



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การโคลนยีน *kac5* ที่แสดงสารยับยั้งคล้ายแบคทีริโอซิน KAC5 จาก
Lactobacillus reuteri KUB-AC5

Cloning of *kac5* Gene Encoding Bacteriocin KAC5 from *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

นามผู้วิจัย นางสาวจิราภรณ์ แดงทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนนิ่ง *kac5* ที่แสดงสารยับยั้งคล้ายแบคทีริโอซิน KAC5
จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

Cloning of *kac5* Gene Encoding Bacteriocin KAC5 from *Lactobacillus reuteri*
KUB-AC5

โดย

นางสาวจิราภรณ์ แดงทอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2555

จิราภรณ์ แดงทอง 2555: การโคลนยีน *kac5* ที่แสดงสารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซิน
KAC5 จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. 119 หน้า

โคลนดีเอ็นเอขนาด 1 – 2 กิโลเบส ที่แสดงสารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซินขนาด 4.7 กิโล
ดาลตันจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วยดีเอ็นเอพาหะ pNZ307 ที่ตัดด้วย *Bam*HI และ
ถ่ายฝากในเชื้อ *Escherichiacoli* DH5 α พบเชื้อลูกผสมจำนวน 3 โคลน แสดงกิจกรรมการยับยั้ง
10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ซึ่งใช้เป็นเชื้อเป้าหมาย เชื้อลูกผสม
ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182 ประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสม ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1115
1384 และ 1581 คู่เบส ซึ่งคล้ายคลึงกับยีนโปรโมเตอร์หรือยีนโครงสร้างของ *amp^r* hypothetical
protein ของเชื้อ *Lactobacillus reuteri* MM4-1A และ hypothetical protein ของเชื้อ *Lactobacillus*
farciminis KCTC3681 ด้วยร้อยละของความเหมือนเป็น 98 , 88 และ 59 ตามลำดับ เมื่อศึกษา
กิจกรรมการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อลูกผสม ACE-C46 พบว่ามีกิจกรรมการ
ยับยั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อลูกผสม ACE-C10 และ ACE-C182 มีกิจกรรมการยับยั้งเพียง
6 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกศึกษาเฉพาะเชื้อลูกผสม ACE-C46 ต่อไป น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ
เชื้อลูกผสม ACE-C46 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* จำนวน 8 ซีโรไทป์ ได้แก่ Albany,
Altona, Enteritidis, Infantis, Kedougou, Mbandake, Sandiego และ Wandsworth เมื่อวิเคราะห์
รูปแบบของโปรตีนจากส่วนของเพอริ พลาสมิด โดยวิธี SDS-Tricine PAGE พบโปรตีนขนาด
ประมาณใหญ่กว่า 4 และ 26 กิโลดาลตัน ให้ชื่อเป็น ACE46-I และ ACE46-II ตามลำดับ แสดง
กิจกรรมการยับยั้ง 100 AU/ml โดยวิธี spot on lawn จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของธนาคารยีน
พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสอง ไม่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียโอซินหรือสารยับยั้งคล้าย
แบคทีเรียโอซินที่ศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงเสนอสาร ACE46-I และ ACE46-II เป็นสารยับยั้งคล้าย
แบคทีเรียโอซินชนิดใหม่

Jiraporn Tangthong 2012: Cloning of *kac5* Gene Encoding Bacteriocin KAC5 from *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, D.Sc. 119 pages.

Chromosomal DNA of 1-2 kb from *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 producing bacteriocin like inhibition substance (BLIS) of 4.7 kD was cloned into BamHI site of pNZ307 and transformed to *Escherichia coli* DH5 α . Only 3 recombinant clones exhibited inhibition activities of 10 AU/ml against *Salmonella* Enteritidis S003. The recombinant clone ACE-C10, ACE-C46, and ACE-C182 containing the insert DNA of 1115, 1384 and 1581 bp showed % identity of 98, 88 and 59 to the sequence of gene *amp^r*, a hypothetical protein of *Lactobacillus reuteri* MM4-1A, and hypothetical protein gene sequence of strain *Lactobacillus farciminis* KCTC3681, respectively. Since the cell free supernatant of clone ACE-C46 still displayed the inhibition activity against *Salmonella* Enteritidis S003 for 24 h while another two clones did for only 6 h, the clone ACE-C46 was therefore selected for further study. Its supernatant exhibited inhibition activities against 8 serotypes of *Salmonella*, Albany, Altona, Enteritidis, Infantis, Kedougou, Mbandake, Sandiego and Wandsworth. Two periplasmic protein, ACE46-I and ACE46-II of higher than 4 and 26 kD analyzed by SDS-Tricine PAGE displayed inhibition activity of 100 AU/ml by spot on lawn method. Based on the data of amino acid sequence from GenBank, these two proteins had no similarity to bacteriocin or BLIS previously studied. They both were proposed to be novel antimicrobial substances.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ให้โอกาสในการทำงานวิจัย และช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย รวมทั้งการตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร. มังกร โรจน์ประภากร อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ ดร. คมแข พิลาสสมบัติ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ให้ทุนอุดหนุนและค้นคว้าวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ (พ.ศ. 2549)

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆธุรการและนักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่น้องๆ พี่ๆและน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆน้องๆที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน สำหรับมิตรภาพ การให้ความช่วยเหลือและเป็นที่ปรึกษาในทุกๆเรื่อง

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ สำหรับความรัก กำลังใจและการสนับสนุนที่มีให้เสมอมา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ข้าพเจ้าสามารถผ่านพ้นปัญหาดังกล่าวไปได้ด้วยดี

จิราภรณ์ แดงทอง

กันยายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	36
อุปกรณ์	36
วิธีการ	40
ผลการทดลองและวิจารณ์	48
สรุป	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	112
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	113
ภาคผนวก ข เทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีวิเคราะห์	116
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	119

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนแบคทีเรียโอชิน	21
2	พลาสมิดที่ในระบบ NICE system	24
3	เซลล์เจ้าบ้านใน NICE system	28
4	ตัวอย่างเว็บไซต์ที่ให้บริการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล	34
5	การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดต่อเชื้อเป้าหมาย	49
6	การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดต่อ เชื้อเป้าหมาย	51
7	การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของเซลล์ลูกผสมต่อเชื้อเป้าหมาย <i>S. Enteritidis</i> S003	57
8	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C10	61
9	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิดลูกผสม pACE-C10 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx	64
10	ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ <i>E. coli</i> ACE-C10	65
11	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ <i>E. coli</i> ACE-C10 กับข้อมูลใน GenBank	66
12	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C182	70
13	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิดลูกผสม pACE-C182 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx	72
14	ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ <i>E. coli</i> ACE-C182	73
15	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ <i>E. coli</i> ACE-C182 กับข้อมูลใน GenBank	74
16	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C46	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิด ลูกผสม pACE-C46 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx	80
18	ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ <i>E. coli</i> ACE-C46	81
19	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่ กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ <i>E. coli</i> ACE-C46 กับข้อมูลใน GenBank	82
20	ค่ากิจกรรมยับยั้งของสารละลายส่วนใสจากส่วนต่างๆของเซลล์ลูกผสม <i>E. coli</i> ACE- C46	88
21	กิจกรรมยับยั้งของสารยับยั้ง KAC5 และ สารยับยั้งจาก <i>E. coli</i> ACE-C46 ต่อเชื้อ <i>Samonella</i> sp. สายพันธุ์ต่างๆ	89

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการทำงานของไนซิน	9
2	ลักษณะการทำงานของนอน-แลนไทไบโอติก	11
3	เปรียบเทียบลักษณะการทำงานของแบคทีเรียโอซิน ซาคาซิน ไนซิน และไลโซสตาฟิน	11
4	ภาพจำลอง Lactacin F operon	19
5	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน precursor ของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนอน-แลนไทไบโอติก	19
6	กระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินกลุ่มนอน-แลนไทไบโอติก	20
7	ระบบการควบคุมการแสดงออกของไนซิน (The nisin controlled gene expression system : NICE system)	26
8	ลักษณะของพลาสมิด pNZ307	27
9	ลักษณะของพลาสมิด pNZ8112	27
10	ลักษณะของพลาสมิด pNZ8113	28
11	ลักษณะของพลาสมิด pNZ307	37
12	ลักษณะของพลาสมิด pNZ8112	37
13	ลักษณะของพลาสมิด pNZ8113	38
14	ลักษณะของพลาสมิด pUC19	38
15	การเจริญของเชื้อเป้าหมาย <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 ที่ทดสอบผลของสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>E. coli</i> TOP10 และ <i>E. coli</i> DH5 α	50
16	การเจริญของเชื้อเป้าหมาย <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 ที่ทดสอบผลของสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิด pNZ307 และ pUC19	52
17	โครโมโซมจาก <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	พลาสมิด pNZ307	54
19	โครโมโซมจาก <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp</i> 143I แบบไม่สมบูรณ์	55
20	พลาสมิด pNZ307 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	56
21	การเจริญของเชื้อเป้าหมาย <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 ที่ทดสอบผลของสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>E. coli</i> DH5 α สายพันธุ์ ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182	58
22	ดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C10 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์	59
23	ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ <i>L. reutei</i> KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม <i>E. coli</i> ACE-C10	60
24	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C10	61
25	Open Reading Frame ของชิ้นดีเอ็นเอ <i>E. coli</i> ACE-C10	64
26	เอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C182 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์	67
27	ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ <i>L. reutei</i> KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม <i>E. coli</i> ACE-C182	68
28	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C182	69
29	Open Reading Frame ของ <i>E. coli</i> ACE-C182	72
30	ดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์	75
31	ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ <i>L. reutei</i> KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม <i>E. coli</i> ACE-C46	76
32	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C46	77
33	Open Reading Frame ของ <i>E. coli</i> ACE-C46	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจาก open reading frame เฟรม -1b ของเซลล์ ลูกผสม ACE-C10 เฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 เฟรม +2b ของเซลล์ ลูกผสม ACE-C46 เฟรม +1b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C182 เฟรม +3 ของเซลล์ ลูกผสม ACE-C182	83
35	ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของเฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46	85
36	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในยีนของเฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46	85
37	ลำดับเบสยีนและลำดับกรดอะมิโนของยีนในตำแหน่ง AC-EC46+2b ของ pACE-C46	86
38	ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในยีนของเฟรม +2b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46	87
39	การหาขนาดโปรตีนจากโคลน pACE-C46 เปรียบเทียบกับพลาสมิด pNZ307	92
40	การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของแถบโปรตีนต่อเชื้อเป้าหมาย <i>S. Enteritidis</i> S003	93

การโคลนยีน *kac5* ที่แสดงสารยับยั้งคล้ายแบคทีริโอซิน KAC5

จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

Cloning of *kac5* Gene Encoding Bacteriocin KAC5

From *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

คำนำ

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ปัจจุบันมีการพัฒนาคุณภาพอาหารทั้งในด้านการแปรรูป คุณค่าทางโภชนาการ และความปลอดภัย โดยคำนึงถึงการยืดอายุการเก็บรักษาด้วยการลดปัจจัยจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย หนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ คือ การใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะ

มีการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ในการเก็บรักษาอาหารเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเป็นสารเร่งโตในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ พบว่าสารเหล่านี้เมื่อบริโภคพร้อมกับอาหาร ก่อให้เกิดการตกค้างและสะสมในร่างกาย ส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในร่างกายของผู้บริโภค (McEwen and Fedorka - Cray, 2002) ในปัจจุบันมีการยอมรับการใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกแทนสารปฏิชีวนะมากขึ้น โดยโปรไบโอติกสามารถสร้างสารยับยั้ง เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แก๊ซคาร์บอนไดออกไซด์ รวม ทั้งสารแบคทีริโอซิน ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และเป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย

แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ การใช้แบคทีริโอซินในอาหารมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารโปรตีนย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหาร ทำให้ไม่เกิดการสะสมในร่างกาย ในปัจจุบันมีการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Association; FDA) เพียงชนิดเดียวคือ นิสิน (nisin) อย่างไรก็ตามมีการค้นคว้าและศึกษาแบคทีริโอซินชนิดใหม่ๆ เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนื่อ ปลา กุ้ง (Muriana and Luchansky, 1993) โดยใช้ในรูปเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิตสารแบคทีริโอซิน หรือใช้ในรูปของแบ

คเทอรีโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์หรือใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักที่มีส่วนประกอบของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Chen and Hoover, 2003)

แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 เป็นแบคทีเรียซึ่งแยกจากลำไส้ไก่ มีสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคในไก่ (Nitisinprasert *et al.*, 2000) และมีการผลิตสารยับยั้งที่มีโครงสร้างและสมบัติคล้ายสารแบคเทรีโอซินในน้ำหมัก (Sukyai, 2003) งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษา การผลิต และ สมบัติของสารยับยั้งบริสุทธิ์ KAC5 พบว่าปริมาณสารยับยั้งที่แยกได้ต่ำเพียง 0.4 เปอร์เซ็นต์ (อาภา สุเวชวัฒนกุล, 2549) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึง มีเป้าหมาย เพื่อ ศึกษาการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในการโคลนยีน *kac5* สำหรับการศึกษาโครงสร้างของยีน *kac5* และเพิ่มผลผลิตต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

ศึกษาการโคลนนิ่ง *kac5* ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ
Lactobacillus reuteri KUB-AC5



การตรวจเอกสาร

1. สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลกติก

กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลกติกทำให้เกิดสารที่มีสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial substance) โดยแบ่งเป็นสารยับยั้งโมเลกุล ขนาดเล็ก (low-molecular mass) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไดอะซีติล (2,3-butanedione) และสารยับยั้งโมเลกุล ขนาดใหญ่ (high-molecular-mass) เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น (Ouwehand, 1998)

1.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ทำให้ค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อมลดลง สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยเข้าสู่ไซโตพลาสซึมในรูปไม่แตกตัว (undissociated form) เมื่อกรดอินทรีย์แตกตัว (dissociated form) มีการปลดปล่อยโปรตอนภายในเซลล์ ทำให้รบกวนการทำงานของเอนไซม์ การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ระบบการขนถ่ายสารระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (electrochemical proton gradient) และกระบวนการเมตาบอลิซึมอื่นๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Smulders *et al.*, 1986; Kashket, 1987; Earnshaw, 1992)

1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารประกอบที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดจากการแตกตัวของ H_2O_2 เป็น O^{2-} และ OH^- ทำให้เกิดการออกซิไดซ์อย่างรุนแรงในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยการออกซิเดชันเกิดที่หมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl group) ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ นอกจากนี้ H_2O_2 ยังทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันบริเวณไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สารจากภายนอกสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์ (Kong and Davidson, 1980) ส่งผลต่อการตายของเซลล์ในที่สุด อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการรีดิวส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ กลายเป็นน้ำด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (NADH peroxidase) และซูโดคะตะเลส (Mn^{2+} pseudocatalase)

(Fortaine *et al.*, 1996) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยในแบคทีเรียแกรมบวกเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบยับยั้งแบบทำลาย (bacteriocidal) (Conner, 1993; Ouwehand, 1998)

1.3 คาร์บอนไดออกไซด์

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentation สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคสในขั้นตอนการบอกรีแลกชันบนน้ำตาลฟรุกโทส 1,6 ไดฟอสเฟต เปลี่ยนเป็นไรโบส -5-ฟอสเฟต ส่วนกลุ่ม homofermentation สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากสารประกอบซิทริกและมาเลต หรือจากกระบวนการบอกรีแลกชันของกรดอะมิโน

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้สภาวะแวดล้อมเป็นสภาวะไร้อากาศ (anaerobic environment) มีลักษณะการทำงานโดยเข้าไปแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมันของเซลล์ (lipid bilayer) ค่าพีเอชภายในและภายนอกเซลล์ไม่เท่ากัน ทำให้การแพร่ของสารในเซลล์ผิดปกติ และเซลล์ตายในที่สุด (Eklund, 1984)

1.4 ไดอะซีทิล (diacetyl)

ไดอะซีทิลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิทริกโดยซิทริกเปลี่ยนเป็นไพรูเวตและไดอะซีทิล ตามลำดับ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จับกับหมู่อาร์จินิน (arginine-binding protein) ของแบคทีเรียและขัดขวางการใช้อาร์จินินภายในเซลล์ (Jay, 2000) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อยีสต์ต้องใช้ปริมาณไดอะซีทิล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกใช้ปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Jay, 1982, Motlagh *et al.*, 1991) พบว่าปริมาณไดอะซีทิลที่ 334 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *Salmonella anatum*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Listeria*

1.5 กรดไขมัน (fatty acid)

แบคทีเรียกรดแลคติกในจีนัส *Lactobacillus* และ *Lactococcus* สามารถผลิตกรดไขมันที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา ความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่คาร์บอน ความเข้มข้น และค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อม โดยกรดไขมันอยู่ในรูปไม่แตกตัว มีประจุบวก (Kabara, 1993)

1.6 สารยับยั้งโมเลกุลเล็กอื่นๆ

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งโมเลกุลเล็กอื่นๆที่เป็นโครงสร้างทางเคมี มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 ดาลตัน และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ข้ามสายพันธุ์ (broad spectrum) (Davidson and Hoover, 1993) ได้แก่

สารแลคโตซิดิน (lactocidin) จาก *Lb. acidophilus* (Gilliland and Speck, 1977) สมบัติของสารทำงานในค่าพีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้ง *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* และ *Clostridium perfringers*

สารอะซิโดลิน (acidolin) จาก *Lactobacillus acidophilus* 2181 (Hamdan and Mikolajcik, 1974) มีมวลโมเลกุลประมาณ 200 ดาลตัน ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงกลุ่ม Enteropathogens และกลุ่มแบคทีเรียสร้างสปอร์ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก

สารบูลการิแคน (bulgarican) จาก *Lb. bulgaricus* DDS14 (Reddy *et al.*, 1983) แสดงกิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 โดยมีค่ากิจกรรมยับยั้งสูงสุดและเสถียรที่ค่าพีเอช 2.2 ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* และ *Serratia marcescens* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา

สารยับยั้งโมเลกุลเล็กจาก *Lb. delbugaricus* ssp. *bulgaricus* 7994 (Abdel-Bar *et al.*, 1987) มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 700 ดาลตัน เป็นโครงสร้างสารประกอบรูปร่างวงแหวน (aromatic ring) แสดง

กิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอช 4 แต่สูญเสียกิจกรรมยับยั้งที่ค่าพีเอชมากกว่า 5 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus aureus* และ *Pseudomonas fragi*

สารที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* VTT E-78086 (Niku-Paavola *et al.*, 1999) สามารถยับยั้งเชื้อ *Pantoea agglomerans* VTT E-90396 และเชื้อรา *Fusarium avenaceum* VTT D-80147

1.7 แบคทีริโอซิน (bacteriocin)

แบคทีริโอซิน ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี 1925 โดย Gratia ซึ่งพบว่า *E. coli* ๓ สร้างสารยับยั้ง *E. coli* V เรียกสารยับยั้งว่า “โคลิซิน (colicin)” ต่อมาในปี 1953 Jacob *et al.* พบสารประกอบคล้ายโคลิซิน (colicin-like substance) ในแบคทีเรียแกรมบวก เรียกว่า แบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งหมายถึงสารที่มีลักษณะเป็น โมเลกุลของโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียง (De Vuyst and Vandamme, 1994) แบคทีริโอซินส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphipillic) มีความเป็นไฮโดรโฟบิกและมีประจุบวก (Chen and Hoover, 2003) ลักษณะการทำงานของแบคทีริโอซินแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ แบบทำลาย (bactericidal) และแบบยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) ปัจจุบันสามารถจำแนกชนิดของแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกออกเป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล พันธะต่างๆในโมเลกุลและโครงสร้างพื้นฐาน

2. แบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซิน เป็นโปรตีนที่ได้มาจากการสังเคราะห์ของไรโบโซม ซึ่งสังเคราะห์โปรตีนสารพิษทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าว และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) Klaenhammer (1988) แบ่ง แบคทีริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

แบคทีริโอซินที่มีผลในการยับยั้งในช่องว่างแคบ (narrow inhibition spectrum) เป็นแบคทีริโอซินที่มีผลยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจินัสเดียวกัน เช่น lactocin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ยับยั้งเฉพาะกลุ่มเชื้อ Lactobacilli สารยับยั้ง diplococcin จาก

เชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 346 ยับยั้งเฉพาะกลุ่มเชื้อ Lactococci หรือยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสอื่นได้เล็กน้อย เช่น lactacin F ยับยั้ง *Lactobacilli* และ *Enterococcus faecalis* เป็นต้น

แบคทีเรียโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงกว้าง (broad inhibition spectrum) เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น ไนซิน จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ยับยั้งกลุ่มเชื้อ *Pediococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostocs*, *Bacilli*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Listeria* และ *Clostridia*

นอกจากนี้ Klaenhammer (1993) ยังแบ่งแบคทีเรียโอซินตามลักษณะโครงสร้าง ว่าง มวลโมเลกุล และความคงตัวต่อความร้อน ได้เป็น 4 ชนิด คือ

2. 1 แลนไทโอบีโอติก (lantibiotic) เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ มีขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน และมีการดัดแปลงเป็นองค์ประกอบประมาณ 19-37 โมเลกุล ประกอบด้วยอนุพันธ์ของกรดอะมิโน แลนไทโอนิน (lantionine) แอลฟา-เมทิลแลนไทโอนิน (α -methylantionine) ดีไฮโดรอลานิน (Dehydroalanine) และดีไฮโดรบิวทีรีน (Dehydro-butyryne) โดยไม่มีกรดอะมิโนชนิด วงแหวนเป็นองค์ประกอบ มีพันธะ thioether 5 พันธะ ทำให้มีความแตกต่างจาก แบคทีเรียโอซินชนิดอื่นๆ

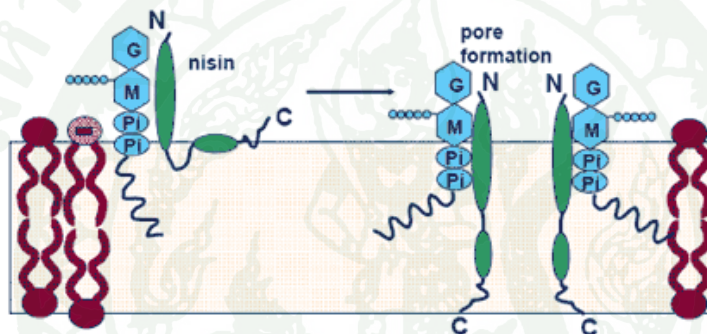
ลักษณะการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มแลนไทโอบีโอติกเกิดจากการรบกวนระบบการขับเคลื่อนโปรตอน หรือ proton motive force (PMF) ซึ่งเป็นพลังงานที่อยู่ในชั้นของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Bruno and Montville, 1993; Ennaher *et al.*, 2000) โดยแบคทีเรียโอซินทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ระบบการลำเลียงสารภายในเซลล์เกิดความไม่สมดุล รวมทั้งขัดขวางการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใหม่ ทำให้สารภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน อีออน และ ATP ปล่อยออกมาออกเซลล์ และเซลล์ตายในที่สุด (McAuliffe *et al.*, 2001)

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ตามโครงสร้างทางเคมี และกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Cleveland *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003)

กลุ่ม 1a (class Ia) เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (elongation) มีประจุสุทธิเป็นบวก (net positive charge) ลักษณะการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นการทำให้เกิดรูพรุนบริเวณผิวของแบคทีเรีย

ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ ไนซิน (nisin) (Hurst, 1981) แลคติซิน 481 (lactacin 481) (Piard *et al.*, 1992) แลคโตซินเอส (lactocin S) (Mortvedt *et al.*, 1991) เป็นต้น

กลุ่ม 1b (class Ib) เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน (globular) มีประจุลบหรือมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (no net charge) การยับยั้งจุลินทรีย์ในลักษณะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ของเซลล์แบคทีเรีย ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ ตัวอย่างได้แก่ ซินนาไมซิน (cinnamycin) (Sahl and Bierbaum, 1998) ดูราไมซิน (duramycin) (Sahl and Bierbaum, 1998) เมอซาซิดิน (mersacidin) (Altena *et al.*, 2000) เป็นต้น



ภาพที่ 1 ลักษณะการทำงานของไนซิน

ที่มา: Wiedemann *et al.* (2001)

2.2 นอน-แลนไทโบอิดิก (non-lantibiotic) แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทนร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที มีประจุสุทธิเป็นบวก และมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน ส่วนใหญ่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Van Belkum and Stiles, 2000)

กลุ่ม 2a (class IIa) ที่บริเวณด้านปลาย N (N-terminal) มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (consensus sequence) เป็น YGNGVXCXXXXCXV แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Listeria* เช่น เพดิโอซิน PA-1 และ AcH (pediocin PA-1 and AcH) (Bennik *et al.*, 1997) เอนเทอโรซินเอ (enterocin A) (Cintas *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001) ไดเวอร์ซินวี 41 (divercin V41) (Pilet *et al.*, 1995) ลิวโคซินเอ (leucocin A) (Hasting *et al.*, 1991) และซาคาซินเอ (sakacin A) (Holck *et al.*, 1992) เป็นต้น

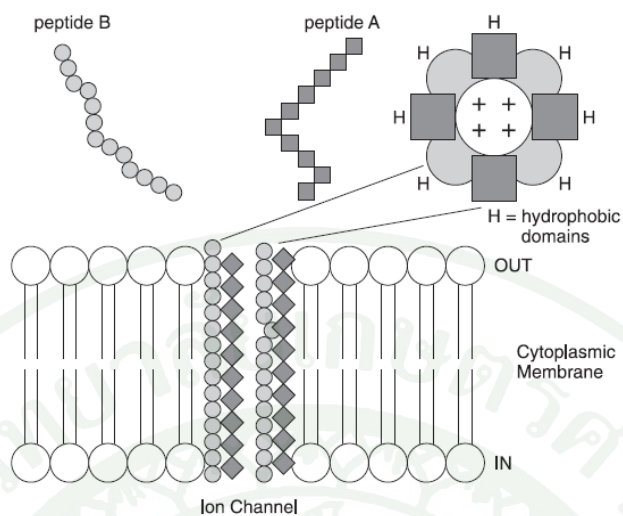
กลุ่ม 2b (class IIb) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ต้องการการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สาย เช่น แพลนทาริซินเอส (plantaricin S) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995) แลคโตคอกซินจี (lactococcin G) (Meyer *et al.*, 1992) แลคติซินเอฟ (lactacin F) (Muriana and Klaenhammer, 1991) และเอนเทอโรซิน NKR-5-3 (enterocin NKR-5-3) (Wilaipun *et al.*, 2004) เป็นต้น

