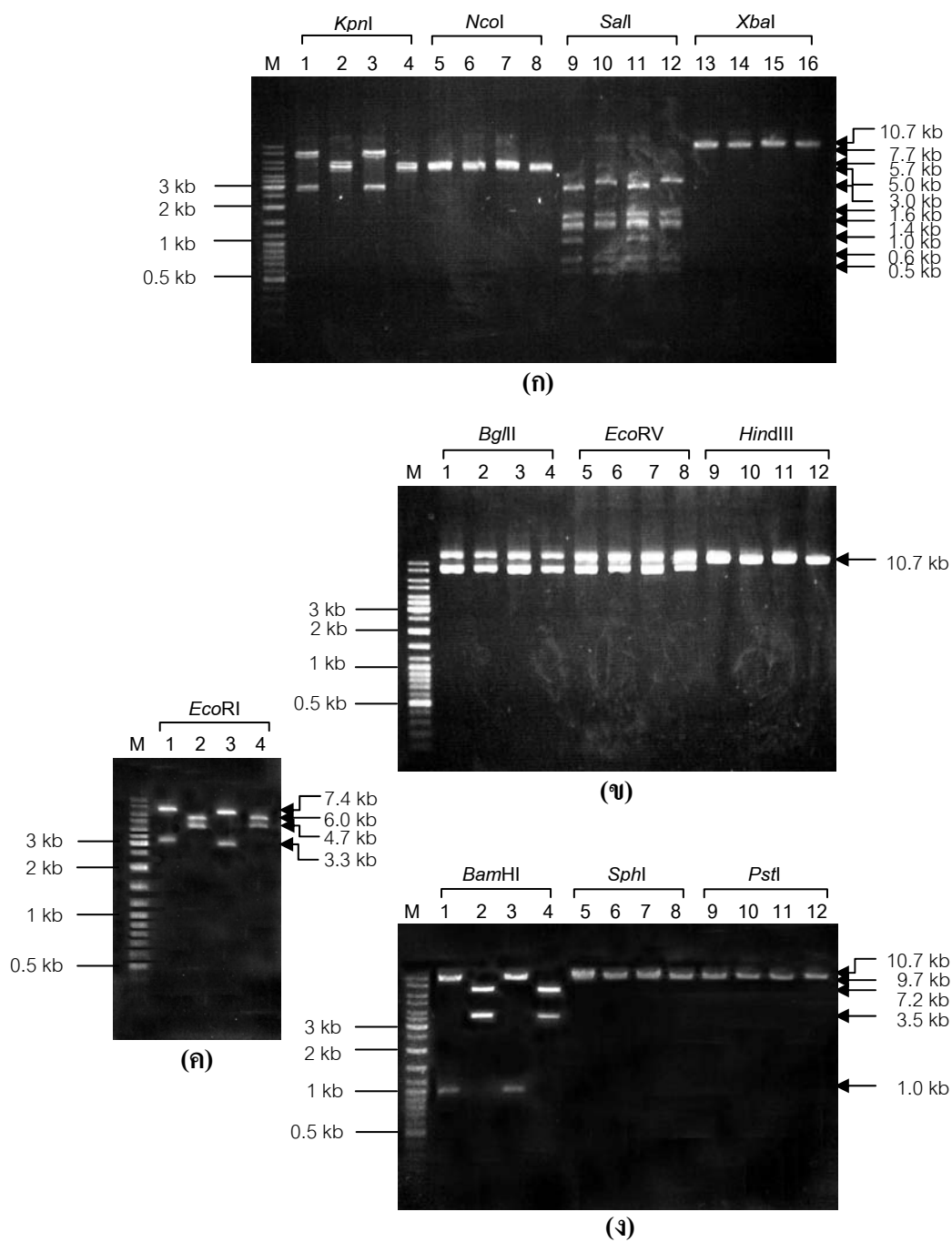


ภาพที่ 12 การคัดเลือกโคลน 9 โคลน (ช่อง 1-9) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*; M = 1 kb ladder

นำทั้ง 4 โคลนที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI*, *SalI*, *SphI* และ *XbaI* (ภาพที่ 13) การตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.0 และ 7.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 1 และ 3) แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 5.0 และ 5.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 2 และ 4) การตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 5.0 และ 5.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 5-8) การตัดด้วยเอนไซม์ *SalI* แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 0.5, 0.6, 1.0, 1.3(x3), 1.6 และ 3.0 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 9 และ 11) แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 0.5, 0.6, 1.3(x3), 1.6 และ 4.0 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 10 และ 12) การตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI*, *HindIII*, *SphI* และ *PstI* พบแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 10.0 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 13-16, ภาพที่ 13 ข แถวที่ 9-12, ภาพที่ 13 ง แถวที่ 5-12) แสดงว่าไม่มีตำแหน่งตัดเหล่านี้อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ การตัดด้วยเอนไซม์ *BglII* และ *EcoRV* พบว่าไม่มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ (ภาพที่ 13 ข แถวที่ 1-8) การตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.3 และ 7.4 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ค แถวที่ 1 และ 3) แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 4.7 และ 6.0 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ค แถวที่ 2 และ 4) การตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.0 และ 9.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ง แถวที่ 1 และ 3) แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.5 และ 7.2 (ภาพที่ 13 ง แถวที่ 2 และ 4) จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด พบว่าทั้ง 4 โคลนมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ 2 แบบ เนื่องจากมีทิศทางการโคลนขึ้นดีเอ็นเอตรงข้ามกัน โดยโคลนหมายเลข 2 และ 6 มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกัน จึงตั้งชื่อพลาสมิดว่า pATT700 ส่วนโคลนหมายเลข 4 และ 8 มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกัน จึงตั้งชื่อพลาสมิดว่า pATT701 โดยเลือกใช้พลาสมิด pATT700 เพื่อทำ subclone ต่อไป

จากการตัดพลาสมิด pATT700 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด ได้แก่ *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sph*I และ *Xba*I (ภาพที่ 13) ซึ่งบางเอนไซม์มีตำแหน่งตัด 1 ตำแหน่ง บน multiple cloning site ของพลาสมิด pUC18 คือ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sph*I และ *Xba*I จากการแยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงว่า *Bgl*II, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I, *Sph*I และ *Xba*I ไม่มีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 3.0 และ 7.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 1 และ 3) แสดงว่ามีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง เอนไซม์ *Nco*I ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 5.2 และ 5.5 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 5 และ 7) แสดงว่ามีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่ง เอนไซม์ *Sal*I ให้แถบดีเอ็นเอ 8 แถบ ขนาด 0.5, 0.6, 1.0, 1.3(x3), 1.6 และ 3.0 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ก แถวที่ 9 และ 11) แสดงว่ามีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ 8 ตำแหน่ง เอนไซม์ *Eco*RI ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 3.3 และ 7.4 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ค แถวที่ 1 และ 3) แสดงว่ามีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง เอนไซม์ *Bam*HI ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 1.0 และ 9.7 กิโลเบส (ภาพที่ 13 ง แถวที่ 1 และ 3) แสดงว่ามีตำแหน่งตัดบนขึ้นดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่ง



ภาพที่ 13 การตรวจสอบ subclone ของ pATT404 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(ก) แถวที่ 1-4 = *KpnI* แถวที่ 5-8 = *NcoI* แถวที่ 9-12 = *SaII* แถวที่ 13-16 = *XbaI*

(ข) แถวที่ 1-4 = *BglII* แถวที่ 5-8 = *EcoRV* แถวที่ 9-12 = *HindIII*

(ค) แถวที่ 1-4 = *EcoRI*

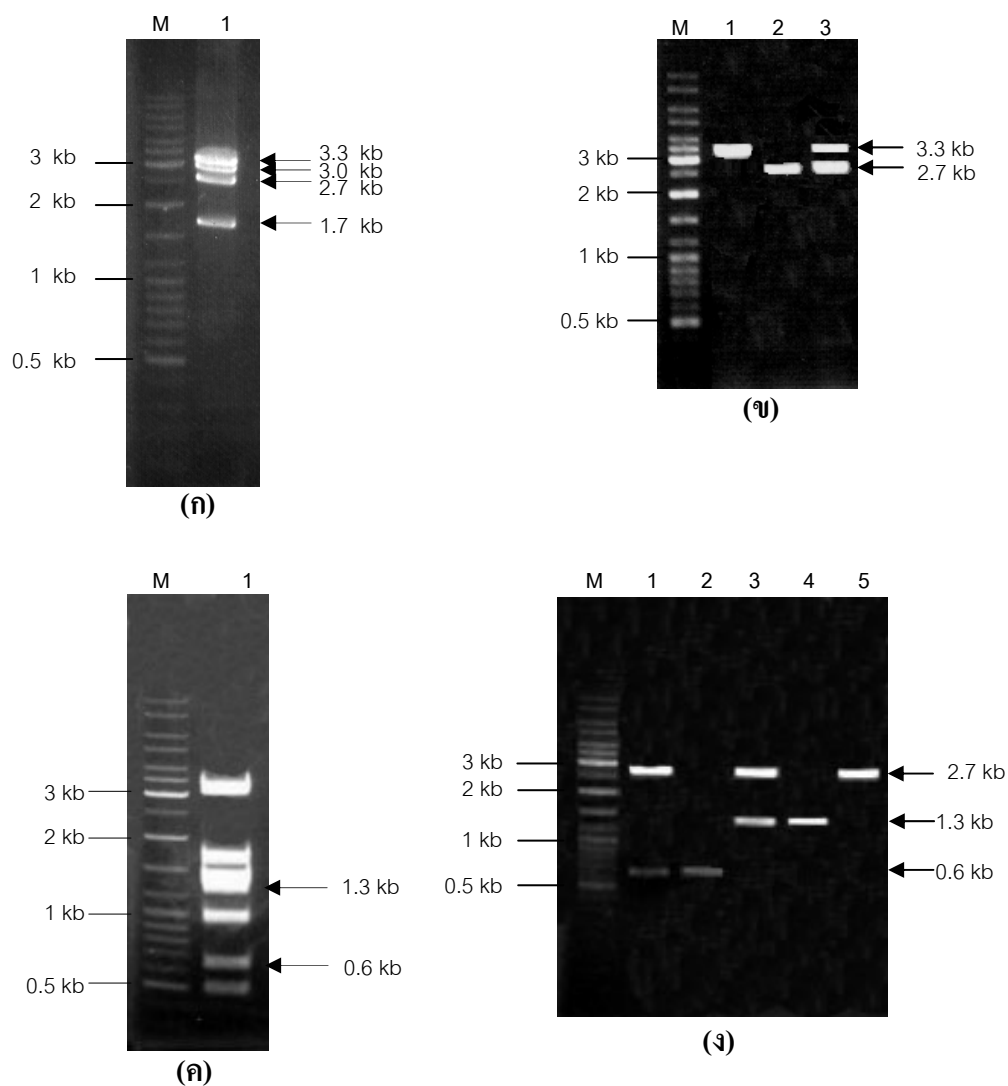
(ง) แถวที่ 1-4 = *BamHI* แถวที่ 5-8 = *SphI* แถวที่ 9-12 = *PstI*; M = 1 kb ladder

1.3 การ subclone พลาสมิด pATT700

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pATT700 ในข้อ 1.2 จึงเลือกเอนไซม์ *EcoRI* และ *KpnI* ในการ subclone ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส (ภาพที่ 14 ก) โคลนเข้าสู่พลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน ได้พลาสมิด pATT702 (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 14 ข)

นำพลาสมิด pATT700 มาตัดด้วยเอนไซม์ *SaI* ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 0.5, 0.6, 1.0, 1.3(x3), 1.6 และ 3.0 กิโลเบส (ภาพที่ 14 ค) เลือกโคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.3 และ 0.6 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT712 และ pATT713 ตามลำดับ (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 14 ง)

นำพลาสมิด pATT702 มาตัดด้วยเอนไซม์ *SaI* (ภาพที่ 15 ก) แล้วนำมา re-ligate เนื่องจากมีส่วนของพลาสมิด pUC18 อยู่ ให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT720 (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 15 ข)



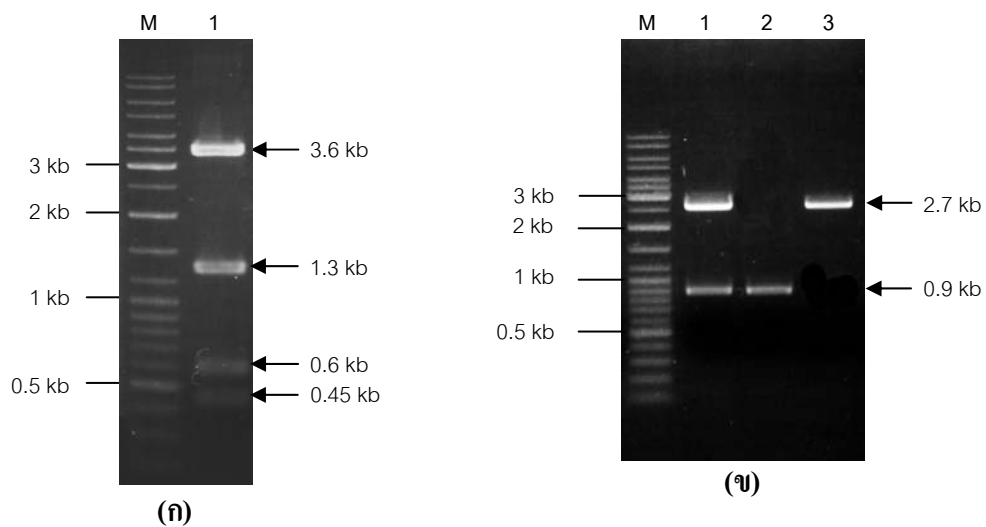
ภาพที่ 14 การ subclone พลาสมิด pATT700 และการตรวจสอบโคลน

(ก) แถวที่ 1 = pATT700/*EcoRI*/*KpnI*

(ข) การตรวจสอบโคลนของพลาสมิด pATT702 แถวที่ 1 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส
แถวที่ 2 = pUC18/*EcoRI* แถวที่ 3 = pATT702/*EcoRI*

(ค) แถวที่ 1 = pATT700/*SaI*

(ง) การตรวจสอบโคลนของพลาสมิด pATT712 และ pATT713 แถวที่ 1 =
pATT713/*SaI* แถวที่ 2 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.6 กิโลเบส แถวที่ 3 = pATT712/*SaI*
แถวที่ 4 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส แถวที่ 5 = pUC18/*SaI*; M = 1kb ladder



ภาพที่ 15 การ subclone พลาสมิด pATT702 และการตรวจสอบโคลน

(ก) แถวที่ 1 = pATT702/*Sa*II

(ข) การตรวจสอบโคลนของพลาสมิด pATT720 แถวที่ 1 = pATT720/*Sa*II/*Eco*RI

แถวที่ 2 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9 กิโลเบส แถวที่ 3 = pUC18/*Sa*II

2. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน Type I PKS จาก *S. rimosus* R7

2.1 การหาลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิด pATT702 และ subclone

หาลำดับเบสของพลาสมิด pATT702 โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward ได้ลำดับเบส 721 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 240 กรดอะมิโน เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่ามีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีน Type I PKS ในฐานข้อมูล GenBank (กันยายน 2548) (ตารางที่ 6) โดยมีค่าความเหมือนกับสารในกลุ่มที่เป็น polyene เช่น pimaricin จาก *S. natalensis* (Aparicio *et al.*, 2000) ซึ่งให้ค่าความเหมือนสูงสุดที่ 65 เปอร์เซ็นต์ candicidin จาก *Streptomyces* sp. FR-008 (Chen *et al.*, 2003) nystatin จาก *S. noursei* (Brautaset *et al.*, 2000) และ amphotericin จาก *S. nodosus* (Caffrey *et al.*, 2001) แสดงว่า pATT702 มียีน Type I PKS จึงหาลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse สำหรับพลาสมิด pATT702, pATT712, pATT713 และ pATT720 ซึ่งเป็น subclone ของพลาสมิด pATT700 ทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ข้อมูล 4 อันดับแรก ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของซันติเอ็นเอในพลาสมิด pATT702 ทางด้านไพรเมอร์ M13 Forward กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastX

ลำดับ ที่	เอนไซม์	จุลินทรีย์	สารที่สังเคราะห์	Identity (%)	Accession No.	เอกสารอ้างอิง
1	PimS2	<i>S. natalensis</i>	Pimaricin	65	CAC20921	Aparicio <i>et al.</i> (2000)
2	FscD	<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	Candicidin	48	AAQ82568	Chen <i>et al.</i> (2003)
3	NysI	<i>S. noursei</i>	Nystatin	48	AAF71766	Brautaset <i>et al.</i> (2000)
4	AmphI	<i>S. nodosus</i>	Amphotericin	47	AAK73501	Caffrey <i>et al.</i> (2001)

ตารางที่ 7 การหาลำดับเบสของ subclone และแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน

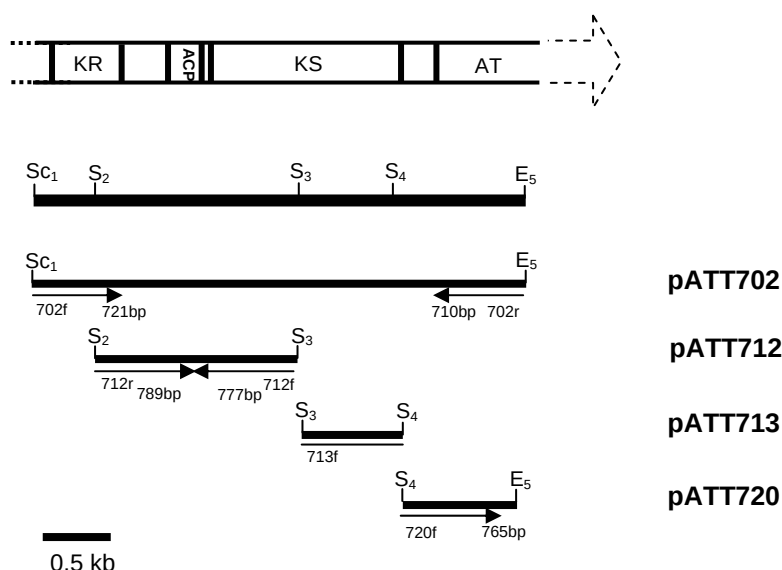
พลาสมิด	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (คู่เบส)	ลำดับกรดอะมิโน
pATT702	M13 Forward	721	240
	M13 Reverse	736	245
pATT712	M13 Forward	777	259
	M13 Reverse	789	263
pATT713	M13 Forward	615	205
pATT720	M13 Forward	765	255

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของพลาสมิด pATT702, pATT712, pATT713 และ pATT720 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีน Type I PKS ในฐานข้อมูล และพบว่าพลาสมิด pATT702 มีส่วนของยีน Type I PKS หลายโดเมน จึงนำพลาสมิดนี้มาทำแผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและระบุโดเมนของยีน Type I PKS เพื่อนำไปใช้ในการทำยีนดัดแปลงต่อไป

2.2 การสร้างแผนที่ยีนของพลาสมิด pATT702

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน ทำให้สามารถนำไปสร้างแผนที่การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อลำดับเบสจากพลาสมิดต่างๆ เข้าด้วยกัน ดังภาพที่ 16

จากการเชื่อมต่อลำดับเบสจากพลาสมิดต่างๆ เข้าด้วยกัน ทำให้ได้ลำดับเบสของพลาสมิด pATT702 มีความยาวทั้งหมด 3,308 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 1,102 กรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนประกอบด้วย โดเมน ketoreductase (KR), acyl carrier protein (ACP), ketoacylsynthase (KS) และบางส่วนของโดเมน acyl transferase (AT) เรียงตามลำดับ



ภาพที่ 16 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและ subclone ของโคลน pATT702 ขนาด 3.3 กิโลเบส
 ลูกศรโปร่งแสดงทิศทางของยีน Type I PKS (โดเมน KR, ACP, KS และ AT)
 ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับเบส B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, Sc = *Sac*I, S = *Sal*II

3. การทำยีนดิสรุปชั้นของกลุ่มยีน Type I PKS ใน *S. rimosus* R7

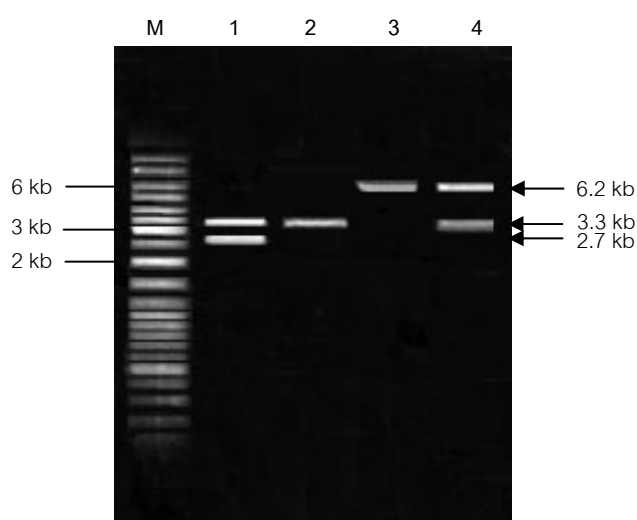
นำพลาสมิด pATT702 มาใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน Type I PKS โดยการทำยีนดิสรุปชั้น เนื่องจากพลาสมิด pATT702 มีส่วนของยีน Type I PKS ที่เหมือนกับกลุ่มยีน polyene หลายชนิด จึงจะใช้พิสูจน์ว่าส่วนของกลุ่มยีน Type I PKS นี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร rimocidin ใน *S. rimosus* R7 โดยจะใช้ชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิด pATT702 เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมเข้ากับ mobilizable plasmid เพื่อทำคอนจูเกชันต่างสกุลเข้าสู่ *S. rimosus* R7 โดยคาดว่าจะเกิด homologous recombination ของชิ้นดีเอ็นเอนี้ที่บริเวณกลุ่มยีน Type I PKS บนจีโนมของ *S. rimosus* R7 ทำให้พลาสมิดแทรกตัวเข้าไปอยู่บนกลุ่มยีน เกิดยีนดิสรุปชั้นเป็นผลให้ transcription ของกลุ่มยีนถูกทำลายไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่สมบูรณ์ได้ ก็จะไม่เกิดการสังเคราะห์สารด้านเชื้อรา rimocidin

3.1 การเตรียมพลาสมิดสำหรับทำยีนดิสรัปชัน

พลาสมิดที่ใช้ในการทำยีนดิสรัปชัน คือ mobilizable plasmid ซึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Streptomyces* ได้แก่ pSET151 (Bierman *et al.*, 1992) และ pIJ8671 (Sun *et al.*, 1999) (ภาพที่ 9 และ 10) โดยจะแทรกยีนดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 3.3 กิโลเบส จากพลาสมิด pATT702

3.1.1 พลาสมิด pATT709

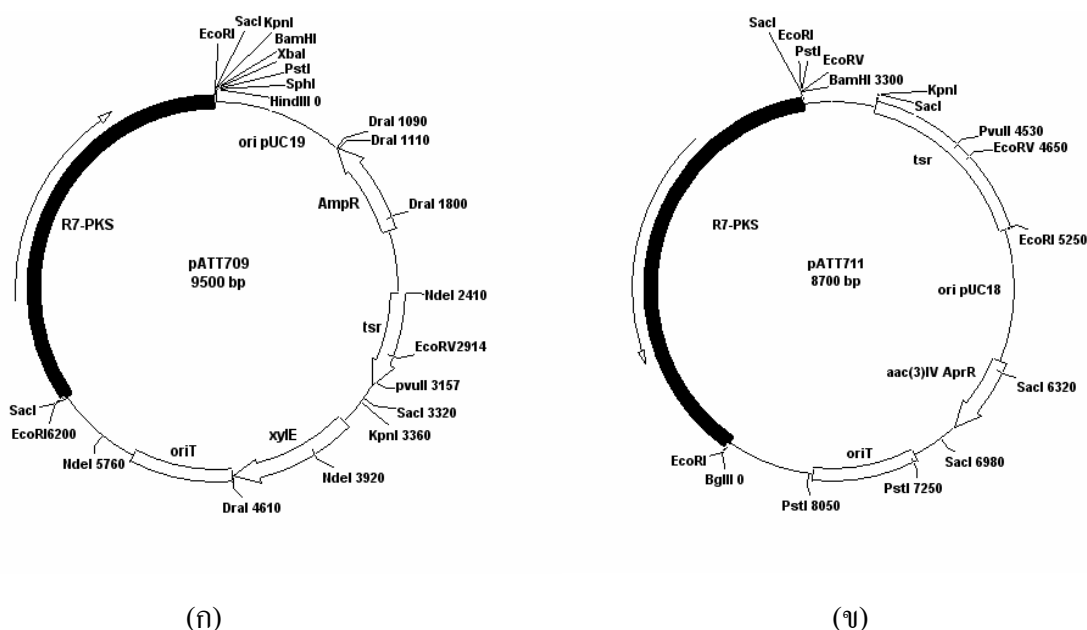
พลาสมิด pATT709 ได้จากการตัดพลาสมิด pATT702 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้ยีนดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส โคลนเข้าพลาสมิด pSET151 ทรานสฟอร์มพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue และตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 17) แล้วจึงนำเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) แพลนที่พลาสมิด pATT709 แสดงในภาพที่ 18 ก



ภาพที่ 17 การตรวจสอบพลาสมิด pATT709 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถวที่ 1 = pATT702/*EcoRI* แถวที่ 2 = ยีน *EcoRI* ขนาด 3.3 kb

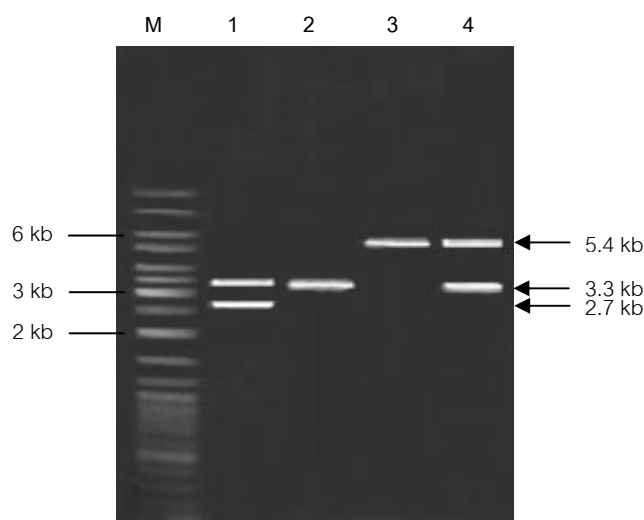
แถวที่ 3 = pSET151/*EcoRI* แถวที่ 4 = pATT709/*EcoRI*; M=1 kb ladder



ภาพที่ 18 แผนที่ของพลาสมิดสายผสมที่ใช้ในการทำยีนดัดแปลง (ก) pATT709 (ข) pATT711

3.1.2 พลาสมิด pATT711

พลาสมิด pATT711 ได้จากการตัดพลาสมิด pATT702 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *PstI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส เนื่องจากไม่สามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอนี้เข้าสู่ pIJ8671 ได้โดยตรง จึงต้องโคลนเข้าพลาสมิด Litmus28 (Evan *et al.*, 1995) ก่อนให้ชื่อว่าพลาสมิด pATT710 แล้วจึงตัดพลาสมิด pATT710 ด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *BglII* นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส โคลนเข้าพลาสมิด pIJ8671 ทรานสฟอร์มพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue ตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 19) แล้วจึงนำเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) แผนที่พลาสมิด pATT711 แสดงในภาพที่ 18 ข



ภาพที่ 19 การตรวจสอบพลาสมิด pATT711 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถวที่ 1 = pATT710/*Bam*HI/*Bg*II แถวที่ 2 = ชิ้น *Bam*HI/*Bg*II ขนาด 3.3 kb

แถวที่ 3 = pIJ8671/*Bam*HI/*Bg*II แถวที่ 4 = pATT711/*Bam*HI/*Bg*II; M=1 kb ladder

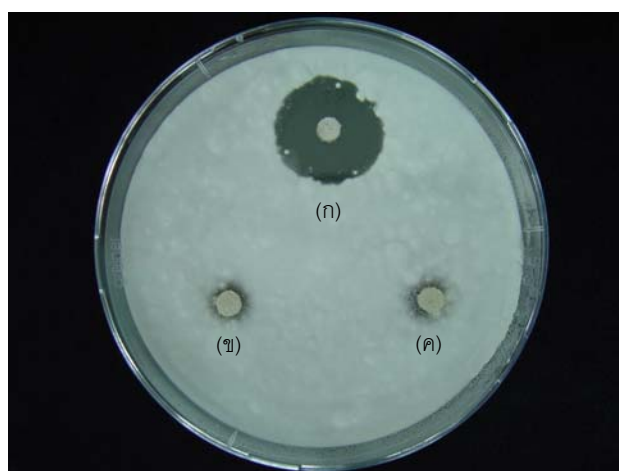
3.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทำยีนดิสรัปชัน

นำ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ที่มีพลาสมิด pATT709 และ pATT711 ไปทำคอนจูเกชันต่างสกุลกับ *S. rimosus* R7 ตามวิธีการทดลองข้อที่ 7.2.3 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้ด้วยยาปฏิชีวนะ thiostrepton ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายที่อยู่บนพลาสมิดทั้งสอง พบว่าได้เอ็กซ์คอนจูแกนส์ของพลาสมิด pATT709 เรียกสายพันธุ์กลายที่ได้ว่า *S. rimosus* ATT709 แต่ไม่พบเอ็กซ์คอนจูแกนส์ของพลาสมิด pATT711 แสดงว่า pSET151 อาจเป็นพาหะที่ดีกว่า pIJ8671 ในการทำคอนจูเกชันต่างสกุลใน *S. rimosus* แต่อย่างไรก็ตาม นิรินทรย์ยา (2548) ได้รายงานไว้ว่าสามารถทำยีนดิสรัปชันได้ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้ pIJ8671 แสดงว่า mobilizable plasmid ทั้งสองนี้น่าจะใช้กับ *S. rimosus* ได้ทั้งคู่ จึงนำ *S. rimosus* ATT709 ไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.1 การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อราของ *S. rimosus* ATT709

ก) ตรวจสอบด้วยวิธี agar plug assay

การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อราโดยการสร้างวงใสของ *S. rimosus* ATT709 ต่อ *Aspergillus niger* ด้วยวิธี agar plug assay เปรียบเทียบกับ wild type พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้น้อยลงอย่างเห็นได้ชัด (วงใสขนาด 0.8 เซนติเมตร เมื่อเทียบกับ wild type ขนาด 1.8 เซนติเมตร) (ภาพที่ 20) คาดว่าน่าจะมีการแทรกตัวของพลาสมิดสายผสมเข้าไปในโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 ในตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านเชื้อรา

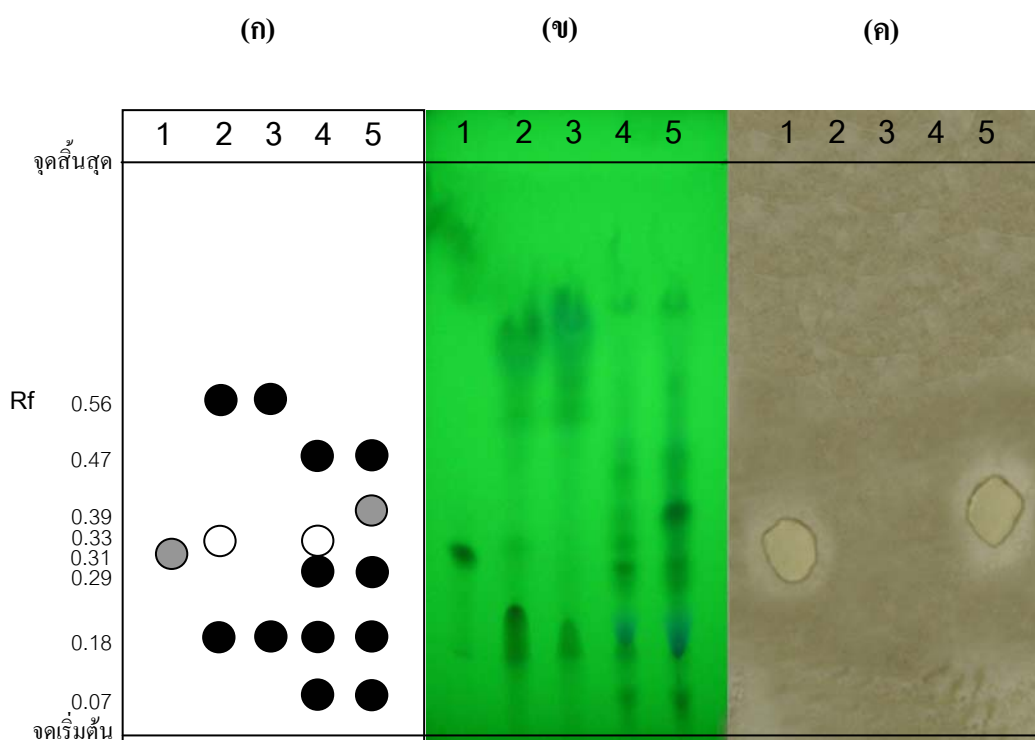


ภาพที่ 20 การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อราโดยการเกิดวงใสของ wild type และสายพันธุ์กลายต่อ *A. niger* ด้วยวิธี agar plug assay (ก) = *S. rimosus* R7
(ข) และ (ค) = *S. rimosus* ATT709

(๗) ตรวจสอบด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) และวิธี
Bioautography

เลี้ยงสายพันธุ์กลายและ wild type ในอาหารเหลว SPG แล้วสกัดสารจากเซลล์และน้ำเลี้ยงของสายพันธุ์กลายและ wild type ตามวิธีการทดลองข้อที่ 9.1 นำสารสกัดมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC เป็น silica gel 60F₂₅₄ (Merck, USA) ขนาด 20x20 เซนติเมตร โดยใช้ n-butanol:acetic acid:H₂O ในอัตราส่วน 4:1:5 เป็นตัวพา ใช้สาร nystatin 250 ไมโครกรัม เป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าสารละลายที่สกัดได้จากส่วนของน้ำเลี้ยงและจากเส้นใยมีการแยกของสารต่างกัน (ภาพที่ 21 ข) โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงของ *S. rimosus* ATT709 พบจุดทึบ 3 ตำแหน่ง คือ ที่ค่า Rf = 0.18, 0.33 และ 0.56 (ภาพที่ 21 ข ช่องที่ 2) ส่วนสารสกัดจากน้ำเลี้ยงของ *S. rimosus* R7 พบจุดทึบ 2 ตำแหน่ง คือ ที่ค่า Rf = 0.18 และ 0.56 (ภาพที่ 21 ข ช่องที่ 3) สารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* ATT709 พบจุดทึบ 6 ตำแหน่ง คือ ที่ค่า Rf = 0.07, 0.18, 0.29, 0.33 และ 0.47 (ภาพที่ 21 ข ช่องที่ 4) ส่วนสารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* R7 พบจุดทึบ 6 ตำแหน่ง คือ ที่ค่า Rf = 0.07, 0.18, 0.29, 0.39 และ 0.47 (ภาพที่ 21 ข ช่องที่ 5) จากผลการทำ TLC พบว่าสายพันธุ์กลายมีการแยกของสารบางตำแหน่งที่แตกต่างไปจาก wild type คือ จุดทึบที่ค่า Rf = 0.33 ซึ่งอาจเป็น intermediate ที่เกิดจากการทำยีนดิสรัปชันของกลุ่มยีน Type I PKS ขณะเดียวกัน wild type ก็มีจุดทึบที่ตำแหน่งค่า Rf = 0.39 ในสารสกัดจากเซลล์ซึ่งไม่พบจุดทึบที่ค่า Rf นี้ในสายพันธุ์กลาย

เมื่อทำ Bioautography บนแผ่น TLC (ภาพที่ 21 ค) พบว่าเกิดวงใสของ *A. niger* บนตำแหน่งที่เป็นสารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* R7 ที่ค่า Rf = 0.39 และยังพบวงใสในตำแหน่งของสาร nystatin ที่ค่า Rf = 0.31 ด้วยเช่นกัน (positive control) แต่ไม่พบวงใสในบริเวณอื่นอีก แสดงว่า *S. rimosus* ATT709 ไม่สามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้



ภาพที่ 21 การตรวจสอบการแยกสารสกัดจาก *S. rimosus* R7 และ *S. rimosus* ATT709 ด้วย TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และ Bioautography

(ก) แผนภาพแสดงจุดที่เกิดจากการแยกตัวของสาร

(ข) ผลการทำ TLC บนแผ่น silica gel 60 F₂₅₄ โดยใช้ n-butanol:acetic acid:H₂O (4:1:5) ตรวจโดยใช้แสง UV

(ค) Bioautography ที่เททับแผ่น TLC จากข้อ ข. ด้วย *A. niger*

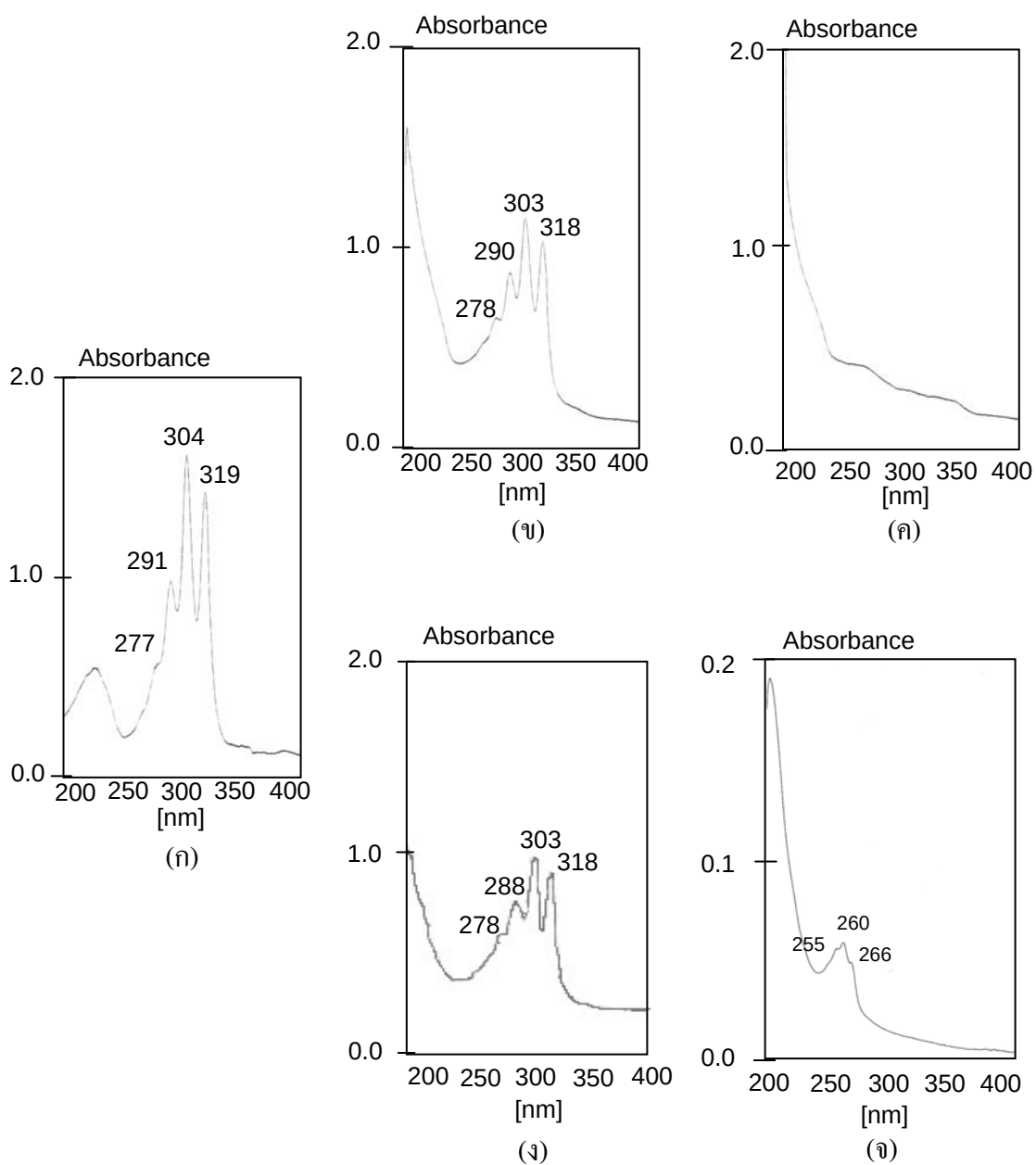
แถวที่ 1 = nystatin 250 ไมโครกรัม แถวที่ 2 = สารสกัดจากน้ำเลี้ยงของ *S. rimosus* ATT709 แถวที่ 3 = สารสกัดจากน้ำเลี้ยงของ *S. rimosus* R7 แถวที่ 4 = สารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* ATT709 แถวที่ 5 = สารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* R7
 ● = ตำแหน่งที่มีการสร้างสารต้านเชื้อรา ○ = ตำแหน่งของสารที่แตกต่าง
 สร้างโดยสายพันธุ์กลาย ● = ตำแหน่งจุดที่บ่งชี้เหมือนกันระหว่างสารสกัดจาก
 เซลล์ (ช่องที่ 2 และ 3) และน้ำเลี้ยง (ช่องที่ 4 และ 5) ของสายพันธุ์กลายและ wild
 type

(ก) ตรวจสอบด้วยวิธี Spectrophotometry

นำสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงที่สกัดจากสายพันธุ์กลายและ wild type ไปเจือจางด้วยเอทานอล แล้ววัดการดูดกลืนแสงในช่วง 200-400 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ nystatin โดย nystatin มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ที่ 277, 291, 304 และ 319 นาโนเมตร (ภาพที่ 22 ก) ซึ่งสอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ (Oroshnik and mebane, 1963) ส่วนสารด้านเชื้อราที่สกัดได้จากเซลล์ให้ค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 278, 290, 303 และ 318 นาโนเมตร (ภาพที่ 22 ข) ซึ่งเท่ากับค่าของ rimocidin ที่ Cope *et al.* (1965) ได้เคยรายงานไว้ ส่วนในสายพันธุ์กลายนั้นพบว่าไม่มีรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเลย (ภาพที่ 22 ค) นอกจากนี้ยังหาค่าจุดตัดบริเวณที่คาดว่าจะเป็น intermediate ($R_f = 0.33$) และบริเวณวงใสที่คาดว่าจะจะเป็นสาร rimocidin ($R_f = 0.39$) มาสกัดด้วยเมทานอลแล้วเจือจางด้วยเอทานอล 1,000 เท่า นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงดังข้างต้น พบว่าสารสกัดที่ค่า $R_f = 0.39$ ให้ค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 278, 288, 303 และ 318 นาโนเมตร (ภาพที่ 22 ง) เท่ากันกับสาร rimocidin ส่วนสารที่คาดว่าจะ เป็น intermediate พบว่าค่า $\lambda_{\max}$ ที่ได้ไม่ได้อยู่ในช่วงเดียวกับสาร rimocidin แต่มีค่าอยู่ที่ 255, 260 และ 266 นาโนเมตร (ภาพที่ 22 จ) จากผลการทดลองนี้ยังสรุปไม่ได้ว่าสารที่คาดว่าจะ เป็น intermediate จะเป็นสารอะไร จะต้องวิเคราะห์ทางเคมีด้วย HPLC และ NMR ต่อไป

3.2.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธี PCR

ตรวจสอบ *S. rimosus* pATT709 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ATT012 และ ATT013 ในอุปกรณ์และวิธีการ (ตารางที่ 5) โดยคู่ไพรเมอร์นี้จำเพาะกับยีน *tsr* (ยีนต้านยา thiostrepton) ซึ่งจะพบยีนนี้ในจีโนมของสายพันธุ์กลายแต่จะไม่พบใน wild type โดยทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 58 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 0.8 กิโลเบส ใน *S. rimosus* pATT709 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันใน wild type (ภาพที่ 23 ข) ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับบริเวณปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส ในบริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิด โดยทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 48 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 3.3 กิโลเบส ในพลาสมิดสายผสม pATT709 ซึ่งใช้เป็น positive control แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวใน wild type และ *S. rimosus* pATT709 (ภาพที่ 23 ค) เนื่องจาก wild type ไม่มีตำแหน่งจับกับไพรเมอร์ ส่วนในสายพันธุ์กลาย ทิศทางของไพรเมอร์ทั้งคู่จะหันออกจากกันเมื่อ pATT709 แทรกเข้าไปบนโครโมโซม ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR (ภาพที่ 23 ก)