กลุ่ม 2c (class IIc) เป็นแบคทีเรียโอซินอื่น ๆ ที่มีสมบัติเป็นนอนแลนไทป์โอติก แต่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่ม 2a หรือ 2b ได้แก่ ไทออลเปปไทด์ (thiol-activated peptides) หรือแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็นวง (cyclic peptides) เช่น เอนเทอโรซิน AS-48 (enterocin AS-48) (Folli *et al.*, 2003) กาสเซอร์ริซินเอ (gassericin A) (Kawai *et al.*, 1994) เป็นต้น

ลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนอน -แลนไทป์โอติกเกิดจากการจับระหว่างด้านปลาย N ของแบคทีเรียโอซินที่มีขั้วและประจุบวก (polar and positive charge) กับส่วนที่เป็นตัวรับ (receptor) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 2) จากนั้นโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยปลาย C (C-terminal) ด้วยความเป็นไฮโดรโฟบิก เมื่อเกิดการรวมตัวกันของแบคทีเรียโอซินหลายโมเลกุล ทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์และส่วนประกอบของสารภายในเซลล์เสียหาย ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Ennahar *et al.*, 2000) ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ ค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อม และค่าพีเอชในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงชนิดของไขมันที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ที่มีความจำเพาะต่อด้านปลาย N (Chen *et al.*, 1997)

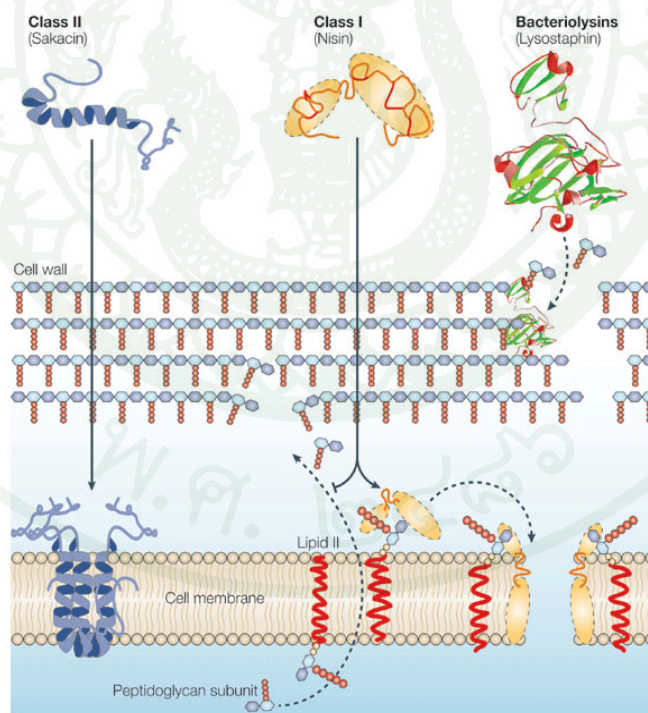
2.3 แบคทีเรียโอซินขนาดใหญ่ (large heat-labile proteins) มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน การศึกษาการทำงาน และโครงสร้างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น เฮลเวติซินเจ (helveticin J) (Joerger and Klaenhammer, 1986) เฮลเวติซินวี-1829 (helveticin V-1829) (Vaughan *et al.*, 1992) เอนเทอโรไลซิน (enterolysin) (Nilson, 1999) เป็นต้น

ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะการทำงานของแบคทีเรียโอซิน ซากาซิน ไนซิน และ ไลโซสตาฟิน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มนอน-แลนไทป์โอติกและแลนไทป์โอติก ตามลำดับ



ภาพที่ 2 ลักษณะการทำงานของนอน-แลนไทโปไอติก

ที่มา: Klaenhammer (1993)



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะการทำงานของแบคทีริโอซิน ซาคาซิน ไนซิน และ ไลโซสตาฟิน

ที่มา: Cotter *et al.* (2005)

2.4 แบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex bacteriocin) เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วยสารประกอบ เปปไทด์ ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต เช่น lactacin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซิน ชนิดไกลโคโปรตีน

ความแตกต่างของแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะในการออกฤทธิ์ยับยั้ง คือ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่สารปฏิชีวนะ คือ สารที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตทั้ง prokaryotes และ eucaryotes ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งสิ่งมีชีวิตทั้ง prokaryotes และ eucaryotes ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและจะไม่ยับยั้งตัวมันเองและการใช้สารปฏิชีวนะสามารถใช้ได้เฉพาะการรักษาโรคเท่านั้นและหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้แบคทีเรียในลำไส้เปลี่ยนแปลง ทั้งยังมีผลต่อการดื้อยาของแบคทีเรียอีกด้วย วัย (เจริญจิระตระกูล และคณะ 2539)

3. สมบัติทางเคมีและชีวภาพของแบคทีเรียโอซิน

3.1 สมบัติทางเคมีของแบคทีเรียโอซิน

สารแบคทีเรียโอซินเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ การใช้เอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ทำลายโครงสร้างการยับยั้งของสารเป็นวิธีทดสอบโครงสร้างเบื้องต้นของสารแบคทีเรียโอซินในน้ำหมัก โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ใช้ ได้แก่ เอนไซม์โปรตีนเอส (protease K) สามารถตัดกรดอะมิโนด้านปลาย C ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล (carboxylic side) ของกรดอะมิโนกลุ่มอะลิฟาติก (aliphatic) ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และ อะโรมาติก (aromatic) เช่น กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และ ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) เอนไซม์โปรตีนเอส (protease) ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิลของกรดกลูตามิก (glutamic acid) หรือ กรดแอสพาทิก (aspartic acid) เอนไซม์เปปซิน (pepsin) ตัดจำเพาะที่กรดอะมิโนอะโรมาติก เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งแอล (L-isomer) ของกรดอะมิโนหมู่ อะโรมาติก รวมถึงหมู่เอมีน (amines) และเอสเทอร์ (esters) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ต่อกับอาร์จินีน (arginine) เป็นต้น (Fermentas Inc., 2006)

ตัวอย่างสารยับยั้งในน้ำหมักจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีโครงสร้างของสารเป็นโปรตีน ทำลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีน ได้แก่ เอนเทอโรซิน GM-1 (enterocin GM-1) ทำลายด้วยเอนไซม์ปาเปน เปปซิน ทริปซิน และโปรติเนสเค แบคทีเรียโอซิน ST28MS และ ST26MS ทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเนสเค โปรติเอส เปปซิน และทริปซิน แบคทีเรียโอซินโบซาซิน 14 (bozacin 14) ทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส และโปรติเนสเค และแบคทีเรียโอซินแพลนทาริซิน LP84 (plantaricin LP84) ทำลายด้วยเอนไซม์ ทริปซิน และไลโมทริปซิน เป็นต้น (Kang and Lee, 2005; Todorov and Dicks, 2005; Ivanova *et al.*, 2000; Suma *et al.*, 1998)

3.2 สมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรียโอซิน

สมบัติทางชีวภาพด้านการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยทั่วไปสารแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (narrow spectrum) แต่ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ข้ามสายพันธุ์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) เนื่องจากการทำงานของแบคทีเรียโอซินเป็นการจับระหว่างความเป็นไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลแบคทีเรียโอซินกับผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ แต่ในแบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์มีส่วนประกอบของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipo-polysaccharide, LPS) ที่สามารถป้องกันสารแบคทีเรียโอซินไม่ให้จับกับผนังเซลล์ (Helander *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ (broad spectrum) สามารถเกิดขึ้นโดยการทำลายส่วนประกอบของ LPS บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ทำให้เซลล์แบคทีเรียอยู่ในรูปเซลล์เปลือย (spheroplast form) หรือการทำงานร่วมกับสารอื่นๆ ที่มีสมบัติทำลายผนังเซลล์ เช่น แลคโตเปอร์ออกซิเดส เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (hydrolytic enzyme) หรือสารจับโลหะ (chelating agent) เป็นต้น (Messen and De Vuyst, 2002; Abee *et al.*, 1995; Helander *et al.*, 1997; Adams, 2003)

3.3 แบคทีเรียโอซินจากกลุ่มเชื้อแลคโตบาซิลลัส

แบคทีเรียโอซินผลิตจากเชื้อในกลุ่มแลคโตบาซิลลัส ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับสารอื่น ได้แก่

แพลนทาริซิน LP84 (plantaricin LP84) จาก *Lb. plantarum* NCIM 2084 (Suma *et al.*, 1998) เมื่อผ่านขั้นตอนเจลฟิเตรชันพบว่ามีความเข้มข้นโมเลกุลประมาณ 1-5 กิโลดาลตัน ทนร้อนที่

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* โดยแสดงกิจกรรมยับยั้งได้ดีที่ค่าพีเอช 4.5-4.8

โบซาซิน 14 (bozacin 14) จาก *Lb. lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova *et al.*, 2000) มวลโมเลกุล 6,200 ดาลตัน ไม่ทนร้อน แสดงกิจกรรมยับยั้งที่ค่าพีเอช 3-10 สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบอื่น

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* F1 และ *Lb. brevis* (Ogunbanwo *et al.*, 2003) ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและ 60 นาที ตามลำดับ แสดงกิจกรรมยับยั้งที่ค่าพีเอช 2-6 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Bacillus* sp., *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp., *E. coli*, *Shigella* และ *Salmonella* sp.

แบคทีเรียโอซิน ST28MS และ ST26MS จาก *Lactobacillus plantarum* (Todorov and Dicks, 2005) มีมวลโมเลกุล 5.5 และ 2.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่สภาวะค่าพีเอช 4 แบคทีเรียโอซิน ST28MS มีค่ากิจกรรมยับยั้งลดลง ขณะที่ ST26MS ยังคงค่ากิจกรรมยับยั้งเท่าเดิม แบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลกติกและแบคทีเรียก่อโรค *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* และ *Acinetobacter baumannii*

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติกในจีนส์อื่นๆ เช่น แบคทีเรียโอซิน AS-48 จาก *Enterococcus faecalis* subsp. *Liquefaciens* S-48 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Myxococcus* โดยลักษณะการยับยั้งขึ้นกับค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อมที่ทำให้โครงสร้างของแบคทีเรียโอซิน สามารถเปลี่ยนสมบัติความเป็นประจุและความเป็นไฮโดรโฟบิกตามค่าพีเอช ทำให้เกิดความจำเพาะระหว่าง แบคทีเรียโอซินกับผนังเซลล์เชื้อเป้าหมาย เช่น ในค่าพีเอชเป็นกลางในช่วง 5-7 สาร AS-48 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Enterococcus faecalis* ด้วยการจับแบบไฮโดรโฟบิกที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย แต่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4 โครงสร้างสารมีความเป็นไฮโดรโฟบิกน้อยลง มีประจุมากขึ้น ทำให้สามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ที่มีส่วนประกอบของ ลิโปโพลิแซคคาไรด์ และ

สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Abriouel *et al.*, 1998) หรือแบคทีเรียโอซิน GM-1 จาก *Enterococcus faecium* GM-1 (Kang and Lee, 2005) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogens* และ *Streptococcus thermophilus* มีสมบัติทนร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แสดงกิจกรรมยับยั้งได้ดีในค่าพีเอช 4.2-5

4. สารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (coccibacilli) ปลายมนขนาด 0.7-1.0 ถึง 2.0-5.0 ไมโครเมตร สามารถพบในลักษณะเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ หรือรวมตัวเป็นกลุ่มเล็ก ๆ มีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกับ *Lb. fermentum* แต่สามารถแยกความแตกต่าง ด้วยสมบัติของผนังเชลล์ (peptidoglycan) หรือส่วนประกอบของโปรตีนในเชลล์โดยวิธี การแยกด้วย กระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE eletrophoresis) (Wood and Holzapfel, 1995) นอกจากนี้ เมื่อจำแนกโดย การใช้น้ำตาล และความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า *Lb. reuteri* สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส ไม่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Lb. fermentum* ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส แต่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Klein *et al.*, 1998) แหล่งที่พบเชื้อ *Lb. reuteri* เช่น ในน้ำนม ระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อ หรือแป้งหมัก (sourdough) เป็นต้น

4.1 รอยเทอริน (Reuterin)

Lactobacillus reuteri ผลิตสารรอยเทอรินเมื่อมีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Axelsson *et al.*, 1998) มีสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส Talarico and Dobrogosz (1989) ทำการแยกสารบริสุทธิ์รอยเทอริน พบว่ามีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 200 ดาลตัน ลักษณะโครงสร้างของสารเป็นโครงสร้าง monomeric, hydrated monomeric และ cyclic dimeric ของสารประกอบ β -hydroxypropionaldehyde

รอยเทอริน จัดเป็นสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้กว้างขวาง (broad spectrum) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella*, *Shigella* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* รวมถึงเชื้อยีสต์ รา และ โปรโตซัว (Axelsson *et al.*, 1998)

ลักษณะการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากสารเข้าขัดขวางการทำงานของเอนไซม์กลุ่มซัลโฟไฮดริล (sulfhydryl enzyme) เช่น ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเตส (ribonucleotide reductase) และเอนไซม์ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ DNA (Talarico and Dobrogosz, 1989)

4.2 รอยเทอริไซคลิน (Reutericyclin)

เป็นสารยับยั้ง โมเลกุลขนาดเล็ก ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. reuteri* LTH2584 แยกจากหัวเชื้อแป้งหมัก (sour dough) แตกต่างจากสารรอยเทอรินโดยมีสมบัติเป็นประจุลบ มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง (highly hydrophobic) น้ำหนักโมเลกุล 349 ดาลตัน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก *Lactobacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria innocua* มีการยับยั้งแบบทำลาย (bacteriocidal) ต่อเชื้อ *Lactobacillus sanfranciscensis* และสามารถยับยั้งสปอร์ที่เพิ่งงอก (germination) ใน *B. subtilis* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ รวมถึง *E. coli* และ *Salmonella* (Ganzle et al., 2000)

4.3 รอยเทอริซิน LA6 (Reuterin LA6)

เป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่แยกจาก *Lactobacillus reuteri* (Toba et al., 1991) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสที่เป็น homofermentation ได้แก่ *Lb. acidophilus* JCM2125, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* JCM1248 และ JCM1148 แต่ไม่ยับยั้งแลคโตบาซิลลัสในกลุ่ม heterofermentation และไม่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* เมื่อนำน้ำหมักปราศจากเชื้อผ่านการกรองด้วยเยื่อกรอง (ultrafiltration) ขนาด 200 กิโลดาลตัน พบกิจกรรมยับยั้งอยู่ส่วนบนของเยื่อกรอง แสดงถึงมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน เมื่อนำไปทดสอบสมบัติ พบว่ากิจกรรมยับยั้ง ทำลายโดยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) สามารถทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แต่ไม่สามารถทนอุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียส

ต่อมา Kabuki et al. (1997) ศึกษาโครงสร้างของ รอยเทอริซิน LA6 โดยเลี้ยง *Lb. reuteri* LA6 ในอาหารเหลว MRS ชนิดดัดแปลง เรียกว่า D'-MRS ที่ทำการแยก Tween 80 และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออก เพื่อป้องกันการรวมตัวกันของ Tween 80 กับไขมัน หรือโปรตีน ซึ่ง

มีผลในการแยกสารแบคทีเรียโอซิน แล้วทำการแยกสารขึ้นสูงด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ ไฮโดรโฟบิก ได้สารบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 2.7 กิโลดาลตัน โครงสร้างประกอบด้วยส่วน ไฮโดรโฟบิก และมีประจุ (polar neutral) 67 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะ การยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002 และ NIAI B6 เป็นแบบทำลายเซลล์ (bacteriolytic) จาก สมบัติต่าง ๆ และโครงสร้างของสารรอยเทอริซิน LA6 จัดเป็นแบคทีเรียโอซินกลุ่ม 2c ที่มี โครงสร้างเป็นวง (cyclic bacteriocin) (Kawai *et al.*, 2001)

4.4 สารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซิน KAC5

สาร KAC5 เป็นสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่แยกจากลำไส้ ไก่โดย Nitisinprasert *et al.* (2000) สารดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในไก่ที่มีความ ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ มีฤทธิ์ยับยั้งกว้าง (broad spectrum) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก และ *Listeria* sp. ดังนั้นจึงจัดจำแนกลักษณะการทำงานของสาร KAC5 เป็นลักษณะของสารยับยั้งคล้าย แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin like inhibition substance, BLIS) (อาภา สุเวชวัฒนกุล, 2549)

สาร KAC5 เสถียรในค่าพีเอช 1-9 แสดงกิจกรรมยับยั้งในช่วงค่าพีเอช 2-5 ทนร้อนที่ อุณหภูมิ 37-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดย ไม่สูญเสียกิจกรรมยับยั้ง (อาภา สุเวชวัฒนกุล, 2549)

สาร KAC5 มีความเป็นไปได้ในการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สาย ที่มีมวลโมเลกุล 4,704.38 และ 4,721.95 ดาลตัน ที่มีขนาดมวลโมเลกุล ความเป็นไฮโดรโฟบิก และประจุคล้ายกัน มี รายงานวิจัยสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีแบคทีเรียโอซินที่มีการทำงานของ เปปไทด์ 2 สายร่วมกัน โดยมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกันจัดเป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม 2b เช่น แลคโตค็อกซินจี (lactococcin G) เป็นสารแบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus lactis* LM2081 (Meyer, 1992) มีมวลโมเลกุล α และ β เท่ากับ 4,346 และ 4,110 ดาลตัน ตามลำดับ หรือแพลนทาริ ซิน NC8 (plantaricin NC8) จาก *Lactobacillus plantarum* NC8 (Maldonado *et al.*, 2003) ที่มีมวล โมเลกุล α และ β เท่ากับ 3,587 และ 4,000 ดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมี แลคตาซินเอฟ

(lactacin F) (Muriana and Klaenhammer, 1991) แลคโตซินเอส (lactocin S) (Mortvedt *et al.*, 1991) เป็นต้น

สาร KAC5 จัดเป็นสารยับยั้งชนิดใหม่ที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นสารกันเสียชีวภาพเพื่อใช้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง หรืออาหารมีความเป็นกรด (ค่าพีเอชต่ำกว่า 4) เช่น น้ำสลัด น้ำผลไม้ ซอสมะเขือเทศ อาหารหมักดอง เป็นต้น (อาภา สุเวชวัฒนกุล, 2549)

5. ระบบควบคุมการสร้าง two-peptide bacteriocin

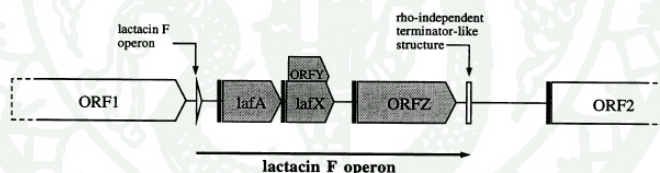
ระบบการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีริโอซินกลุ่มนอน -แลนไทเปโอติก แบคทีริโอซินที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สายด้วยกัน ซึ่ง คล้ายคลึง กับสาร KAC5 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการสังเคราะห์แบคทีริโอซินที่เป็นการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สายนี้เกิดจากการควบคุมโดยยีนที่จำเป็น ดังนี้ ยีนควบคุมการสร้างสายเปปไทด์ 2 ยีน ทำหน้าที่สังเคราะห์สาย pre-peptide ทั้ง 2 สาย immunity gene ควบคุมการสร้าง immunity protein ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการยับยั้งของแบคทีริโอซินต่อเซลล์ผู้ผลิต และ ยีนควบคุมการสังเคราะห์ ABC transporter โปรตีนทำหน้าที่นำแบคทีริโอซินผ่านเยื่อหุ้มออกนอกเซลล์โดยใช้พลังงานจาก ATP และแบคทีริโอซิน ในกลุ่มนี้บางชนิดอาจมี accessory gene ซึ่งเป็นยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่เฉพาะของยีน (Garneau *et al.*, 2002; Nes *et al.*, 1995)

ระบบ operon ของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษากันมากได้แก่ lactacin F operon ของ *Lactobacillus johnsonii* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ lactacin F มีขนาด 6.3 กิโลดัลตัน โดย lactacin F operon ประกอบด้วย *lafA* และ ยีน *lafX* ถอดรหัสได้ prepeptide ขนาด 75 และ 62 โมเลกุลกรดอะมิโน ตามลำดับ (ภาพที่ 4) โดยในกระบวนการ post-translational modification จะมีการตัดกรดอะมิโนออกจาก LafA 18 โมเลกุล ที่ตำแหน่ง Val-Val-Gly-Gly..... Arg ส่วน ORFZ ถอดรหัสให้โปรตีนขนาด 124 กรดอะมิโน ซึ่งเป็น immunity protein ทำหน้าที่ป้องกันการยับยั้งจากแบคทีริโอซินให้กับเซลล์ผู้ผลิต จากการทดลอง site direct mutation ยีน *lafA* พบว่ายีน *lafA* ที่ตำแหน่ง -1 และ -2 ทางด้าน N-terminal เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลที่มีความอนุรักษ์และเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการตัดแต่ง prepeptide ให้สามารถมีกิจกรรมของแบคทีริโอซินได้ เนื่องจากเมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่นที่ตำแหน่งดังกล่าวแล้ว ไม่พบกิจกรรมของสาร lactacin F เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของแบคทีริโอซินในกลุ่มนอน -แลนไทเปโอติก พบว่า ตำแหน่งกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลมีความอนุรักษ์และเป็นตำแหน่งที่

เอนไซม์ตัดสาย prepeptide อย่างจำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 5 (Muriana and Klaenhammer, 1991; Moll *et al*, 1998 ; Oppegård *et al*, 2007)

Muriana และ Klaenhammer (1991) ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนแลคตาซินเอฟ ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* 11088 โดยออกแบบโพรบจากปลาย N ของกรดอะมิโน โดยโคลนยีนด้วยเวกเตอร์ *Escherichia coli* - *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นพาหะในการนำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Lactobacillus acidophilus* T143 พบว่าแลคตาซินเอฟ สามารถแสดงออกกกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียได้เหมือนกับ แลคตาซินเอฟ จากสายพันธุ์ปกติ

ขั้นตอนการสังเคราะห์แบคทีริโอซินกลุ่มนอน -แลนไทโอบีติก มีดังนี้ ในขั้นตอนแรก Histidine protein kinase (HPK) และ Response regulator (RR) จับกันอยู่ในรูปของ complex ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสและแปลรหัสของ operon เมื่อมีการแปลรหัสจะได้ precursor จากนั้น precursor จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดย accessory gene ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไกลซีน และถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดย ABC transporter (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 4 ภาพจำลอง Lactacin F operon

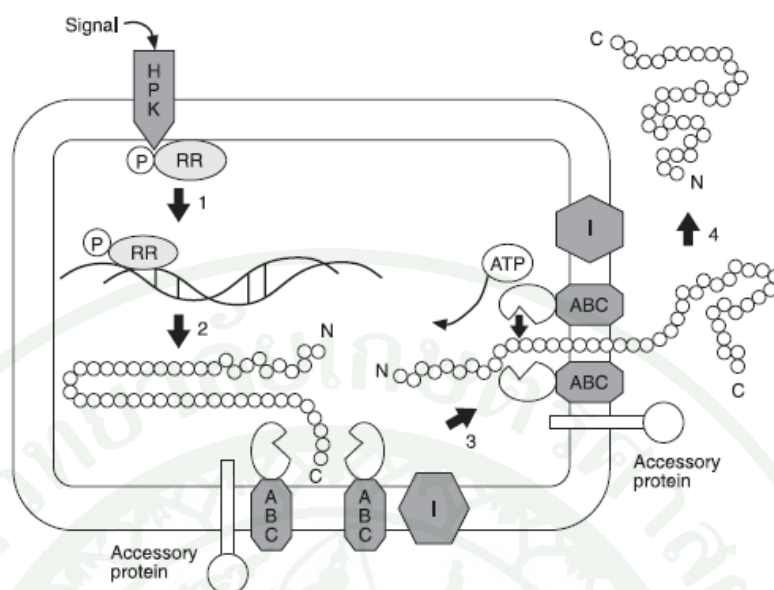
ที่มา: Fremaux and Klaenhammer (1993)

Class II non-lantibiotic bacteriocins

Precursor	Processing	
MMNMKPTFSYEQLDNSALEQVVGG	KYYG	leucocin A
MKNQLNFNIVSDEELSEANGG	KLTF	lactococcin A
MKNQLNFNIVSDEELAEVNGG	SLQY	lactococcin B
MKNQLNFEILSDEELQINGG	IRGT	lactococcin M
MKKIEKLTEKEMANIIGG	KYYG	pediocin PA-1
MMVKELSMTELQTITGG	ARSY	sakacin A
MKQFNYLSHKDLAVVVG	RNNW	lactacin F
LS EL GG		consensus

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน precursor ของแบคทีริโอซินในกลุ่มนอนแลนไทโอบีติก

ที่มา: Sablon *et al*. (2000)



ภาพที่ 6 กระบวนการสังเคราะห์แบคทีริโอซินกลุ่มนอน-แลนไทไบโอติก
ที่มา: Sablon *et al.* (2000)

6. การโคลนยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

การโคลนยีน หมายถึง การแยกยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจ นำมาเพิ่มปริมาณให้ได้มากเท่าที่ต้องการเพื่อใช้ในการศึกษา เช่น ศึกษาการควบคุมการแสดงออก หน้าที่ และความสำคัญของยีนนั้นในเซลล์ จะถ่ายฝากยีนดังกล่าวลงในสิ่งมีชีวิตอื่น เพื่อผลิตสารหรือให้แสดงลักษณะบางประการ เมื่อเตรียมดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่สนใจแล้ว ไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอจากจีโนมทั้งหมดหรือ cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA ก็ตามก็ต้องนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ก่อน โดยพิจารณาเลือกเวกเตอร์ตามความเหมาะสม เมื่อนำ cDNA หรือชิ้นส่วนจากดีเอ็นเอทั้งหมดมาต่อกับเวกเตอร์แล้วจึงนำมาถ่ายฝากในเซลล์ผู้รับ จะได้ประชากรของเซลล์หรือประชากรของฝากที่มีชิ้นดีเอ็นเอลักษณะต่างๆ เรียกว่า DNA library หรือ gene bank ปัจจัยที่มีผลต่อการโคลนยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอได้แก่