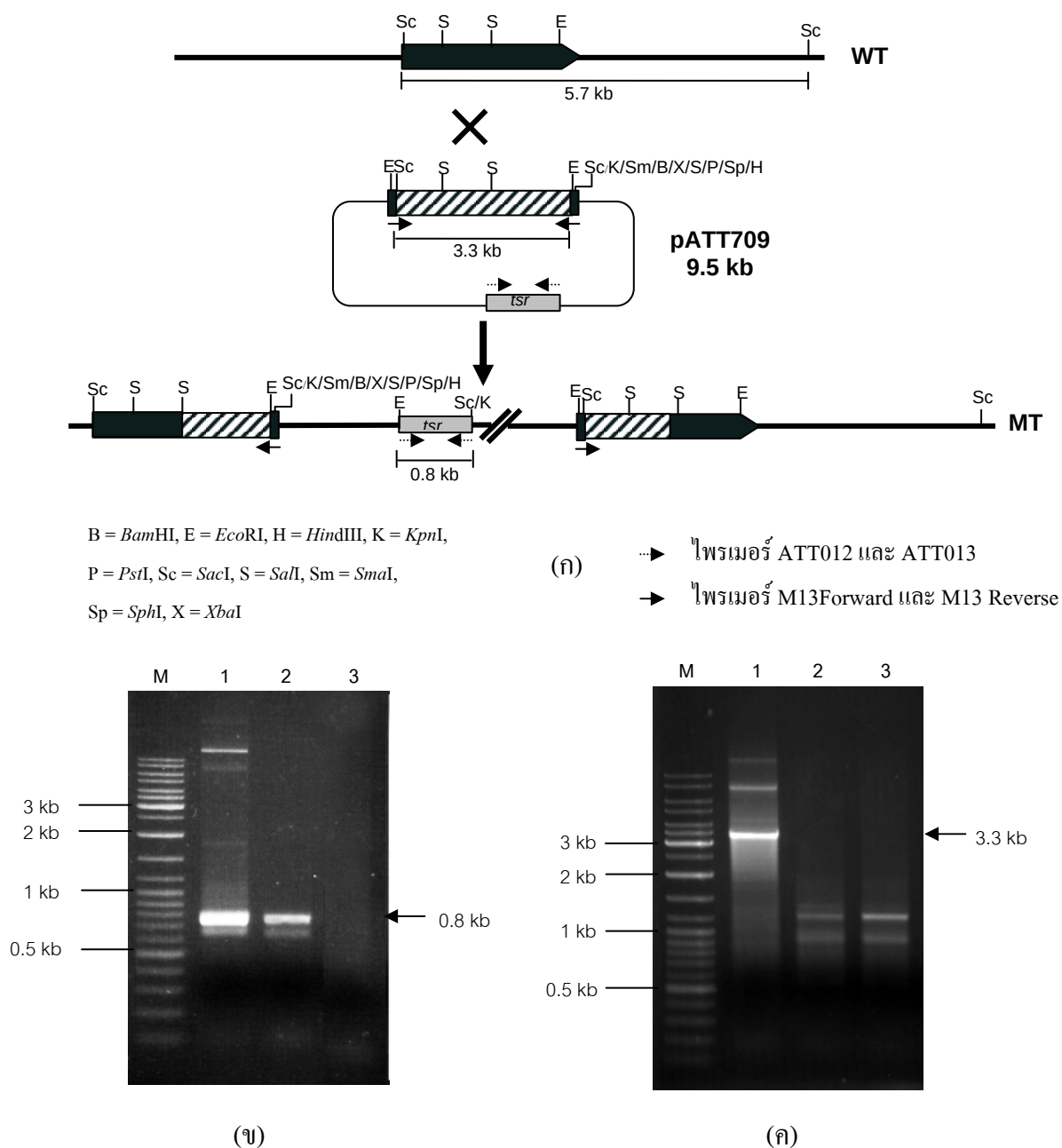
ภาพที่ 22 ผลการทำ Spectrophotometry ของสารสกัดที่ค่าดูดกลืนแสง 200-400 นาโนเมตร

(ก) = nystatin 25 mg/ml เจือจาง 500 เท่า (ข) = สารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* R7

เจือจาง 1000 เท่า (ค) = สารสกัดจากเซลล์ของ *S. rimosus* ATT709 เจือจาง 1000 เท่า

(ง) = สารสกัดจากซลิคาเจล ณ ตำแหน่ง $R_f = 0.39$ ของ *S. rimosus* R7 เจือจาง 1000 เท่า

(จ) = สารสกัดจากซลิคาเจล ณ ตำแหน่ง $R_f = 0.33$ ของ *S. rimosus* ATT709 เจือจาง 1000 เท่า

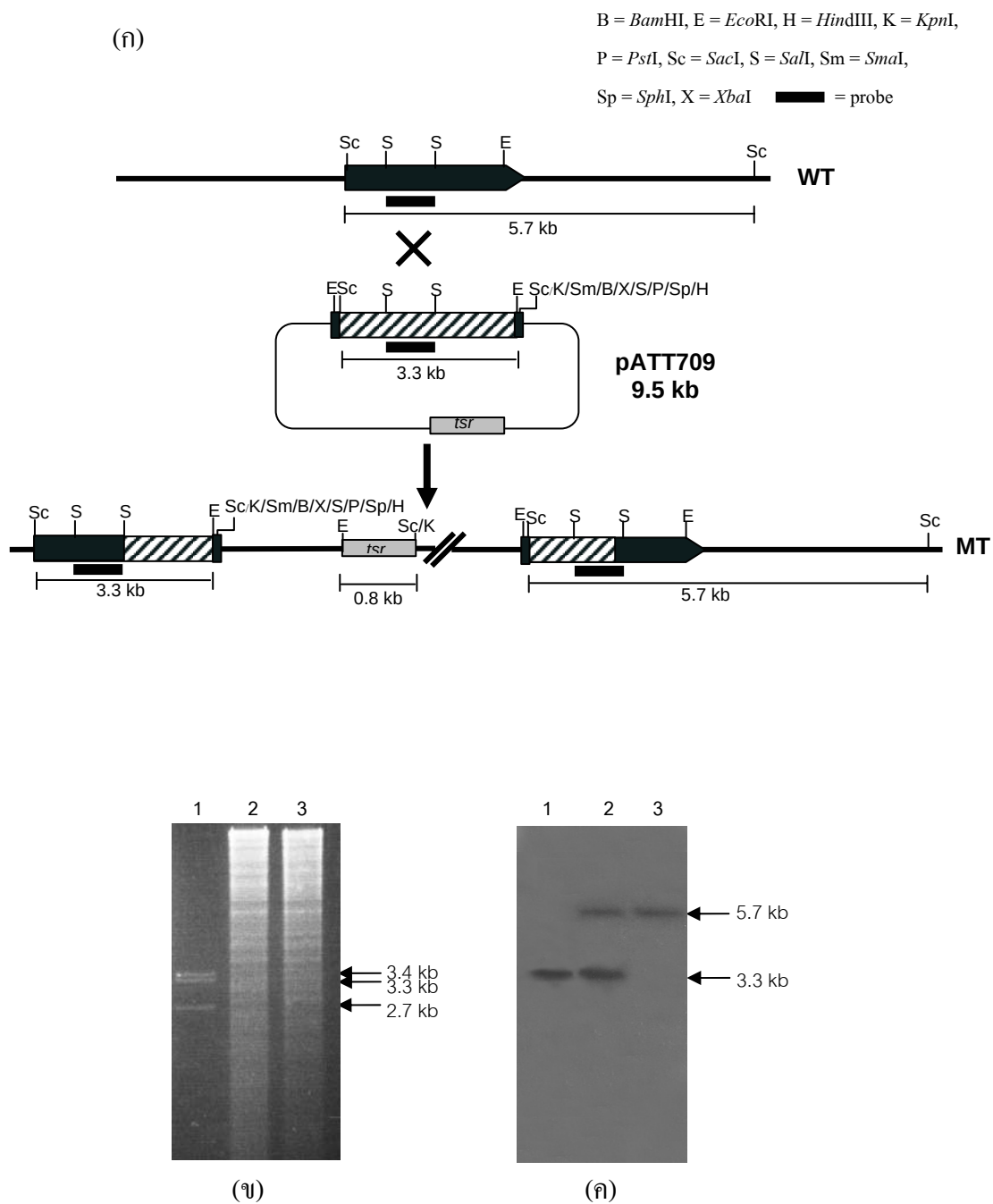


ภาพที่ 23 การตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี PCR

(ก) แผนี่การแทรกของพลาสมิด pATT709 บน โครโมโซมของ *S. rimosus* R7 และทิศทางของไพรเมอร์ (ข) ผลลัพธ์ PCR ของยีน *tsr* โดยไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 ที่อุณหภูมิ annealing 58 °C (ค) ผลลัพธ์ PCR ของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส โดยไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse ที่อุณหภูมิ annealing 48 °C แถวที่ 1 = pATT709 แถวที่ 2 = *S. rimosus* ATT709 แถวที่ 3 = *S. rimosus* R7; M = 1 kb ladder

3.2.3 การตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization

นำ *S. rimosus* pATT709 ไปตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส ซึ่งได้จากการตัดพลาสมิด pATT712 ด้วยเอนไซม์ *SaI* เป็นโพรบ (ภาพที่ 25 ก) ผลของการทำ Southern blot hybridization โดยการตัดโครโมโซมของ *S. rimosus* pATT709 ด้วยเอนไซม์ *SacI* เปรียบเทียบกับพลาสมิด pATT709 และ wild type ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 25 ข) พบว่า *S. rimosus* ATT709 ให้แถบดีเอ็นเอสองแถบขนาด 5.7 และ 3.3 กิโลเบส (ภาพที่ 25 ค แถวที่ 2) ในขณะที่พลาสมิด pATT709 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส (ภาพที่ 25 ค แถวที่ 1) และ wild type ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส (ภาพที่ 25 ค แถวที่ 3) แสดงว่าเกิด homologous recombination ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (3.3 กิโลเบส จากพลาสมิด pATT702) เข้าที่ตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 เป็นผลให้เกิดยีนดัดแปรขึ้น ไม่เกิดการสร้างสารต้านเชื้อรา rimocidin แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่โคลนได้นี้เป็นส่วนของยีน rimocidin synthase (*rms*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร polyene นี้ ดังนั้นจึงจะโคลนดีเอ็นเอบริเวณใกล้เคียงจากผล Southern hybridization



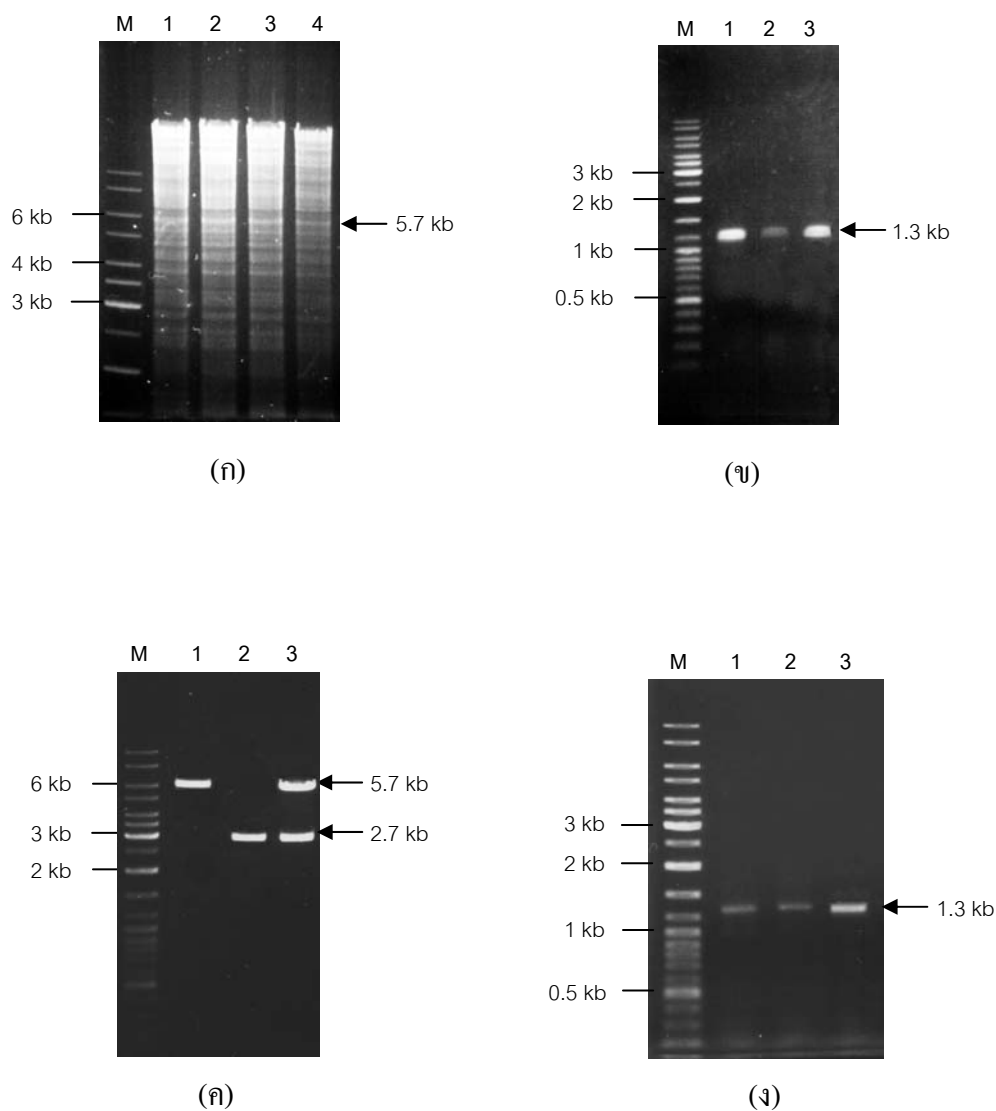
ภาพที่ 24 แผนที่แสดงการเกิดยีนดัดแปรและการตรวจสอบผลโดยวิธี Southern blot hybridization ด้วยเอนไซม์ *Sac*I (ก) แผนที่การแทรกของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส บนโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 (ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sac*I (ค) ภาพ Southern hybridization โพรบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส จากพลาสมิด pATT712 แถวที่ 1 = pATT709/*Sac*I แถวที่ 2 = *S. rimosus* ATT709/*Sac*I แถวที่ 3 = *S. rimosus* R7/*Sac*I

4. การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับเบสของกลุ่มยีน **Type I PKS** ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร **ต้านเชื้อรา rimocidin**

จากการตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดยการทำ Southern blot hybridization พบว่าเมื่อตัดโครโมโซมของ *S. rimosus* ATT709 ด้วยเอนไซม์ *SacI* แล้วโพรบด้วยบางส่วนของยีน Type I PKS พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาด 3.3 และ 5.7 กิโลเบส (ภาพที่ 24 ค) โดยชิ้น 3.3 กิโลเบสเป็นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไปในพลาสมิดเพื่อทำยีนคัสรีปชัน ส่วนชิ้นขนาด 5.7 กิโลเบส เป็นชิ้นที่รวมเอาชิ้น 3.3 กิโลเบสและบริเวณที่ต่อเนื่องออกไปบนโครโมโซม (ภาพที่ 24 ก) จึงจะโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 เพื่อหาลำดับเบสและวิเคราะห์โดเมนต่างๆ ต่อไป

4.1 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส

ตัดโครโมโซมของ *S. rimosus* ATT709 ด้วยเอนไซม์ *SacI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 25 ก) แล้วตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส นำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ATT010 และ ATT011 (ตารางที่ 5) ที่จำเพาะต่อโดเมน KS เพื่อตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้มีส่วนของโดเมน KS เนื่องจากทราบแล้วว่าชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 3.3 กิโลเบส มีโดเมน KS อยู่ ซึ่งพบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.3 กิโลเบสของโดเมน KS อยู่จริง (ภาพที่ 25 ข) จึงนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน จากนั้นทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* XL1-Blue เลือกโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส ให้ชื่อว่า pATT718 (ตรวจสอบโคลนภาพที่ 25 ค) ตรวจสอบโคลนที่ได้ใหม่อีกครั้งโดยการทำพีซีอาร์โดเมน KS พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.3 กิโลเบส (ภาพที่ 25 ง) จึงเชื่อมั่นว่าเป็นโคลนที่ต้องการจริง โดยจะนำไป subclone และวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 25 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและการตรวจสอบโคลน

(ก) แถวที่ 1-4 = *S. rimosus* ATT709/*Sac*I

(ข) การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอโดยการทำ PCR โดเมน KS แถวที่ 1 = *S. rimosus* R7 แถวที่ 2 = ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 5.7 กิโลเบส ที่ตัดออกจากเจลในรูป (ก) แถวที่ 3 = pATT709

(ค) การตรวจสอบพลาสมิด pATT718 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถวที่ 1 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส แถวที่ 2 = pUC18/*Sac*I

แถวที่ 3 = pATT718/*Sac*I

(ง) การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมโดยการทำ PCR โดเมน KS

แถวที่ 1 = *S. rimosus* R7 แถวที่ 2 = pATT718 แถวที่ 3 = pATT709

M = 1 kb ladder

4.2 การตรวจสอบพลาสมิด pATT718 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

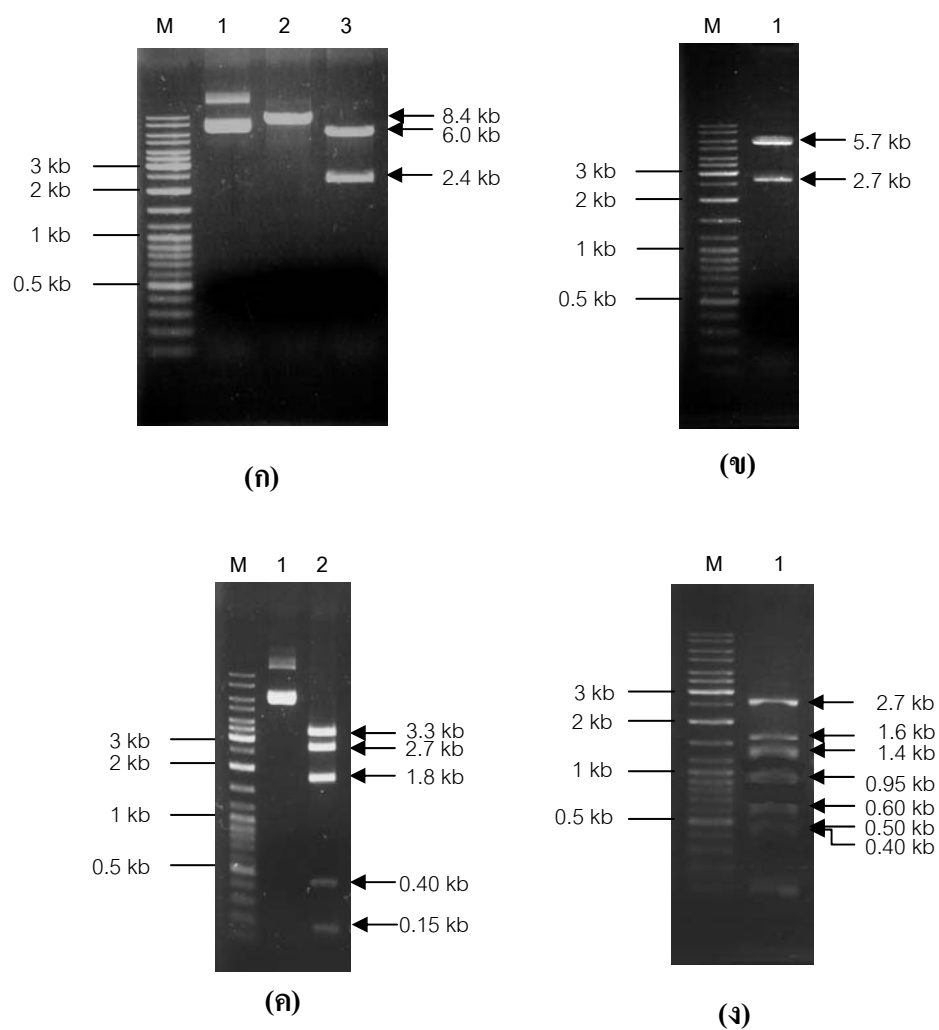
นำพลาสมิด pATT718 ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I และ *Sal*I ซึ่งทั้ง 5 ชนิดมีตำแหน่งตัดเพียงตำแหน่งเดียวบนพลาสมิด pUC18 จากการแยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงว่า *Bam*HI ไม่มีตำแหน่งตัดบนชิ้นดีเอ็นเอ (ภาพที่ 26 ก แถวที่ 2) เอนไซม์ *Eco*RI มีตำแหน่งตัดบนชิ้นดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาด 6.0 และ 2.4 กิโลเบส (ภาพที่ 26 ก แถวที่ 3) เอนไซม์ *Sac*I มีตำแหน่งตัดบนชิ้นดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาด 5.7 และ 2.7 กิโลเบส (ภาพที่ 26 ข) เมื่อตัดเอนไซม์ *Kpn*I ร่วมกับเอนไซม์ *Eco*RI ให้แถบดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาด 3.3, 2.7, 1.8, 0.4 และ 0.15 กิโลเบส (ภาพที่ 26 ค แถวที่ 2) เอนไซม์ *Sal*I มีตำแหน่งตัดบนชิ้นดีเอ็นเอ 7 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอ 8 แถบ ขนาด 2.7, 1.6, 1.4, 0.95, 0.6, 0.5, 0.4, 0.15 และ 0.10 กิโลเบส (ภาพที่ 26 ง)

4.3 การ subclone พลาสมิด pATT718

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pATT718 จึงเลือกใช้เอนไซม์ *Eco*RI ผสมกับ *Sac*I ในการ subclone ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3, 2.7 และ 2.4 กิโลเบส โดยเลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นบริเวณที่ถัดจากชิ้น 3.3 กิโลเบส ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย เชื่อมกับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT719 (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 27 ก)

นำพลาสมิด pATT718 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ผสมกับ *Kpn*I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3, 2.7, 1.8, 0.4 และ 0.15 กิโลเบส เลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส เชื่อมกับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน ให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT704 (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 27 ข)

นำพลาสมิด pATT719 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Sal*I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4, 0.95, 0.5 และ 0.15 กิโลเบส (ภาพที่ 27 ค) เลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.5 และ 0.95 กิโลเบส เชื่อมกับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT721 และ pATT722 ตามลำดับ (ตรวจสอบโคลนในภาพที่ 27 ง)



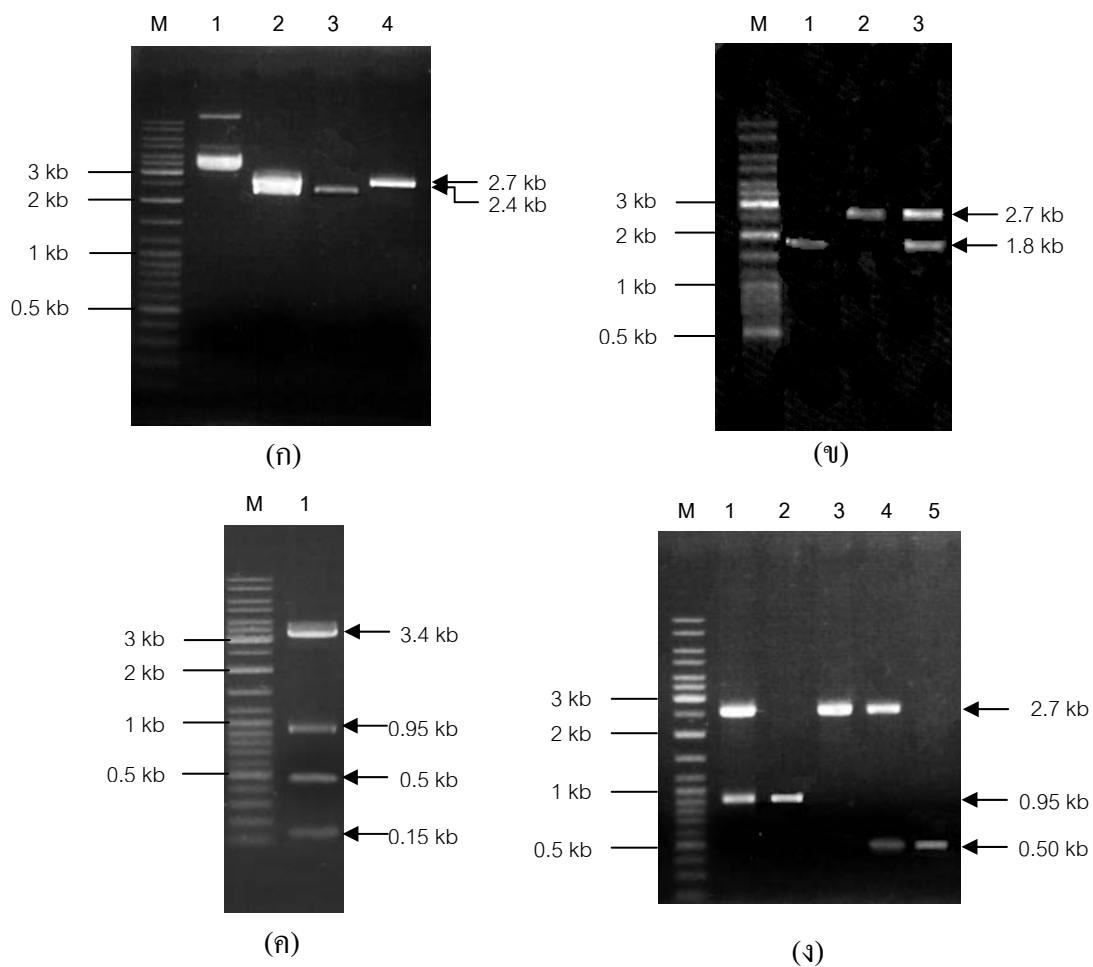
ภาพที่ 26 การตัดพลาสมิด pATT718 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(ก) แถวที่ 1 = pATT718 แถวที่ 2 = pATT718/*Bam*HI แถวที่ 3 = pATT718/*Eco*RI

(ข) แถวที่ 1 = pATT718/*Sac*I

(ค) แถวที่ 1 = pATT718 แถวที่ 2 = pATT718/*Eco*RI/*Kpn*I

(ง) แถวที่ 1 = pATT718/*Sal*I; M = 1 kb ladder



ภาพที่ 27 การตรวจสอบ subclone ของพลาสมิด pATT718

- (ก) แถวที่ 1 = pATT719 แถวที่ 2 = pATT719/*EcoRI/SacI* แถวที่ 3 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.4 กิโลเบส แถวที่ 4 = pUC18/*EcoRI/SacI*
- (ข) แถวที่ 1 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส แถวที่ 2 = pUC18/*EcoRI/KpnI* แถวที่ 3 = pATT704/*EcoRI/KpnI*
- (ค) แถวที่ 1 = pATT719/*SalI*
- (ง) แถวที่ 1 = pATT721/*SalI* แถวที่ 2 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.95 กิโลเบส
แถวที่ 3 = pUC18/*SalI* แถวที่ 4 = pATT722/*SalI* แถวที่ 5 = ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.5 กิโลเบส; M = 1 kb ladder

4.4 การหาลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 และ subclone

หาลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward ได้ลำดับเบสยาว 749 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 249 กรดอะมิโน เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX (กันยายน 2548) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีน Type I PKS ดังตารางที่ 8 โดยมีค่าความเหมือนกับสารในกลุ่มที่เป็น polyene เช่น pimarinin จาก *S. natalensis* (Aparicio *et al.*, 2000) ซึ่งให้ค่าความเหมือนสูงสุดที่ 84 เปอร์เซ็นต์ candididin จาก *Streptomyces* sp. FR-008 (Chen *et al.*, 2003) nystatin จาก *S. noursei* (Brautaset *et al.*, 2000) และ amphotericin จาก *S. nodosus* (Caffrey *et al.*, 2001) แสดงว่า pATT718 มียีน Type I PKS จึงหาลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse สำหรับพลาสมิด pATT718 และ subclone ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ข้อมูล 4 อันดับแรก ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจีนดีเอ็นเอในพลาสมิด pATT718 ทางด้านไพรเมอร์ M13 Forward กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastX

ลำดับ ที่	เอนไซม์	จุลินทรีย์	สารที่สังเคราะห์	Identity (%)	Accession No.	เอกสารอ้างอิง
1	PimS2	<i>S. natalensis</i>	Pimaricin	84	CAC20921	Aparicio <i>et al.</i> (2000)
2	FscD	<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	Candididin	64	AAQ82568	Chen <i>et al.</i> (2003)
3	NysI	<i>S. noursei</i>	Nystatin	58	AAF71766	Brautaset <i>et al.</i> (2000)
4	AmphI	<i>S. nodosus</i>	Amphotericin	57	AAK73501	Caffrey <i>et al.</i> (2001)

ตารางที่ 9 การหาลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 และ subclone

พลาสมิด	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (คู่เบส)	ลำดับกรดอะมิโน
pATT718	M13 Forward	749	249
	M13 Reverse	775	258
pATT704	M13 Forward	812	270
	M13 Reverse	843	281
pATT719	M13 Reverse	746	248
pATT721	M13 Reverse	474	158
pATT722	M13 Reverse	704	234

4.5 การสร้างแผนที่ยีนของพลาสมิด pATT718

จากผลการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pATT718 และ subclone ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบส สามารถนำไปสร้างแผนที่การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และสามารถนำ subclone ต่างๆ มาเชื่อมต่อกัน ทำให้ได้แผนที่ของพลาสมิด pATT718 ดังภาพที่ 28

จากการเชื่อมต่อลำดับเบสทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทำให้ได้ลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 ที่สมบูรณ์ ซึ่งมีความยาว 5,676 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 1,892 กรดอะมิโน มีปริมาณ G+C เป็น 75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29) และได้เก็บในฐานข้อมูล GenBank ที่ accession No. AY701054 (ภาคผนวก) พบว่าลำดับกรดอะมิโนประกอบด้วย 5 โดเมน คือ โดเมน KR (กรดอะมิโนที่ 50-229) โดเมน ACP (กรดอะมิโนที่ 338-408) โดเมน KS (กรดอะมิโนที่ 431-838) โดเมน AT (กรดอะมิโนที่ 936-1245) และ โดเมน KR (กรดอะมิโนที่ 1543-1716)

เมื่อนำลำดับเบสของพลาสมิด pATT702 และ subclone ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการทำยีนดิสรัปชันมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของพลาสมิด pATT718 พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกันทั้งหมด แสดงว่าพลาสมิด pATT702 เป็นส่วนหนึ่งของพลาสมิด pATT718 ดังนั้นจึงสามารถโคลนยีน Type I PKS ที่อยู่ต่อจากบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ นอกจากนี้บริเวณปลายด้าน 3' ของพลาสมิด pATT718 พบว่ามีบางส่วนซ้อนทับกับปลาย 5' ของพลาสมิด pATT403 (ประกิตชัย, 2547) แสดงว่ายีนดีเอ็นเอของยีน Type I PKS ที่เคยถูกรายงานไว้ในพลาสมิด pATT403 เป็นส่วนหนึ่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านเชื้อรา rimocidin หรือ rimocidin synthase (*rms*) ดังที่ได้เคยรายงานไว้ใน *S. rimosus* R7 (นิรินทรียา, 2548)

2959: GAGACCGGTTCA^{AT}CCAGCCGGCCCTGTTCCGCACTCGAGGTGGCGCTGTTCC
987: E T G F T Q P A L F A I E V A L F

3010: CGGCTGGCCGAGTCGCTGGGTATACGCCGGACTTCGTGGCCGGCACTCG
1004: R L A E S L G I R P D F V A G H S

3061: ATCGGCGAGATCGCGGCGCATGTGCGAGGAGTGTTCCTCACTGGCGGAC
1021: T G E I A A A H V A G V F S L A D

3112: GCGTGTGCGCTGGTGGCGGCCGTGCGCGGCTGATGCAAGGCGTGGCGGAG
1038: A C A L V A A R A R L M Q A L P E

3163: GGCGGCGCATGGTGGCGATCGAGGCCACCGAGGGCGAGGTCGGGCGCGG
1055: G G A M V A I E A T E G E V G P R

3214: CTGGCGACGGGGTGTGATCGCGGCGCTCAACGGCCGGAGTCGGTGGT
1072: L A D G V S I A A L N G P E S V V

3265: ATCTCCGGAACGAGGACGCGGTCTCGGATCGCGGCGGAA^{ATTC}CGCCGACT
1089: I S G T Q D A V L R S R R N S P T
pATT704r →

3316: GAGGGCGGCAAGACCCGGCGGCTGTGGTGGCGACGCGCTTCCACTCGCGG
1106: E G R K T R L S V S H A F H S P

3367: CTGATGGACCGATGCTGGCGACTTCCGGCAGGTGGCCGAGGGGCTGGCG
1123: L M D P M L A D F R Q V A E G L A

3418: TACGAGGCCCCGCGTATCCGCGTGGTGTCCAACGTGACGGGCGAACTCGCC
1140: Y E A P R I P L V S N V T G E L A

3469: ACCGCGGAGCTGATGTCAGCGCCGCGGTACTGGGTGCAACGCTACGGGAC
1157: T A E L I C T F G V M W Q H V R D

3520: ACGGTGCGGTTCCGCCGACGCGTGTCCGCGCGTGGAGGCCGAGGGCGCCTCG
1174: T V R F A D G V R A L E A E G A S

3571: GTCTTCTGGAGGTGGGCGCGGAGGGGTGCTGACGGCGATGGCCGAGCAC
1191: V F L E V G P D G V L T A M A Q H

3622: AGCCTGGCGGACGCGGCGGTGGCGGCTCCCGCCCTCCGCAAGGACCGCCCG
1208: S L A D A A V A V P A L R K D R P

3673: GAGGAAACCGCCCTGCTACCGCGCTGGCGCAGCTGTACGTACCGGGGTC
1225: E E T A L L T A L A Q L Y V T G V

3724: GGCATCGACTGGTCCGGCGTCTTCCAGGCGACCGGCGCCGCGGTGGAC
1242: G I D W S G V F D G T G A R R V D

3775: CTGCGCACCTACCCCTTCCAGCAGGAGTGGTTCCTGGCGGAGACCGCGCC
1259: L P T T Y P F Q Q E W F W P E T A P

3826: GCGGCGAGCCGCGGCGGACGCGTGGCGGCTCCGGTGGACCGGAGTTCTGG
1276: A A S P A Q D A G S Q A P V D A E F W

3877: GACGCGGTGGAGCGCGAGGACCTGACAGCGCTCTCCGCGGACCTCGACCTG
1293: D A V E R E D L T A L S A D L D L

3928: GACGGCTCCGCGCTGGGCGCCTCGTACCGGCTGTGCGCTGGCGCGAAGCG
1310: D G S A L G A S Y R L S P G A Q A

3979: CGTCGAGCGCTGAC^{CTCGAC}GGCTGGCGCTACCAAGTGACGTGGAAGCCG
1327: R R A L D V D G W R Y Q V T W K P

4030: CTCACGGGACCTCGGCGAGCAGCTTCCGGGGCGGTGGCTGGCGCTCGTC
1344: L T G T S A S T L S G P W L A L V

4081: CGGCGAGGCGGTGGCGATGATGAGTGAGCGGCTCCGTGGTGGCGGCCCTC
1361: P A G G A D D E W T A S V V A A L

4132: GCGGACGACCGGTGGCGGTGCGAGGCGGACCGGCGGCTCCGGGCGCTG
1378: G D D A V S V E A D P A D S R A L

4183: ACCGCCGCGTGGCGAACTGGCGCGCAGGGCGAGGATTCGCGGGAGTC
1395: T A R L A E L A A Q G Q E F A G V

4234: GTCTCGCTCTCGGCGGCGGACCGGCGAAGGTGTGCGCTCCGGCGGGGCG
1412: V S L L A A R T G E G V A S G G A

4285: GCCTGGCGGACGCGGCGGTACAGGCACTGGCGGACGCGGATCGGTGCC
1429: A W P D A A V Q A L A D A G I G A

4336: CGCCTCTGGTACGTACCCGTTGGCGGGTGGCGGTGGCGGCTCGGAGACG
1446: R L W Y V T R G A V A V G R S E T

4387: GACGTGGACGCCGCCAGGCGGCGGTGGGGAGCGGGCGGGTGGCGGCC
1463: D V D A A Q A A V W G A G R V A A

4438: CTCGACCAACCCGACCTCTGGGGCGGACT^{CTCGAC}ATCGGGACGCTCCTC
1489: L D H P D L W G G L V D I A D V L

4489: GACCGGCGCTGGCGGACCGGTTCCGTGGCGTGTGCGGTACGGGCGCG
1497: D R R S A D R F R A V L S G T G G

4540: GAGGACAGGTGGCACTGCGGTCTCGGGCGCTTCGGACGCCGCTGGTA
1514: E D Q V A L R S S G A F G R R L V

4591: CGCGCCACGCGGACACCC^{CTCGAC}TCGTTGGCAGCGCTCCGGCAGGTC
1531: R A T A D T P S T P W Q P S G T V

4642: CTGGTCTGCGGCGGCGCTCCGGCACCGGGGCTCTGCGCCGCTGGCTC
1548: L V V G G A S G T G G L C A R W L

4693: GCGGACAGGGCGCCAGCACATCTGTGGCGGGCGGCCACGCCCGAG
1565: A G Q G A Q H I L L A G P A T P E

4744: GCGGACACCTGCCTGCCGAACCTGACGGCTCGGCGCTGAGTGCACGGG
1582: A D T L P A E L D G L G A E L T R

4795: GTCACCTGCGACCGGGCGACAGCGACGCACTGCTGAACGCCCTCACCGCA
1599: V T C D P A D S D A L L N A L T A

4846: CTCCCGCCACGGCACCGGCTGACCGCGCTGCTACGGCGACGCGGAAGCA
1616: L P P T A P L T A V V Y A D A E A

4897: CTGTCCGGCGACGGCGAGCGGGCACAGCCCTGGCGGCTGCACACGGCC
1633: L S G D G E P G T A L A A L H T A

4948: GTGGAGAACCTGGCGGCGTCCGCCGAAGCGGCGGCGAACGCCCTG
1650: V E N L A A V A E A A A G E R P L

← **pATT704f KpnI₁₀**

4999: GACGCTTCTGCTGTGCTCTCGATCGCG^{GGTACC}TGGGGTGGCGGCGG
1667: D A F V L C S S I A G T W G A G G

5050: CGGGGCGGAGGCGGCGGCGGAGCCCTGCTGGACGCCCTGGCGGGCGG
1684: R G A E A A A G A L L D A L A R R

KpnI₁₁

5101: TACCGGCGACGCGGACTGCGTGGCTGTCCGTGGTGGCGGCTGGGG
1701: Y R A R G L R A L S V A W G A W A

5152: GACACACCGACGACGCTGGCGGCGATCTGGGGTCAACGGCTGGCG
1718: D T T D D S L A A H L R V N G L P

KpnI₁₂

5203: GTGATGGACCGGCAACGGGCGCTGCTCCGCGCTCCGCGCTCGCGG^{GGTACC}
1735: V M D A E R A L S A L S R S A G T

5254: GACGCGGCTCGGTGACGGTCCGCGGACGTCAGGTGGGACGGTTCGCGCGG
1752: D A A S V T V A D V R W D R F A P

5305: GCCTTCAACCGCAACGGCGGCGGCGCTTCAACGACCTGCCCGAGGCC
1769: A F T R N R R G A L F T D L P E A

5356: AGGGCGGCACTGCGGGAACCGGGGAACCGGGGACGGGACCGGACCGGA
1786: R A A L A E P G N A G Q G T A T G

5407: CTCGGGGCGGCGCTCGCGGCGGACGGGCGGCGGAGCAGACGAGGCGCTG
1803: L G A R L A G R P A A E Q T E A L

Acyl carrier protein (ACP)

5458: CTGACCTGATCCGCGGCGAGGTGGCGACGGTGTCTGGCTTCGCGGACGCC
1820: L T L I R G E V A T V L G F A D A

5509: GACGCGTCCCGTCCGGAACCGGCTTCAAGGACCTCGGCTTCACTGCTG
1837: D A V P S G P A F K D L G F D S L

SalI₁₃

5560: ACCGCGGCTCGACCTGCGGCAACGAGTCCGCCAGGCGACCGGCTGTCCCTG
1854: T A V D L R N Q L A T A T G L S L

←

5611: CCCGCACCTCTGCTTCTCACTACCGGACGCGGAGGCGCTGGCGGGCAC
1871: P A T L V F D Y P T A E A L A G H

pATT718r SacI₁₄

5662: CTCGGACCGAGCTC
1888: L R T E L

4.6 การวิเคราะห์โดเมนของ rimocidin synthase (RMS) ใน *S. rimosus* R7

โดเมนทั้งหมดของ RMS ใน *S. rimosus* จะนำมาทำ multiple alignment กับ Type I PKS อื่นๆ ในฐานข้อมูล 15 ชนิด โดยแบ่งเป็นกลุ่ม macrolide และกลุ่ม polyene ดังตารางที่ 10

4.6.1 โดเมน KR

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของพลาสมิด pATT718 พบว่ามีโดเมน KR 2 โดเมน โดยโดเมน KR แรกมีความยาว 179 กรดอะมิโน (ภาพที่ 29; นิวคลีโอไทด์ที่ 151-688; กรดอะมิโนที่ 50-229) ส่วนโดเมน KR ที่สองมีความยาว 174 กรดอะมิโน (ภาพที่ 29; นิวคลีโอไทด์ที่ 4627-5146; กรดอะมิโนที่ 1543-1716) เมื่อนำโดเมน KR ทั้งสองโดเมนไปเปรียบเทียบกับโดเมน KR อื่นในฐานข้อมูลพบบริเวณที่เป็น active-site motif 2 ตำแหน่ง คือ GxGxxGxxxA ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับ NADP(H) (Scrutton *et al.*, 1990) และ aSRrG (Brautaset *et al.*, 2000) เฉพาะโดเมนที่ 1 (718-KR1) แต่ในโดเมนที่ 2 (718-KR2) พบว่าตำแหน่ง glycine ตัวที่ 2 เป็น serine คือ GASGTGGLCA และบริเวณ active-site motif ตำแหน่งที่สองมีลำดับกรดอะมิโนเป็น AGPAT ซึ่งแตกต่างจาก conserved sequence อาจเป็นไปได้ว่า 718-KR2 นี้ inactive มีรายงานโดเมน KR ที่ inactive ใน KR-9 ของกลุ่มยีสสังเคราะห์ pimarinic โดยบริเวณที่เป็น active site motif จะมีลำดับกรดอะมิโน คือ PASGTGGHCA และ ADRTA (Aparicio *et al.*, 2000) ใน KR-13 ของกลุ่มยีสสังเคราะห์ amphotericin มี active site motif คือ GTRAMGARAA และ TTSPA (Caffrey *et al.*, 2001) ใน KR-15 ของกลุ่มยีสสังเคราะห์ candicidin มี active site motif คือ RAEGFGGHVA และ AGPAG (Chen *et al.*, 2003) ใน KR-13 ของกลุ่มยีสสังเคราะห์ nystatin มีลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่จับกับ NADP(H) เป็นปกติ แต่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่สองมี active site motif เป็น TAPD (ภาพที่ 30) ซึ่งจากการที่โดเมน KR inactive ของกลุ่มยีสที่สร้างสาร polyene คาดว่าอาจทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า hemiacetal ring ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ (Kadota *et al.*, 2004)

ตารางที่ 10 กลุ่มเชื้อ Type I PKS ที่นำมาใช้ในการทำ multiple alignment และ phylogenetic tree