6.1 ดีเอ็นเอพาหะ (plasmid)

พลาสมิด เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีการพันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoil) มีขนาดตั้งแต่ 1 พันคู่เบส ถึง 200,000

คู่เบส หรือประมาณ 0.2-4 เปอร์เซ็นต์ ของโครโมโซม พลาสมิด ส่วนใหญ่ ประกอบด้วย ยีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าบ้านของพลาสมิด มีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น ทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

พลาสมิดมีคุณสมบัติเป็นหน่วยที่จำลองตัวเองได้ พลาสมิดแต่ละชนิดมีวิธีการการจำลองตัวที่แตกต่างกัน เช่น เอฟ -แฟกเตอร์ (F-Factor) ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดหนึ่ง มีวิธีการจำลองตัวและแยกตัวภายใต้การควบคุมแบบเดียวกับโครโมโซมของแบคทีเรีย จึงมีจำนวนเพียง 1 หรือ 2 โมเลกุลในหนึ่งเซลล์ เรียกว่า stringent plasmid การจำลองตัวของพลาสมิดอีกแบบหนึ่งมีการควบคุมที่แตกต่าง โดยการจำลองตัวไม่ขึ้นกับการจำลองตัวของโครโมโซม ทำให้มีจำนวนหลายโมเลกุลในหนึ่งเซลล์ เรียกว่า relaxed plasmid

พลาสมิดที่ใช้การโคลนนิ่ง นิยมใช้พลาสมิดที่มีขนาดเล็ก และมีการจำลองตัวแบบ relaxed นอกจากนี้ พลาสมิดยังต้องประกอบด้วย ยีนเครื่องหมาย (marker gene) ที่กำหนดลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ และมีตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง 1 ตำแหน่ง (unique site) (ปิยโชคณากุล, 2543)

6.1.1 พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนนิ่งแบคทีเรียโอซิน

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการโคลนนิ่งแบคทีเรียโอซินอย่างกว้างขวางจึงมีการพัฒนาพลาสมิดเพื่อให้มีความเหมาะสมกับการโคลนและการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนนิ่งแบคทีเรียโอซิน

Plasmid	Characteristics	Reference
pGIP013	pNZ8020 derivative containing <i>L. plantarum</i> <i>alr</i> gene from pNZ7115 for selection	Mierau and Kleerebezem (2005)
pMSP3535	Vector, which contains both nisRK and pAM1 PnisA and ColE1 replicons, nisRK, Em ^R	Mierau and Kleerebezem (2005)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plasmid	Characteristics	Reference
pMLS114	Derivative of pLPV111 containing all spp genes necessary for production of the class II bacteriocin sakacin P Em ^R	Hühne <i>et al.</i> (1996)
pGM1	pMLS114 derivative; pepN replaces sppA and spiA, Em ^R	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pGM4	pMLS114 derivative; pepN replaces sppA and spiA; deletion in sppIP, Em ^R	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pGM4-GUS	pMLS114 derivative; gusA replaces sppA and spiA; deletion in sppIP, Em ^R	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pSAK20	11.8 kb; contains the operon RIRorf4sapKRTE, necessary for transcriptional activation and processing / transport of sakacin A; Cm ^R	Axelsson and Holck (1995)
pVS2	5.0 kb; cloning vector, used here for creating double-resistant indicator strains; Em ^R Cm ^R	von Wright <i>et al.</i> (1987)
pLPV111	4.2 kb; E. coli/L. plantarum/L. sake shuttle vector; Em ^R	Axelsson and Holck (1995)
pSIP200	Backbone vector for the pSIP series, 3.1 kb,	Sørvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP301	sap-based expression vector, 5.7 kb, Em ^R ; SapKR expression driven by ermL read-through and cognate promoter	Sørvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP400	spp-based expression vector, 5.5 kb, Em ^R ; SppKR expression driven by ermL read-through	Sørvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP401	spp-based expression vector, 5.6 kb, Em ^R ; SppKR expression driven by ermL read-through and cognate promoter	Sørvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP500	nis-based expression vector, 5.4 kb, Em ^R ; NisRK expression driven by ermL read through	Sørvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP501	nis-based expression vector, 5.5 kb, Em ^R ; NisRK expression driven by ermL readthrough and cognate promoter	Sørvig <i>et al.</i> (2003)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plasmid	Characteristics	Reference
pSIP302	pSIP300 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP303	pSIP301 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP402	pSIP400 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP403	pSIP401 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP502	pSIP500 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)
pSIP503	pSIP501 with gusA	SØrvig <i>et al.</i> (2003)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mierau and Kleerebezem (2005) ; SØrvig *et al.* (2003)

6.1.2 พลาสมิดในระบบควบคุมการแสดงออกของยีนไนซิน (The nisin controlled gene expression system : NICE system)

ระบบการควบคุมการแสดงออกของไนซิน (The nisin controlled gene expression system : NICE system) ประกอบด้วย ยีนจำนวน 11 ยีน (ภาพที่ 6) ได้แก่

ยีน *nisA* ทำหน้าที่เป็น โปรโมเตอร์ (promoter) ในการควบคุมการแสดงออกของยีนไนซิน (Mierau and Kleerebezem, 2005)

ยีน *nisB*, *nisT*, *nisC*, *nisI*, *nisP* เป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการดัดแปลง (modification) และกระบวนการส่งผ่านอนุภาคไนซินออกสู่ภายนอกเซลล์ (Mierau and Kleerebezem, 2005)

nisRK เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง regulator protein ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญใน NICE system ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของ nisin gene cluster โดย *nisR* ถอดรหัสให้ response regulator และทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ของ *nisK* ซึ่งถอดรหัสได้ histidine protein kinase (Zhou *et al.*, 2005)

ยีน *nisFEG* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้ immunity protein ซึ่งมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์ของผู้ผลิตไนซิน จากการยับยั้งของไนซิน โดย *nisF* ทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ โดยการแสดงออกของ *nisF* นั้นแสดงออกในภาวะที่มีไนซินเป็นสารกระตุ้นการแสดงออกเท่านั้น ไม่สามารถแสดงออกได้ในภาวะที่ปราศจากไนซิน (Pascalle *et al.*, 1996)

จากพื้นฐานความรู้เรื่องการแสดงออกใน NICE system โดยพลาสมิดจะต้องมี *nisA* และ *nisF* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์เป็นส่วนประกอบ โดยส่วนใหญ่พลาสมิดจะมีส่วนของ pSH71 replicon ซึ่งเป็น พลาสมิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *Lactococcus lactis* และ *E. coli* โดยมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เป็น selective marker นอกจากนี้ พลาสมิดที่สร้างขึ้นนั้นอาจมีส่วนของ signal sequence ซึ่งควบคุมการหลั่ง (secretion) ผลผลิตของยีนออกสู่ภายนอกเซลล์ (Fuglsang 2003) ตารางที่ 2 แสดงพลาสมิดในระบบ NICE system

ตารางที่ 2 พลาสมิดที่ในระบบ NICE system

Plasmid	Characteristics	Reference
General plasmids		
pNZ123	High copy broad host range vector with <i>L. lactis</i> replication genes, cat-gene and multiple cloning site	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ273	Promoter-probe vector. Derivative of pNZ123 with promoterless β -glucuronidase gene (<i>gusA</i>) from <i>E. coli</i> .	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
Vectors		
pNZ8008	Promoterless <i>gusA</i> gene fused to the nisin promoter, used for study of the nisin-controlled expression in <i>L. lactis</i> and other hosts; Cm ^R	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ8021	Vector for transcriptional fusions; Cm ^R	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ8037	Broad host range vector with <i>cat</i> -gene, <i>nisA</i> -promoter and multiple cloning sites with <i>NcoI</i> -site for gene fusions	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Plasmid	Characteristics	Reference
pNZ8048	Like pNZ8037, with terminator sequence behind the MCS	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ8110	Like pNZ8048, with <i>usp45</i> signal sequence translationally fused to the <i>nisA</i> -promoter and <i>NaeI</i> site for gene fusion	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ8148	Like pNZ8148, with a deletion of 184 bp to remove a small <i>B. subtilis</i> DNA fragment	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ8150	Like pNZ8148, with a <i>ScaI</i> -site for gene fusions instead of a <i>NcoI</i> -site	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ9530	Low copy vector pIL252 with <i>nisR</i> and <i>nisK</i> genes and Em ^R , compatible with pNZ8 vectors in other host than <i>Lactococcus lactis</i>	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ9520	High copy vector pIL253 with <i>nisR</i> and <i>nisK</i> genes and ery-resistance, compatible with pNZ8 vectors in other host than <i>Lactococcus lactis</i>	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ9500	Part of <i>nisP</i> and complete <i>nisRK</i> in pUC19 Em ^R (for integration purpose)	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)
pNZ9573	Plasmid for integration of <i>nisRK</i> into the <i>pepN</i> locus of <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> . Cm ^R , Em ^R , P15A-ori of <i>Escherichia coli</i>	Mathiesen <i>et al.</i> (2004)

ที่มา: คัดแปลงจาก Mierau and Kleerebezem (2005); SØrvig *et al.* (2003)

Eichenbaum *et al.* (1998) ได้ทำการสร้างพลาสมิด pNZ9530 ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ *nisA* และ ยีน *gus* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase โดยนำพลาสมิดเวกเตอร์ pNZ9530 ที่สร้างขึ้นเข้าสู่เซลล์ของ *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* และ *Bacillus subtilis* เมื่อวัดระดับของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีค่ากิจกรรมของ

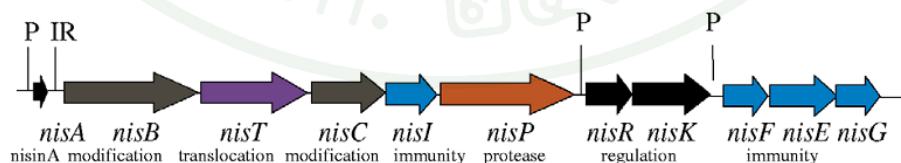
เอนไซม์ β -glucuronidase แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างในการแสดงออกของ เอนไซม์ β -glucuronidase นี้แสดงว่าประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ *nisA* มีความแตกต่างกันในเซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิด ทั้งนี้ประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ยังขึ้นอยู่กับ codon usage ของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแปลรหัสเป็นเอนไซม์ β -glucuronidase

Pascalle *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase โดยเชื่อมยีนเข้ากับพลาสมิด pNZ8032 ในตำแหน่งหลังโปรโมเตอร์ *nisA* แล้วแสดงออกใน *Lactococcus lactis* NZ3900 พบว่ายีน *gus* มีการแสดงออกของยีนได้ เอนไซม์ β -glucuronidase สูงกว่าการแสดงออกในสายพันธุ์ปกติ (wildtype)

พลาสมิด pNZ307 มีขนาด 3103 คู่เบส ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย 3 ชนิดคือยีน *lacZ* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ยีน *lacF* เป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ lactose specific enzyme ชนิด III^{lac} เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้กับพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (Food grade cloning plasmid) และ ยีน Amp^r ยีนควบคุมการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ แอมพลิซิลิน (ภาพที่ 8)

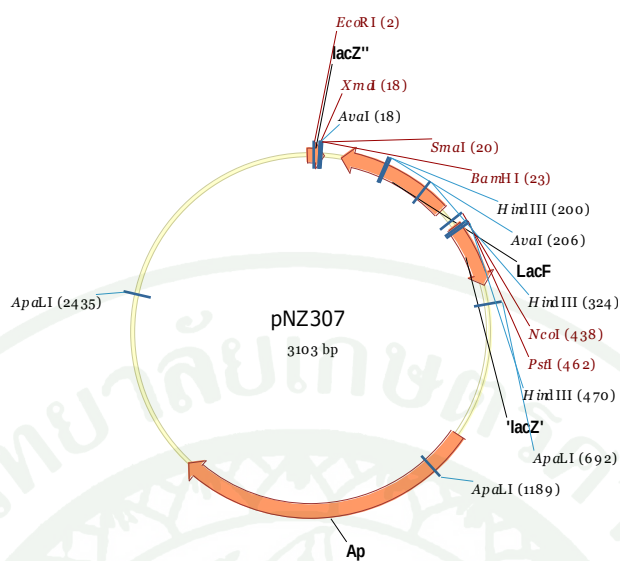
พลาสมิด pNZ8112 มีขนาด 3478 คู่เบส ประกอบด้วยยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟนิคอลล โปรโมเตอร์ *PnisA* และ ssUSP ซึ่งเป็น signal sequence ซึ่งควบคุมการหลั่ง (secretion) ผลผลิตของยีนที่สนใจออกสู่ภายนอกเซลล์ (ภาพที่ 9)

พลาสมิด pNZ8113 มีขนาด 3368 คู่เบส ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับ pNZ8112 แต่ pNZ8113 ไม่มีส่วนของ ssUSP (ภาพที่ 10)



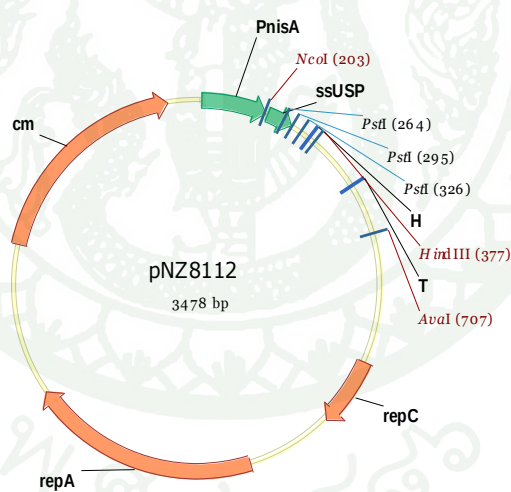
ภาพที่ 7 ระบบการควบคุมการแสดงออกของไนซิน (The nisin controlled gene expression system : NICE system)

ที่มา: Zhou *et al.* (2005)



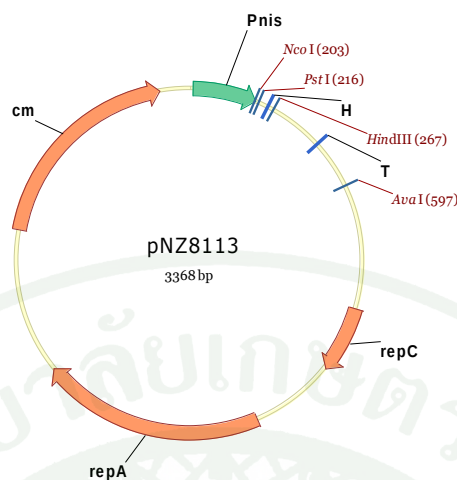
ภาพที่ 8 ลักษณะของพลาสมิด pNZ307

ที่มา: NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)



ภาพที่ 9 ลักษณะของพลาสมิด pNZ8112

ที่มา: NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)



ภาพที่ 10 ลักษณะของพลาสมิด pNZ8113

ที่มา : NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)

6.2 เซลล์เจ้าบ้าน (Host strain)

เซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนในระบบ NICE system ดังแสดงในตารางที่ 3 ได้แก่ *Lactococcus lactis* NZ2900, NZ900 และ NZ9700 ซึ่งมี *nisR* และ *nisK* เป็นยีนควบคุมการสร้าง regulator นอกจากนั้นยังมีการใช้แบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* เป็นต้น รวมถึง *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดอีกด้วย (Pavan *et al.*, 2000)

ตารางที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านใน NICE system

Strains	Characteristics
<i>L.lactis</i> NZ9700	Progeny of the conjugation between nisin producer strain NIZO B8 with MG1614. Carries nisin–sucrose transposon Tn5276.
<i>L.lactis</i> NZ9800	Derivative of NZ9700. Has a 4-bp deletion in <i>nisA</i> gene, leading to inactivation of the nisin operon except for the <i>nisRK</i> genes that are transcribed by a constitutive promoter.

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Strains	Characteristics
<i>L.lactis</i> NZ9000	Integration of <i>nisRK</i> into the <i>pepN</i> gene of strain MG1363 using plasmid pNZ9573. Most commonly used host of the NICE system.
<i>L.lactis</i> NZ3900	Derivative of NZ3000; <i>nisRK</i> integrated into the <i>pepN</i> gene. Host for food-grade use of the NICE system by plasmid selection based on the ability to grow on lactose as carbon source.
<i>L.lactis</i> NZ9000 htrA	NZ9000 with clean deletion of the <i>htrA</i> gene. Host for protein secretion
<i>L.lactis</i> FI7847	A non-nisin producer FI5876-derivative with a deletion in <i>nisA</i> gene

ที่มา : De Ruyter *et al.* (1996)

6.3 วิธีการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยตรง เรียกว่า ทรานส์ฟอเมชัน (transformation) โดยการเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้าน ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก เรียกว่า เซลล์คอมพลีเทนท์ (competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น CaCl_2 เป็นต้น นำคอมพลีเทนท์เซลล์นี้ร่วมกับพลาสมิดที่ติดต่อกับยีนที่สนใจเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) พลาสมิดจะสามารถแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ (ปิยโชคณากุล, 2548)

อิเล็กโตรพอเรชัน (electroporation) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ โดยจะต้องใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสม เมื่อใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสมจะผลทำให้พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านอย่างมีประสิทธิภาพ (ปิยโชคณากุล, 2548) ข้อดีของอิเล็กโตรพอเรชัน คือ ประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสูง ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องขนาดของพลาสมิดที่นำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและเหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (Holo and Nes, 1989) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของอิเล็กโตรพอเรชัน ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้าน

ซึ่งแตกต่างกันในเชื้อแต่ละชนิด สารละลายที่ใช้ในการเตรียม competent cell และขนาดของกระแสไฟฟ้า (Serron *et al.* 2001)

Holo and Nes (1989) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับเทคนิคอิเล็กโตรพอเรชั่น พบว่า เมื่อเลี้ยง *L. lactis* subsp. *cremoris* ในอาหาร M17 ที่มีไกลซีนความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ ซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทำการถ่ายทอดพลาสมิด pIL253 ขนาด 4.8 kb โดยใช้ cuvette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร กระแสไฟฟ้าขนาด 1.5 กิโลโวลต์ ความต้านทานขนาด 200 โอห์ม และความจุไฟฟ้าขนาด 25 ไมโครฟารัดด์ ประสิทธิภาพในการทรานส์ฟอร์มสูงถึง 10^7 transformants ต่อ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม

Axelsson *et al.* (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนอน-แลนโทไปโอติก 3 ชนิดคือ ซากาซิน พี เพดดิโอซิน พีเอ -1 และ พิสซิโคลิน-61 โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรพอเรชั่นในการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSAK20 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *Lactococcus sake* ที่เลี้ยงในอาหาร M17 ที่มีไกลซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ ซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยใช้ cuvette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร กระแสไฟฟ้าขนาด 1.5 กิโลโวลต์ ความต้านทานขนาด 200 โอห์ม และความจุไฟฟ้าขนาด 25 ไมโครฟารัดด์ พบว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของ *Lactococcus sake* ที่ได้รับยีนมีกิจกรรมยับยั้งของสารยับยั้งทั้ง 3 ชนิด และ ประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มมีค่าเท่ากับ 10^4 transformants ต่อ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม

7. การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การที่โปรตีนนั้นมีประจุได้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่กรดอะมิโน หมู่คาร์บอกซิลและหมู่อื่นๆ ในไซด์เชน (side chain) โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นบวก ลบ หรือเป็นกลาง การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้หลายวิธี เช่น การเปรียบเทียบและการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ การเปรียบเทียบและตรวจสอบการสร้างโปรตีนที่เซลล์หรือสิ่งมีชีวิตที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมได้แสดงออก การแยกและการทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน การทดสอบสมบัติของโปรตีนทางอิมมูโนวิทยา และการตรวจสอบหาขนาดของโปรตีนที่เราสนใจ เป็นต้น

หลักการทั่วไปของ SDS-PAGE คือ การทำให้ โปรตีนเสียสภาพ ด้วยสารประกอบ 2-mercaptoethanol ซึ่งไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน การนำโปรตีนไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-5 นาที โปรตีนทั้งหมดจะถูก SDS ที่มีคุณสมบัติเป็น detergent และมีประจุเป็นลบจับอย่างหนาแน่นทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ โปรตีนจะเสียสภาพจากรูปร่างทรงกลม (Globular) ไปอยู่ในสภาพที่เป็นเหยียดตรง (Linear) โปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุเป็นบวกโดยการเคลื่อนที่ของโปรตีนนั้นจะอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว ซึ่งเราสามารถที่จะหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เราสนใจได้จากการเทียบระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่เราสนใจกับโปรตีนขนาดมาตรฐานที่เราทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (Sambrook *et al.*, 2001)

ปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่าโซเดียมโดดีลซัลเฟต หรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS เรียกว่า SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหาขนาดโมเลกุลของ มัน SDS เป็นสารซักฟอกแอนไอออนิก (anionic detergent) ที่มีประจุลบ สามารถจับกับสายโซ่พอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วนที่คงที่ คือ SDS 1.4 กรัม/สายโซ่พอลิเพปไทด์ 1 กรัม SDS-พอลิเพปไทด์คอมเพลกซ์ (SDS-polypeptide complex) นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเพปไทด์เมื่อจับด้วย SDS จะคลายการม้วนออกเป็นสายยาว ซึ่งคงที่ในขณะที่ความยาวของคอมเพลกซ์จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลของสายโซ่ พอลิเพปไทด์ คอมเพลกซ์นี้มีประจุลบ (เนื่องประจุของ SDS ไปคบบังประจุของโปรตีน) มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากันและมีรูปร่างเหมือนกันจึงทำให้การเคลื่อนที่ของสายโซ่พอลิเพปไทด์ขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเพปไทด์และทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้วบวกเมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเพปไทด์ และจากวิธีการย้อมสีทำให้ทราบถึงจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายโซ่พอลิเพปไทด์ใน "native protein" (Sambrook *et al.*, 2001)

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษาน้อยเป็น ไมโครกรัม มีประโยชน์ในการศึกษาพวเคนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยโปรตีนที่ถูกแยกโดย SDS-PAGE สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไปได้ โดยแต่ละแถบที่แยกออกจากกันจากเจลแล้วกำจัด SDS หรือสารเคมีอื่นๆ จากนั้นจึงนำไปศึกษา เช่น วิเคราะห์กรดอะมิโน แผนที่เพปไทด์ (peptide map) หาปลาย N- หรือหาปลาย C- เป็นต้น (Sambrook *et al.*, 2001)

สารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายหรือเจือจางสารผสมโปรตีนต้องมี SDS ปริมาณมากเกินไป และมีสารไธออล (thiol reagent) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducer) สลายพันธะไดซัลไฟด์ สารไธออลที่นิยมใช้คือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล หรือ β-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) และไดไธโอไธเรออล (dithiothreitol หรือ DTT) DTT มีข้อดีคือไม่มีกลิ่นและเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ที่ให้ผลเท่ากับ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเนื่องจากยูเรียมีความสามารถในการสลายพันธะอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน ที่เกิดขึ้นในโมเลกุลของโปรตีนจึงใช้ยูเรียเป็นสารทำให้แตกตัว (dissociating agent) เช่นเดียวกันกับ SDS แต่ต้องใช้ยูเรียความเข้มข้นสูงประมาณ 8M ในการทำโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ และต้องมีสารสลายพันธะไดซัลไฟด์ด้วย ข้อดีของยูเรียก็จะมีผลต่อประจุของโปรตีนเพราะฉะนั้นการแยกสายโซ่พอลิเพปไทด์จึงขึ้นกับขนาดและประจุซึ่งต่างจาก SDS อย่างไรก็ตามการแยกสายโซ่พอลิเพปไทด์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดและประจุทำให้การหามวลโมเลกุลได้ผลไม่ถูกต้องทีเดียว ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้ SDS มากกว่ายูเรียเมื่อต้องการหามวลโมเลกุลของโปรตีน (Sambrook *et al.*, 2001)

8. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์

ชีวสารสนเทศศาสตร์ หรือ Bioinformatics เป็นวิทยาศาสตร์แขนงใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและวิจัยเพื่อผลิตข้อมูล จัดระบบเรียบเรียงข้อมูล เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยา (Kitano, 2002 และ Slonim, 2003) ตัวอย่างของข้อมูลเหล่านี้ ได้แก่ ข้อมูลระดับโมเลกุลประเภทลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม ลำดับกรดอะมิโนในสายโปรตีน ไปจนถึงข้อมูลระดับการแสดงออกของยีน หน้าที่ของยีน การตอบสนองของยีน และยักรวมถึงข้อมูลทางสถิติและบทความทางวิทยาศาสตร์อีกด้วย

เป้าหมายของชีวสารสนเทศศาสตร์ ได้แก่ การจัดรูปแบบข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายแก่การค้นหา วิเคราะห์ และนำไปใช้ สามารถเพิ่มเติมข้อมูลลงในฐานข้อมูลได้สะดวกรวดเร็ว นอกจากนี้ ยังมีการกรองวิเคราะห์ข้อมูลดิบในระดับหนึ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความหมายเข้าใจง่าย ตัวอย่างเช่น การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน แสดงตำแหน่งที่น่าจะเป็น signal peptide และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการวิจัยพัฒนาทางด้านซอฟต์แวร์และฮาร์ดแวร์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลเป็นไปได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้นก็มีความสำคัญมากเช่นกัน และ