สาร	ตัวย่อ	จำนวน โมดูล	จำนวนโดเมน			เชื้อที่ผลิต	Accession	เอกสารอ้างอิง
			KS	AT	ACP			
สารกลุ่ม macrolide								
Erythromycin	ERY	6	6	7	7	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Q03131-3	Donadio <i>et al.</i> , 1991
Megalomycin	MEG	6	6	7	7	<i>Micromonospora megalomicea</i>	AAG13917-9	Volchegursky <i>et al.</i> , 2000
Olendomycin	OLE	6	7	7	7	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Q07017, AAF82408-9	Swan <i>et al.</i> , 1994; Shah <i>et al.</i> , 2000
Pikromycin	PIK	6	7	7	7	<i>Streptomyces venezuelae</i>	AAC69329-32	Xue <i>et al.</i> , 1998
Niddamycin	NID	7	8	8	8	<i>Streptomyces caelestis</i>	AAC46024-8	Kakavas <i>et al.</i> , 1997
Tylosin	TYL	7	8	8	8	<i>Streptomyces fradiae</i>	AAB66504-8	DeHoff <i>et al.</i> , 1996
FKB520	FKB	10	10	10	11	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	AAF86392-3, 6	Wu <i>et al.</i> , 2000
Rifamycin	RIF	10	10	10	11	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	AAC01710-4	August <i>et al.</i> , 1998
Spinosad	SPN	10	10	11	11	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	AAG23262-6	Waldron <i>et al.</i> , 2001
Avermectin	AVE	12	6	7	7	<i>Streptomyces avermitilis</i>	BAA84474-5, 8-9	Ikeda <i>et al.</i> , 1999
สารกลุ่ม polyene								
Pimaricin	PIM	13	13	13	14	<i>Streptomyces natalensis</i>	CAC20919-21, 30-1	Aparicio <i>et al.</i> , 2000
Rapamycin	RAP	14	14	14	15	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	CAA60459-60, 62	Schwecke <i>et al.</i> , 1995
Amphotericin	AMP	18	19	19	19	<i>Streptomyces nodosus</i>	AAK73501-3,12-4	Caffrey <i>et al.</i> , 2001
Nystatin	NYS	18	19	19	19	<i>Streptomyces noursei</i>	AAF71766-8, 74-6	Brautaset <i>et al.</i> , 2000
Candididin/FR008	FSC	21	21	21	22	<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	AAQ82561, 4-8	Chen <i>et al.</i> , 2003

AMP-KR5	SEGTVLVTG--	GTGGLGGLVARHLVMERGVRRLLL	TSRSGLDAAAG-ARELVAELENLGA	56	Active module
NYS-KR4	ADGTVLVTG--	GTGGLGGLVARHLVRS CGVRHLLL	TSRSGVGAAG-AAGLVAEESLGA	56	
AMP-KR9	GEGAVLVTG--	GTGGLGAVLARHLVAEHGVRELVL	VSRRGGAAAG-AAELVAELAESGA	56	
NYS-KR9	GEGAVLVTG--	GTGGLGAVLARHLVAEYGVDRLLL	VSRRSGERAVG-AGELVAELAGVGA	56	
PIM-KR2	PSGTVLVTG--	GTGGLGRVMARHLVVEHGVNRLLL	VSRRGPAAEG-AEELVTELRHSGA	56	
PIM-KR11	ADGTVLVTG--	GTGGLGRELARHLVVERGVRRLLL	VSRRSGPEAPG-VSGLSDELAHGA	56	
718-KR1	PTGTVLVTG--	GTGALGGHVAR-WLAEAGAQHLLL	VSRRGADAPG-AGELAAQIEDMGV	55	
NYS-KR10	ATGTVLITG--	GTGGLGAEVARWLARA-GAQHLVL	TSRRGPDAPG-AAELRAELEGYGP	55	Inactive module
PIM-KR6	ARGTVLITG--	GTGALGAEAAARWLARS-GAEHLLL	TSRRGPEAPG-AAELAAEIEELGA	55	
AMP-KR1	PRGTVLVTG--	GSGLTAPGLARHLAAQ-GAEHLVL	LSRRGADAPG-AAELAAELQAAGT	55	
PIM-KR9	PAGTVLVVG--	PHSGTGGHGCARWLAGQ-GAQHLVL	ADRTAPD----TAQLIGELDALGV	52	
718-KR2	PSGTVLVVG--	GASGTGGLCARWLAGQ-GAQHLL	AGPATPE----ADTLPAELDGLGA	52	
FSC-KR15	PAGTVLVTG--	RHEGFGGHVARWLAH-GATGVLL	AGPAGPEDAA-TTALRAEVEALGA	55	
AMP-KR13	PHGTVLVVG--	GIRAMGARAARWLARE-GAARLVL	TTSP-ADSATDTEELRAELGRLGA	55	
NYS-KR13	PTGTVLVGGTGT	GTMGGRAARWLVE-GARHLVL	TADGTTTAADEALTAELAALGA	59	
		GxGxxGxxxA	xSRxG		

GxGxxGxxxxA

xSRxG

ภาพที่ 30 Multiple alignment ของโดเมน KR ในบริเวณ active site

บรรทัดต่างแสดง active site motif; กรอบสี่เหลี่ยม = กรดอะมิโนที่แตกต่างจาก active site motif

4.6.2 โดเมน ACP

โดเมน ACP มีความยาว 71 กรดอะมิโน (ภาพที่ 29; นิวคลีโอไทด์ที่ 1012-1224; กรดอะมิโนที่ 338-408) เมื่อนำโดเมน ACP ไปเปรียบเทียบกับโดเมน ACP อื่นในฐานข้อมูลพบลำดับกรดอะมิโน LGFDS ซึ่งคือ active site motif (LGXDS) โดยมี S (serine) เป็น active site เป็นบริเวณที่จับกับ phosphopanthetheine ดังภาพที่ 31

FKB-ACP4	LGVVRDTAATLLGHTDAAAVTATTAFKD	LGVD	SLTALGLRNRLSEALGIPLPATLVFDYP	60
RAP-ACP8	VKVVCDSAATVLGHADVDSIPVTAAFRD	LGVD	SLTAVELRNLSLTKATGLRLPATLVFDYP	60
PIM-ACP10	LALVRDRVAAVLGFADADAVPSGQAFTD	LGFD	SLTAVDLRNQLAVATGLALPATLVFDYP	60
AMP-ACP11	LETVRTEAASVLGLSSAEDLTDQRAFRD	VGFD	SLTAVGLRNRLASVTGLTLPSTMVFDYP	60
FSC-ACP13	LELVREAAATVLGHASPEVLSERRAFRD	IGFD	SLTAVDLRNRLASVTGLTLPSTLVFDYP	60
SPN-ACP7	LEVVLAEASTLGHDSAEAVQPDRTFAEL	GFDS	SLTAVELRNRLNAVTGLRLPPTLVFDHP	60
PIK-ACP3	QELVREHLAVVLNHPSP EAVDTGRAFRD	LGFD	SLTAVELRNRLKNATGLALPATLVFDYP	60
AVE-ACP2	LALVRSHIATVLGHTTPTDIPPDRAFRD	LGFD	SLTAVELRNRLSRTTGLRLPTTLAFDHP	60
TYL-ACP5	LAETIRAHAAAVLGHGSDSIPEDRAFKD	LGFD	SLTAVEMRNRLSAATGLRLPATLVFDHP	60
ERY-ACP1	FELVRSHAAAVLGHASAE RVPADQAFEL	GVDS	SLSAELERNRLGAATGVRLPPTTVFDHP	60
MEG-ACP2	VRLVRRDAAAVLGS-DAKAVPATTPFKD	LGFD	SLAAVFRNRNLAATHGLRLPATLVFEHP	59
OLE-ACP6	VKLVRTEAAAVLGHGSAQDVP AERAFKEL	GFDS	SLTAVQLRNRLAAATGTRLPASAVFDHP	60
NID-ACP3	LELVRETEAAAVLGHGDPGAVGAERSFKD	AGFD	SLTAVDLRNRLNARTGLRLPATLVFDHP	60
NYS-ACP14	VDLVRTRAAQVLGYPDTEAVAAERSFRD	GVDS	SLGAVELRNQLSAATGTLNLPATLVFDHP	60
RIF-ACP5	LDLVRAQVAAVLGHADASAVRVDTAFKD	AGFD	SLTAVELRNMRMTATGLKLPATLVFDYP	60
718-ACP	LDLVRTRVARSSAQ RHLGHRRRPR-LQR	LGFD	SLTTVELRNTLTAA TGLKLPATLVYDYP	59

LGxDS

↓

LGxDS

*

ภาพที่ 31 Multiple alignment ของโดเมน ACP ในบริเวณ active site

บรรทัดต่างแสดง active site motif; * = active site

4.6.3 โดเมน KS

โดเมน KS มีความยาว 409 กรดอะมิโน (ภาพที่ 30; นิวคลีโอไทด์ที่ 1291-2515; กรดอะมิโนที่ 431-838) เมื่อนำโดเมน KS มาเปรียบเทียบกับโดเมน KS อื่นในฐานข้อมูล พบส่วนที่เป็น active site motif คือ GPxxxxxTACSS โดยมี C (Cystein) เป็น active site (Donadio *et al.*, 1991) โดยโดเมน KS ของพลาสมิด pATT718 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น **GPAVTVD**TACSS ดังภาพที่ 32

718-KS	SGRLSYAFGLEGPAVTVDTACSSALV	174
PIM-KS12	SGRLSYTLGLEGPAVTVD TACSS SLV	178
AMP-KS3	SGRLSYFLGAEGPAVTVD TGCSS SLV	175
AVE-KS4	SGRVAYALGLEGPAL TVD TACSSSLV	178
SPN-KS9	SGRVAYSFGFEGPAVTVD TACSS SLV	179
FSC-KS9	SGRLSYTFGWEGPAVTVD TACSS SLV	169
NYS-KS10	SGRVAYTLGLEGPAVTVD TACSS SLV	176
NID-KS3	SGRVAYTLGLQGPAL TVD TACSSSLV	178
FKB-KS3	SGRLSYFYGLEGPAVTVD TACSS SLV	173
RAP-KS7	SGRLSYFFGLEGPAIT MD TACSSSLV	172
PIK-KS4	SGRVSYTLGLEGPAVTVD TACSS SLV	178
RIF-KS8	SGRVSYVLGFEGPAVTVD TGCSS SLV	178
OLE-KS6	SGRISYTFGLEGPAVTVD TACSS SLV	178
TYL-KS7	SGRISYALGLEGPSMT VET TACSSSLV	178
ERY-KS1	SGRIAYTLGLEGPAIS VD TACSSSLV	178
MEG-KS5	SGRVAYTLGLEGPAVTVD TACSS GLT	166
	GPxxxxxTACSS	
	*	

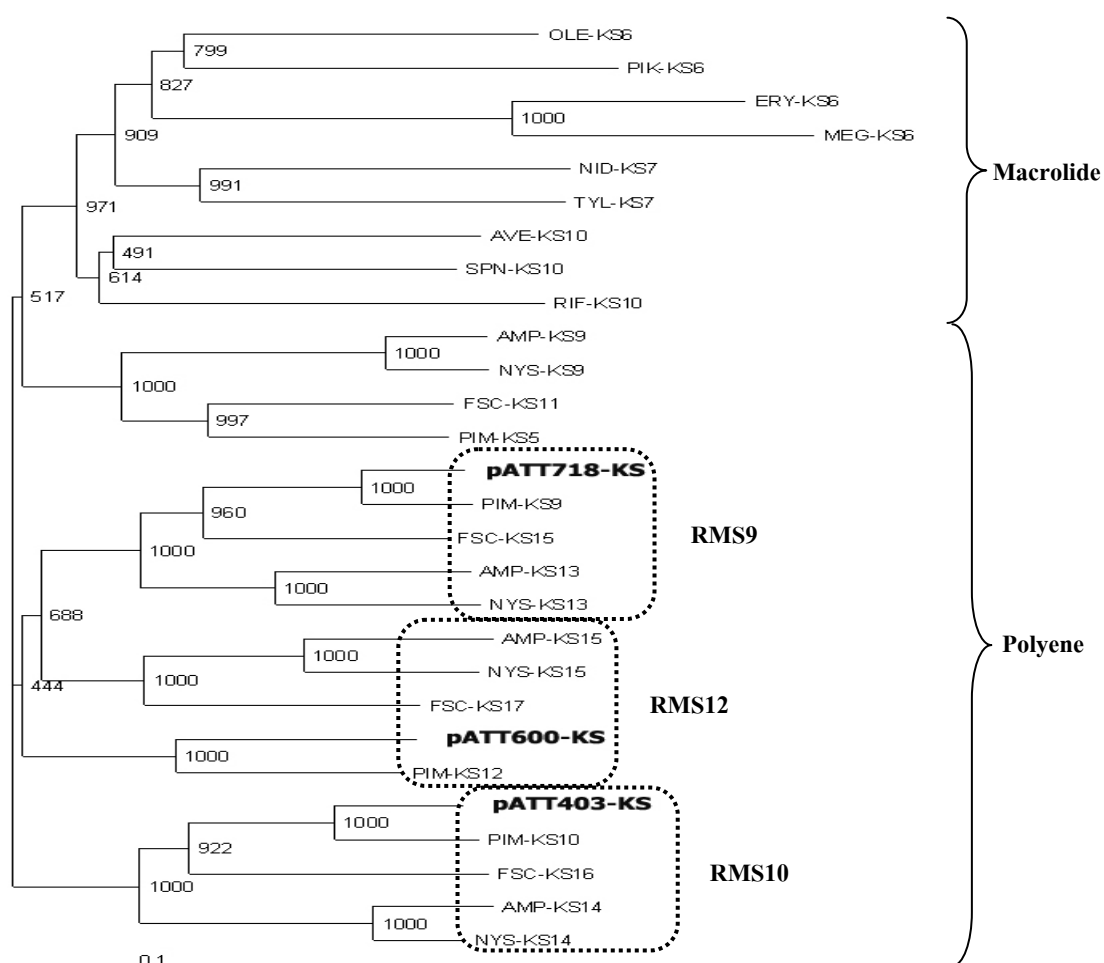
ภาพที่ 32 Multiple alignment ของโดเมน KS ในบริเวณ active site

บรรทัดต่างแสดง active site motif; * = active site cystein

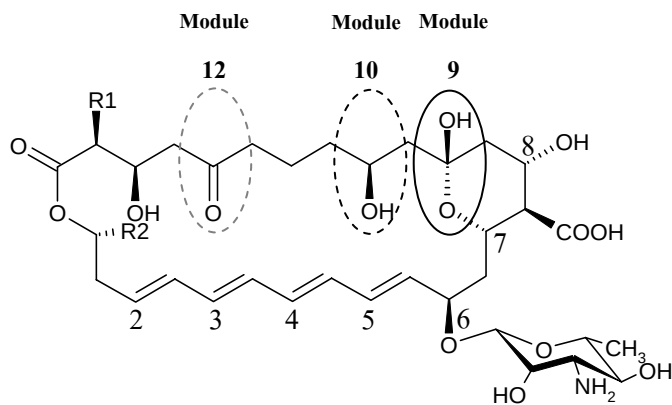
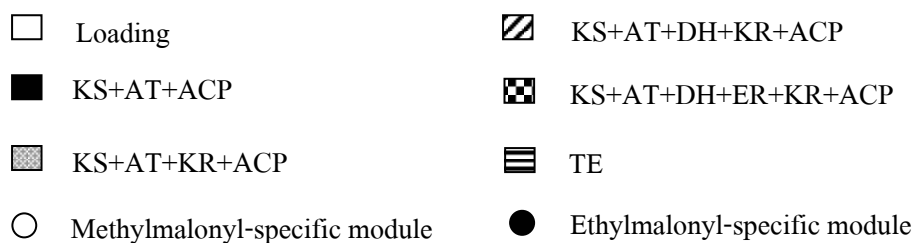
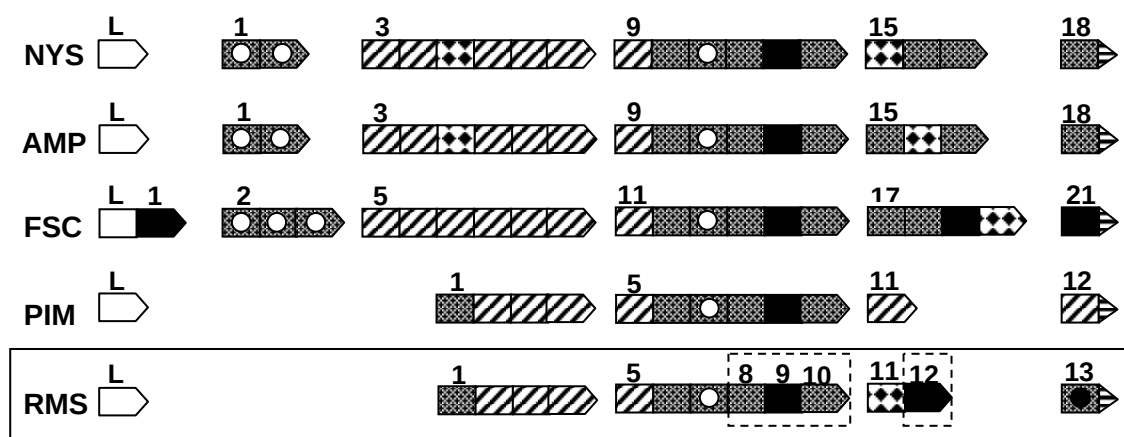
หลังจากการทำ multiple alignments ของลำดับกรดอะมิโนของโดเมน KS แล้ว จึงเลือกโดเมน KS บางโดเมนจากฐานข้อมูลมาทำ phylogenetic tree ร่วมกับโดเมน KS จากพลาสมิด pATT718 พบว่า โดเมน KS สามารถแบ่งได้ตามชนิดของสารที่ผลิต และขนาดโมเลกุลของสาร (ภาพที่ 34) จากภาพ phylogenetics tree สามารถแบ่งโดเมน KS ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารในกลุ่ม macrolide และสารในกลุ่ม polyene ซึ่งจะมีโครงสร้างของสารขนาดใหญ่กว่า

โดเมน KS ของพลาสมิด pATT718 อยู่ในกลุ่มของสาร polyene โดยโดเมน KS ของสารในกลุ่มนี้ยังมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยลงไปอีก นอกจากนี้ยังได้นำโดเมน KS จากพลาสมิด pATT403 (ประกิตชัย, 2547) และโดเมน KS จากพลาสมิด pATT600 (นิรินทรียา, 2548) มาวิเคราะห์ด้วย พบว่า pATT718-KS จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ PIM-KS9, FSC-KS15, AMP-KS13 และ NYS-KS13 ส่วน pATT403-KS จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ PIM-KS10, FSC-KS16, AMP-KS14 ตามที่

ได้เคยรายงานแล้วโดยประกิจชัย (2547) และ NYS-KS14 และ pATT600-KS จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ PIM-KS11, PIM-KS12, FSC-KS17, AMP-KS15 และ NYS-KS15 ตามที่ได้รายงานแล้วโดยนิรินทรียา (2548) จากการแบ่งกลุ่มย่อยดังกล่าวสามารถเขียนแผนภาพการจัดเรียงตัวของกลุ่มเอนไซม์ RMS ร่วมกับ Type I PKS ของสารกลุ่ม polyene ได้ดังภาพที่ 34 เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของสาร rimocidin (ภาพที่ 34) พบว่า pATT718-KS, pATT403-KS และ pATT600-KS อยู่คนละโมดูล จากการเปรียบเทียบโดยใช้ Type I PKS ของสารที่อยู่ในกลุ่ม polyene ได้แก่ nystatin (NYS), amphotericin (AMP), candicidin (FSC) และ pimaricin (PIM) (ภาพที่ 33) มาวิเคราะห์พบว่า pATT718-KS อยู่โมดูลที่ 9 ขณะที่มียารายงานแล้วว่า pATT403-KS และ pATT600-KS อยู่ในโมดูลที่ 10 และ 12 ตามลำดับ (ประกิจชัย, 2547; นิรินทรียา, 2548) (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 33 Phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ของโดเมน KS ของพลาสมิด pATT718 เปรียบเทียบกับโดเมน KS ของสารกลุ่ม macrolide และ polyene
 กรอบเส้นประ = กลุ่มย่อยของโดเมน KS; ตัวเลขข้างท้าย KS = ลำดับโมดูล
 AVE = avermectin, AMP = amphotericin, ERY = erythromycin,
 FSC = candicidin/FR008, MEG = megalomycin, NID = niddamycin, NYS = nystatin,
 OLE = olendomycin, PIK = pikromycin, PIM = pimaricin, RIF = rifamycin,
 SPN = spinosad, TYL = tylosin



R1 = CH₂-CH₃ ; R2 = CH₂-CH₂-CH₃

ภาพที่ 34 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน Type I PKS ของสารกลุ่ม polyene

AMP = amphotericin, FSC = candicidin, NYS = nystatin, PIM = pimaricin

RMS = rimocidin, L = Loading domain, ตัวเลข = ลำดับโมดูล

กรอบเส้นทึบ = แบบทำนายนการจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน *rms*

กรอบเส้นประ = โมดูลที่มีการหาลำดับเบสแล้ว

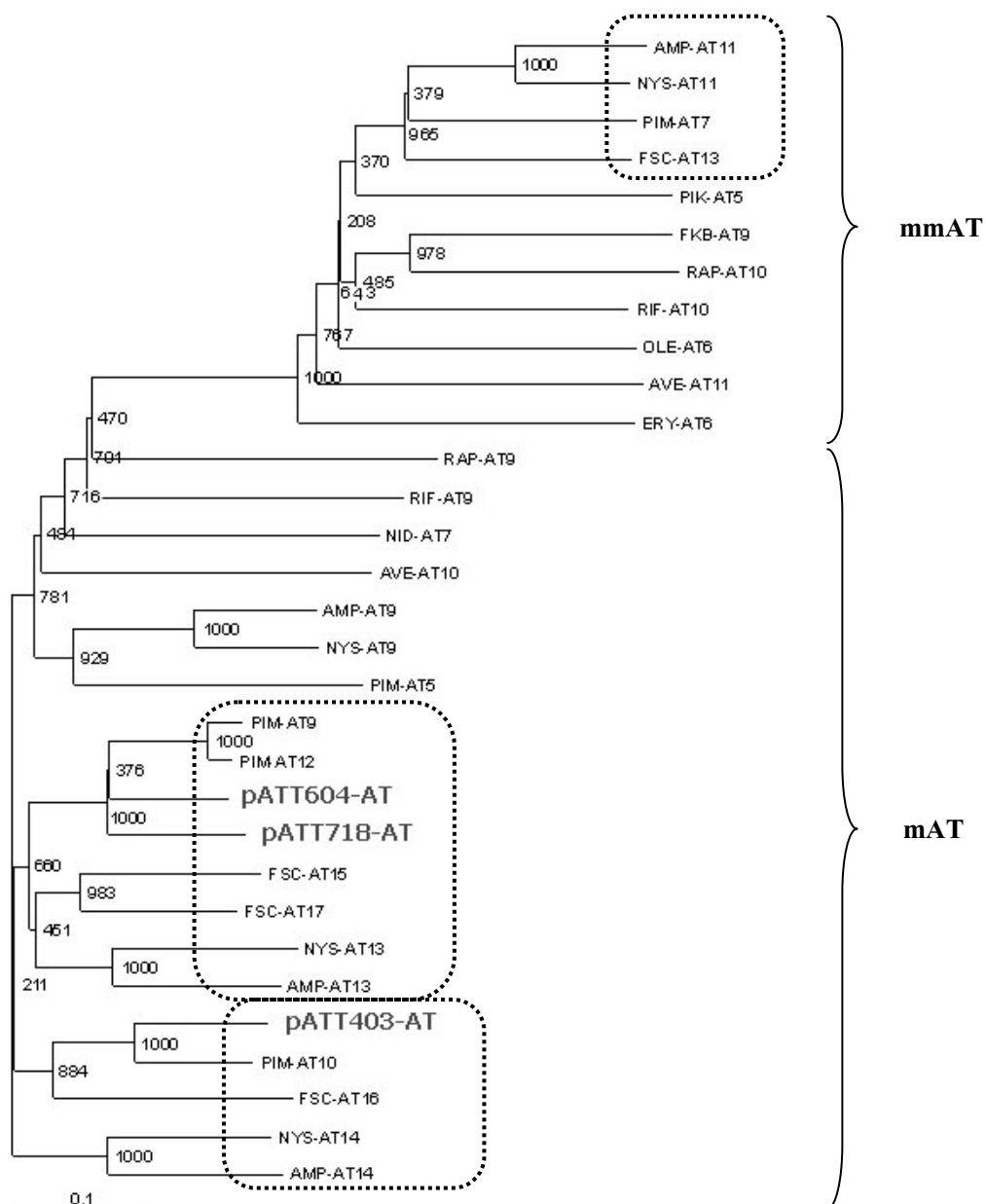
ที่มา: คัดแปลงมาจาก Aparicio *et al.* (2003)

4.6.4 โดเมน AT

โดเมน AT มีความยาว 310 กรดอะมิโน (ภาพที่ 29; นิวคลีโอไทด์ที่ 2806-3735; กรดอะมิโนที่ 936-1245) จากการเปรียบเทียบโดเมน AT กับโดเมน AT อื่นในฐานข้อมูลพบ active site motif คือ GHSXG ซึ่งมี S (serine) เป็น active site (Donadio *et al.*, 1991) โดเมน AT ของ พลาสมิด pATT718 มีลำดับเป็น **GHSIG** ทำการคัดเลือกโดเมน AT บางส่วนจากฐานข้อมูลไปทำ phylogenetic tree พบว่าแบ่งโดเมน AT ออกเป็นสองกลุ่ม คือโดเมน AT ที่จำเพาะต่อ malonyl-CoA (mAT) และโดเมน AT ที่จำเพาะต่อ methylmalonyl-CoA (mmAT) โดย pATT718-AT อยู่ในกลุ่มของโดเมน AT ที่จำเพาะต่อ malonyl-CoA ดังภาพที่ 36 นอกจากนี้ยังพบ specific motif ของ mAT คือ xTxxTQPALFAxevALxrLxxxwGxxPxxvxGHS (Chotewutmontri and Thamchaipenet, 2002) โดย pATT718-AT มีลำดับเป็น **ETGFTQPALFAIEVALFRLAESLGIRPDFVAGHS** (ภาพที่ 35) นอกจากนี้ยังนำโดเมน AT จากพลาสมิด pATT403 (ประภิตชัย, 2547) และโดเมน AT จากพลาสมิด pATT604 (นิรินทรยา, 2548) มาวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยพบว่า ทั้ง pATT718-AT, pATT604-AT และ pATT403-AT จัดอยู่ในกลุ่มที่จำเพาะต่อ mAT และยังจัดอยู่ในกลุ่มย่อยอีก คือ pATT403-AT จัดอยู่ในกลุ่ม PIM-AT10, FSC-AT16, AMP-AT14 และ NYS-AT14 ในขณะที่ pATT718-AT และ pATT604-AT จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ PIM-AT9, PIM-AT11, AMP-AT13, NYS-AT13, FSC-AT15 และ FSC-AT17 ซึ่งสอดคล้องกับการทำ phylogenetic tree ของโดเมน KS ดังได้กล่าวไปแล้ว

718-AT	EGLDETGFTQPALFAIEVALFRLAESLGIRPDFVAGHSIGIEIAAAHVAGVFSLADACALV	107
PIM-AT9	EGLD ETGFTQPALFAIEVALFRLAESLGVRPDFVGGHS IG IEIAAAHVAGVFS LADACALV	107
PIM-AT10	ERLNETGYTQPALFAIEVALFRLVASWGIRPDFVAGHSIG IEIAAAHVAGVFS LDDACRLV	111
AMP-AT14	ETLNETGHTQPALFAFEVALYRLVESWGVTPDFVAGHSVGEIAAAHVAGVLSLDDACRLV	112
NYS-AT14	EALHATGNTQPALFAVEVALYRLIESWGVPRPDFVAGHSVGELAAAHVAGVLSLDDACRLV	112
AMP-AT3	ELLNETGWTQPALFAVEVALYRLVSSLGVTPDYVGGHSIG IEIAAAHVAGVLS LEDACALV	112
NYS-AT4	QLVDRGTGYTQPALFAIEVALFRLLEAWGITPDFVAGHSIG IEIAAAHVAGVLS LGDACRLV	112
AVE-AT10	RLIEDTGFAQPALFAFEVALFRLLETWGLTPDYVLGHSVGELAAAHVAGMLCLADAVLV	120
PIK-AT2	ALLDETRYTQCALFALEVALFRLVESWGMRAALLGHSVGEIAAAHVAGVFSLADAARLV	116
TYL-AT7	ALLDRTEYTQPALFAVEVALHRLLEHWMRPDLLLGHSVGELAAAHVAGVLDLDDACALV	116
NID-AT1	DLLDRTEYTQPALFALQTALYRTLARGTQAHLVLGHSVGEITAAHIAAGVLDLPDAARLI	113
RAP-AT5	LEVNETGYAQPALFALQVALFGLLESWGVPRDAVVGHSVGELAAAGVVSGLWSLEDACTLV	99
RIF-AT9	GLLNQTVFTQAGLFAVESALFRLAESWGVPRPDVVLGHSVGEITAAAYAAGVFSLPDAARIV	119
SPN-AT4	QLLDQTLWAQSGLFALQAGLLGLLGSWGVPRPDVVMGHSVGELAAAFAGVLSLRDAARLV	114
FKB-AT10	ALAHDTLYAQAGLFTLEVALRLLEHWGVPRPDVLVGHSVGEVTAAYAAGVLTLDATATELI	112
	xTxxTQPALFAxevALxrLxxxwGxxPxxvxGHS	

ภาพที่ 35 Multiple alignment ของโดเมน AT ที่จำเพาะต่อ malonyl-CoA ในบริเวณ active site
บรรทัดล่างแสดง specificity motif ของ malonate specific AT



ภาพที่ 36 Phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ของโดเมน AT ของพลาสมิด pATT718 เปรียบเทียบกับโดเมน AT ของสารโพลีลิไทด์

กรอบเส้นประ = กลุ่มย่อยของโดเมน AT ของสารกลุ่ม polyene; ตัวเลขข้างท้าย AT = ลำดับโมดูล; mAT = malonate specific AT; mmAT = methylmalonate specific AT

สรุป

โดเมน KS จากพลาสมิด pATT401 (ประกิตชัย, 2547) ถูกใช้เป็นโพรบในการตามหากลุ่มยีน Type I PKS ของ *S. rimosus* R7 ด้วยการทำให้ Southern hybridization จากพลาสมิด pATT404 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* สามารถโคลนยีนขนาด 8 กิโลเบส หลังจาก subclone แล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส ประกอบด้วยส่วนของโดเมน KR, ACP, KS และบางส่วนของโดเมน AT ของกลุ่มยีน Type I PKS จึงใช้ชิ้นดีเอ็นเอนี้ขนาด 3.3 กิโลเบส เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการหากลุ่มยีน Type I PKS ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน โดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าสู่พลาสมิด pSET151 โดยอาศัยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *S. rimosus* R7 ได้สายพันธุ์กลาย *S. rimosus* ATT709 เมื่อนำสายพันธุ์กลายมาวิเคราะห์ พบว่าสามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type เมื่อสกัดสารจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงของ *S. rimosus* R7 และ *S. rimosus* ATT709 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SPG มาตรวจสอบโดยการทำ TLC ด้วยแผ่น silica gel 60 F₂₅₄ และทำ Bioautography พบว่าสารสกัดจากเส้นใยของ *S. rimosus* R7 เท่านั้นที่มีวงใสต่อ *A. niger* ขณะที่สายพันธุ์กลายไม่มีวงใสเกิดขึ้น เมื่อสกัดสารบริเวณวงใสมาตรวจสอบด้วยวิธี Spectrophotometry พบว่าได้ $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 278, 290, 303 และ 318 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับค่า $\lambda_{\max}$ ของ rimocidin ส่วนในสายพันธุ์กลายนั้น ผลจากการทำ TLC พบว่ามีตำแหน่ง Rf = 0.33 แตกต่างจาก wild type ซึ่งอาจเป็นสาร intermediate จึงสกัดสารบริเวณดังกล่าวมาตรวจสอบ พบว่าได้ $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 255, 260 และ 266 นาโนเมตร ซึ่งไม่ใช่ช่วงความยาวคลื่นของสารในกลุ่ม polyene

เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธี PCR ยีน *tsr* และชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย พบว่าพลาสมิดแทรกตัวเข้าไปในจีโนมของ *S. rimosus* R7 จริง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Southern hybridization พบว่า *S. rimosus* ATT709 มีการแทรกของพลาสมิด pATT709 เข้าไปในโครโมโซม โดยการเกิด homologous recombination แบบ single crossover จึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส จากผลการทำ Southern hybridization นำมาวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าประกอบด้วยโดเมน KR, ACP, KS, AT และ KR ซึ่งบริเวณปลาย 3' ซ้อนทับอยู่กับส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิด pATT403 ซึ่งเคยถูกรายงานไว้แล้วโดยประกิตชัย (2547) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าโดเมน AT จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อ malonyl-CoA ขณะเดียวกันบริเวณโดเมนที่พบน่าจะอยู่ในโมดูลที่ 8 และ 9 ของ rimocidin synthase (RMS) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร rimocidin ใน *S. rimosus* R7

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ณัฐจิรา พูลสวัสดิ์ และ อรินทิพย์ ธรรมชัยพินัด. 2544. การโคลนยีนคีโตซินเทสซึ่งเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์โพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 จาก *Streptomyces* sp. A2a-19, น. 119-122. ใน รายงานการ ประชุมทางวิชาการของสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12. ภาควิชาพันธุศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประกิตชัย โชติวุฒิมินตรี. 2547. การโคลนยีนและการศึกษาลักษณะของยีนโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 ใน *Streptomyces rimosus* R7 ที่ผลิตสารต้านเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรินทร์ยา สุตดาชาติ. 2548. การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 จาก *Streptomyces rimosus* R7 ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.

Anton, N., M.V. Mendes, J.F. Martin and J.F. Aparicio. 2004. Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. **J. Bacteriol.** 186: 2567-2575.

Aparicio, J.F., A.J. Colina, E. Ceballos and J.F. Martin. 1999. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimarin. **J. Biol. Chem.** 274: 10133-10139.

Aparicio, J.F., R. Fouces, M.V. Mendes, N. Olivera and J.F. Martin. 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimarin in *Streptomyces natalensis*. **Chem. Biol.** 7: 895-905.

- Aparicio, J.F., P. Caffrey, J.A. Gil and S.B. Zotchev. 2003. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 179-188.
- August, P.R., L. Tang, Y.J. Yoon, S. Ning, R. Muller, T.W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C.G. Kim, X. Zhang, C.R. Hutchinson CR and H.G. Floss. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. **Chem. Biol.** 5: 69-79.
- Bangera, M.G. and L.S. Thomashow. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. **J. Bacteriol.** 181: 3155-3163.
- Bentley, S.D., K.F. Chater, A.-M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill and D.A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature** 417: 141-147.
- Berdy, J. 1986. Further antibiotics with practical application, pp. 486-507. *In* H. Pape and H-J. Rehm, eds. **Biotechnology** volume 4. Weinheim, Florida.
- Berdy, J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? pp. 13-14. *In* V. Debabov, Y. Dudnikand V. Danlienکو, eds. **Proceeding of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes**. All-Russia Scientific Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia.

- Bibb, M.J., J.M. Ward and D.A. Hopwood, 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. **Nature** 274: 398-400.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E.T. Seno, R.N. Rao and B.E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. **Gene** 116: 43-49.
- Brautaset, T., O.N. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, A.R. Strom, S. Valla and S.B. Zotchev. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. **Chem. Biol.** 7: 395-403.
- Brewer, G.A. and T.B. Platt. 1967. Antibiotics, pp. 460-633. In F.D. Snell and C.L. Hilton, eds. **Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis**. Vol 5. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bullock, W.O., J.M. Fernandez and J.M. Short. 1987. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strains. **Biotechnology** 5: 376-379.
- Caffrey, P., S. Lynch, E. Flood, S. Finnan and M. Oliynyk. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and lated genes. **Chem. Biol.** 8: 713-723.
- Campelo, A.B. and J.A. Gill. 2002. The candicidin gene cluster from *Streptomyces grieus* IMRU 3570. **Microbiology** 148: 51-59.
- Chen, C.W. 1995. The unstable and ends of *Streptomyces* linear chromosome: nuisance without cures. **Trends Biotechnol.** 13: 157-160.

- Chen, S., X. Huang, X. Zhou, L. Bai, J. He, K.J. Jeong, S.Y. Lee and Z. Ceng. 2003. Organization and mutational analysis of a complete FR-008/Candididin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. **Chem. Biol.** 10: 1065-1076.
- Chotewutmontri, P. and A. Thamchaipenet. 2002. Cloning of type I polyketide synthase gene from *Streptomyces rimosus* R7, an anti-fungal producer, P-EP03. *In* **Proceedings of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.**
- Chung, C.T., S.L. Niemela and R.H. Miller. 1989. One –step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 86: 2172-2175.
- Ciftci, T., T.A. Borkman, L.E. McDaniel and C.P. Schaffer. 1984. Comparative analysis of hexaene antibiotics. **J. Antibiot.** 37:876-884.
- Cope, A.C., E.P. Burrows, M.E. Derieg, S. Moon and W-D. Wirth. 1965. Rimocidin I: Carbon skeleton, partial structure and absolute configuration at C-27. **J. Am. Chem. Soc.** 87: 5452-5460.
- _____, A.C., U. Axen and E.P. Burrows. 1966. Rimocidin. II. Oxygenation pattern of the rimocidin aglycone. **J. Am. Chem. Soc.** 88: 4221-4227.
- Cortes, J., S.F. Haydock, G.A. Roberts, D.J. Bevitt and P. Leadlay. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythaea*. **Nature** 348: 176-178.
- Crawford, D.L. 1978. Biodegradation of agricultural and urban wastes, pp. 433-439. *In* M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski, eds. **Actinomycetes in Biotechnology.** Academic Press, San Diego.

- Davisson, J.D., F.W. Tanner, Jr., A.C. Finlay and I.A. Solomons. 1951. Rimocidin, a new antibiotic. **Antibiot. Chemother.** 1: 289-290.
- DeHoff, B.S., K.L. Sutton and P.R. Jr. Rosteck. 1996. Sequence of *Streptomyces fradiae* ty lactone synthase gene *tylG*. (Unpublished).
- Dimarco, A., G. Cassinelli and F. Arcamone. 1981. The discovery of duanorubicin. **Cancer Treatment Rep.** 65: 3-8.
- Dinya, Z.M. and F.J. Sztaricskai. 1986. Ultraviolet and light absorption spectrometry. In A. Aszalos, ed. **Modern Analysis of Antibiotics.** Marcel Dekker, Inc., New York. 535 p.
- Donadio, S., M.J. Staver, J.B. McAlpine, S.J. Swanson and L. Katz. 1991. Modular organization of gene required for complex polyketide biosynthesis. **Science** 252: 675-679.
- _____, S. and L. Katz. 1992. Organization of the enzyme domains in multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. **Gene** 111: 51-60.
- _____, S., J.B. McAlpine, P.J. Sheldon, M. Jackson and L. Katz. 1993. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 90: 7119-7123.
- Dutcher, J.D. 1968. The discovery and development of amphotericin B. **Dis. Chest.** 54: 40-42.
- Evan, P.D., S.N. Cook, R.D. Riggs and C.J. Noren. 1995. LITMUS: Multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional *in vitro* transcription. **Biotechniques** 19: 130-135.

Fernandez-Moreno, M.A., E. Martinez, L. Boto, D.A. Hopwood and F. Malpartida. 1992.

Nucleotide sequence and deduced functions of a set cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. **J. Biol. Chem.** 267: 19278-19290.

Flett, F., V. Mersinias and C.P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. **FEMS Microbiol. Lett.** 155: 223-229.

Falkowski, L., J. Zielinski, J. Golik, E. Bylec and E. Borowski. 1978. The structure of rimocidin: Mass spectrometric analysis of derivatives of the antibiotic. **J. Antibiot.** 31: 742-749.

Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordaski. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic Press, London.

_____, M. 1989. Supergeneric classification of actinomycetes, pp. 2333-2339. In S.T. William, ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol.4. William and Wilkins, Baltimore.

Hamilton-Miller J.M.T. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotic. **Bacteriol. Rev.** 37:166-196.

Hazen, E.L. and R. Brown. 1951. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. **Proc. Soc. Exp. Biol.** 76:93.

Hee-jin, C., K. Baik-ho, K. Jeong-dong and H. Myung-soo. 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. **Biocontrol.** 33: 335-343.

- Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C.J. Gardner, J.A. Cullum and S.G. Oliver. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 272-277.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chapter, T. Kieser, C.T. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiare, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985. **Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual**. The John Innes Foundation, Norwich, 356p.
- _____, D.A. and D.H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Annu. Rev. Genet.** 24: 37-66.
- _____, D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. **Chem. Rev.** 97: 2465-2498.
- Hutchinson, C.R., H. Decker, H. Motamedi, B. Shen, R.G. Summers, E. Wendt-Pienkowski and W.L. Wessel. 1993. Molecular genetics and biochemistry of a bacterial type II polyketide synthase, pp. 203-216. In: **"Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics"**. R.H. Baltz, G.D. Hegeman and P.L. Skatrud, eds. American Society of Microbiology. Washington, DC
- Ikeda, H., T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta and S. Omura. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96: 9509-9514.
- _____, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature.** 21: 526-531.
- Imada A. and K. Hotta. 1992. Historical perspectives of approaches to antibiotics discovery, pp. 1-23. In J.A. Sutcliffe and N.H. Georgopapadakou, eds. **Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy**, New York.

- Izumikawa, M., P.R. Shipley, J.N. Hopke, T. O'Hare, L. Xiang, J.P. Noel and B.S. Moore. 2003. Expression and characterisation of type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Ind. Biotechnol.** 30: 510-515.
- Kadota I., Y. Hu, G.K. Packard and S.D. Rychnovsky. 2004. A unified approach to polyene macrolide: synthesis of candidin and nystatin polyols. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101: 11992-11995.
- Kakavas, S.J., L. Katz and D. Stassi. 1997. Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. **J. Bacteriol.** 179: 7515-7522.
- Kao, C.M., M. McPherson, R.N. McDaniel, H. Fu, D.E. Cane and C. Khosla. 1997. Gain of function mutagenesis of the erythromycin polyketide synthase 2, engineered biosynthesis of an eight-membered ring tetraketide lactone. **J. Am. Chem. Soc.** 119:11339-11340.
- Kieser, H.M., T. Kieser and D.A. Hopwood. 1992. A combined genetic and physical map of *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. **J. Bacteriol.** 174: 5496-5507.
- _____, H.M., T., M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. **Practical Streptomyces genetics.** The John Innes Foundation, Norwich.
- Kumar, P., A.T. Koppisch, D.E. Cane and C. Khosla. 2003. Enhancing the modularity of the modular polyketide synthase: transacylation in modular polyketide synthases catalyzed by malonyl-CoA:ACP transacylase. **J. Am. Chem. Soc.** 125: 14307-14312.
- Leblond, P., M. Redenbach and J. Cullum. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.** 175: 3422-3429.

- Lechevalier, H., R.F. Acker, C.T. Corke, C.M. Haenseler and S.A. Waksman. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. **Mycologia** 45: 155-171.
- Lezhava, A., T. Mizukami, T. Kajitani, D. Kameoka, M. Redenbach, H. Shinkawa, O. Nimi and H. Kinashi. 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. **J. Bacteriol.** 177: 6492-6498.
- Li, T-L, O.W. Choroba, H. Hong, D.H. Williams and J.B. Spencer. 2001. Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics: characterisation of a type III polyketide synthase in the path-way to (s)-3,5-dihydroxyphenylglycine. **Chem. Commun.** 20: 2156-2157.
- Lin, Y-S., H.M. Kieser, D.A. Hopwood and C.W. Chen. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Mol. Microbiol.** 10: 923-933.
- Liu, L., Thamchaipenet, A., Fu, H., Betlach, M. and Ashley, G. 1997. Biosynthesis of 2-nor-6-deoxyerythronolide B by rationally designed domain substitution. **J. Am. Chem. Soc.** 119: 10553-10554.
- MacNeil, D.J., K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. **Gene** 111: 61-68.
- Martin, J.F. and A.L. Demain. 1976. Control by phosphate of candicidin production. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 71: 1103-1109.
- _____, J.F. 1985. Biosynthesis, regulation and genetics of polyene macrolide antibiotics, pp. 355-387. In S. Omura, ed. **Macrolide Antibiotics Chemistry, Biology and Practice**. Academic Press, New York.