เนื่องจากข้อมูลจากการศึกษาระบบชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตมีปริมาณและความซับซ้อนมาก บางครั้งอาจไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างชุดข้อมูลได้ ดังนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องใช้ชีวสารสนเทศศาสตร์ โดยเริ่มจากการเก็บข้อมูลดิบ และจัดข้อมูลเป็นหมวดหมู่เพื่อลดความซับซ้อนของข้อมูลแล้วจึงจัดการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณทางคณิตศาสตร์และสถิติ ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จะบ่งบอกถึงการค้นพบองค์ความรู้ใหม่ๆทางวิทยาศาสตร์หรืออาจกำหนดทิศทางการทำงานในอนาคตว่าต้องตั้งสมมติฐานอย่างไรและทดสอบสมมติฐานโดยใช้ข้อมูลชนิดใด ต้องการเทคโนโลยีใดบ้างเพื่อตอบคำถาม

ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบันงานวิจัยทางชีววิทยาและชีววิทยาโมเลกุลมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ขณะเดียวกันก็ได้ผลิตข้อมูลปริมาณมาก ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ที่ปริมาณเพิ่มขึ้นแบบ exponential ข้อมูลบางส่วนได้ถูกนำเสนอ หรือตีพิมพ์เผยแพร่ แต่ข้อมูลปริมาณมหาศาลที่ไม่เปิดเผยยังคงถูกเก็บรักษาไว้ ข้อมูลหลักทางชีววิทยาแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน โครงร่างสามมิติของชีวโมเลกุล และข้อมูลจากการทดลองหาหน้าที่ของยีน (functional genomics) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลทางชีววิทยาประเภทอื่น เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างยีนเมแทบอลิซึม ภาพแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ บทความวิทยาศาสตร์ ข้อมูลทางสถิติอื่นๆ ก็ยังคงมีความสำคัญ

การเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ระหว่างสายดีเอ็นเอ หรือสายโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล (Homology or Similarity search) เมื่อทราบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่กำลังศึกษา หรือลำดับกรดอะมิโนบนสายโปรตีนแล้ว สิ่งต่อไปที่ควรวิเคราะห์ คือ วิเคราะห์หาว่าสายดีเอ็นเอที่ได้มีส่วนของยีนหรือไม่ ถ้าใช่เป็นยีนอะไร แสดงออกเป็นโปรตีนอะไร และโปรตีนมีหน้าที่อะไร สายโปรตีนที่กำลังศึกษามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูลบ้าง สิ่งมีชีวิตอื่นมีโปรตีนชนิดนี้หรือไม่ เพื่อจะได้ทำนายว่ายีนนั้น ๆ จะแสดงออกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะทางกายภาพ-ชีวภาพอย่างไร จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนชนิดใด น่าจะมีหน้าที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตหรือไม่ เพื่อการตัดสินใจว่าควรจะศึกษายีนหรือโปรตีนชนิดนี้อย่างไร ควรศึกษาต่อไปในแนวลึกหรือไม่ ซอฟต์แวร์ที่ใช้สำหรับบริการชนิดนี้มีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตกันมาก คือ BLAST, FASTA และ SSEARCH ทั้ง 3 โปรแกรมใช้ฐานข้อมูลเดียวกัน (คือ GenBank, EMBL และ DDBJ) แต่วิธีการคำนวณ (algorithm) ต่างกันไป ได้แก่ วิธีการคำนวณแบบ BLAST, FASTA และ Smith-Waterman algorithm ตามลำดับ เพราะฉะนั้นถึงแม้จะใช้

สายดีเอ็นเอตัวอย่างเดียวกัน แต่ผลลัพธ์จากแต่ละโปรแกรมอาจต่างกัน ความเร็วและความไวในการคำนวณก็ต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเว็บไซต์ที่ให้บริการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล

ฐานข้อมูล	เว็บไซต์
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
FASTA	http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-e.html
SSEARCH	http://www.ddbj.hig.ac.jp/search/ssearch-e.html

Nyquist *et al.* (2011) ศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสในจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *Lactobacillus sakei* 23K กับเชื้อ *Lactobacillus sakei* 18 สายพันธุ์ ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ยีนที่มีความเหมือนกันของเชื้อ *Lactobacillus sakei* ได้แก่ ยีนควบคุมกระบวนการ nucleoside scavenging ยีนควบคุมการสร้างอาร์จีนิน และ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยารีด็อกซ์ (redox) และระดับออกซิเจน

Voget *et al.* (2011) ศึกษาลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ *Carnobacterium* sp. 17-4 แบคทีเรียกรดแลคติก ที่พบในอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์นม โดยวิธี 454 GS-FLX system พบว่า *Carnobacterium* sp. 17-4 มีขนาดจีโนม 2,635,294 คู่เบส พลาสมิดดีเอ็นเอขนาด 50,105 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *Carnobacterium* sp. 17-4 กับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ *Carnobacterium* sp. 17-4 มีความคล้ายกับยีน orthologous ของเชื้อ *Carnobacterium* sp. AT7 คิดเป็น 74.4 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ชุดของยีนควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินที่มีลักษณะเป็นวง (circular bacteriocin biosynthesis cluster) carnocyclin A ซึ่งผลิตโดย *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 อยู่ในส่วนของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *Carnobacterium* sp. 17-4

Bakkal (2011) โคลนยีน โดยการสร้างธนาคารยีนจากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Burkholderia multivorans* (ATCC17616) โดยใช้พลาสมิด pUC19 พบ โคลนที่แสดงกิจกรรมยับยั้งต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 1 โคลน และมีขนาดดีเอ็นเอของ *B. multivorans* ขนาด 714 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST มีความคล้ายกับลำดับเบสของ hypothetical protein (Bm 1615) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบระบบการทำงาน แต่เป็นโปรตีนที่มีความใกล้เคียงกับ membrane protein ของเชื้อ *B. multivorans*



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 แยกจากลำไส้ไก่ และผลิตสารยับยั้ง KAC5 (Nitisinprasert *et al.* 2000) ใช้เป็นแหล่งของโครโมโซมในการโคลนยีน *kac5*

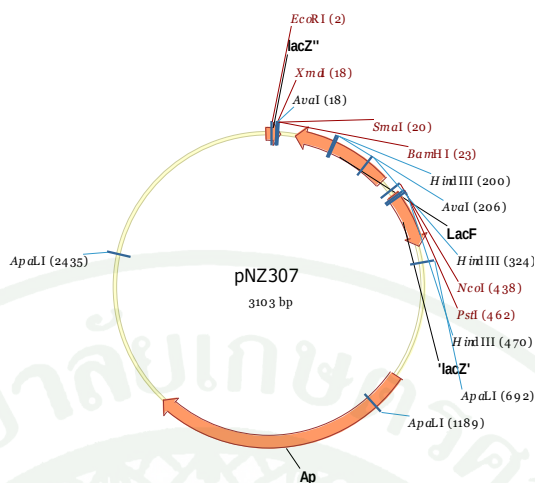
เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิด เก็บในกลีเซอรอล 50% ที่ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรม ดังนี้ F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺), λ ⁻ และทนต่อกรด nalidixic (Meselson and Yuan, 1968; Hanahan, 1985; FOCUS, 1986; Grant, *et al.*, 1990)

เชื้อ *Escherichia coli* TOP10 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิด เก็บในกลีเซอรอล 50% ที่ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรม ดังนี้ F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻ ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin (Invitrogen[®])

เชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 เชื้อก่อโรคในไก่ จากบริษัท เบ็ทเทอร์ โพรดัคส์ แอนด์ เทคโนโลยี จำกัด ประเทศไทย ใช้เป็นเชื้อเป้าหมายในการทดสอบกิจกรรมยับยั้งของสาร KAC5 เก็บใน 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ที่ -80 องศาเซลเซียส

2. พลาสมิด

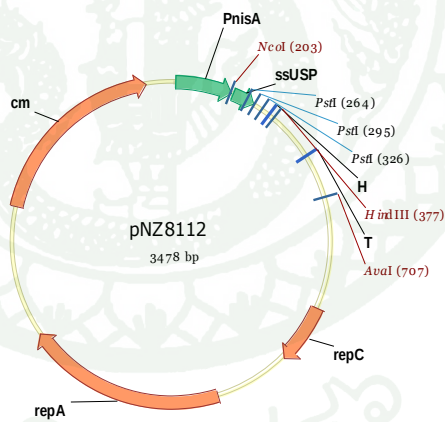
พลาสมิด pNZ307 มีขนาด 3103 คู่เบส ประกอบด้วย ยีน *lacZ* ยีน *lacF* และ ยีน *amp^r* (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ลักษณะของพลาสมิด pNZ307

ที่มา: NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)

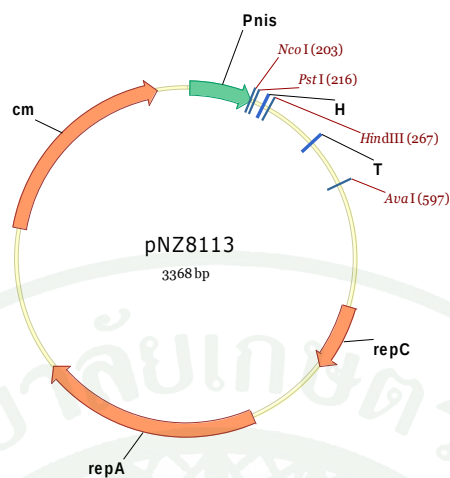
พลาสมิด pNZ8112 มีขนาด 3478 คู่เบส ประกอบด้วย Cm^r โปรโมเตอร์ *PnisA* และ ssUSP (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ลักษณะของพลาสมิด pNZ8112

ที่มา: NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)

พลาสมิด pNZ8113 มีขนาด 3368 คู่เบส ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับ pNZ8112 แต่ pNZ8113 ไม่มีส่วนของ ssUSP (ภาพที่ 13)

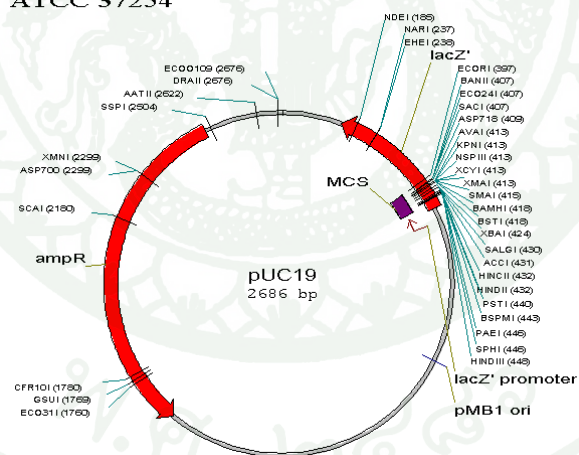


ภาพที่ 13 ลักษณะของพลาสมิด pNZ8113

ที่มา : NIZO THE FOOD RESEARCHERS (2007)

พลาสมิด pUC19 ขนาด 2686 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วย ยีน *amp^R* ยีน *lacZ*

ATCC 37254



ภาพที่ 14 ลักษณะของพลาสมิด pUC19

ที่มา : Vieira and Messing (1982)

3. สารเคมีและเอนไซม์

- 3.1 *Bam*HI (Fermentas, USA)
- 3.2 *Bsp*143I (Fermentas, USA)
- 3.3 *Eco*RI (Fermentas, USA)
- 3.4 *Pst*I (Fermentas, USA)
- 3.5 T4 DNA ligase (Promega, USA)
- 3.6 QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA)
- 3.7 NucleoSpin extract II® (Machere-Nagel, USA)
- 3.8 Agarose (Research organics, USA)
- 3.9 RNase (Fermentas, USA)
- 3.10 6X loading dye (Fermentas, USA)
- 3.11 1 Kb DNA marker (Fermentas, USA)
- 3.12 λ /HindIII+EcoRI DNA marker (Fermentas, USA)
- 3.13 Phenol (Amresco, USA)
- 3.14 Chroloform (Merks, Germany)

วิธีการ

1. การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยนำเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 1 โคโลนีเลี้ยงในอาหาร MRS 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอด microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ที่ังสารละลายส่วนบน ทำซ้ำ 1 รอบ เติมบัฟเฟอร์ A (6.7เปอร์เซ็นต์ของ sucrose, TE buffer pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex mixer เติมสารละลาย lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 5 นาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนเกิดการย่อยสลายผนังเซลล์อย่างสมบูรณ์ โดยสังเกตได้จากสารละลายใส จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกโดยการเติมฟีนอลอิมิตัวในโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติมสารละลายผสมของ Phenol : Chloroform อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติมสารละลายผสมของ Chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม isopropanol 2 เท่าของปริมาตรสารละลายเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเพื่อให้สารละลายผสมกัน บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ังสารละลายใส เหลือตะกอนดีเอ็นเอ เติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อดึงตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ังสารละลายใส นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer 40 ไมโครลิตร

ทำการกำจัด RNA โดยเติมสารละลาย RNase 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกำจัด RNase โดยเติมสารละลายผสมของ Phenol : Chloroform อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่เติมสารละลายผสมของ Chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube ใหม่เติม 3 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเตต ปริมาตร 0.1 เท่าและเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตร สารละลาย บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายใส เติมน้ำ ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายใส นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer 40 ไมโครลิตร และเก็บดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส ศึกษาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* DH5 α

วิธีการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* DH5 α ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep[®] Spin miniprep kit (Qiagen, USA) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้องเทสารละลายทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 มิลลิตรทันที นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 750 มิลลิตรใส่ลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำบัฟเฟอร์ NE ปริมาตร 750 มิลลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ไหลผ่านลงคอลัมน์ด้านล่างทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจากเมมเบรน โดยใช้บัฟเฟอร์ EB หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมธนาคารยีน

3.1 การตัดโครโมโซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

โครโมโซมดีเอ็นเอที่ สกัดได้ตัดแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp143I* (*Fermentus*) ที่มีตำแหน่งจดจำการตัด 4 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 1.0 – 2.0 กิโลเบส ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้ โครโมโซมดีเอ็นเอของ *L. reuteri* KUB-AC5 1 ไมโครกรัม 10x บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ *Bsp143I* 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Bsp143I* 1 ยูนิต โดยมีปฏิกิริยารวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร โดยส่วนที่เหลือจะเป็นน้ำปลอดเชื้อที่มีการกำจัดไออนออกแล้ว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำปฏิกิริยา 2 ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดได้ ศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล

สกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการด้วย NucleoSpin® Extract II จากบริษัท Machercy-Nagal

3.3 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *BamHI* แบบสมบูรณ์ (complete digestion) โดยใช้ปริมาณพลาสมิดเริ่มต้น 5 ไมโครกรัม และใช้เอนไซม์ 5 ยูนิตต่อ 1 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (12-18 ชั่วโมง) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นศึกษาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

3.4.1 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5'-phosphate ของพลาสมิด

การกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5'-phosphate ของพลาสมิด ตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) ด้วยเอนไซม์ Calf Intestine Alkaline Phosphate (CIP) 0.01 ยูนิตต่อ 1 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอ โดยให้ปฏิกิริยาสุดท้ายเป็น 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

กำจัดเอนไซม์ CIP ออกโดยใช้ SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายผสมของ Phenol : Chloroform อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับลှอนไปมาเบาๆ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่เติมสารละลายผสมของ Chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับลှอนไปมาเบาๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 3 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเตต ปริมาตร 0.1 เท่าและแอลกอฮอล์บรีสุทซ์ ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตรสารละลาย บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายใส เติม 70 เปอร์เซ็นต์ของ ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายใส นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer 40 ไมโครลิตร

3.4.2 การเชื่อมต่อโครโมโซมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Sambrook *et al.* (1989) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Lb. reuteri* KUB-AC5 ที่มีขนาด 1.0 – 2.0 กิโลเบส ผสมกับ พลาสมิด pNZ307 ที่ผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกแล้ว โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิดng โครโมโซมดีเอ็นเอng 10X T4 DNA ligase buffer 1.5 ไมโครลิตร ATP ความเข้มข้น ? T4 ligase 1 ยูนิต และ น้ำปราศจากไอออนผ่านการฆ่าเชื้อปรับ ปริมาตรเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α โดยวิธี Heat shock

3.5.1 การเตรียม competent cell โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ดำเนินการตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 α 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะมีออกซิเจน จนถึงระยะ log phase โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.3-0.4 แสงวัดเลี้ยงเชื้อในน้ำแข็ง 10 นาที เทเชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายใส่ที่ง เดิมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ที่เย็น ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาณเซลล์ของ *E. coli* DH5 α ผสมเป็นเนื้อเดียวกันนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยก competent cell โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 2000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายใส่ที่ง เดิมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ที่เย็น ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาณเซลล์ของ *E. coli* DH5 α ผสมเป็นเนื้อเดียวกันนำไปแช่ในน้ำแข็งข้ามคืน จากนั้นแบ่ง competent cell ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดละ 210 ไมโครลิตร เดิมกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านตามขั้นตอนของ Sambrook *et al.*, (1989) โดยนำหลอดใส่ competent cell และดีเอ็นเอลูกผสม แช่น้ำแข็ง ส่วนทอปและไปเปิดนั้นนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้พลาสติก 5 ไมโครกรัม ต่อ competent cell 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม SOC 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 60 นาที นำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร X-gal ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (Recombinant cell)

โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์ลูกผสมที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร X-gal ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ

IPTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ่ายลงบนอาหาร LB ที่มี สารปฏิชีวนะแอมพลิซิ ลิน 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมยับยั้งของสาร ยับยั้งต่อเชื้อ เป้าหมาย

5. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Microplate Reader

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Turcotte *et al.* (2003) ; Delgado (2005); Naghmouch *et al.* (2007) เลี้ยงเซลล์ลูกผสมในอาหาร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิ ลิน บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 22 ชั่วโมง และเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ซึ่งเป็นเชื้อเป้าหมาย ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ใน 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโน เมตรเท่ากับ 0.15 ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ลูกผสม เก็บสารละลายส่วนบน เพื่อทดสอบกิจกรรมการ ยับยั้ง ต่อเชื้อเป้าหมาย เดิมเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ลงในไมโครไตเตอร์เพลท ขนาด 96 หลุม ในอาหารเหลว NB ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมสารยับยั้งลง ในหลุมที่มีเชื้อเป้าหมาย 100 ไมโครลิตร โดยเติมสารยับยั้งตัวอย่างละ 2 หลุม (2 ซ้ำ) ใช้สารยับยั้ง จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 สายพันธุ์ปกติ และใช้น้ำฆ่าเชื้อ เป็นตัวอย่างควบคุมในแต่ละ ไมโครเพลท บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader Model 680 ของบริษัท BIO-RAD โดยกำหนดให้สารยับยั้งที่มีผลยับยั้งเชื้อเป้าหมายแสดงค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเป้าหมายที่ทดสอบด้วยชุดควบคุม บันทึกเป็นค่ากิจกรรมยับยั้งของ สารในหน่วย AU/ml โดยคำนวณจาก

$$\text{ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าการเจือจางสูงสุดที่แสดงกิจกรรมยับยั้ง} \times 1000}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)}}$$

6. การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท 1st Base laboratory ประเทศมาเลเซีย และศึกษาสมบัติของลำดับเบสจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ด้วยโปรแกรม blastx และ blastn

7. การสกัดสารยับยั้งจากส่วนต่างๆของเซลล์ลูกผสม

เลี้ยงเซลล์ลูกผสมที่ได้ในอาหาร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิคลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ลูกผสมด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เก็บสารละลายไซโต (Extracellular) เพื่อทำการทดสอบกิจกรรมยับยั้งต่อไป

ทำการสกัดสารประกอบจากเพอริพลาสมิซึม และไซโตพลาสมิซึมเดิม โดยวิธีดัดแปลงของ Yamaphai *et al.* (2007) ใส่สเฟียโรพลาสมัฟเฟอร์เพื่อละลายส่วนที่เป็นเซลล์ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนไซโต แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 500 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนไซโต (periplasmic) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย ไลซิสบัฟเฟอร์ แล้วทำการโซนิเคตด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (JIRCAS, Japan) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนไซโต (Intracellular)

8. การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Laemmli (1970) นำสารยับยั้งที่ได้จากข้อ 7 ไปทำให้เข้มข้นโดย vacuum dryer ให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่า จากนั้นตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเตรียมเจลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางผนวกที่ ข4 โดยใส่ ammoniumpersulfate 10เปอร์เซ็นต์ (เตรียมก่อนใช้) และ TEMED เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นเทเจลที่เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น separating gel ลงไประหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น แล้วเทน้ำกลั่นปิดทับที่ผิวหน้า ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว แล้วจึงเทเจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น stacking gel ทับบนผิวหน้าของ separating gel ใส่หัวลิงใน stacking gel และรองจนกระทั่งแข็งตัว นำหัวออก จะเกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง โดยเตรียมตัวอย่างผสม

กับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 คัมเป็นเวลา 2-4 นาทีเติมลงในช่องใส่ตัวอย่างปริมาตร 10-15 ไมโครลิตร และใช้ความต่างศักย์ขนาด 100 โวลต์ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จ ย้อมเจลโดยใช้ silver stain plus kit (Bio-Rad, USA) โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เทียบน้ำหนักโมเลกุล คือ SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, USA) ประกอบด้วย ไมโอซิน (myosin, 210 kD) ฟอสโฟริเลส (Phosphorylase, 105 kD) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, 78 kD) กลูตาเมต ดีไฮโดรจีเนส (Glutamic Dehydrogenase, 55 kD) แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol Dehydrogenase, 45 kD) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic Anhydrase, 34 kD) ไมโอกลูบิน เรด (Myoglobin Red, 17 kD) ไลโซไซม์ (lysozyme, 16 kD) และอะโปรตีนิน (aprotinin, 7 kD) และ อินซูลิน บี เชน (Insulin, B Chain, 4 kD)

9.การสกัดโปรตีนจาก SDS-PAGE

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Thermo Scientific (2009) โดยทำการตัดเจลในตำแหน่งของแถบโปรตีนที่สนใจ จากนั้นทำการละลายแถบโปรตีนนั้นด้วยซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บดชิ้นเจลที่ตัดด้วยไม้บดขนาดเล็ก จากนั้นเก็บสารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (12 – 18 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเจล และเก็บสารละลายสารยับยั้งเพื่อทดสอบกิจกรรมยับยั้งด้วยวิธี spot on lawn ต่อไป

10. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี spot-on-lawn

ทดสอบกิจกรรมของสารยับยั้งโดยวิธีการ ดัดแปลงของ Schillinger and Lucke (1989) ใช้เชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 เป็นเชื้อเป้าหมายตลอดการทดลองเพาะเชื้อในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ใน 5 มิลลิตร เชื้อที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงอาจให้มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.146 ใส่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในอาหารกึ่งแข็ง (nutrient soft agar) ประกอบด้วยวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วเททับลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ปริมาตร 10 มิลลิตร รอให้ผิวหน้าแห้ง หยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบโดยเจือจางทีละ 2 เท่า (2-fold serially diluted) บ่ม

ข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดบริเวณใส (clear zone) บันทึกเป็นค่ากิจกรรมยับยั้งของสารในหน่วย AU/ml โดยคำนวณจาก

$$\text{ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าการเจือจางสูงสุดที่แสดงบริเวณใส} \times 1000}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)}}$$



ผลการทดลองและวิจารณ์

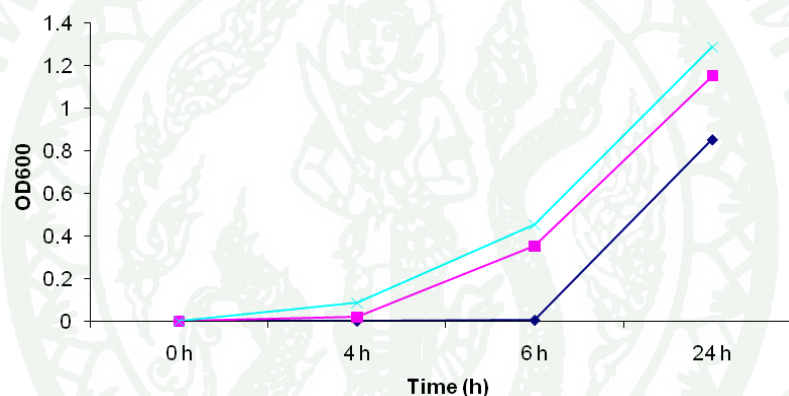
1. การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการโคลนยีน *kac5*

E. coli เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้สำหรับการโคลน และการแสดงออกของยีน เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ใช้อาหารที่เตรียมได้ง่ายและราคาไม่แพง มีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับลำดับเบส โปรโมเตอร์และเทอร์มินเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนจากโปรคาริโอท และ ยูคาริโอท พาหะดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* ประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญคือ ลำดับเบสโปรโมเตอร์ซึ่งเป็นลำดับเบสที่กำหนดตำแหน่งเริ่มการถอดรหัส ยีน ลำดับเบสเทอร์มินเตอร์เป็นลำดับเบสที่กำหนดตำแหน่งหยุดกระบวนการถอดรหัส และ ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจับของไรโบโซม (ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence) เพื่อ กำหนดตำแหน่งเริ่มการสังเคราะห์โปรตีน (ปิยโชคานุกูล, 2543) ดังนั้นจึงเลือก *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีน อย่างไรก็ตามได้มีการพบว่าสารเมตาบอไลต์ที่ผลิตขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Schierack et al. (2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ *E. coli* สายพันธุ์ Nissle ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Salmonella* Typhimurium SL1344 โดยสารยับยั้งจาก *E. coli* สายพันธุ์ Nissle สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ β - galactosidase ของเชื้อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ SL1344 ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบผลของเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ TOP10 และ DH5 α ต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าการเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ซึ่งแสดงด้วยค่า absorbance จากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศเซลล์ของ *E. coli* DH5 α และ *E. coli* TOP10 มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่า สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* TOP10 มีผลยับยั้งการเจริญของ *S. Enteritidis* S003 ได้ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการทดสอบ ในขณะที่ สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α ไม่แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ตลอด 24 ชั่วโมง และ *S. Enteritidis* S003 สามารถเจริญได้ดีกว่า *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วย สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* TOP10 ดังแสดงในภาพที่ 15 ดังนั้นจึงเลือก *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีน *kac5* ต่อไป

ตารางที่ 5 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จาก เซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดต่อเชื้อ เป้าหมาย