- Matsushima, P. and R.H. Baltz. 1985. Efficient plasmid transformation of *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae* protoplasts. **J. Bacteriol.** 163: 180-185.
- Mazodier, P., R. Petter and C. Thompson. 1989. Intergeneric conjugation between *E.coli* and *Streptomyces* species. **J. Bacteriol.** 171: 3583-3585.
- McDaniel, R., A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, M. Betlach and G. Ashley. 1999. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “unnatural” natural products. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 96: 1846-1851.
- McGinnis, M.R. and M.G. Rinaldi. 1996. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids, pp. 176-184. *In* V. Lorian, ed. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Melino, M.R. and N.H. Sigal. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. **J. Immunol.** 144: 251-258.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. **Meth. Enzymol.** 101: 20-78.
- Mendes, M.V., E. Recio, R. Fouces, R. Luiten, J.F. Martin and J.F. Aparicio. 2001. Engineering biosynthesis of novel polyene: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. **Chem. Biol.** 8: 635-644.
- Murli, S., J. Kennedy, L.C. Dayem, J.R. Carney and J.T. Kealey. 2002. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved 6-deoxyerythronolide B production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30: 500-509.

- Norrander, J., T. Kempe and J. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene** 26: 101-106.
- Oliynyk, M., M.J.B. Brown, J. Cortes, J. Staunton and P.F. Leadley. 1996. A hybrid modular polyketide synthase obtained by domain swapping. **Chem. Biol.** 3: 833-839.
- Oroshnik, W. and A.D. Mebane. 1963. p.17. *In* L. Zechmeister, ed. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Vol.21. Springer Verlag, Wien.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput. Appl. Biosci.** 12: 357-358.
- Paiva, N.L., M.F. Robers and A.L. Demain. 1993. The cyclohexane moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus*. **J. Ind. Microbiol.** 12: 423-428.
- Pandey, R.C. and K.L. Rinehart, Jr. 1977. Polyene antibiotic VIII: the structure of rimocidin. **J. Antibiot.** 30:146-162.
- _____, E.C. Guenther, A.A. Aszalos and J. Brajtburg. 1982. Physicochemical and biological comparison of polyene macrolide antibiotics fungichromin, lagosin and cogomycin. **J. Antibiot.** 35: 988-996.
- Pandza, K., G. Pfalzer, J. Cullum and D. Hranueli. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. **Microbiology** 143: 1493-1501.
- Pigac, J. and H. Schrempf. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomyces by electroporation. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 352-356.

- Rhodes, P.M., N. Winskill, E.J. Friend and M. Warren. 1981. Biochemical and genetic characterisation of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis. **J. Gen. Microbiol.** 124: 329-338.
- Ryan, K.J. 2004. Pathogenesis, immunity, and chemotherapy of fungal infection, pp. 639-647. *In* K.J. Ryan and C.G. Ray, eds. **Sherris Medical Microbiology: an introduction to infectious diseases**. 4th ed. McGraw-Hill, New York.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Schwecke, T., J.F. Aparicio, I. Molnar, A. Konig, L.E. Khaw, S.F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, J.B. Lester, G.A. Bohm, J. Staunton and P. Leadlay. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 92: 7839-7843.
- Scrutton, N.S., A. Berry and R.N. Perham. 1990. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. **Nature** 343: 38-43.
- Seco, E.M., F.J. Perez-Zuniga, M.S. Rolon and F. Malpartida. 2004. Start unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108. **Chem. Biol.** 11: 357-366.
- _____, E.M., T. Cuesta, S. Fotso, H. Laatsch and F. Malpartida. 2005a. Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108. **Chem. Biol.** 12: 535-543.
- _____, E.M., S. Fotso, H. Laatsch and F. Malpartida. 2005b. A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in *Streptomyces diastaticus* var. 108. **Chem. Biol.** 12: 1093-1101.

- Shah, S., Q. Xue, L. Tang, J.R. Carney, M. Betlach and R. McDaniel. 2000. Cloning, characterization and heterologous expression of a polyketide synthase and P-450 oxidase involved in the biosynthesis of the antibiotic oleandomycin. **J. Antibiot.** 53: 502-508.
- Sia, E.A., D.M. Kuehner and D.H. Figurski. 1996. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. **J. Bacteriol.** 178: 1457-1464.
- Simon, R., U. Priefer and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. **Biotechnology** 1: 784-791.
- Simpson, T.J. 1995. Polyketide biosynthesis. **Chem. Ind.** 11: 407-411.
- Southern, T.G. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98: 503-507.
- Sowinski, P., J. Pawlak and E. Borowski. 1995. Stereostructure of rimocidin. **J. Antibiot.** 48: 1288-1291.
- Struyk, A.P., I. Hoette, G. Drost, J.M. Waisvisz, T. Vaneek and J.C. Hoogerheide. 1958. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. **Antibiot. Annu.** 5: 878-885.
- Sun, J., G.H. Kelemen, J.M. Fernandez-Abalos and M.J. Bibb. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology** 145: 2221-2227.
- Swan, D.G., A.M. Rodriguez, C. Vilches, C. Mendez and J.A. Salas. 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. **Mol. Gen. Genet.** 242: 358-362.

- Takano, E., J. White, C.J. Thompson and M.J. Bibb. 1995. Construction of thiostrepton inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. **Gene** 166: 133-137.
- Tewfik, E.M. and S.G. Bradley. 1967. Characterization of deoxyribonucleic acids from streptomycetes and nocardia. **J. Bacteriol.** 94: 1994-2000.
- Thamchaipenet, A. 1999. Multiple domain substitutions of erythromycin polyketide synthase to produce a combinatorial library. **Actinomycetologica** 13: 113-119.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Volchegursky, Y., Z. Hu, L. Katz and R. McDaniel. 2000. Biosynthesis of the anti-parasitic agent megalomicin: transformation of erythromycin to megalomicin in *Saccharopolyspora erythraea*. **Mol. Microbiol.** 37: 752-762.
- Volpon, L. and J.-M. Lancelin. 2002. Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. **Eur. J. Biochem.** 269: 4533-4541.
- Walsh, T.J. 1992. Invasive fungal infection: problems and challenges for developing new antifungal compounds, pp. 349-373. In A.S. Joyce, H.N. Georgopapadakou, eds. **Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy**. 1st ed. Chapman and Hall, New York.
- Waldron, C., P. Matsushima, P.R. Rostek Jr., M.C. Broughton, J. Turner, K. Madduri, K.P. Crawford, D.J. Merlo and R.H. Baltz. 2001. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. **Chem. Biol.** 8: 487-499.

- Weber, J.M., C.K. Wierman and C.R. Hutchinson. 1985. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythraea*. **J. Bacteriol.** 164: 425-433.
- Wellington, E.M.H., N. Cresswell, P.R. Herron. 1992. Gene transfer between streptomycetes in soil. **Gene** 115: 193-198.
- Williams, S.T., M.E. Sharpe, J.G. Holt. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Wu, K., L. Chung, W.P. Revill, L. Katz and C.D. Reeves. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. **Gene** 251: 81-90.
- Xue, Y., L. Zhao, H.W. Liu and D.H. Sherman. 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 12111-12116.
- Yuan, W.M. and D.L. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3119-3128.
- Zotchev, S., K. Haugan, O. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen and S. Valla. 2000. Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. **Microbiology** 146: 611-619.

ภาคผนวก

LOCUS AY701054 8939 bp DNA linear BCT 02-DEC-2005
 DEFINITION Streptomyces rimosus rimocidin synthase (rms) gene, partial cds.
 ACCESSION AY701054
 VERSION AY701054.2 GI:82659653
 KEYWORDS .
 SOURCE Streptomyces rimosus
 ORGANISM [Streptomyces rimosus](#)
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 8939)
 AUTHORS Chotewutmontri,P.
 TITLE Cloning and characterisation of type I polyketide synthase from an
 anti-fungal antibiotic producing Streptomyces rimosus
 JOURNAL Thesis (2004) Kasetsart University, Bangkok, Thailand
 REFERENCE 2 (bases 1 to 8939)
 AUTHORS Tanittaisong,A.
 TITLE Characterisation of type I polyketide synthase gene cluster from
 rimocidin-producing Streptomyces rimosus R7
 JOURNAL Thesis (2004) Kasetsart University, Bangkok, Thailand
 REFERENCE 3 (bases 1 to 8939)
 AUTHORS Thamchaipenet,A. and Chotewutmontri,P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JUL-2004) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phaholyothin, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand
 REFERENCE 4 (bases 1 to 8939)
 AUTHORS Thamchaipenet,A. and Tanittaisong,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-NOV-2005) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phaholyothin, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand
 REMARK Sequence update by submitter
 COMMENT On Nov 25, 2005 this sequence version replaced gi:[51594272](#).
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..8939
 /organism="Streptomyces rimosus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="R7"
 /db_xref="taxon:[1927](#)"
[gene](#) <1..>8939
 /gene="rms"
[CDS](#) <1..>8939
 /gene="rms"
 /note="type I polyketide synthase; Rms; RMS; module 8-10"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="rimocidin synthase"
 /protein_id="[AAU08169.2](#)"
 /db_xref="GI:82659654"
 /translation="ELDSTTLRRLATVLADSGGEDQLAVRTTAAAFARRLAHHRVMPDS
 EAGTFSPTGTVLVTGGTGALGGHVARWLAEAGAQHLLLSRRGADAPGAGELAAQIED
 MGVVRTLAACDTADRGALDAVLAEIPEEHPLTAVFHTAGTVDDGTLDTLTPEQFTSVL
 HAKVTATRTLHEATRDLDLSAFVLFSVAGTLGAPGQGNYYAANAFLDFAEAHRRHAG
 LPATSIAGPWAEDGMAADGTDVQARIRGGYNPLPPQLALTALRQAIIEQGAPTLLTA
 DIDWQRYAEVFTATRPSPVLVGDPELRQATAPAGTAEALREPALRQRLAGLSPAARP
 RFVLDLVRTRVARSSAQRHLGHRRRPRLQRLGFDLTTVELRNTLTAAATGLKLPATLV
 YDYPTPIALADFLLAELQGALPESDR LAPAGGAAADDDPIAVVGLNCRFPGGIRSP
 DLWQLLGRGEDAISGFADRGWDL DALAQGGSATLEGGFLDGVGLFDAFFGISPREA
 LAMDPQQRLLLETSWEVFERAGIDPATLRGSRGTGVFGTNGQDYATVLRRTGTADIR
 GHVATGNTASVLSGRLSYAFGLEGPVTVDTACSSALVALHMAANALRSGECTLALAG
 GVSVMSSPDSFTEFTVQGLAPDGRCKPFADAADGTSWSEGVGVVLVLERLSDARRNGH
 EVWGIVRGTA VNVQDGASNGLTAPSGRAQQRAIRQALADADLAPADIDVVEAHGTGTTL
 GDP IEAQALITAYGPDRERPLLLGAVKSNLGHTQAAAGVAGTIKMLLAMRHGVL PKNL
 HVDWSDGTVSLVTEEQAWPETGHARRAGVSAFGVSGTNAHVIIIEQAPEAEPEADGPA
 EPTTVPGVLPWPVSAKSEAALAAQIERITALTGLAPADVGHSLATGRSAFTHRAVLAA
 DGTGVRELARGIAQETDGKLALLFSGGQAQRAGMGRELYGRFPVFAEALDAVLAFDA
 GLRDVIFGDAEGLDETGTQPALFAIEVALFRLAESLGIRPDFVAGHSIGEIAAAHVA
 GVFS LADACALVAARARLMQALPEGGAMVAIEATEGEVGPRLADGVSI AALNGPESV
 ISGTQDAVLRSRNSPTEGRKTRRLSVSHAFHSLMDPMLADFRQVAEGLAYEAPRIP
 LVSNTVGELATAELICTPGYWVQHVRDTRFADGVRALEAGASVFLEVGPDGVLTAM
 AQHSLADA AVAPALRKDRPEETALLTALAQLYVTGVGIDWSGVFDGTGARRVDLPTY
 PFQQEWFWPETAPAASPADGSQAPVDAEFWD AVEREDLTALSADLDLDGSALGASYRL
 SPGAQARRALDVGWRYQVTWKPLTGTSASTLSGPWLALVPAGGADDEWTASVVAALG
 DDAVSVEADPADSRALTARLAELAAQGGQEFAGVVSLAARTGEGVASGGAAWPDAAVQ
 ALADAGIGARLWYVTRGAVAVGRSETDVAQA AAVWGAGRVAALDHPDLWGGLVDIAD

VLDRRSADRFRAVLSGTGGEDQVALRSSGAFGRRLVRATADTPSTPWQPSGTVLVVG
 ASGTGGLCARWLAGQGAQHILLAGPATPEADTLPAELDLGLGAELTRVTCDPADSDALL
 NALTALPPTAPLTAVVYADAEALSGDGEPGTALAAHTAVENLAAVAEAAAGERPLDA
 FVLCSSIAGTWAGGGRGAEAAAGALLDALARRYRARGRLRALSVAWGAWADTTDDSLAA
 HLRVNGLPVMADAEALSALRSAGTDAASVTVADVRWDRFAPAFTRNRRGALFTDLPE
 ARAALAEPNAGQGTATGLGARLAGRPAAEQTEALLTLIRGEVATVLGFADADAVPSG
 PAFKDLGFDLSLTAVDLRNQLATATGLSLPATLVFDYPTAEALAGHLRTELFGEEDDAL
 PAVGAVRARGAADDPVVIVGMSCRYPGGVRSPEDLWQLAMGEVDAIGGFPVDRGWDLE
 TLLNGDRDRGRRTAVREGGFLYDVADFDPGFFGIAPREAMVMDPQQRILLEASWEALE
 RAGIDPAGLRGGDTGVFIGGSGDYRPEAGQLGHAQTAQSASLLSGRVAYHFGLEGPT
 VSDTACSSSLVALHLAAQALRNGECSVALTGGVTVMSSPVNFVEFGEMGALAPDGR
 RAFADSASGTGWSEGVGLVLERLSDARRNGHEILAVLRGSAINQDGASNGITAPNGP
 SQRRVIRRALADAGLAPGDVDAVEAHGTGTLGDPPIEAQALLATYQGERELPLYLGSL
 KSNIGHTQAAAGVAGVIKVMQAMRHGVLPRTLHVDAPSABHVDWDSGAVELLTEADWP
 RTDHPRRAGISAFGASGTNSHVIIEQFEQPEPAVTTEPVEAHGGLPVPVSAAPALR
 AQARQLHSYVTARPGLGTADLARALATRSVFTHRAAVLAGDRDLRAGLAALADGRT
 APQVVQGEAAARRGKLAVLFSGGTQRLGMGRELYARFPAFAAAFDVTAHLDTLDR
 PLRDVLSEDAERLNETGYTPALFAIEVALFRLVESWGIKIRPDAAGHSIGEIAAAHVA
 GVFSLEDACKVVAARARLMNALPSGGAMVAVQATEEEVLTALLTAGVSIAGNPRSVV
 LSGDEGAVLDIADKL TADGRKTRRLRVSHAFSLHMDAILDDFRVTRSDYHAPRIP
 LVSNVTGEAATEEQVCSPTYWVRHVREAVRFGDGIRTLAESGVTAFLLEPGDGLCAM
 AQDTLDALASRALAVPVLKDRGEQESAVTALARLYADGAAPDWALLAGTAGTPRRN
 DLPTYFPQRQRYWPATLPGDASAAPEGADDGFWTAVREADFASLETTNLVDGALAKV
 LPALADWRRRRGEENTVDGWRQITWQPLSPQPARTPAGTWLAVLPAGHADDPAADA
 VTALGPDTVRLEVADPDRAALAEERLRLAADGFAFTGVVSLALATTPAGGADAPEAL
 ALTTALIQALGDADLAAPLWCVTRGAVAAAPSEVP"

ORIGIN

1	gagctcgaca	gcaccaccct	gcgccgtctg	gccaccgtcc	tcgccgacag	cggcgccgag
61	gaccagctcg	ccgtacgcac	caccgcggcc	ttcgcccgcc	gcctggcgca	ccaccgcgtc
121	atgccggact	ccgagggcggg	tacgttcacg	cccaccggca	ccgtgctcgt	caccggcggc
181	accggcgctc	tcggcggaca	tgttgcccgc	tggtcgcgcg	aagcggggcg	cgagcacctg
241	ctgctggta	gccgccgcgg	cgccgacgcg	ccggcgccgg	gcgaactggc	gcgcagatc
301	gaggacatgg	gcgtacgggt	caccctcgcg	gcgtgcgaca	ccgccgaccg	cggcgcgctc
361	gacgccgtac	tgcccgagat	ccccgaagag	caccgcgtca	ccgcggtcct	ccacaccgcc
421	gggaccgtcg	acgacggcac	cctggacacg	ctcaccctcg	agcagttcac	ctccgtcctg
481	cacgccaagg	tcaccgcgac	ccgcaccctg	cacgaggcca	ccgcgcacct	ggacctgagc
541	gccttcgtgc	tcttctctc	cgctgccggc	accctcggcg	caccgggcca	gggcaactac
601	gcccgggcca	acgccttcct	cgacgccttc	gccgagcacc	gccgcgcccc	cggcctgccc
661	gcgacctcga	tcgcctgggg	tccctggggc	gaggacggca	tgccggccga	cggcaccgac
721	gtccaggcac	gcattccggc	aggcggtacc	aaccgcgtgc	cgcccgagct	cgccctcacc
781	gccctgcggc	aggcgatcga	gcaggggccc	ccgacgtcta	ccctcgcgga	catcgactgg
841	cagcgctacg	cggaggtgtt	caccgcgacg	cgccccagcc	ccctcgtcgg	cgacctgccc
901	gaactgcgcc	aggccaccgc	accgcgccgg	acagcggagg	ccgcctcggc	ggaaccggcc
961	ctcgccgagc	ggctcgccgg	gctctcgccg	gccgcgcgcc	cgcgcttcgt	cttggtatctc
1021	gtacggaccc	gggtcgcgcg	gtcctcgcca	cagcggcacc	tcgggcatcg	gcgcccagccg
1081	cgccttcacg	gactcggttt	cgactcgctg	accaccgtcg	aactgcgcaa	caccctcacg
1141	gccgccaccg	gcctgaaact	gcccgcgacc	ctcgtctacg	actaccgcag	accgatcgcc
1201	ctcgccgact	tcctgctcgc	cgaactccag	ggcgccctgc	ccgagtcgga	ccggtctgcc
1261	ccggccccc	gaggccgcgc	cgccgacgac	gacccgatcg	ccgtcgtcgg	cctgaactgc
1321	cgtctccccc	gcggcatccg	gtcccccgaa	gacctctggc	agctgctcgg	ccggggcgag
1381	gacgccatct	ccggcttccc	cgcggaccgc	ggctggggacc	tggaagccct	cgcccagggc
1441	ggctccgcga	ccctcgaagg	cggattcctc	gacggcgctc	gcctcttcga	cgcccggttc
1501	ttcggcatct	cgccccgcga	ggccctggcc	atggaccccc	agcagcgctt	gctgctggag
1561	acgtcctggg	aggtcttcga	gcggggccgc	atcgaccggg	ccaccctcgc	cggcagccgt
1621	accggcgtct	tcgtcggcac	caacggccag	gactacgcca	cggtctcggc	ccgggcgacc
1681	ggcaccgccc	acatccgcgg	gcacgtcgcc	accggcaaca	ccgccagcgt	cctgtccggc
1741	cgcctctcct	acgccttcgg	cctggagggc	ccggccgtca	ccgtcgacac	cgctcgtcc
1801	tccgcgctgg	tcgccctgca	catggcgggc	aacgccctgc	gcagcggcga	gtgcaccctc
1861	gactggccgg	gtggcgtctc	ggtgatgtcg	agccccgact	ccttcaccga	gttcacgggt
1921	cagggcgggc	tcgccccgga	cggccgctgc	aagcccttcg	ccgacgcggc	cgacggcacc
1981	agctgggtccg	agggcggtgg	cgctctcgtc	ctggaacggc	tctccgacgc	ccggcgcaac
2041	ggccacgagg	tgtggggcat	cgtgcgcggc	accgccgtca	accaggacgg	cgctccaac
2101	gggctgaccg	cgcccagcgg	acgggcccag	cagcgcgcca	tcgcccaggg	cctcgccgat
2161	gccgacctcg	cccccgccga	ctcgatgtg	gtcgaggcgc	accggcaccg	caccaccctc
2221	ggcgacccca	tcgaggcgca	ggccctcatc	accgcctacg	ggccggaccg	cgagcggccg
2281	ctgctgctcg	gcgccgtcaa	gtcgaacctg	ggccacaccc	aggccgccc	ggcgctcggc
2341	ggcaccatca	agatgctcct	ggccatgcgc	cacggcgtgc	tgcccaagaa	cctgcacgtc
2401	gactgggtcgg	acggcacggt	ctcgtcgtc	accgaggagc	aggcgtggcc	cagaccggc
2461	cacgcccggc	gggcccgggt	ctccgccttc	ggcgtgagcg	gcaccaacgc	ccacgtcatc
2521	atcgagcagg	caccggaggc	ggaggagccc	gaggcggacg	ggcccgcgga	gcccaccacg
2581	gtgccggggc	tcgtgccctg	gcccgtgtcg	gccaagtccg	aggccgcgct	ggcgccacag
2641	atcgagcggga	tcacggcgct	gaccggcctc	gcgcccgcgg	acgtggggcca	ctccctggcc
2701	accggcagggt	cggcggtcac	ccaccgcgcg	gtcctcgcgg	ccgacggtac	ggcggtacgg