แหล่งของน้ำเลี้ยงเชื้อ ปราศจากเซลล์	OD 600	SD	ชุด ควบคุม	OD 600	SD	P
<i>E. coli</i> TOP10	0.85285	0.006384	LB	1.286475	0.004309	2.553
<i>E. coli</i> DH5 α	1.151	0.046239	LB	1.286475	0.004309	2.553



ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* TOP10 และ *E. coli* DH5 α

- ◆ แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* TOP10
- แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α
- × แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยอาหาร LB

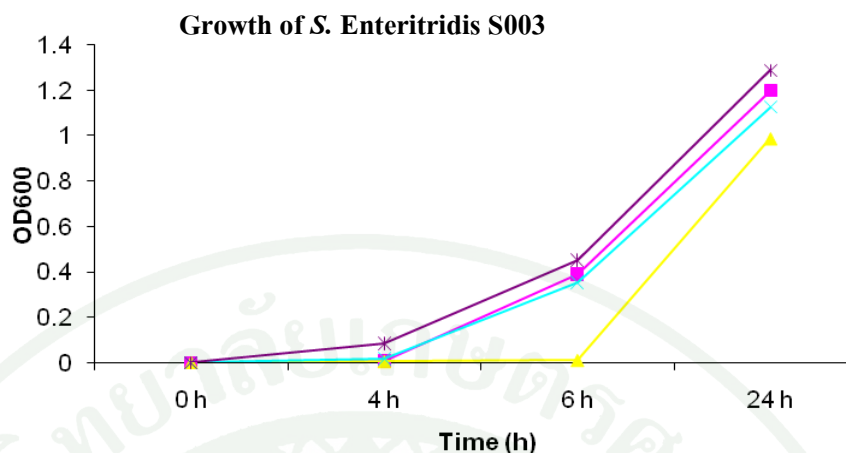
2. การเลือกพลาสมิดในการโคลนยีน *kac5*

ทำการเลือกพลาสมิดที่เหมาะสมในการโคลนยีน *kac5* โดยศึกษาผลของ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศเซลล์ จาก *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด 2 ชนิด คือ pNZ307 และ pUC19 ต่อการเจริญของเชื้อ

เป้าหมายคือ *Salmonella. Enteritidis* S003 จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader Model 680 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่มี พลาสมิด pNZ307 และพลาสมิด pUC19 ส่งผลต่อการเจริญของ *salmonella* อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากเชื้อ *E. coli* DH5 α (ชุดควบคุม) อย่างไรก็ตาม สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC19 มีผลยับยั้งการเจริญของ *S. Enteritidis* S003 ได้ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการทดสอบ ในขณะที่ สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pNZ307 ไม่แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ตลอด 24 ชั่วโมงที่ทดสอบกิจกรรมยับยั้ง และ *S. Enteritidis* S003 สามารถเจริญได้ดีกว่า *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วย สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC19 ดังแสดงในภาพที่ 16 ดังนั้นจึงเลือกใช้พลาสมิด pNZ307 ในการศึกษาเกี่ยวกับโคลนีนต่อไป

ตารางที่ 6 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดต่อเชื้อเป้าหมาย

แหล่งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์	OD 600	SD	ชุด ควบคุม	OD 600	SD	P
<i>E. coli</i> DH5 α /pNZ307	1.1966	0.042	LB	1.2865	0.004	2.553
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC19	0.9864	0.005	LB	1.2865	0.004	2.553
<i>E. coli</i> DH5 α	1.1230	0.051	LB	1.2865	0.004	2.553



ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pNZ307 และ pUC19

- แทน การเจริญของเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pNZ307
- ▲ แทน การเจริญของเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pUC19
- × แทน การเจริญของเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5α
- * แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ที่ทดสอบด้วยอาหาร LB

มีการประสบความสำเร็จในการใช้เชื้อ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อศึกษาการแสดงออกของสารแบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ Bukhtiyarova *et al.* (1997) ศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้าง Pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* H โดยใช้ *E. coli* chi 925 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และ Shuttle vector pHPS9 เป็นพลาสมิดในการโคลนยีน พบยีนยีนควบคุมการสร้าง Pediocin AcH และมีการหลั่งสาร Pediocin AcH จากเซลล์เจ้าบ้าน

Osmanagaoglu *et al.* (2000) ศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้าง Pediocin P จากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* Pep1 โดยใช้ *E. coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pHD1.0 เป็นพลาสมิด พบยีนยีนควบคุมการสร้าง Pediocin P แต่ไม่พบกิจกรรมยับยั้งของ Pediocin P ต่อเชื้อเป้าหมาย

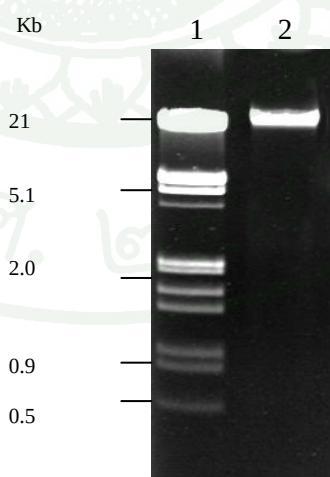
Moon Gi *et al.* (2006) ศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้าง Pediocin PA-1 โดยทำการเชื่อมยีนเข้ากับยีน *DHFR* ซึ่งเป็นยีนที่มี His tagged จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* โดยใช้ *E. coli* M15 เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pQE40PED เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบขึ้นยีนควบคุมการสร้าง Pediocin PA-1 และมีการแสดงออกแบบ overexpression โดยสารที่แสดงออกนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA metal affinity chromatography

อย่างไรก็ตามเห็นได้ว่างานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีการใช้เชื้อ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน งานวิจัยนี้เป็นงานชิ้นแรก ซึ่งศึกษาแสดงออกของสารยับยั้ง ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าว

3. การโคลนยีน *kac5*

3.1 ปริมาณและคุณภาพของโครโมโซมจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5

พบว่าความเข้มข้นของโครโมโซมดีเอ็นเอของ *Lb. reuteri* KUB-AC5 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร มีค่าในช่วง 1.84 - 2.42 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.82 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงและเมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ 1 แถบ โดยไม่มีสาร โปรตีนหรืออาร์เอ็นเอปนเปื้อนดังแสดงในภาพที่ 17

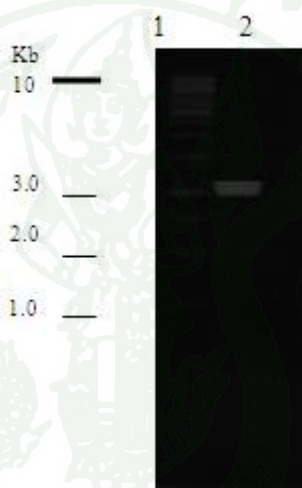


ภาพที่ 17 โครโมโซมจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5

- | | |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII และ EcoRI |
| ช่องที่ 2 | โครโมโซมของเชื้อ <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 |

3.2 ปริมาณและคุณภาพของพลาสมิด pNZ307

พบว่าความเข้มข้นของพลาสมิด โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.2 - 0.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.81 - 1.98 แสดงว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง และเมื่อตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิด ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ซึ่งมีขนาด 3.1 กิโลเบส เมื่อเปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 พลาสมิด pNZ307

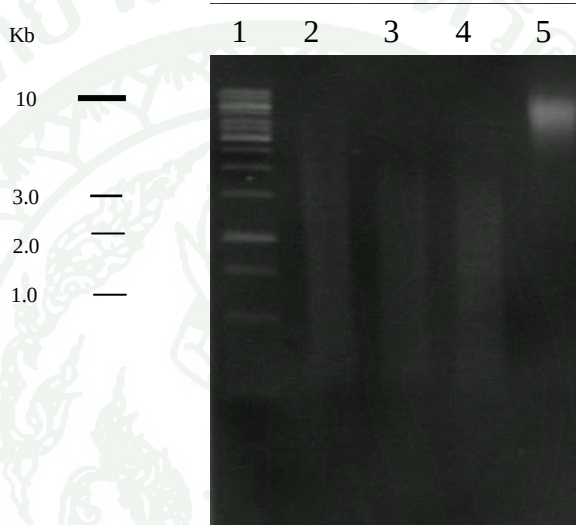
ช่องที่ 1 1 Kb DNA marker

ช่องที่ 2 พลาสมิด pNZ307

3.3 การเตรียมธนาคารยีน

สารเปปไทด์ KAC5 ที่ผลิตโดย *Lb. reuteri* KUB-AC5 มีน้ำหนักโมเลกุล 4.7 กิโลดาลตัน (อาภา 2549) ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นจำนวนเบส พบว่าจะมีขนาดประมาณ 129 คู่เบส ดังนั้นเพื่อทำการเตรียมโครโมโซมในการโคลนยีน ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ให้ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1 ถึง 2 กิโลเบส เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ครอบคลุมขนาดของยีนที่ควบคุมการผลิตสารเปปไทด์ KAC5

จากการการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bsp*143I เป็น 0.25 ยูนิตต่อไมโครลิตร และแปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มเป็น 15, 20 และ 25 นาที พบว่าเมื่อทำการตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.25 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้เวลาในการบ่ม 25 นาที จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1 ถึง 2 กิโลเบสมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 19 จึงเลือกสภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมสำหรับการ เตรียมธนาคารยีนต่อไป

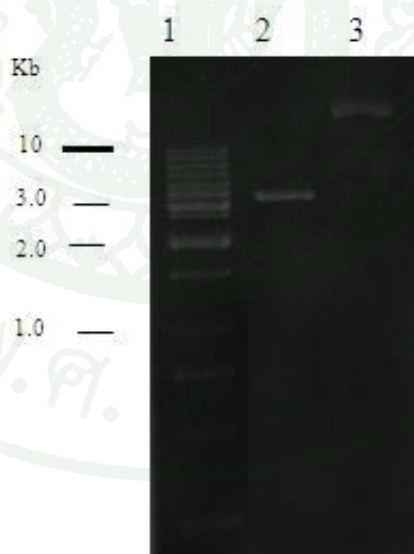


ภาพที่ 19 โครโมโซมจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์

ช่องที่ 1	1 Kb DNA marker
ช่องที่ 2	โครโมโซมของ <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp</i> 143I ความเข้มข้น 0.25 U/ μ l เป็นเวลา 15 นาที
ช่องที่ 3	โครโมโซมของ <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp</i> 143 ความเข้มข้น 0.25 U/ μ l เป็นเวลา 20 นาที
ช่องที่ 4	โครโมโซมของ <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp</i> 143 ความเข้มข้น 0.25 U/ μ l เป็นเวลา 25 นาที
ช่องที่ 5	โครโมโซมของ <i>Lb. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp</i> 143

ได้มีการศึกษาแบคทีเรียโอซิน ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และทำงานด้วยเปปไทด์ 2 ชนิด ได้แก่ lactacin F พบว่าระบบ lactacin F operon ของ *Lactobacillus johnsonii* มีขนาด 6.3 กิโลคาลตัน โดย lactacin F operon ประกอบด้วย *lafA* และ ยีน *lafX* ถอดรหัสได้ prepeptide ประกอบด้วย 75 และ 62 โมเลกุลกรดอะมิโน ตามลำดับ ส่วน *ORFZ* ถอดรหัสให้โปรตีน ประกอบด้วย 124 กรดอะมิโน ซึ่งเป็น immunity protein ทำหน้าที่ป้องกันการยับยั้งจากแบคทีเรียโอซินให้กับเซลล์ผู้ผลิต (Muriana and Klaenhammer, 1991; Moll *et al*, 1998 ; Oppegård *et al*, 2007) เมื่อคำนวณเป็นจำนวนเบสพบว่าจะมีขนาด ทั้งหมดประมาณ 7119 คู่เบส ดังนั้นจึงเลือกตัดชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 1-2 กิโลเบส ซึ่งครอบคลุมระบบควบคุมยีน

พลาสมิด pNZ307 มีขนาด 3103 คู่เบส ประกอบด้วย multiple cloning site 4 ตำแหน่ง คือ *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *NcoRI* และ *PstI* สำหรับในการทดลองนี้ได้ตัดพลาสมิดแบบสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* เพื่อให้เกิดปลายคู่สมที่สามารถจับกับปลายของโครโมโซมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp143* เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ *BamHI* สามารถตัดพลาสมิด pNZ307 ได้อย่างสมบูรณ์ ได้พลาสมิดในลักษณะเส้น (linear form) ขนาด 3103 คู่เบส ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 พลาสมิด pNZ307 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*

- | | |
|-----------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 Kb DNA marker |
| ช่องที่ 2 | พลาสมิด pNZ307 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> |
| ช่องที่ 3 | พลาสมิด pNZ307 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> |

เมื่อเชื่อมต่อดีนีเอ็นเอจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5 กับพลาสมิด pNZ207 ในอัตราส่วน พลาสมิด ต่อ ดีนีเอ็นเอ *Lb. reuteri* KUB-AC5 เท่ากับ 1 : 4 แล้วเคลื่อนย้ายดีนีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock พบเซลล์ลูกผสมทั้งหมด 183 โคโลนี ตามทฤษฎีเมื่อคำนวณด้วย โปรแกรม SCIENCE GATEWAY (Bacteria Transformation Efficiency Calculator) พบว่าโอกาสของการได้ยีนที่ต้องการ ที่ระดับความเป็นไปได้ 95% จำเป็นต้อง ได้จำนวนโคลนทั้งหมด 6250 โคโลนี อย่างไรก็ตามผลการสร้างธนาคารยีน ภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น ส่งผลให้ได้เซลล์ ลูกผสมเพียง 183 โคโลนี ซึ่งต่ำกว่าค่าทางทฤษฎี

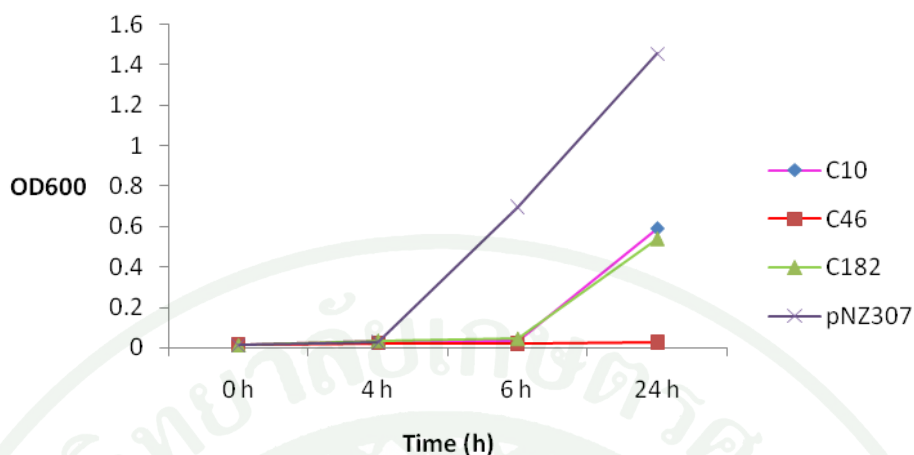
3.4 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

โดยวิธี Micro titer plate Assay พบ เซลล์ลูกผสม 3 โคลน ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งดัง แสดงในตารางที่ 7 ให้ชื่อเป็น *E. coli* ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182

ตารางที่ 7 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของเซลล์ลูกผสมต่อเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003

แหล่งของสารยับยั้ง	OD600	ค่ากิจกรรมยับยั้ง (Au/ml)
<i>E. coli</i> ACE-C10	0.0405	10
<i>E. coli</i> ACE-C46	0.0130	10
<i>E. coli</i> ACE-C182	0.0965	10
<i>E. coli</i> DH5 α ที่มี pNZ307	1.420	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	0.007	10
LB	1.4750	0

การทดสอบผลของสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182 ต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 พบว่า สารเมตาบอไลต์ใน น้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* สายพันธุ์ ACE-C10 และ ACE-C182 มีผลยับยั้งการเจริญของ *S. Enteritidis* S003 ได้ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการทดสอบ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003 ตลอด 24 ชั่วโมงของการทดสอบกิจกรรม ในขณะที่ สารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* ACE-C46 แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ตลอด 24 ชั่วโมงที่ทดสอบกิจกรรม ยับยั้ง ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α สายพันธุ์ ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182

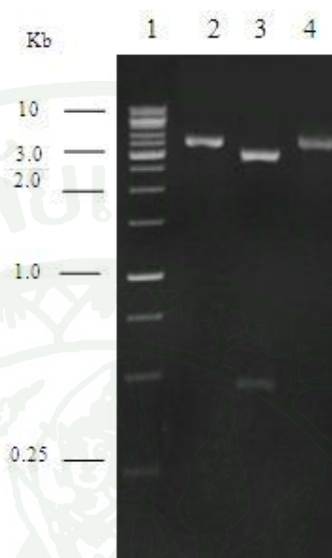
- ◆ แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α สายพันธุ์ ACE-C10
- แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α สายพันธุ์ ACE-C46
- ▲ แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α สายพันธุ์ ACE-C182
- × แทน การเจริญของเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* Enteritidis S003 ที่ทดสอบด้วยสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pNZ307

4. สมบัติของเซลล์ลูกผสม ACE-C10

4.1 ขนาดของจีนดิเอ็นเอในพลาสมิดลูกผสม pACE-C10

ศึกษาด้วยปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PstI* พบว่า เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน *E. coli* ACE-C10 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* พบแถบดีเอ็นเอ ปรากฏ 1 แถบ ขนาด 4200 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะต่อ *EcoRI* ไม่ปรากฏในจีนดิเอ็นเอ ขณะที่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *PstI* พบแถบดีเอ็นเอ ปรากฏ 2 แถบ ขนาด 3700 คู่เบส และ 500 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 22 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะต่อ *PstI* ใน

ชิ้นดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์ที่เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pNZ307 จึงมีขนาด 1097 คู่เบส



ภาพที่ 22 ดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C10 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- | | |
|-----------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 Kb DNA marker |
| ช่องที่ 2 | pACE-C10 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI |
| ช่องที่ 3 | p ACE-C10 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI และ <i>Pst</i> I |
| ช่องที่ 4 | pACE-C10 ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI และ <i>Pst</i> I |

4.2 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ pACE-C10

นำโคลนที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลน *E. coli* ACE-C10 มีขนาด 1140 คู่เบส (ภาพที่ 23) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1097 คู่เบส)

GAATTCGAGCTCGGTACCTCGAGCTCGGTACCGGGACCTGATCCGTCGTTTCCCTTTCT
 CAATAAGTTCAATGAGTTTATGCATTAATTACTTTGCTCCTCTTTTATAAAGTTGATGA
 GGTGATGAATCACATCTTTTAATAAGATCGTAGTCATCAAGTGATCCTGACCATGCATCA
 TAGTAACACTGTATGGAAGTTCCTCCCCAGAAGCTTCTCGAGCCACATACCTGTCTGAG
 AACTGTGAGCCTCTGCAATACAGCTTCCTGCTTCTACTACAAGACTATCTGCCTTAGCGA
 AATCACCATTTTCAGCCGCTTTAAGCGCTTCTAAAAGCTTAGAGCGAGCATCTCCAGCAT
 AAGCAACAATTTCAAACCCTAAGAGAGTCATCTCTTCTCTGTTCAACAATATCCTCCG
 TTTTATGTTTTACTATACTTTATCAGTCCATGGACGGATCAGTCGACCTGCAGGCATGC
 AAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA
 ACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG
 CACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTA
 TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAAT
 CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCC
 CTGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
 CTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGT
 GATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGGGG
 CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAA
 TATGTTATCCGCTCATGAGACCAATAACCCTGAATAAATGCTTCAATAATTATTGAAAA
 AGGAAGGAGGTATTGAGGTATTCAACATTTTCCGNTTGTGTTGGCAGCAAAGGGAAAGAG

ภาพที่ 23 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C10
 ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบส

4.3 วิเคราะห์ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ของลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ pACE-C10

เมื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
 จำนวน 40 เอนไซม์ ดังนี้ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 5 ตำแหน่ง คือ *Drd1* เอนไซม์ตัด
 จำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง คือ *Aat2 Acc65 Afe1 ApaL1 Ase1 BfrB1 Bmr1 Bpm1 Bpu10*
Bsa1 BseR1 BsmB1 BspH1 BspM1 BsrB1 BssS1 BstAP Ear1 Ecl2 EcoR1 Fsp1 Hind3 Kas1
Kpn1 Nar1 Nco1 Nde1 Nsi1 Psi1 Pvu1 Pvu2 Sac1 Sal1 Sbf1 SpAcc SpDon Sph1 Xho1 เอนไซม์
 ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 11 ตำแหน่ง คือ *Bgl1* (Web Map Preferences) ดังแสดงในภาพที่ 24
 เห็นได้ว่าตำแหน่งตัดจำเพาะของ *EcoR1* และ *PstI* อยู่ในส่วนของ cloning site ของพลาสมิด
 pNZ307



ภาพที่ 24 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C10 โดยแสดงลำดับเบสตำแหน่งที่ 1 ของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 8 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C10

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C10		ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)		
<i>Aat2</i>	953		186		
<i>Acc65</i>	13	27	13	14	1112
<i>AfeI</i>	326	1189	326	813	
<i>ApaLI</i>	703	1139	703	436	

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C10				ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)			
<i>AseI</i>	85	1139			1054	85		
<i>BfrB1</i>	82	175	1139		964	93	82	
<i>BglI</i>	636	1139			636	503		
<i>BmrI</i>	636	1139			613	526		
<i>BpmI</i>	337	1139			802	337		
<i>BsaI</i>	1031	1139			1031	108		
<i>BseR1</i>	88	1139			88	1051		
<i>BsmB1</i>	835	877	1139		835	42	262	
<i>BspH1</i>	927	1033	1139		927	106	106	
<i>BspM1</i>	476	1139			476	663		
<i>BsrB1</i>	1031	1139			1031	108		
<i>BssS1</i>	896,	1139			896	243		
<i>BstAP</i>	702	1139			702	437		
<i>Drd1</i>	460	789	1139		460	329	350	
<i>Ear1</i>	398	585	1139		398	187	554	
<i>Ecl2</i>	9	23	1139		9	14	1116	
<i>EcoR1</i>	1	1139			1	1138		
<i>Fsp1</i>	626	1139			626	513		
<i>Hind3</i>	211	335	481	1139	211	124	146	658
<i>Kas1</i>	645	1139			645	494		

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C10					ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)				
<i>Kpn1</i>	17	31	1139			17	14	1108		
<i>Nar1</i>	646	1139				646	493			
<i>Nco1</i>	449	1139				449	690			
<i>Nde1</i>	698	1139				698	441			
<i>Nsi1</i>	84	177	1139			84	93	962		
<i>Psi1</i>	107	1139				107	1032			
<i>Pvu1</i>	607	1139				607	532			
<i>Pvu2</i>	576	1139				576	563			
<i>Sac1</i>	11	25	1139			11	14	1114		
<i>Sal1</i>	463	1139				463	676			
<i>Sbf1</i>	473	1139				473	666			
<i>SpAcc</i>	210	378	516	919	1139	210	168	138	403	220
<i>SpDon</i>	406	434	506	1139		406	28	72	633	
<i>Sph1</i>	479	1139				479	479	660		
<i>Xho1</i>	18	217	1139			18	199	922		

4.4 เปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอภายใน pACE-C10 กับฐานข้อมูล

เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอจากเซลล์ลูกผสมเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอจากโครโมโซมของ *L. reutei* KUB-AC5 ที่เชื่อมต่อกับ พลาสมิด pNZ307 ในเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C10 ขนาด 1140 คู่เบส นั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ พลาสมิดของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C10 กับฐานข้อมูล Blastx พบว่า ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวของเซลล์ลูกผสมโคลน *E. coli* ACE-C10 คล้ายคลึงกับ ลำดับเบส โปรโมเตอร์ในการสังเคราะห์โปรตีน ampicillin resistance protein ของพลาสมิด pAm08CQ3205 และลำดับเบสของยีนในการสังเคราะห์โปรตีน ampicillin resistance protein ของ

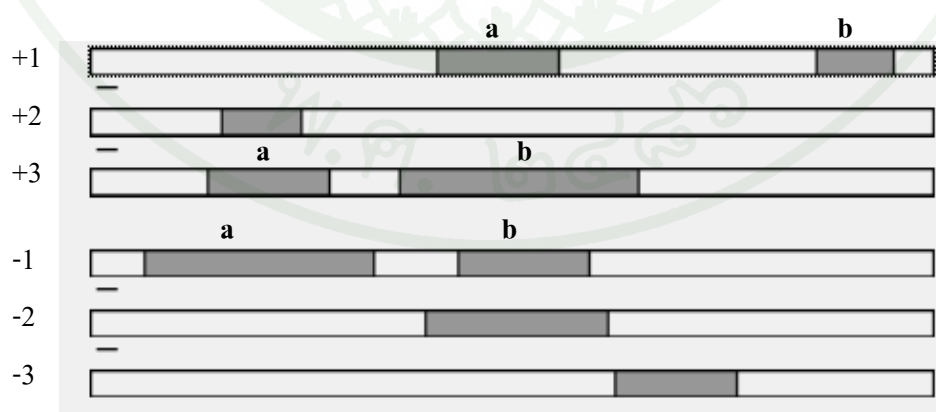
พลาสมิด pESPAC ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งโปรตีน ampicillin resistance protein ของ *E. coli* มีผลยับยั้งการเจริญของ *Salmonella enteritrica* (Micheal *et al.*, 2009)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิดลูกผสม pACE-C10 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx

Accession no.	เชื้อจุลินทรีย์	ยีน	Bit score	e-value	Identity (%)
GQ149346.1	<i>Escherichia coli</i> plasmid pAm08CQ3205	<i>Amp^r</i> promoter	1136	0.0	98
EU718182.1	Expression vector pESPAC	<i>Amp^r</i>	1136	0.0	98

4.5 วิเคราะห์ Open Reading Frame ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C10

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C10 ด้วยโปรแกรม ORFinder พบว่าเฟรมการอ่านของยีนที่เป็นได้ ในการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมด 9 เฟรม คือ เฟรม +1a, +1b, +2, +3a, +3b, -1a, -1b, -2, -3 ดังแสดงในภาพที่ 25 และลำดับกรดอะมิโนของแต่ละเฟรมแสดงในตารางที่ 10



ภาพที่ 25 Open Reading Frame ของชิ้นดีเอ็นเอ *E. coli* ACE-C10

ตารางที่ 10 ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ *E. coli* ACE-C10

ORF	ตำแหน่ง	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาดของโปรตีน (กิโลดาลตัน)
+1a	460 – 618	MQAWHWPSFY NVVTGKTLAL PNLIALQHIP LSPAGVIAKR PAPIALPNSC AA	5.9
+1b	958 - 1059	MEVPPQKLL E PTYLSENCEP LQYSFLLLLLQ DYL P	4.4
+2	176 - 280	MEVPPQKLL E PTYLSENCEP LQYSFLLLLLQ DYL P	4.3
+3a	157 - 317	MHHSNTVWKF LPRSFSQHT CLRTVSLCNT ASCFYYKTIC LSEITIFSRF KRF	6.9
+3b	408 – 722	MFLLYFISPW TDQSTCRHAS LALAVVLQRR DWENPGVTQL NRLAAHPPFA SWRNSEEART DRPSQQLRSL NGEWRLMYFL LTHLCGISHR IWCTLSTICS DAA	12.8
-1a	72 - 374	MTLLGFEIVA YAGDARSKLL EALKAAENGD FAKADSLVVE AGSCIAEAHS SQTGMLAREA SGEELPYSVT MMHGQDHLMT TILLKDVIHH LIELYKRGAK	11.6
-1b	486 - 659	MRKEKIPHQA PFAIQAAQLL GRAIGAGLFA ITPAGERGMC CKAIKLGNAR VFPVTTL	6.5
-2	443 - 682	MRCEIPHRCV RRKYRIRRH S PFRLRNCWEG RSVRASSLLR QLAKGGCAAR RLSWVTPGFS QSRCKTTAS AKLACLQVD	10.0
-3	694 - 852	MTVKTSDTCS SRRRSQLVCK RMPGADKPVR ARQRVLAGVG AGLTMRHQSR LY	6.3

พบเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันทั้งหมด 7 เฟรม ดังแสดงในตารางที่ 11 คือ เฟรม +1a ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 159 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 52 กรดอะมิโน

เฟรม +3a เป็นยีนที่มีขนาด 162 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 53 กรดอะมิโน เฟรม +3b เป็นยีนที่มีขนาด 315 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 104 กรดอะมิโน

เฟรม -1a เป็นยีนที่มีขนาด 303 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 100 กรดอะมิโน เฟรม -1b เป็นยีนที่มีขนาด 174 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 57 กรดอะมิโน

เฟรม -2 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 240 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 79 กรดอะมิโน

เฟรม -3 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 159 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 52 กรดอะมิโน

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ *E. coli* ACE-C10 กับข้อมูลใน GenBank

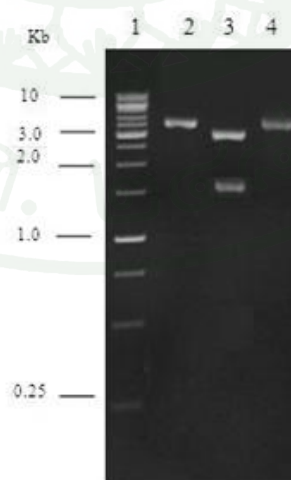
ORF	Accession No.	ยีน	เชื้อจุลินทรีย์	% Identity
+1a	AAA56734.1	non-functional lacZ alpha peptide	unidentified cloning vector	100
+3a	XP_001541233.1	predicted protein	Ajellomyces capsulatus NAml	41
+3b	PRK09525	beta-D-galactosidase	cloning vector	100
-1a	YP_004761516.1	lactose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
-1b	YP_004205980.1	hypothetical protein BSn5_11685	<i>Bacillus subtilis</i> BSn5	100
-2	GAA30512.1	LacOPZ-alpha peptide from pUC9	cloning vector pUC9	65
-3	AAA75561.1	lac repressor, partial	unidentified cloning vector	65

วิเคราะห์ความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนของเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาด ใกล้เคียง 4.7 กิโลดาลตัน ดังแสดงในตารางที่ 11 พบเฟรม +1a และ +3b มีความเหมือนกับยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ beta-D-galactosidase ที่ระดับ 100 % ขณะที่เฟรม -1a มีความเหมือนกับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ lactose-specific phosphotransferase enzyme IIA component ของ *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ที่ระดับ 100 % นอกจากนั้นยังพบเฟรม -1b มีความเหมือนกับยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein BSn5_11685 ของเชื้อ *Bacillus subtilis* BSn5 ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเห็นได้ว่ายีน ควบคุมการสร้าง hypothetical protein BSn5_11685 ของ *Bacillus subtilis* BSn5 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ มีความเป็นไปได้ในการแสดงออก สารยับยั้งที่มีกิจกรรมต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* ACE-C46

5. สมบัติของเซลล์ลูกผสม ACE-C182

5.1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิดลูกผสม pACE-C182

เมื่อทำการตัดพลาสมิดลูกผสม pACE-C182 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 1 แถบ ขนาด 4500 bp และเมื่อตัดพลาสมิดลูกผสม C182 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *PstI* พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 2 แถบ ขนาด 4000 bp และ 500 bp ดังแสดงในภาพที่ 26 ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* แบบไม่สมบูรณ์ที่เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pNZ307 จึงมีขนาด 1397 bp



ภาพที่ 26 ดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C182 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์

- ช่องที่ 1 1 Kb DNA marker
- ช่องที่ 2 pACE-C182 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI
- ช่องที่ 3 pACE-C182 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ PstI
- ช่องที่ 4 pACE-C182 ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ PstI

5.2 ลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอของ pACE-C182

นำโคลนที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลน *E. coli* ACE-C182 ขนาด 1613 คู่เบส (ภาพที่ 27)

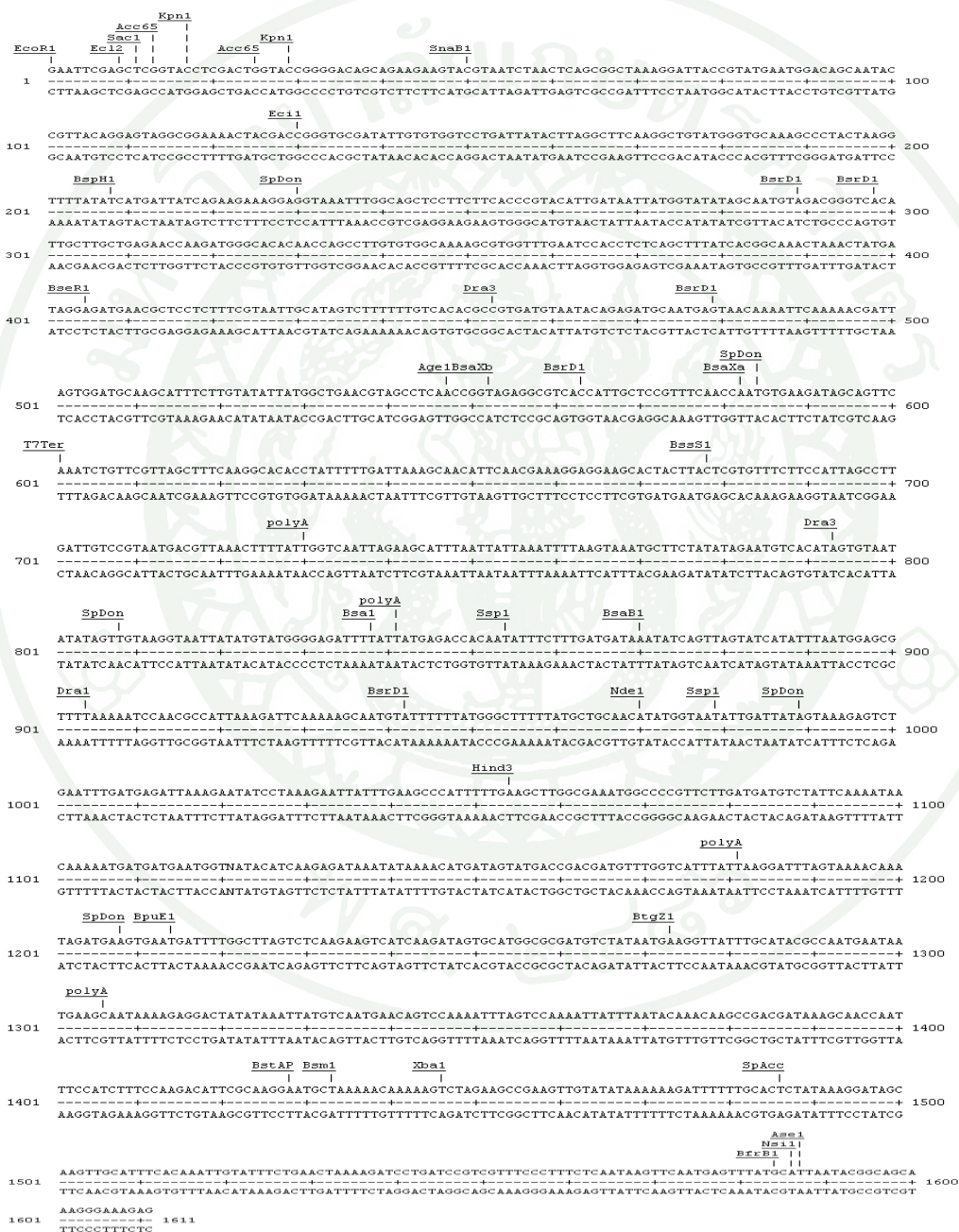
```
GAATTCGAGCTCGGTACCTCGACTGGTACCGGGGACAGCAGAGAAGTAAGTAATCTAAC
TCAGCGGCTAAAGGATTACCGTATGAATGGACAGCAATACCGTTACAGGAGTAGGCGGAAACTA
CGACCGGGTGGATATTGTGTGCTCTGATTATACTTAGGCTTCAAGGCTGTATGGGTGCAAGC
CCTACTAAGGTTTATATCATGATATTCAGAAGAAAGGAGGTAAATTTGGCAGCTCCTTCTTCAC
CCGTACATTGATAATTATGGTATATAGCAATGTAGACGGGTCACTTGTCTTGTGAGAACCAAGA
TGGGCACACAAACAGCCTTGTGTGGCAAAAGCGTGGTTTGAATCCACCTCTCAGCTTTATCACGG
CAAACTAAACTATGATAGGAGATGAACGCTCCTCTTTTCGTAATTGCATAGTCTTTTGTGCACAC
GCCGTGATGTAATACAGAGATGCAATGATTAACAAAATTCAAAAACGATTAGTGATGCAAGCAT
TTCTTGTATATTATGGCTGAACGTAGCCTCAACCGGTAGAGGCGTCAACCATTGCCTCGTTCACAC
CAATGTGAAGATAGCAGTTCAAATCTGTTCTTGTAGCTTTCAAGGCACACCTATTTTGTATTAAAG
CAACATTCAACGAAAGGAGGAAAGCACTACTTACTCGTGTCTTCTCCATTAGCCTTGATTGTCCGT
AATGAOGTTAACTTTTATGGTCAATTTAGAAGCATTTAATTATTAATTTTAAGTAAATGCTTC
TATATAGAAATGTACATAGTGAATATATAGTTGTAAAGGTAATTATATGTATGGGGAGATTTTAT
TATGAGACCAATATTTCTTTGATGATAAATATCAGTTAGTATCATATTTAATGGAGCGTTTAA
AAAAATCCAAAGCCATTAAAGATCAAAAAGCAATGTATTTTATGAGCTTTTATGCTGCAACA
TATGGTAAATATTGATTATAGTAAAGAGTCTGAATTTGATGAGATTAAGGAATATCCTAAAGAAAT
ATTTGAAGCCCATTTTGAAGCTTGGCGAAAAGGCGCGTCTTGTATGATGTCTATTCAAAATAA
CAAAAATGATGATGAATGGTATACATCAAGAGATAAATATAAAACATGATAGTATGACCGACGA
TGTTTGGTCATTATTAAGGATTTAGTAAAAAATAATAGATGAAGTGAATGATTTTGGCTTAGTCT
CAAGAAGTCATCAAGATAGTGCATGGCGGATGTCTATAATGAAGGTTATTTGCATACGCCAATG
AATAATGAAGCAATAAAAGAGGACTATATAAATTATGTCAATGAACAGTCCAAAATTTAGTCCAA
AATTATTTAATACAAACAAAGCGGAGATAAAGCAACCAATTTCCATCTTCCAAAGACATTCGCA
GGAATGCTAAAAACAAAAGTCTAGAGCGGAGTTGTATATAAAAAGATTTTTCAGCTCTAT
AAAGGATAGCAAGTTGCATTTACAAAATTGTATTCTGAACATAAAGATCCTGATCGTGTATTC
CCTTTCTCAATAAGTTCAATGAGTTTATGCATTAATACGGCAGCAAGGGAAAGAG
```

ภาพที่ 27 ลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C182 โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบส

5.3 วิเคราะห์ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ของ ลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอของ pACE-182

เมื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 28 และตารางที่ 12 พบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 26 เอนไซม์ ดังนี้ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่ง

จดจำ 6 ตำแหน่ง คือ *Acc65* *Age1* *Ase1* *BfrB1* *BpuE1* *Bsa1* *BsaB1* *BsaXa* *BsaXb* *BseR1* *Bsm1* *BspH1* *BsrD1* *BssS1* *BstAP* *BtgZ1* *Dra1* *Dra3* *Eci1* *Ecl2* *EcoR1* *Hind3* *Kpn1* *Nde1* *Nsi1* *Sac1* *SnaB1* *SpAcc* *SpDon* *Ssp1* *T7Ter* *Xba1* (Web Map Preferences) โดยมีตำแหน่งตัดจำเพาะของ *EcoR1* และ *PstI* อยู่ในส่วนของ cloning site ของพลาสมิด pNZ307 จึงได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1600 bp ขณะที่ไม่พบตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *PstI*



ภาพที่ 28 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในขึ้นดีเอ็นเอ pACE-C182 โดยแสดงลำดับเบสตำแหน่งที่ 1 ของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 12 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C182

เอนไซม์	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C182					ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)				
ตัดจำเพาะ										
<i>Acc65</i>	13	25	1611			13	12	1586		
<i>Age1</i>	547					547	1064			
<i>Ase1</i>	1587	1611				1587	24			
<i>BfrB1</i>	1584	1611				1584	27			
<i>BpuE1</i>	1214	1611				1214	397			
<i>Bsa1</i>	838	1611				838	773			
<i>BsaB1</i>	870	1611				870	741			
<i>BsaXa</i>	582	1611				582	1029			
<i>BsaXb</i>	552	1611				552	1059			
<i>BseR1</i>	405	1611				405	1206			
<i>Bsm1</i>	1433	1611				1433	178			
<i>BspH1</i>	208	1611				208	1403			
<i>BsrD1</i>	289	298	479	563	942	289	9	181	84	379 669
<i>BssS1</i>	678	1611				678	933			
<i>BstAP</i>	1428	1611				1428	183			
<i>BtgZ1</i>	1273	1611				1273	338			
<i>Dra1</i>	904	1611				904	707			
<i>Dra3</i>	453	793	1611			453	340	818		
<i>Eci1</i>	130	1611				130	1481			
<i>Ecl2</i>	9	1611				9	1602			
<i>EcoR1</i>	1	1611				1	1610			
<i>Hind3</i>	1054	1611				1054	557			
<i>Kpn1</i>	17	29	1611			17	12	1582		

ตารางที่ 12 (ต่อ)

เอนไซม์	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C182						ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)			
ตัดจำเพาะ										
<i>Nde</i> I	970	1611					970	641		
<i>Nsi</i> I	1586	1611					1586	25		
<i>Sac</i> I	11	1611					11	1600		
<i>Sna</i> BI	50	1611					50	1561		
<i>Sp</i> Acc	1486	1611					1486	125		
<i>Sp</i> Don	230	584	808	989	1208		230	354	224	181 219
<i>Ssp</i> I	854	979	1611				854	125	632	
<i>T7</i> Ter	601	1611					601	1010		
<i>Xba</i> I	1446	1611					1446	165		

5.4 เปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอภายใน pACE-C182 กับฐานข้อมูล

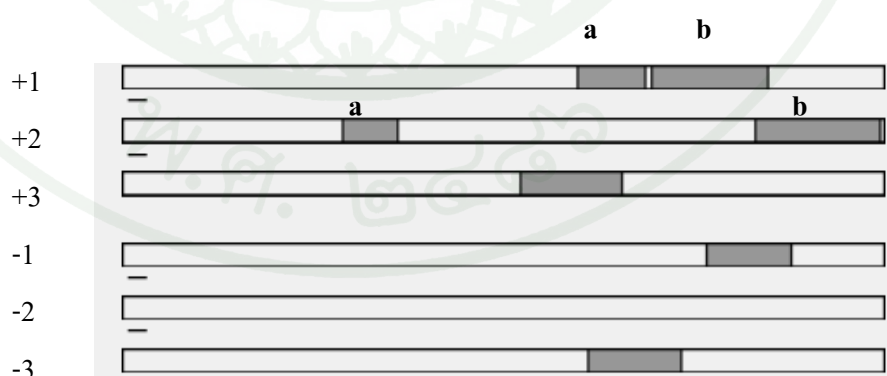
ชิ้นดีเอ็นเอจากโครโมโซมของ *L. reutei* KUB-AC5 ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pNZ307 ในเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C182 ขนาด 1581 คู่เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C182 กับฐานข้อมูล Blastx พบว่า ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C182 มีความเหมือนต่ำเพียง 31-59% ต่อยีนของ hypothetical protein LfarK3_11909 ของเชื้อ *Lactobacillus farciminis* KCTC3681 ยีน gp24 ของ Brochothrix phage BL3 ยีน conserved hypothetical protein ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* M23864:W1 และ ยีน hypothetical protein lb338_phage_50 ของเชื้อ *Lactobacillus* phage Lb338-1 ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิดลูกผสม pACE-C182 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx

Accession no.	เชื้อจุลินทรีย์	ยีน	Bit score	e-value	Identity (%)
<u>ZP_08577804.1</u>	<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC3681	hypothetical protein LfarK3_11909	241	2e-40	59
<u>YP_004301558.1</u>	Brochothrix phage BL3	gp24	73.2	2e-21	38
<u>ZP_04817323.1</u>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> M23864	hypothetical protein	36.8	1e-18	31
<u>YP_002790729.1</u>	<i>Lactobacillus</i> phage Lb338-1	hypothetical protein	66.6	4e-18	37

5.5 วิเคราะห์ Open Reading Frame ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C182

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C182 ด้วยโปรแกรม ORFinder พบว่าเฟรมการอ่านของยีนที่เป็นได้ในการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมด 6 เฟรมด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 29 และตารางที่ 14



ภาพที่ 29 Open Reading Frame ของ *E. coli* ACE-C182 ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ORFinder

ตารางที่ 14 ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ *E. coli* ACE-C182

ORF	ตำแหน่ง	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาดของโปรตีน (กิโลดาลตัน)
+1a	946 - 1086	MLQHMVILII VKSLNLMRLK NILKNYLKPI FEAWRNGPVL DDVYSK	5.9
+1b	1102 - 1341	MVIHQEINIK HDSMTDDVWS FIKDLVKQID EVNDFGLVSR SHQDSAWRDV YNEGYLHTPM NNEAIKEDYI NYVNEQSKI	10.0
+2a	461 - 574	MSNKIQKRLV DASISCILWL NVASTGRGVT IAPFQPM	4.4
+2b	1316 - 1576	MSMNSPKFSP KLFNTNKPTI KQPISIFPRH SQGMLKTKSL EAEVVYKKDF LHSIKDSKLH FTNCISELKD PDPSFPFLNK FNEFMH	10.8
+3	828 - 1040	MRPQYFFDDK YQLVSYLMER FKNPTPLKIQ KAMYFLWAFY AATYGNIDYS KESEFDEIKE YPKELFEAHF	9.3
-1	1216 - 1392	MEIGCFIVGL FVLNNFGLNF GLFIDIIYIV LFYCFIIHWR MQITFIIDIA PCTILMTS	7.4
-3	971 - 1162	MTKHRRSYH VLYLSLDVPF IIIFVILNRH HQERGHFAKL QKWASNNSLG YSLISSNSDS LL	7.7

ทั้งนี้มีเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาด 4.7 กิโลดาลตัน นั่นคือ เฟรม +1b ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 240 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 79 กรดอะมิโน

เฟรม +2b ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 261 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 86 กรดอะมิโน

เฟรม +3 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 213 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 70 กรดอะมิโน

เฟรม -1 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 177 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 58 กรดอะมิโน

เฟรม -3 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 192 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 63 กรดอะมิโน

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ *E. coli* ACE-C182 กับข้อมูลใน GenBank

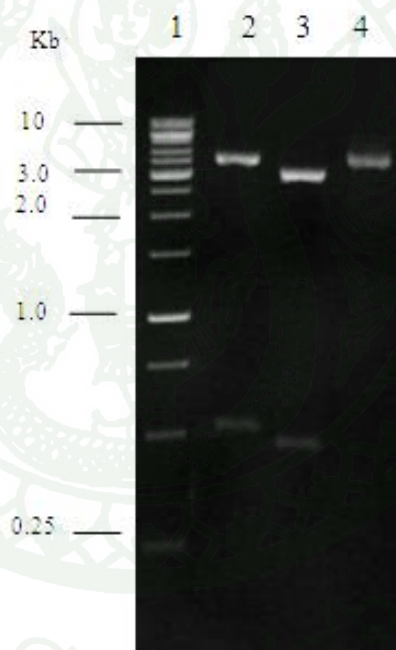
ORF	Accession No.	ยีน	เชื้อจุลินทรีย์	% Identity
+1b	ZP_08577804.1	hypothetical protein LfarK3_11909	<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC 3681	53
+2b	EGV62463.1	hypothetical protein CANTEDRAFT_136403	<i>Candida tenuis</i> ATCC 10573	38
+3	ZP_08577804.1	hypothetical protein LfarK3_11909	<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC 3681	59
-1	ZP_01946569.2	hypothetical protein A35_A0120	<i>Coxiella burnetii</i> 'MSU Goat Q177	32

วิเคราะห์ความ เหมือน ของลำดับกรดอะมิโนของเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นไปได้ขนาด 4.7 กิโลดาลตัน พบ 4 เฟรม ซึ่งมีความเหมือนต่ำเพียง 32-59% คือ ยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein LfarK3_11909 ของเชื้อ *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681 ยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein CANTEDRAFT_136403 ของเชื้อ *Candida tenuis* ATCC 10573 ยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein LfarK3_11909 ของเชื้อ *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681 และยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein A35_A0120 ของเชื้อ *Coxiella burnetii* 'MSU Goat Q177 ดังแสดงในตารางที่ 15 จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ไม่สามารถสรุปตำแหน่งของยีนจากเชื้อ *E. coli* ACE-C182 ซึ่งแสดงกิจกรรมการยับยั้งต่ำ

6. สมบัติของเซลล์ลูกผสม ACE-C46

6.1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิดลูกผสม pACE-C46

เมื่อทำการตัดพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 2 แถบ ขนาด 4300 bp และ 150 bp ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จดจำโดย *EcoRI* มี 2 ตำแหน่งคือ บริเวณ cloning site และภายในชิ้นดีเอ็นเอ และเมื่อตัดพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *PstI* พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 3 แถบ ขนาด 3800 bp 500 bp และ 150 bp ดังนั้นชิ้น ดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* แบบไม่สมบูรณ์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pNZ307 จึงมีขนาด 1347 bp (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 ดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์

- | | |
|-----------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 Kb DNA marker |
| ช่องที่ 2 | pACE-C46 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> |
| ช่องที่ 3 | pACE-C46 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>PstI</i> |
| ช่องที่ 4 | pACE-C46 ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>PstI</i> |

6.2 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ pACE-C46

นำโคลนที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลน *E. coli* ACE-C46 ขนาด 1613 คู่เบส (ภาพที่ 31) ซึ่งต่างจากวิธี การวัดขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ประมาณ 300 คู่เบส