2761 gaactcgccc gcggcatcgc ccaggagacc gacggcaagc tggccctgct gttctcgggc
 2821 cagggcgccg agcgcgccgg gatggggccg gagctgtacg gccgggtccc ggtgttcgcc
 2881 gaggcgctgg acgcggtact ggcgcacttc gacgccgggc tgcgggacgt gatcttcggt
 2941 gacgcggagg gcctggacga gaccgggttc accagccggg ccctgttcgc catcgagggtg
 3001 gcgctgttcc ggctggccga gtcgtgggt atacgccggg acttcgtggc cggccactcg
 3061 atcggcgaga tcggggcggc gcatgtggca ggagtgttct cactggcgga cgcgtgtgcg
 3121 ctggtggcgg ccggtgcccg gctgatgcag gcgctgccgg agggcgggcg gatggtggcg
 3181 atcgaaggcca ccgagggcga ggtcggggcg cggctggccg acggggtgtc gatcgcgcg
 3241 ctcaacggcc cggagtccgt ggtgatctcc ggaacgcagg acgcggtcct gcgatcgcg
 3301 cggaaattcg cgaactgagg ccgaagacc cggcgccctgt cggtagacca cgccttcac
 3361 tcgcagctga tggaccgat gctggcgga ttcggcagg tggccgagg tctggcgta
 3421 gagggcccg gtatcccgct cgtgtccaac gtgacggggc aactcgccac cgcggagctg
 3481 atctgcacgc ccgggtactg ggtgcagcac gtacgggaca cgggtcggtt cgcgacggt
 3541 gtcgcgcgcg tggaggccga gggcgccctg gtcttcctgg aggtggggcc ggacgggggtg
 3601 ctgacggcga tgccagca cagcctggcc gacgcggccg tggccgtccc cgcctccgc
 3661 aaggcagccc ccgaggaac cgcctgtc gcagctgtg cgtacccggg gacactgccc
 3721 gtcggcatcg actggtccgg cgtcttcgac ggcaccggcg cccgcccggt ggacctgccc
 3781 acctaccctc tccagcagga gtggttctgg ccggagaccg cgcgccggcg gagccggcg
 3841 gacggctcgc aggtccggt ggacgccgag ttctgggacg cggtagagcg cgaggacctg
 3901 acagcgctct ccgccacgt cgacctggac ggtcccgcg tggggcgctc cgggacctg
 3961 tcgctggcg cgcaagcgcg tcgagcgtc gacgtcgac gctggcgta ccaggtagcg
 4021 tggagccgc tcaccggcac ctccggcagc acgctttccg ggccgtgggt ggcgctcgtc
 4081 ccggcaggcg gtgccgatga tgagtggacc gcctccgtgg tcgcccctc cggcgacgac
 4141 ccggtgagcg tcgagggcga ccggggcgac tccggggcg tgaccggccc cgtggcgaa
 4201 ctggccgcgc agggccagga gttcgcgga gtcgtctcgc tctggccgc ccggaccggc
 4261 gaaggtgtcg cctccggcgg ggcggccctg ccggacggcg cggtagagc actggccgac
 4321 gccggtatcg gtgccgcct ctggtacgtc acccgtggcg cggtaggggt cggccgctcg
 4381 cagctggacg tggacggcgc ccaggcgcg gtgtgggag cggggcggtg cgagccctc
 4441 gaccacccc acctctgggg cggactcgtc gacatcgcg acgtcctcga ccggcgctcg
 4501 gcggaccgggt tccgtgccgt gctgtccggt acggggcgcg aggaccaggt ggcactgccc
 4561 tctcggggcg cttcggacg ccggctggta cgcgccacg ccgacacccc gtcgactccg
 4621 taccgacgg ccggcacggt cctggctgctc ggccggcggt cgggacccg cgggctctg
 4681 gcccgctggc tcgccgaca gggcgcccag cacatctcgc tggccgggccc cgccacgccc
 4741 gagcgggaca cctgcctgc cgaactcgac ggccctggcg ctgagctgac cggggtaccc
 4801 tgcgaccccg ccgacagcga cgcactgtg aacgcctca ccgactccc gccacggga
 4861 ccgctgacgg ccgtcgcta cgcgacgcg gaagcactgt ccggcgacgg cgagccggg
 4921 acagccctgg ccgcgtgca cacggccgtg gagaacctgg cggccgtcgc cgaagcggg
 4981 gccggcgaaac ggcccctgga cgccttcgtc ctgtgtcct cgatcgccgg tacctgggg
 5041 gccggcgggc gggggcggga ggcggcgccc ggagccctgc tggacgccct ggcccggcg
 5101 taccgacac gcggaactgc tgccctgtcc gttgcctggg gcgcctggg cgacaccac
 5161 gacgacagcc tggccgcgca tctgcccgtc aacggcctgc cggtagtga cgccgaacgg
 5221 gccctgtccg cgtctcccg ctccggcggt accgacggcg cctcggtgac ggtcgccgac
 5281 gtacgggtgg accggttcgc gccggccttc acccgcaacc ggcgcggcg cctgttcacc
 5341 gacctgccc agccagggc gcactcgc gaacccggga acgcccggga cgcggcgcg
 5401 accggactcg gggcccggt cgccggccga ccggccggcg agcagaccga ggcgtgctg
 5461 accctgatcc gcggcgaggt ggccacgggt ctcgggttcg ccgacggcga cgcgtccc
 5521 tccggaccgg cttcaagga cctcggttc gactcgtga ccgcccga cctgccaac
 5581 taccgtcgca ccggacggg cctgtccctg ccgcccaccc tcgtctcga ctaccgacg
 5641 gcggaggcgc tggccgggca cctgcccacc gagctcttc gcgaggacgg cgacgcgtg
 5701 cccgccgtcg gagcggtacg ggcgcggggc gcggccgacg acccggtcgt catcgtcgg
 5761 atgagctgcc gtaaccggg cggggtccgc tcgcccagg acctgtggga gctggccatg
 5821 ggcgaggtgg acgcatcgg cggcttcccc gtggaccgtg gctgggacct gtagagcgtg
 5881 ctgaacggcg accgggacgg ccgcccggg accgcccgtc gcgaagggcg cttctctac
 5941 gacgtggccg acttcgaccc ggggttcttc gggatcgcg cgcgcgagg catggtgatg
 6001 gacccgcagc agcgcacct gctggaagca tcctgggagg cgctggagcg ggcgggcatc
 6061 gacccggccg ggctgcgcgg cgtgacacc ggcgtgttca tcggcgccg ctcggcgac
 6121 taccggccc agggggcca gctgggccc gccagaccg cgcagtcggc cagcctgctg
 6181 tccggccggg tggcctacca ctccggcctg gaaggcccga ccgtcagcgt cgacacggcc
 6241 tgctcgtcgt cctggtggc gctccacctg gccggccagg cgctgcgaa cggcgagtg
 6301 tccgtcgcgc tcaccggcg gttgacggtg atgtccagcc cggtagaact ctcgagttc
 6361 ggcgagatgg gcgccctcgc gcccgacggc cgctgcccgg ccttcgccga ctccgcgagc
 6421 ggcaccggct ggtccgagg gttgggctc ctcgtactgg agcgctctc ggacggccg
 6481 cgcaacggcc acgagatcct ggcggtactg cgcggtcgg cgatcaacca ggacggcgcc
 6541 acgaacggca tcaccgcgc caacggcccc tcgacagccc ggtgcatcc cggggcctg
 6601 gccgacggcg ggctgcgcc gggcgacgtg gacgcggtgg agggcgacgg caccggcacc
 6661 accctggcg accccatcga ggcgagggc ctgctggcca cgtacgggca ggagcgtgaa
 6721 ctgccgctgt acctcgggtc gttgaagtcc aacatcgccc acaccaggc cgccggcggt
 6781 gttgccggcg tgatcaagat gtcgagggc atggcgacg cgcgctcga gctgctgacg
 6841 cacgtcgacg cgcgctcggc gcacgtggac tgggactccg gcgcccgcga gctgctgacg
 6901 gagcgggccg actggcccg tacggaccac ccccgcccg ccggcatctc ggccttcggc
 6961 gccagcgga ccaactccca cgtgatcatc gagcagttcg agcagcccga accggcggtc
 7021 accaccgaac cgttggagg ccacggccc ctcgggtgac ccgtgtcggc cgcggcgcg
 7081 caggcactgc gggccaggc ccggcagctg cactcctacg tgaccggccg cccgggactc

7141	ggcaccgcgcg	acctggcccg	cgcgctggcc	accaccgcgt	cgtgtttcac	ccaccgcgcc
7201	gccgtcctcg	cgggcgaccg	cgaccgactg	ctggccggcc	tggccgcgct	cgccgacggc
7261	cgcaccgcac	cccaggctgc	acagggtgag	gcgcgcggcc	gccgcggcaa	gctcgcgggtg
7321	ctgttctccg	gccaggccac	ccagcgctcg	ggcatgggac	gggagctgta	cgcccgcttc
7381	ccgcgcgttcg	ccgcggccct	cgacgcggtg	accgcgcacc	tggacaccga	actggaccgc
7441	cccctgcggg	acgtgctgtc	cgaggacgcg	gagcggctga	acgagaccgg	ctacaccag
7501	cccgcgctgt	tcgccatcga	ggtggcgctg	ttccgcctgg	tggagtctct	gggtattccg
7561	ccggaacttcg	cgcccgggca	ctcgatcggc	gagatcgcgg	cccgcgcagt	ggccggggctc
7621	ttctccctcg	aggacgcctg	caaggtcctg	gcgcgcgcgg	cccgcttgat	gaacgcctctg
7681	ccgtccggcg	gcgccatggt	cgcgctccag	gccaccgagg	aggaggtgac	ggccctgctg
7741	accgcgggag	tgtcgatcgc	cgcgcgtcaac	gggcgcgctg	cgtgtggtct	ctccgcgcgac
7801	gagggcgccg	tcttgacatc	cgccgacaaa	cctaccgcgc	acgggcgcaa	gactaggcgt
7861	ttgcgggtca	gcatgcatt	tactactctg	catatggagc	ccatcttcga	cgaacttcgg
7921	cgggtcaccc	gcagcgtgga	ctaccacgcc	ccgcggatcc	cgctggtgtc	caacgtcacc
7981	ggcgaggcgg	ccaccgagga	gcaggtgtgc	tcccgcgact	actgggtgcg	ccacgtccgc
8041	gagggcgttc	gcttcggcga	cggcatctgc	accctcgccg	agagcgcgct	gaccgccttc
8101	ctggagctcg	gccccagcgg	cgggtgtgct	gccatggccc	aggacacctt	ggacgccttg
8161	gcgtcgcggg	ccctggccgt	accggtcctg	gcgaaggacc	gcggcgagca	ggaatccgcg
8221	gtcacccgcc	tcgcccggtc	gtacgccgac	ggagcggccc	cggactggga	cgccctgtct
8281	gccgggagcg	ccaccggggc	ccgccgcac	gacttcgcca	cctacccttt	ccagcgcgac
8341	cgctactggc	cgccaccctc	gccggcgac	gcttcgcgac	cgccggaggg	cgcggacgag
8401	ggcttctgga	cgcgcggtcg	cgagccgcac	ttcgctctgc	tggagacgac	cgtaacgtc
8461	gacggcgaag	cgctggccaa	ggtgtctccc	gccctcgccg	actggcgccg	ccggcgccgc
8521	gaggagaaca	ccgtgcacgg	ctggcggcag	catagcacct	ggcagccgct	gagtcgcgag
8581	cccgcgccga	ccccgcagg	cacctggctc	gccgtgtctc	cggccggaca	cggccgacgac
8641	ccctggcgccg	ccgcagccgt	caccgcgctg	ggaccgcgaca	ccgtacgcct	ggaagtgtcg
8701	gaccccgacc	gagcggcgct	cgccgaacgg	ctgcgcgcac	tggccgccga	cgggttcgcg
8761	ttaccgcgag	tgtgtctcct	cctggccctc	gccaccacgc	ccgcgcggcg	cgcgacagcc
8821	cccaggcgac	tggccctgac	gaccgcccct	atccaggcgc	tcggcgacgc	ggacctcgcc
8881	ccaccctctg	agtacgtcac	cccgccgcgc	ctgcgcgcgc	cacctctcaa	cccgatacc

```
>rimocidin synthase
```

ELDSTTLRLRLATVLADSGGDEQLAVRTTAAFRRLAHRHVMPESEAGTFSPTGTVLVI1GGTGALGGHVARWLEAQAQHL1LLVSRRGADAPAGELA1AAQIEDMGVVRT1LAACDTA
 DRGALDVALE1EPIEELH1TAVFHTAGTVDGDD1GLT1PEQFTSVLHKAVT1HT1HEATRD1LD1SAFLV1SSVAGT1LGAPGGNY1AAANAF1DL4AEHRRHGL1PATS1AWGPAWA
 EGMGAADGTVDQV1ARRRGYV1N1PQJLAL1RL4QTEQ1GAPT1L1HDK1DWQRY1AEVFT1ATRPS1LVGDL1PEL1RQAT1APAG1A1EAD1RL1QAL1REPAL1RQ1AGL1S1PAAR1PRF1VL1D1VRTR
 ARSSAQ1RHL1GRRRRL1PQ1L1G1FDSL1TVL1TRNT1TAAT1GLK1PAT1LV1DPT1IAL1AD1L1LAE1QW1F1PSDR1LAP1AGRA1ADD1PA1VGL1NCR1FPG1ITSP1D1WQL1GRGE
 DATSGF1DHR1DD1DL1AQQGSA1TEG1FL1DVG1FL1DAAF1G1SPREAL1MAAD1QV1RL1L1SWE1FERA1G1DPAT1LRG1ST1FV1GNT1FQ1DY1VTL1RRAT1GT1D1IRGHVAT1V
 SVL1SG1FV1AG1FLE1G1P1VDT1AC1SSAL1H1MAAN1LR1SGE1TL1AG1GV1SM1SP1ST1F1T1G1D1R1P1L1G1AD1G1P1D1R1G1K1F1ADA1AD1G1T1W1SWE1GV1GL1V1LER1L1D1SARR1N1G1HW1D1V1RG1V
 TV1NQ1D1GAS1GL1T1P1S1GA1RQ1A1I1Q1AL1AD1L1AD1D1V1D1W1E1AG1HT1T1L1D1D1P1E1A1Q1L1T1AY1F1G1V1D1R1L1L1G1AV1KN1L1Q1AA1G1AV1T1K1ML1MRH1G1VL1K1NL1H1W1S1D1G1
 TV1SL1VTE1EQ1AW1PET1GH1ARR1AG1V1SAF1G1V1SG1T1NAH1V1IE1Q1A1PE1A1EE1PAD1G1PAE1T1TV1P1GL1VP1WP1V1SAK1SE1A1L1AA1Q1IER1IT1AL1T1GL1AD1P1V1GH1SL1AT1GR1SA1F1THR1VA1L1AAD1GT1G1VR
 EL1ARG1E1T1D1G1K1L1AL1F1SS1Q1QA1G1R1AG1M1E1Y1GR1FP1FA1E1AL1D1VA1HF1D1AG1L1RD1V1F1D1G1AE1L1D1T1G1F1T1Q1AL1F1AE1V1AL1R1A1ES1L1R1D1P1F1V1AGH1S1IE1TAA1H1AV1G1F1V1SL
 AD1AC1AL1VA1AR1AL1M1Q1AL1PEG1G1MA1VE1T1E1G1EV1G1PR1AD1G1V1S1A1AL1NG1P1V1S1GT1Q1D1V1L1RS1RN1SP1TE1G1K1R1L1TV1S1V1AF1H1PS1L1MD1P1L1AD1R1G1V1R1Q1A1E1Y1A1E1P1R1L1V1S
 VT1G1L1A1E1AL1T1CP1GY1V1QH1VR1D1T1RF1AD1G1V1RA1E1AG1S1V1F1D1G1P1D1V1L1T1A1M1Q1H1S1AD1AA1V1P1AL1R1D1R1PE1AT1L1T1AL1Q1LV1Y1TG1V1D1G1WS1G1D1F1T1G1ARR1V1D1L1T1PY1P1Q1
 Q1EW1MF1PT1A1P1AS1AD1G1S1Q1P1DA1E1F1V1D1ER1D1L1T1S1AD1L1D1G1S1A1S1Y1RL1S1P1QA1RR1AL1D1W1G1RY1Q1W1K1P1T1S1AST1S1G1P1W1AL1V1P1AG1AD1E1T1AS1V1A1AL1D1G1
 AV1SE1D1PAD1R1S1AL1T1AR1LE1A1A1Q1Q1G1F1AG1V1S1L1A1ART1G1E1V1S1A1G1G1W1P1AA1D1A1Q1L1AD1AG1I1G1R1V1Y1T1G1RA1V1AG1R1SE1T1VD1AA1Q1V1W1AG1R1V1A1D1L1P1D1W1G1L1D1V1AD1
 D1RR1S1ADR1F1RA1V1L1SG1T1G1ED1Q1V1D1R1SG1G1F1RR1L1R1AT1D1T1P1M1Q1S1G1TV1L1V1G1G1S1AG1T1G1L1CAR1W1L1Q1G1A1L1L1AG1P1AT1D1L1PA1E1LD1G1L1A1E1T1P1D1PAD1S1AL1
 N1AL1T1AL1P1T1AP1L1TAV1V1Y1DA1E1AL1S1G1D1R1G1E1P1T1A1AL1H1T1AVEN1A1AA1VE1AA1A1GER1L1D1AF1V1L1C1S1I1AG1T1W1G1AG1GR1G1EA1A1AG1AL1D1AL1RR1Y1R1AR1G1L1R1AL1S1V1AW1G1AD1T1D1D1S1AL
 A1HL1RV1N1GL1P1MA1ER1AL1S1R1S1AG1T1D1AS1V1Y1AD1V1R1D1F1PA1E1T1R1N1RG1AL1F1D1L1P1EAR1AL1E1P1NG1A1G1G1AT1GL1GAR1L1R1P1AG1E1T1E1L1T1IR1GE1V1AT1L1F1G1AD1AD1V1P1
 S1G1PA1K1FL1G1P1D1L1TAV1DL1R1Q1LAT1T1S1L1PAT1L1V1Y1D1T1AE1A1L1G1H1L1R1TEL1F1G1ED1G1AL1P1AV1G1AR1AG1AD1D1V1V1G1M1S1R1G1V1P1G1S1R1D1W1Q1L1AM1GE1V1D1IG1G1F1P1DR1G1W1D1
 D1LET1L1NG1D1R1D1GR1G1T1ARE1G1F1L1Q1AD1VD1D1P1G1F1G1A1P1RE1AM1V1D1P1Q1R1T1L1E1AS1E1AL1ER1A1D1AG1P1D1AG1L1RG1D1GT1F1G1G1G1S1D1Y1R1E1A1G1H1Q1A1T1Q1AS1AL1S1GR1V1Y1AH1G1
 E1P1TV1S1D1T1AC1SS1L1V1L1A1L1Q1N1G1E1C1S1VAL1T1G1V1TV1S1M1P1NV1F1E1G1EM1G1AL1D1P1G1R1CA1F1S1D1G1T1W1S1G1E1V1GL1V1LER1L1D1SARR1N1G1H1E1L1V1R1G1S1A1D1N1G1E1G1S1NG1T1
 A1PN1G1S1Q1R1R1R1RAL1AD1AG1L1P1GD1V1D1VE1A1H1G1T1D1L1D1P1T1E1A1L1T1G1Q1ER1EL1P1L1Y1G1SL1K1N1S1I1G1T1Q1AA1G1V1Y1K1I1M1Q1AM1RH1G1L1P1RTL1H1VD1P1AS1H1Y1D1W1S1G1AV1EL1T1
 E1AD1W1D1P1TR1D1H1RR1G1S1A1F1AG1S1D1G1K1NS1H1V1IE1Q1F1E1Q1PE1A1VT1PE1V1E1H1G1LP1VP1V1S1A1AL1Q1AR1Q1AL1H1SY1Y1T1AR1G1L1D1AD1LAR1L1T1R1S1V1F1L1R1V1S1W1G1R1P1D1F1A1G1H1S1G1
 E1TAA1H1AV1G1V1S1L1E1D1G1Q1V1AAR1AL1M1AL1P1SG1M1A1G1S1A1G1E1E1E1V1T1AL1T1AG1V1S1A1V1N1G1P1R1SV1L1S1G1E1V1AD1I1AD1L1T1AD1G1K1R1L1RV1S1AF1H1S1H1M1A1L1D1F1RR1V1R1S1V1
 V1Y1H1AP1R1L1V1S1N1T1G1E1A1T1E1Q1C1S1P1V1W1H1R1E1AV1F1D1G1T1R1L1AES1G1V1T1AL1E1L1G1PD1G1C1A1M1AQ1T1D1AL1S1AR1V1P1L1R1D1K1R1G1E1Q1S1A1V1T1AR1L1Y1AD1G1AP1D1W1AL1
 A1G1T1AG1T1P1RR1ND1L1T1PY1F1G1R1Y1Q1P1AT1L1P1GD1S1A1E1A1P1G1AD1G1F1T1V1RE1AD1F1AS1L1T1L1NV1D1G1E1AL1K1V1L1P1AL1AD1W1RR1R1G1E1T1D1W1G1R1Q1T1W1Q1L1S1P1Q1P1AR1T1AG1T1W1L1V1P1D1
 G1H1AD1D1P1AA1D1AV1T1G1D1T1VR1E1AD1D1P1RA1A1ER1L1AL1D1G1A1F1T1G1V1S1L1A1L1T1P1A1G1DA1E1P1AL1T1T1A1T1G1D1A1I1A1P1L1C1V1T1R1G1A1Y1A1E1P1F1V1

```
>Streptomyces rimosus rimocidin synthase (rms) gene, partial cds
```

[illegible]

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวอภันตรี ธนิตไธสง
 เกิดวันที่ 30 กันยายน 2523
 สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์
 ประวัติการศึกษา 2545 วท.บ. (ชีววิทยา) พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ผลงานทางวิชาการ

อภันตรี ธนิตไธสง และ อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2003. การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 จาก *Streptomyces rimosus* R7 ที่สร้างสารต้านเชื้อรา , น. 138-143. ใน รายงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น, กรุงเทพฯ.

Thamchaipenet, A., Sudtachat, N. and Tanittaisong, A. 2005. Disruption of Type I polyketide synthase gene cluster involved in polyene antibiotics production from *Streptomyces rimosus*. In 5th International Symposium on Industrial Microbiology and Biotechnology. 27-29 June 2005, Shanghai, China.

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

- 2546-2547 - ทุนระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 2547 - ทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 2548 - ทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์