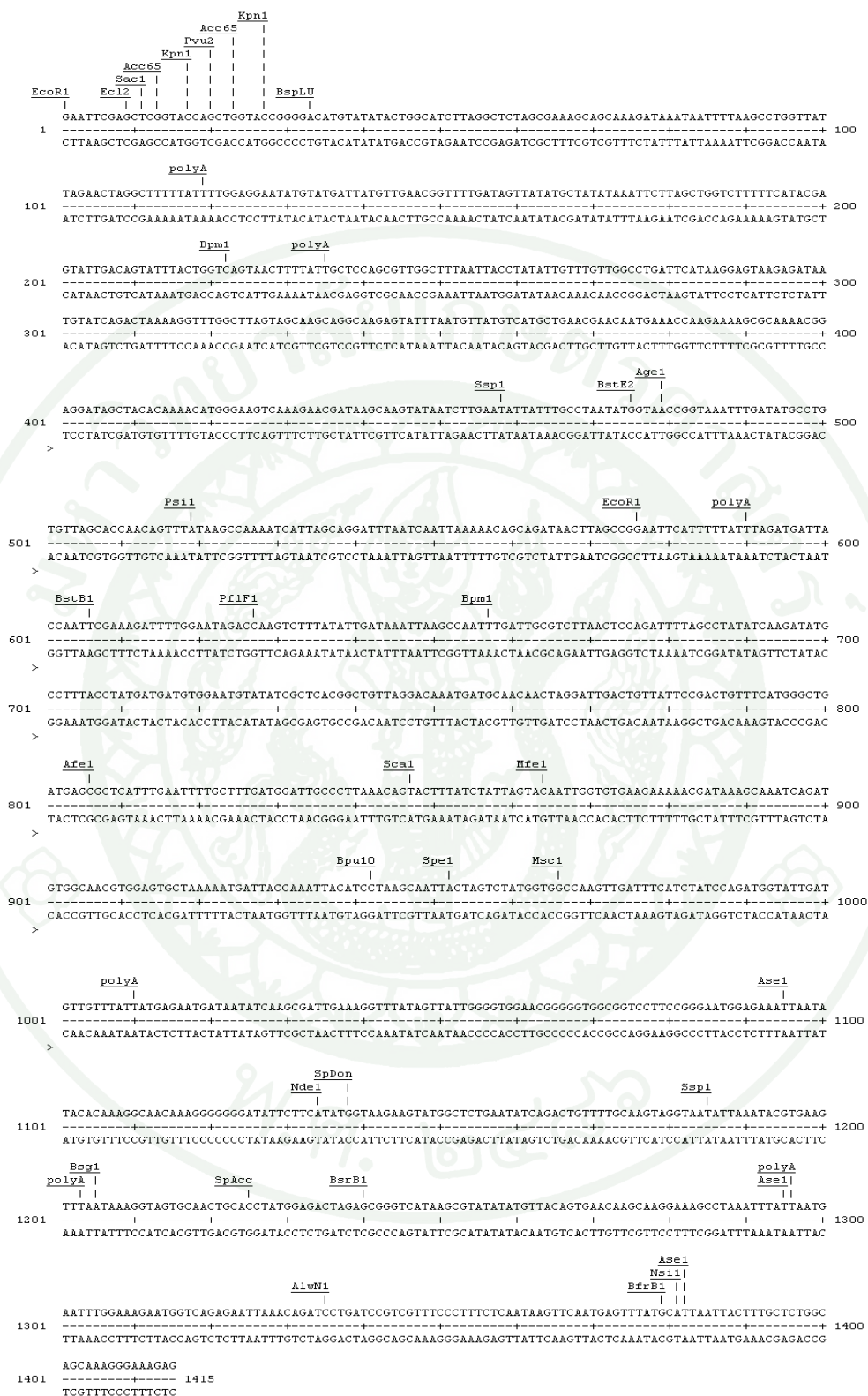
```
GAATTCGAGCTCGGTACCGCTGGTACCGGGGACATGTATATACTGGCATCTTAGGCTCT
AGCGAAAGCAGCAAAGATAAATAATTTTAAGCCTGGTTATTAGAACTAGGCTTTTTATTT
TGGAGGAATATGTATGATTATGTTGAACGGTTTTGATAGTTATATGCTATATAAATTCCTT
AGCTGGTCCTTTTTCATACGAGTATTGACAGTATTTACTGGTCAGTAACCTTTATTGCTCC
AGCGTTGGCTTTAATTACCTATATTGTTTGTGGCCTGATTCATAAGGAGTAAGAGATAA
TGTATCAGACTAAAAGGTTTGGCTTAGTAGCAAGCAGGCAAGAGTATTTAATGTTATGTC
ATGCTGAACGAACAATGAACCAAGAAAAGCGCAAAACGGAGGATAGCTACACAAAACAT
GGGAAGTCAAAGAACGATAAGCAAGTATAATCTGAATATTATTTGCCTAATATGGTAAC
CGGTAAATTTGATATGCCTGTGTAGCACCAACAGTTTATAAGCCAAAATCATTAGCAGG
ATTTAATCAATTAAAAACAGCAGATAACTTAGCCGGAATTCATTTTTATTATAGATGATTA
CCAATTCGAAAGATTTTGGAAATAGACCAAGTCTTTATATTGATAAATTAAGCCAATTTGA
TTGCGTCTTAACTCCAGATTTTAGCCTATATCAAGATATGCCTTTACCTATGATGATGTG
GAATGTATATCGCTCACGGCTGTAGGACAAATGATGCAACAACTAGGATTGACTGTTAT
TCCGACTGTTTCATGGGCTGATGAGCGCTCATTTGAATTTTGCTTTGATGGATTGCCCTT
AAACAGTACTTTATCTATTAGTACAATTGGTGTGAAGAAAACGATAAAGCAAATCAGAT
GTGGCAACGTGGAGTGCTAAAAATGATTACCAAAATTACATCCTAAGCAATTACTAGTCTA
TGGTGGCCAAGTTGATTTTCATCTATCCAGATGGTATTGATGTTGTTTATTATGAGAATGA
TAATATCAAGCGATTGAAAGGTTTATAGTTATTGGGGTGGAAACGGGGGTGGCGGTCCTTC
CGGGAATGGAGAAATTAATATACACAAAGGCAACAAAGGGGGGGATATTCTTCATATGGT
AAGAAGTATGGCTCTGAATATCAGACTGTTTTCGAAGTAGGTAATATTAATACGTGAAG
TTTAATAAAGGTAGTGCAACTGCACCTATGGAGACTAGAGCGGGTCATAAGCGTATATAT
GTTACAGTGAACAAGCAAGGAAGCCTAAATTTATTAATGAATTTGGAAGAATGGTCAG
AGAATTAAACAGATCCTGATCCGTCGTTTCCCTTTCTCAATAAGTTCAATGAGTTTATGC
ATTAATTACTTTGCTCTGGCAGCAAAGGGAAGAG
```

ภาพที่ 31 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ *L. reutei* KUB-AC5 ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบส

6.3 วิเคราะห์ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ของลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของ pACE-C46

เมื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 26 เอนไซม์ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง คือ *Acc65 AfeI AgeI AlwNI AseI BfrBI BpmI Bpu10 BsgI BspLU BsrBI BstBI BstE2 EcoRI KpnI MfeI MscI NdeI NsiI PflFI PsiI ScaI SpAcc SpDonI SspI* (Web Map Preferences) โดยมีตำแหน่งตัดจำเพาะของ *EcoRI* อยู่ในส่วนของ cloning site ของพลาสมิด pNZ307 และภายในชิ้นยีนอีก 1 ตำแหน่ง

เนื่องจากภายในลำดับเบสของพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 นั้นพบตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีผลทำให้เมื่อทดสอบตัดเวกเตอร์ลูกผสมด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้วจะพบแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 2 แถบด้วยกัน คือ ขนาด 4000 bp และ 500 bp (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C46 โดยแสดงลำดับเบสตำแหน่งที่ 1
 ของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 16 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในชิ้นดีเอ็นเอ pACE-C46

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C10				ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)			
<i>Acc65</i>	13	23	1415		13	10	1392	
<i>Afe1</i>	806	1415			806	609		
<i>Age1</i>	479	1415			479	936		
<i>AlwN1</i>	1335	1415			1335	80		
<i>Ase1</i>	1095	1295	1382	1415	1095	200	87	33
<i>BfrB1</i>	1379	1415			1379	36		
<i>Bpm1</i>	222	657	1415		222	435	758	
<i>Bpu10</i>	942	1415			942	473		
<i>Bsg1</i>	1205	1415			1205	210		
<i>BspLU</i>	33	1415			33	1382		
<i>BsrB1</i>	1240	1415			1240	175		
<i>BstB1</i>	606	1415			606	809		
<i>BstE2</i>	475	1415			475	940		
<i>Ecl2</i>	9	1415			9	1406		
<i>EcoR1</i>	1	576	1415		1	575	839	
<i>Kpn1</i>	17	27	1415		17	10	1388	
<i>Mfe1</i>	864	1415			864	864	551	
<i>Msc1</i>	966	1415			966	449		
<i>Nde1</i>	1134	1415			1134	281		
<i>Nsi1</i>	1381	1415			1381	34		
<i>PflF1</i>	627	1415			627	788		
<i>Psi1</i>	519	1415			519	896		
<i>Pvu2</i>	20	1415			20	1395		

ตารางที่ 16 (ต่อ)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดภายใน pACE-C10			ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)		
<i>Sca1</i>	847	1415		847	568	
<i>SpAcc</i>	1225	1415		1225	190	
<i>SpDon</i>	1138	1415		1138	277	
<i>Spe1</i>	952	1415		952	463	
<i>Ssp1</i>	458	1185	1415	458	727	230

6.4 เปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอภายใน pACE-C46 กับฐานข้อมูล

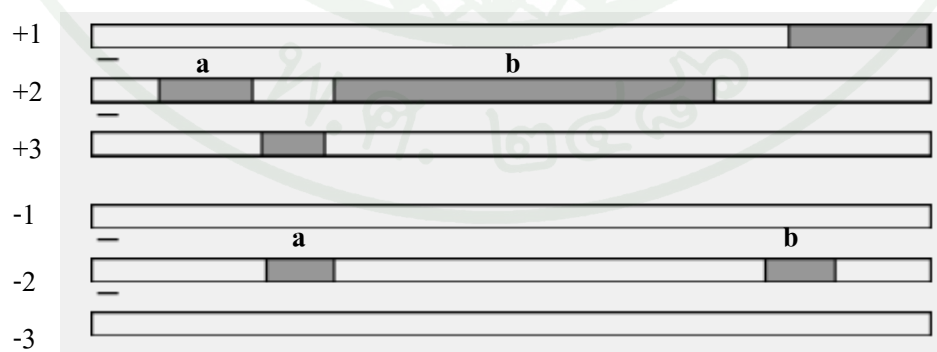
ชิ้นดีเอ็นเอจากโครโมโซมของ *L. reutei* KUB-AC5 ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pNZ307 ในเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 ขนาด 1384 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ผลของการหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Blastx พบว่า ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 นั้นมีลำดับเบสเหมือนกับ hypothetical protein ของเชื้อแบคทีเรีย *L. reuteri* MM4-1A, *L. reuteri* CF48-3A, *L. reuteri* MM2-3 และ *L. reuteri* 100-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (gastrointestinal tract) (Human Microbiome Project : HMP., 2009) ที่ระดับ 88% ดังแสดงใน ตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนดิเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx

Accession no.	เชื้อจุลินทรีย์	ยีน	Bit score	e-value	Identity (%)
ZP_03962405.1	<i>L. reuteri</i> MM4-1A	Conserved hypothetical protein	47.4	0.004	88
ZP_03973535.1	<i>L. reuteri</i> CF48-3A	conserved hypothetical protein	47.4	0.004	88
ZP_03849101.1	<i>L. reuteri</i> MM2-3	conserved hypothetical protein	47.4	0.004	88
ZP_03072541.1	<i>L. reuteri</i> 100-23	conserved hypothetical protein	47.4	0.004	88

6.5 วิเคราะห์ Open Reading Frame ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C46

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนจาก pACE-C46 ด้วยโปรแกรม ORFinder พบว่าเฟรมการอ่านของยีนที่เป็นได้ ในการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมด 6 เฟรมด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 33 และลำดับกรดอะมิโนของแต่ละเฟรม แสดงในตารางที่ 18



ภาพที่ 33 Open Reading Frame ของ *E. coli* ACE-C46 ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ORFinder

ตารางที่ 18 ตำแหน่งและลำดับกรดอะมิโนของ Open Reading Frame ของ *E. coli* ACE-C46

ORF	ตำแหน่ง	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาดของโปรตีน (กิโกลาดตัน)
+1	1153 - 1183	LQVGNIKYVK FNKGSATAPM ETRAGHKRIY VTVNKQGKPK FINEFGKNGQ RIKQILIRRP FSISMSLCIN YFAL	9.0
+2a	116 - 268	MIMLNGFDSY MLYKFLAGLF HTSIDSIYWS VTFIAPALAL ITYIWCWPD	6.2
+2b	401 - 1030	MGSQRTISKY NLEYLPMNV TGKFDMPVLA PTVYKPKSLA GFNQLKTADN LAGIHFYLD YQFERFWNRP SLYIDKLSQF DCVLTPDFSL YQDMPLPMMM WNVYRSRLG QMMQQLGLTV IPTVSWADER SFEFCFDGLP LNSTLSISTI GVKKNDKANQ MWQRGVLKMI TKLHPKQLLV YGGQVDFIYP DGIDVVYYEN DNIKRLKGL	26.2
+3	282 - 389	MYQTKRFGVLV ASRQEYLMMLC HAERTMKPRK AQNGG	4.5
-2a	292 - 42	MFCVAILRFA LFLVSLFVQH DITLNTLACL LLSQTF	4.4
-2b	1114 - 1230	MTRSSLHRCS CTTFIKLHVF NITYLQNSLI FRAILLTI	4.6

ทั้งนี้มีเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาด 4.7 กิโลดาลตัน นั่นคือ เฟรม +1 ซึ่งเป็นยีนที่มีขนาด 231 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 76 กรดอะมิโน

เฟรม +2a เป็นยีนที่มีขนาด 153 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 50 กรดอะมิโน

เฟรม +2b เป็นยีนที่มีขนาด 630 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้โปรตีนขนาด 209 กรดอะมิโน

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเฟรมที่สังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่า
หรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตันของ *E. coli* ACE-C46 กับข้อมูลใน GenBank

ORF	Accession No.	ยีน	เชื้อจุลินทรีย์	% Identity
+1	ZP_07461657.1	conserved hypothetical protein	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 6249	43
+2a	ZP_05553516.1	predicted protein	<i>Lactobacillus coleohominis</i> 101-4-CHN	35
+2b	AEB93122.1	hypothetical protein LJP_0796	<i>Lactobacillus johnsonii</i> DPC 6026	44

วิเคราะห์ความเหมือน กันของลำดับกรดอะมิโนของเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นไปได้ขนาด 4.7 กิโลดาลตัน พบว่าเฟรมการอ่านของยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตัน 3 เฟรม ดังแสดงในตารางที่ 18 คือ เฟรม +1 มีความคล้ายกับยีนควบคุมการสร้าง conserved hypothetical protein ของเชื้อ *Streptococcus mitis* ATCC 6249 เฟรม +2a มีความคล้ายกับยีนควบคุมการสร้าง predicted protein ของเชื้อ *Lactobacillus coleohominis* 101-4-CHN และ เฟรม +2b มีความคล้ายกับยีนควบคุมการสร้าง hypothetical protein LJP_0796 ของเชื้อ *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 มีระดับความเหมือนต่ำเพียง 35-44% อย่างไรก็ตาม เฟรม +2a และ เฟรม +2b นั้นมีความใกล้เคียงกับยีนที่แสดงโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ของเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้เกี่ยวข้องกับสารยับยั้ง นอกจากนั้นเชื้อลูกผสม *E. coli* ACE-C46 สามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงกว่าเชื้อลูกผสมอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือก *E. coli* ACE-C46 เพื่อศึกษาสมบัติทางโปรตีนต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบ ความเหมือน ของลำดับกรดอะมิโนของเฟรมการอ่านของยีน ที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 4.7 กิโลดาลตัน จำนวน 5 เฟรม จากโคลน ACE-C10 ACE-C46 และ ACE-C182 ได้แก่ เฟรม -1b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C10 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ hypothetical protein BSn5_11685 ของเชื้อ *Bacillus subtilis* BSn5 เฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ predicted protein ของเชื้อ *Lactobacillus coleohominis* 101-4-CHN เฟรม +2b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ hypothetical protein

LJP_0796 ของเชื้อ *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 เฟรม +1b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C182 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ hypothetical protein LfarK3_11909 ของเชื้อ *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681 เฟรม +3 ของเซลล์ลูกผสม ACE-C182 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ hypothetical protein LfarK3_11909 ของเชื้อ *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681 ด้วยโปรแกรม ClustalW 2.0 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 34 พบว่าไม่ปรากฏลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของทั้ง 5 เฟรม แสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากแหล่งต่างๆ ไม่มีความสัมพันธ์กัน

```

C46Frame+2b      MGSQRTISKYNLEYYPNMTVTKGKFDMPVLAPTQYKPKSLAGFNQLKTADNLAGIHFYLLD 60
C46Frame+2a      -----MIMLN-----GF-----DS 9
C182Frame+3      -----MRP-----QY-----FFDDK 10
C182Frame+1a      -----
C10Frame-1b      -----MTLLG-----FEIVAYAG-----DARS 17

C46Frame+2b      YQFERFWNRPS-LYIDKLSQFDCVLTDPDFSLYQDMPLPMMWNVYRSRLGQMMQQLGLT 119
C46Frame+2a      YMLYKFLAG---LFHTSID-----SIY-----WSVT---FIAPALALITY- 43
C182Frame+3      YQLVSYLMER---FKNPTP---LKIQKAMY-----FLWAFY---AATYGNIDYS 50
C182Frame+1a      -MLQHMVIL---IIVKSLN-----LMR-----LKNIL---KNYLKPIF- 31
C10Frame-1b      KLEALKAAENGDFAKADS---LVVEAGSCIAEAHS---SQTGMLAR---EASGEELPYS 68
:
C46Frame+2b      VIPTVSWADERSFEFCFDGLPLNSTLSISTIGVKKNDKANQMWQGVLMITKLHPKQLL 179
C46Frame+2a      ---IVCWPS----- 50
C182Frame+3      --KESEFDEIKEYPKELFEAHF----- 70
C182Frame+1a      ---EAWRNGPVLDDVYSK----- 46
C10Frame-1b      --VTMMHGQDHLMTTILLKDVIIHLLIELYKRGAK----- 100
:

C46Frame+2b      VYGGQVDFIYPDGDIVVYVYENDNIKRLKGL 209
C46Frame+2a      -----
C182Frame+3      -----
C182Frame+1a      -----
C10Frame-1b      -----

```

ภาพที่ 34 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจาก open reading frame เฟรม -1b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C10 เฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 เฟรม +2b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 เฟรม +1b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C182 เฟรม +3 ของเซลล์ลูกผสม ACE-C182

จากผลการวิเคราะห์เฟรมการอ่านของยีนของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน ACE-C10 ACE-C46 และโคลน ACE-C182 พบว่า เฟรมการอ่านยีนของโคลนทั้งสาม มีความใกล้เคียงกับยีนควบคุมการสร้างโปรตีนไม่ทราบหน้าที่ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงกิจกรรมการยับยั้ง อย่างไรก็ตาม โคลน ACE-C46 แสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกโคลน ACE-C46 เพื่อศึกษาต่อไป

7. การวิเคราะห์โครงสร้างของจีนีนจาก pACE-C46

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนีนที่โคลนได้จาก *L. reuteri* KUB-AC5 ที่เชื่อมต่อไปในพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 ด้วยโปรแกรม Blastx นั้น พบว่า ลำดับเบสมีความเหมือนกับลำดับเบสของ hypothetical protein ของเชื้อแบคทีเรีย *L. reuteri* MM4-1A *L. reuteri* CF48-3A *L. reuteri* MM2-3 และ *L. reuteri* 100-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกับแหล่งของจีนีนที่เชื่อมต่อไปและสารเมตาบอไลต์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α สายพันธุ์ ACE-C46 แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *S. Enteritidis* S003 ตลอด 24 ชั่วโมงที่ทดสอบกิจกรรมยับยั้ง จึงทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของลำดับเบสของจีนีนที่โคลนได้จากพลาสมิดลูกผสม pACE-C46

จากการวิเคราะห์เฟรมการอ่านของจีนีน พบว่าเฟรม +2a และเฟรม +2b นั้นมีความใกล้เคียงกับจีนีนของแบคทีเรียกรดแลคติกในจีนัส *Lactobacillus* เหมือนกับ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ซึ่งเป็นแหล่งของจีนีนในการโคลนยีนจึงสนใจศึกษาสมบัติของเฟรม +2a และ +2b

7.1 วิเคราะห์ตำแหน่งของ Open Reading Frame +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46

สุเวษวัฒน์กุล (2549) รายงานว่าเมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ KAC5 ด้วยเครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) แสดงสารที่มีมวลโมเลกุลขนาด 4,704.38 และ 4,721.95 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์เฟรมที่มีการสังเคราะห์โปรตีน +2a พบตำแหน่งของเมไธโอนีนตำแหน่งที่ 1 นั้นเป็นลำดับเบสที่ 116 สังเคราะห์ให้โปรตีน ขนาด 50 กรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 35 เมื่อวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนจากลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม PROTEIN CALCULATOR v3.3 พบว่า โปรตีนมีขนาด 6260.37 มีค่า pI เท่ากับ 4.7 ซึ่งเป็นค่าที่มีผลต่อรูปร่างของโปรตีน (Stryer Biochemistry, 3rd edition.) (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้แสดงโปรตีน ให้ชื่อเป็น PACE-C46+2a ใหญ่กว่าโปรตีน KAC5 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 4.7 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถตั้งสมมติฐานว่า PACE-C46+2a เป็น pre-peptide จากกระบวนการตัด leader sequence ด้วยเอนไซม์ serine tyrosine kinases (Cancer Research, 2006) ระหว่าง Serine และ Tyrosine ตำแหน่งที่ 9 และ 10 ตามลำดับ ส่งผลให้ได้ mature peptide ขนาด 4.7 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ YMLYK FLAGL FHTSI DSIYW SVTFI APALA LITYI VCWPD S

```

116 atgattatgttgaacggttttgatagttatatgctatataaattc
    M I M L N G F D S Y M L Y K F
161 ttagctggtctttttcatacagagtattgacagtatttactggtca
    L A G L F H T S I D S I Y W S
206 gtaacttttattgctccagcgttggctttaattacctatatattgtt
    V T F I A P A L A L I T Y I V
251 tgttggcctgattcataa 268
    C W P D S *

```

ภาพที่ 35 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของเฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 ตำแหน่งที่
โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ 1 ขีด คือ start codon และ ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ 2 ขีด คือ
stop codon

เมื่อวิเคราะห์หาลำดับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
จำนวน 1 เอนไซม์ คือ เอนไซม์ *BpmI* ที่ลำดับเบสตำแหน่งที่ 204 ดังแสดงในภาพที่ 36

Genomic map of the ACE-C46 +2a frame. The DNA sequence is shown with a scale from 1 to 1000. The BpmI site is located at position 204, indicated by a vertical line and the label 'BpmI'.

ภาพที่ 36 ตำแหน่งตัดจำเพาะภายในยีนของเฟรม +2a ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46 โดยลำดับเบสที่
ขีดเส้นใต้ 1 ขีด คือ start codon และ ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ 2 ขีด คือ stop codon

7.2 วิเคราะห์หาตำแหน่งของ Open Reading Frame +2b ของเซลล์ลูกผสม ACE-C46

สำหรับเฟรมที่มีการสังเคราะห์โปรตีน +2b พบ โปรตีนขนาด 209
กรดอะมิโน ให้ชื่อเป็น PAC-EC46+2b และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส พบตำแหน่งของ start codon
ที่ตำแหน่งเบสที่ 401 และ stop codon ที่ตำแหน่งเบสที่ 1030 ดังแสดงในภาพที่ 37 เมื่อนำไป
คำนวณขนาดของโปรตีน ด้วยโปรแกรม PROTEIN CALCULATOR v3.3 พบว่า โปรตีน PAC-
EC46+2b มีขนาด 26.2 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 8.31 ซึ่งเป็นค่าที่มีผลต่อรูปร่างของโปรตีน
(Stryer Biochemistry, 3rd edition.)

```

401 atggggaagtcaaaagaacgataagcaaggtataatccttgaatattat
M G S Q R T I S K Y N L E Y Y
446 ttgcctaatatggtaaccggtaaaatttgatatgcctgtgttagca
L P N M V T G K F D M P V L A
491 ccaacagttttataagccaaaatcatttagcaggatttaatacaatta
P T V Y K P K S L A G F N Q L
536 aaaacagcagataaacttagccgggaattcatttttatttagatgat
K T A D N L A G I H F Y L D D
581 taccaattcgaaagatttttggaaatagaccaagtctttatatattgat
Y Q F E R F W N R P S L Y I D
626 aaattaagccaatttgattgctgcttaactccagatttttagccta
K L S Q F D C V L T P D F S L
671 tatcaagatatgcctttacctatgatgatgtggaatgtatatatgc
Y Q D M P L P M M M W N V Y R
716 tcacggctgttaggacaaatgatgcaacaaactaggattgactgtt
S R L L G Q M M Q Q L G L T V
761 attccgactgtttcatgggctgatgagcgcctcatttgaattttgc
I P T V S W A D E R S F E F C
806 tttgatggattgccccttaaaccagtactttatctatttagtacaatt
F D G L P L N S T L S I S T I
851 ggtgtggaagaaaaacgataaaagcaaatcagatgtggcaacgtgga
G V K K N D K A N Q M W Q R G
896 gtgctaaaaatgattaccaaaattacatcctaagcaattactagtc
V L K M I T K L H P K Q L L V
941 tatgggtggccaagttgatcttcatctatccagatgggtatttgatgtt
Y G G Q V D F I Y P D G I D V
986 gttttattatgagaatgataatatcaagcgattgaaagggtttatag 1030

```

ภาพที่ 37 ลำดับเบสยีนและลำดับกรดอะมิโนของยีนในตำแหน่ง AC-EC46+2b ของ pACE-C46

โดย ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ 1 ขีด คือ start codon และ ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ 2 ขีด คือ stop codon

เมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 14 เอนไซม์ คือ เอนไซม์ *Afe1* *Age1* *Bpm1* *Bpu10* *BstB1* *BstE2* *EcoR1* *Mfe1* *Msc1* *PflF1* *Psi1* *Sca1* *Spe1* *Ssp1* (ภาพที่ 38)

8. การแสดงออกของยีนจาก E. coli ACE-C46

8.1.1 กิจกรรมของสารยับยั้งจากส่วนต่างๆของเซลล์ดุกผสม *E. coli* ACE-C46

วิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *E. coli* ACE-C46 ซึ่งเจริญในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพลิซิลิน รวมทั้งสารยับยั้งจากเซลล์ในส่วน periplasm และ cytoplasm พบว่า สารละลายจากส่วนของ periplasm มีกิจกรรมยับยั้งสูงสุดคือ 100 AU/ml ส่วนสารละลายจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และไซโตพลาสซึม มีกิจกรรมยับยั้งเท่ากับ 80 AU/ml (ตารางที่ 20) เห็นได้ว่าสารยับยั้งสามารถพบทั้งจากภายนอก และภายในเซลล์ ผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า มีการ

ปลดปล่อยสารยับยั้งสู่ภายนอกเซลล์ หรือเกิดการแตกของเซลล์ ข้อสมมติฐานดังกล่าวยังไม่ชัดเจน จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 20 ค่ากิจกรรมยับยั้งของสารละลายส่วนใสจากส่วนต่างๆของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE- C46

supernatant	ค่ากิจกรรมยับยั้ง (AU/ml)
extracellular	80
periplasmic	100
intracellular	80

8.1.2 กิจกรรมของสารยับยั้งจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 ต่อเชื้อ *Samonella sp.*

ทดสอบกิจกรรมยับยั้งของสารยับยั้งจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 ต่อเชื้อ *Samonella sp.* สายพันธุ์ต่างๆเปรียบเทียบกับสาร KAC5 จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่า สารยับยั้งจากส่วนของ extracellular เซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 สามารถยับยั้ง *Samonella sp.* ได้ทั้งสิ้น 7 ซีโรไทป์ (Serotype) ส่วนสาร KAC5 สามารถยับยั้ง *Samonella sp.* ได้ทั้งสิ้น 29 สายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกิจกรรมยับยั้งของสารยับยั้งทั้ง จาก wild type *Lb. reuteri* KUB-AC5 และเชื้อลูกผสม *E. coli* ACE-C46 พบว่า เชื้อ *Samonella sp.* สายพันธุ์ที่ยับยั้งโดยสาร KAC5 ที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งอยู่ในช่วง 0 – 160 Au/ml นั้น ไม่พบการยับยั้งโดยสารยับยั้งจาก *E. coli* ACE-C46 แสดงให้เห็นว่า *Samonella sp.* สายพันธุ์ดังกล่าว สามารถยับยั้งด้วยการทำงานของ โปรตีน PACE-C46+2a PACE-C46+2b และกรดอินทรีย์ที่ *Lb. reuteri* KUB-AC5 ผลิตขึ้น ขณะที่ *Samonella sp.* อีก 7 ซีโรไทป์คือ Albany, Kedougou, Wandsworth, Mbandake, Sandiego, Enteritidis และ Infantis สามารถยับยั้งด้วย โปรตีน PACE-C46+2a และ PACE-C46+2b ตามลำดับ

ตารางที่ 21 กิจกรรมยับยั้งของสารยับยั้ง KAC5 และ สารยับยั้งจาก *E. coli* ACE-C46 ต่อเชื้อ *Samonella* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อเป้าหมาย	กิจกรรมยับยั้ง (Au/ml)	
	KAC5	สารยับยั้งจาก <i>E. coli</i> ACE-C46
<i>Salmonella</i> Albany	560	10
<i>S. Altona</i>	80	0
<i>S. Give</i>	150	0
<i>S. Cubana</i>	160	0
<i>S. Manhattan</i>	40	0
<i>S. Tennessee</i>	40	0
<i>S. Weltevreden</i>	40	0
<i>S. Bovismorbificans</i>	80	0
<i>S. Krefeld</i>	70	0
<i>S. Rissen</i>	0	0
<i>S. Ouakam</i>	0	0
<i>S. Stanley</i>	80	0
<i>S. Oslo</i>	80	0
<i>S. Bredeney</i>	0	0
<i>S. Kedougou</i>	320	10
<i>S. Wandsworth</i>	320	10
<i>S. Senftenberg</i>	0	0
<i>S. Amsterdam</i>	80	0
<i>S. Kouka</i>	40	0
<i>S. Poona</i>	40	0
<i>S. Kentucky</i>	0	0
<i>S. Cannstatt</i>	0	0
<i>S. Agona</i>	80	0
<i>S. Mbandake</i>	320	10

ตารางที่ 21 (ต่อ)

เชื้อเป้าหมาย	กิจกรรมยับยั้ง (Au/ml)	
	KAC5	สารยับยั้งจาก <i>E. coli</i> ACE-C46
<i>S. Orion</i>	80	0
<i>S. Schwarzengrund</i>	40	0
<i>S. Molade</i>	80	0
<i>S. Lexington</i>	150	0
<i>S. Derby</i>	80	0
<i>S. Saintpaul</i>	300	0
<i>S. Sandiego</i>	310	10
<i>S. Virchow</i>	140	0
<i>S. Hadar</i>	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	640	10
<i>Salmonella sp.</i>	70	0
<i>S. Virchow</i>	140	0
<i>S. Infantis</i>	320	10
<i>S. Enteritidis</i> S003	620	10

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของสาร KAC5 กับสมบัติของสารยับยั้งโมเลกุล ขนาดเล็กจากแลคโตบาซิลลัสสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น สารบูลการิแคน (bulgarican) (Reddy *et al.*, 1983) ที่แสดงกิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 โดยมีค่ากิจกรรมยับยั้งสูงสุด และเสถียรที่ค่าพีเอช 2.2 ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หรือสารยับยั้งจาก *Lb. delbugaricus* ssp. *bulgaricus* 7994 (Abdel-Bar *et al.*, 1987) แสดงกิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอช 4 ทนร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หรือสารอะซิโดลิน (Hamdan and Mikolajcik, 1974) ที่มีสมบัติ ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ แบคทีเรียกลุ่ม Enteropathogens และกลุ่มแบคทีเรียสร้างสปอร์ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก หรือโครงสร้างกรดไขมันจาก *Lactobacillus casei* GG (Silva *et al.*, 1987) ที่แสดงค่ากิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอช 3-5 ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคแต่ไม่สามารถยับยั้ง

เชื้อแลคโตบาซิลลัสสปีชีส์เดียวกัน จากสมบัติของสารยับยั้งโมเลกุลเล็ก พบว่าสาร KAC5 มีสมบัติคล้ายสารโมเลกุลเล็กในการทำงานที่ค่าพีเอชต่ำ ทุนร้อน สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก และแกรมลบ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตาม KAC5 มีโครงสร้างต่างจากสารยับยั้งโมเลกุลขนาดเล็กข้างต้นเนื่องจากเป็นโครงสร้างของโปรตีน

รายงานของสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และมีสมบัติคล้ายสาร KAC5 พบว่ามีแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่สามารถทำงานในค่าพีเอชต่ำได้แก่ โบซาซิน 14 (bozacin 14) จาก *Lb. lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova *et al.*, 2000) มีมวลโมเลกุล 6,200 ดาลตัน สามารถแสดงกิจกรรมยับยั้งที่ค่าพีเอช 3-6 โดยยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* อย่างไรก็ตามสารโบซาซิน 14 ไม่มีสมบัติทุนร้อน จึงมีความแตกต่างจากสาร KAC5 ทั้งน้ำหนักโมเลกุล และสมบัติทางกายภาพ

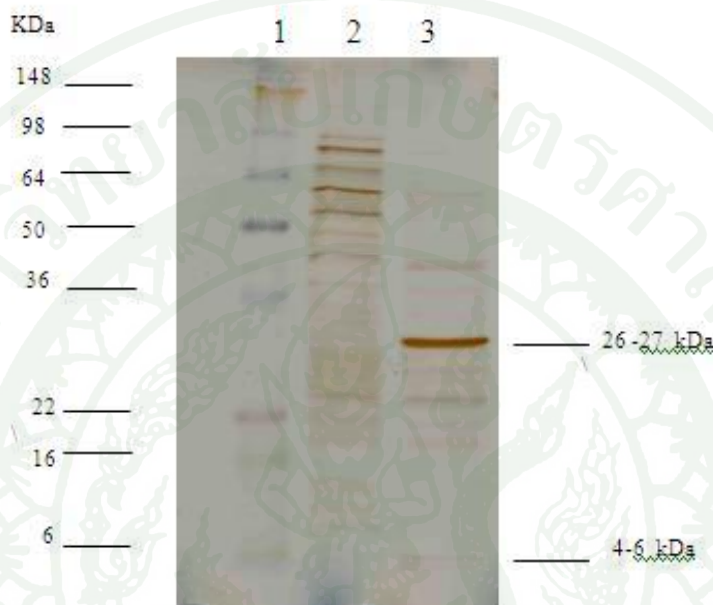
นอกจากนี้ สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แยกได้จาก *Lb. reuteri* สปีชีส์เดียวกัน ได้แก่ รอยเทอริน (Axelsson *et al.*, 1989) มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 200 ดาลตัน สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบ รวมถึงเชื้อยีสต์ รา และโปรโตซัว แต่มีข้อจำกัดที่สารถูกผลิตในสภาวะที่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารกลุ่มที่สองคือ สารรอยเทอริไซคลิน (Ganzle *et al.*, 2000) มีมวลโมเลกุล 349 ดาลตัน แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. และกลุ่มสุดท้ายแบคทีเรียโอซินรอยเทอริน LA6 (Toba *et al.*, 1991) มีมวลโมเลกุล 2,700 ดาลตัน แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัสสปีชีส์เดียวกัน ผลิตสารยับยั้งที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากสาร KAC5

ด้วยความแตกต่างของสมบัติฟิสิกส์เคมี และจุลชีววิทยา ในรูปของสาร KAC5 จาก wild type และลำดับกรดอะมิโนจากโคลน ACE-C46 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. reuteri* KUB-AC5 เป็นสารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซินชนิดใหม่

8.2 ลักษณะสารยับยั้งเปปไทด์จากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46

เนื่องจากสารละลายในส่วนของ periplasm เป็นสารละลายส่วนที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายจากส่วนของ extracellular และ intracellular จึงนำสารละลายจากส่วนของ periplasm เพื่อศึกษาเปปไทด์ที่แสดงออกมา ด้วย วิธี 15%SDS-PAGE พบว่ามีแถบ

โปรตีนที่เกินมาจากสารละลายในส่วนของ periplasm จากพลาสมิด pNZ307 จำนวน 2 แถบ คือ โปรตีนขนาด 4 และ 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 39) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสข้างต้น พบว่าในเฟรมการอ่านโปรตีนที่ +2 นั้น จะได้โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 26.27 และ 4.7 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 39 การหาขนาดโปรตีนจากโคลน pACE-C46 เปรียบเทียบกับพลาสมิด pNZ307

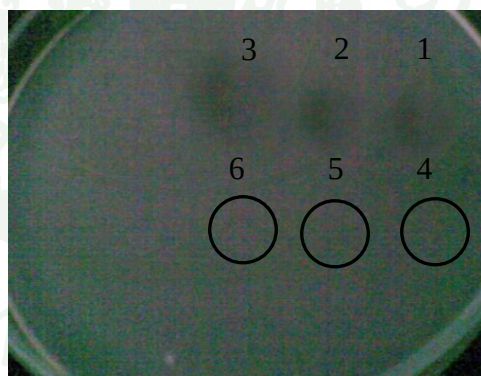
- | | |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard |
| ช่องที่ 2 | Periplasm ของ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pNZ307 |
| ช่องที่ 3 | Periplasm ของโคลน pACE-C46 |

รายงานวิจัยสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีแบคทีเรียโอซินที่มีการทำงานของเปปไทด์ 2 สายพันธุร่วมกัน โดยมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกันจัดเป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม 2b เช่น แลคโตค็อกซินจี (lactococcin G) เป็นสารแบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus lactis* LM2081 (Meyer, 1992) มีมวลโมเลกุล α_1 และ β เท่ากับ 4,346 และ 4,110 ดาลตัน ตามลำดับ หรือ แพลนทาริซิน NC8 (plantaricin NC8) จาก *Lactobacillus plantarum* NC8 (Maldonado *et al.*, 2003) ที่มีมวลโมเลกุล α และ β เท่ากับ 3,587 และ 4,000 ดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมี แลคตาซิน เอฟ (lactacin F) (Muriana and Klaenhammer, 1991) แลคโตซินเอส (lactocin S) (Mortvedt *et al.*, 1991) แพลนทาริซินเอส (plantaricin S) (Jimenez-Diaz *et al.*, 1995) เอนเทอโรซิน NKR-5-3 (enterocin NKR-5-3) (Wilaipun *et al.*, 2004) เป็นต้น ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้ง

ของโคลนลูกผสม ACE-C46 เกิดจากการทำงานของโปรตีน 2 สายคือ PACE-C46+2a และ PACEC46+2b

8.3 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของแถบโปรตีน

ทำการตัดแถบโปรตีนขนาดประมาณ 4.7 และ 26 กิโลดาลตัน จาก 15% SDS-PAGE แล้วทำการละลายแถบโปรตีนด้วยซีเทรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 จากนั้นทดสอบกิจกรรมยับยั้งด้วยวิธี spot on lawn พบว่า เกิดบริเวณใสของเชื้อเป้าหมายที่บริเวณที่ทดสอบด้วยแถบโปรตีนทั้งสองแถบ โดยพบว่า ที่ตำแหน่งที่ทดสอบกิจกรรมยับยั้งด้วยสารละลายจากการตัดแถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน นั้นบริเวณใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.1 เซนติเมตร ส่วนตำแหน่งที่ทดสอบกิจกรรมยับยั้งด้วยสารละลายจากการตัดแถบโปรตีนขนาด 4.7 กิโลดาลตันนั้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.8 เซนติเมตร แต่บริเวณใสก็ยังคงมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณใส ที่เกิดจากกิจกรรมยับยั้งของสาร KAC5 จาก *Lb. reuteri* KUB-AC5 ซึ่งมีขนาด 1.4 เซนติเมตร (ภาพที่ 40) ขณะที่ชุดควบคุม ประกอบด้วย สารละลาย periplasm จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pNZ307 สารละลายซีเทรทบัฟเฟอร์ และสารสกัดจาก 15% SDS-PAGE ไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง



ภาพที่ 40 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งของแถบโปรตีนต่อเชื้อเป้าหมาย *S. Enteritidis* S003

ตำแหน่งที่ 1 บริเวณใสที่เกิดจากแถบโปรตีนขนาด 4.7 กิโลดาลตัน

ตำแหน่งที่ 2 บริเวณใสที่เกิดจากแถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน

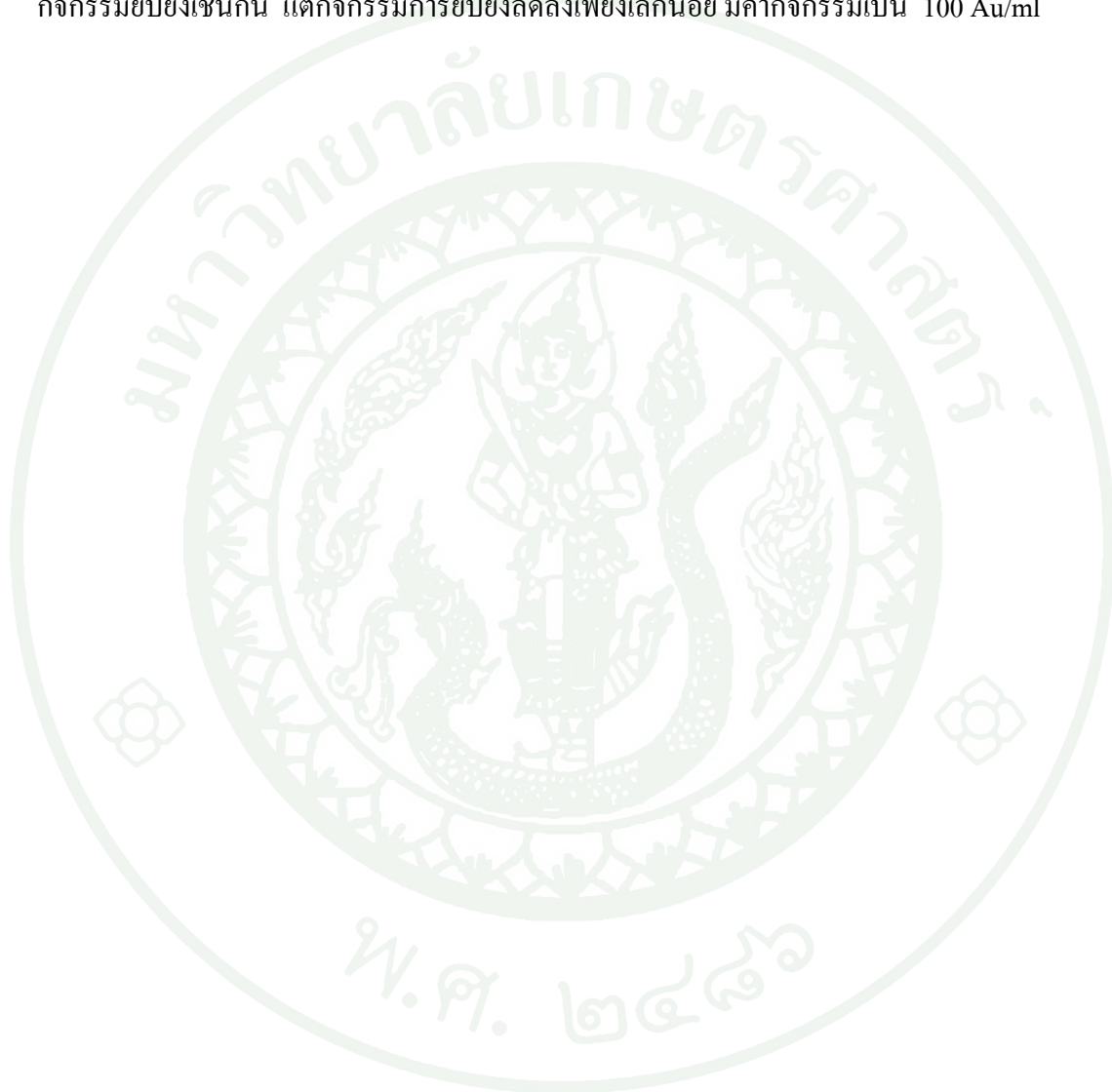
ตำแหน่งที่ 3 บริเวณใสที่เกิดจาก KAC5

ตำแหน่งที่ 4 ทดสอบด้วยตัวอย่างจากพลาสมิด pNZ307

ตำแหน่งที่ 5 ทดสอบด้วยซีเทรทบัฟเฟอร์

ตำแหน่งที่ 6 ทดสอบด้วย 15% SDS-PAGE

Chan *et al.* (2011) ศึกษาการโคลนยีน carocin S2 แบคทีเรียโอซินผลิตโดย *Pectobacterium carotovorum* แสดงออกใน *E. coli* BL21 พบว่า เมื่อตรวจสอบขนาดของโปรตีน ด้วย 10 % SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 85 กิโลดาลตัน และ immunity protein ขนาด 10 กิโลดาลตัน เมื่อทดสอบกิจกรรมยับยั้งจากโปรตีนที่แยกจาก 10% SDS-PAGE พบว่ายังคงแสดงกิจกรรมยับยั้งเช่นกัน แต่กิจกรรมการยับยั้งลดลงเพียงเล็กน้อย มีค่ากิจกรรมเป็น 100 Au/ml



สรุป

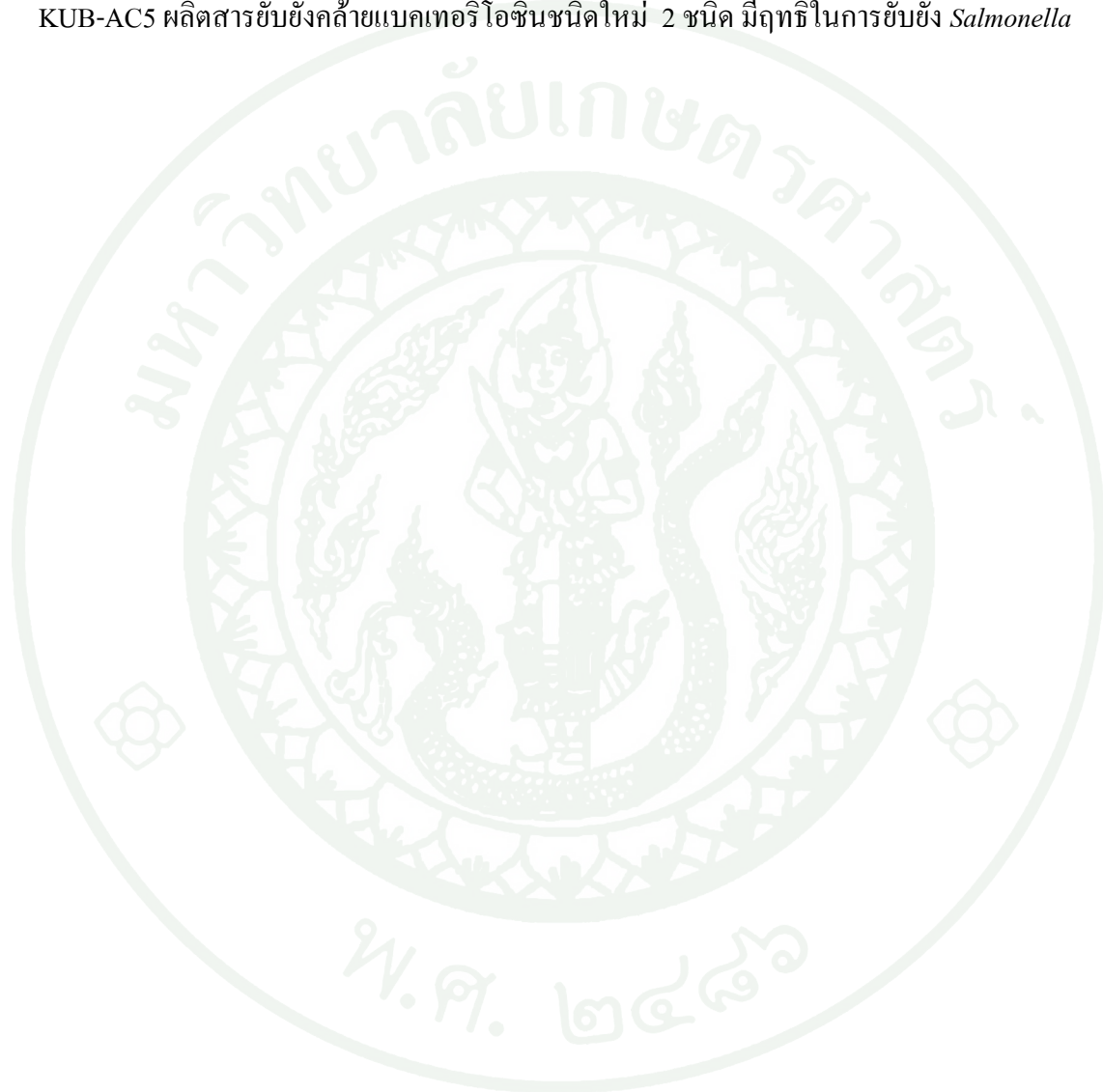
การเลือกเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนแบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 พบว่า *E. coli* DH5 α และ พลาสมิด pNZ307 เหมาะสมสำหรับการศึกษาการโคลนยีนแบคทีเรียโอซินจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5

การโคลนยีน แบคทีเรียโอซินจาก *Lb. reuteri* KUB-AC5 จากการสร้างธนาคารยีน พบเซลล์ลูกผสมทั้งหมด 183 โคลนี และโคลนที่แสดงกิจกรรมยับยั้งต่อเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 จำนวน 3 โคลน คือ โคลน ACE-10 ACE-46 และ ACE-182 โดยมีค่ากิจกรรมยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml อย่างไรก็ตามโคลน ACE-C10 และ โคลน ACE-C182 แสดงกิจกรรมยับยั้งในช่วง 6 ชั่วโมงของการทดสอบ ส่วนสารยับยั้งจากโคลน ACE-C46 นั้นแสดงกิจกรรมยับยั้งต่อเชื้อเป้าหมายตลอด 24 ชั่วโมงของการทดสอบ

เมื่อศึกษาลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิดลูกผสม พบว่ามีเพียงเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 เท่านั้นที่มีข้อมูลลำดับเบสตรงกับ Conserved hypothetical protein ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. reuteri* MM4-1A *Lb. reuteri* CF48-3A *Lb. reuteri* MM2-3 และ *Lb. reuteri* 100-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่ง open reading frame ของจีนดีเอ็นเอพลาสมิดลูกผสม pACE-C46 พบว่าเฟรมที่มีการแปลรหัสให้โปรตีนคือเฟรม +2 ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีน PACE-C46+2a และ PACE-C46+2b ขนาด 6.2 กิโลดาลตัน และ 26.2 กิโลดาลตัน มีความเหมือนโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ของเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* ที่ระดับต่ำเพียง 35 และ 44% ตามลำดับ

เมื่อทำการสกัดสารยับยั้งจากส่วนของ Extracellular Periplasm และ intracellular ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 นั้น พบว่า สารละลายจากส่วนของ Periplasm มีค่ากิจกรรมยับยั้งสูงที่สุด คือ 100 AU/ml เมื่อนำไปศึกษาขนาดโปรตีนด้วยวิธี 15% SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนต่างจาก *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pNZ307 คือแถบโปรตีนขนาด 4.7 และ 26.2 กิโลดาลตัน ให้ชื่อเป็น PACE-C46+2a และ PACE-C46+2b ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ด้วยวิธี spot on lawn พบว่าโปรตีน PACE-C46+2a และ PACE-C46+2b แสดงกิจกรรมการยับยั้ง 0.8 และ 1.1 เซนติเมตร ตามลำดับ

สรุปผลของการโคลนยีนจากเชื้อ *Lb. reuteri* KUB-AC5 ด้วยการสร้างธนาคารยีน ทำให้ได้เซลล์ลูกผสม *E. coli* ACE-C46 ที่ผลิตสารยับยั้ง 2 ชนิดคือ PACE-C46+2a และ PACE-C46+2b ที่มีขนาดประมาณ 4.7 และ 26.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจาก สารแบคทีริโอซิน และสารคล้ายแบคทีริโอซินที่ศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Lb. reuteri* KUB-AC5 ผลิตสารยับยั้งคล้ายแบคทีริโอซินชนิดใหม่ 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella*



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- บัณฑิต ถิ่นคำรพ. 2541. สถิติสำหรับการวิจัยทางสาธารณสุข : ตอนที่ 3 วิธีการนำเสนอข้อมูลทางสถิติในรายงานวิจัย (ภาคที่ 2). วารสารระบาดวิทยาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 3(2):26-29.
- วิลาวัลย์ เจริญจริยะตระกูล , เมตตา องค์สกุล และ ผกาพรรณ สิงห์ชัย . 2539. ผลการยับยั้งจาก *Lactobacillus* จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphyrococcus aureus* *Salmonella typhimurium* *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน. ว. สงขลานครินทร์. 18 : 302-305.
- สุรินทร์ ปิยโชคณกุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อาภา สุเวชวัฒนกุล . 2549. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะของสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Abdel-Bar, N., N.D. Harris and R.L. Rill. 1987. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Food.Sci.** 52: 411-415.
- Abee, T., L. Krockel and C. Hill. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.** 28:169-185.
- Abriouel, H., E. Validivia, A. Galvez and M. Maqueda. 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. **Appl Environ. Microbiol.** 64: 4623-4626.
- Adams, M. 2003. Nisin in multifactorial food preservation, pp. 39-52. *In* S. Roller, ed. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. **CRC Press**, Boca Raton.
- Altena, K., A. Guder, C. Cramer and G. Bierbaum. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Appl Environ. Microbiol.** 66:2565-71.

- Axelsson, L. and A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. **J. Bacteriol.** 177: 2125-2137.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Björnslett, Vincent G.H. Eijsink and A. Holck. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. **FEMS Microbiol. Lett.** 168: 137-143.
- Bakkal, E. S. 2011. The Role of Bacteriocins in Mediating Interactions of Bacterial Isolates from Cystic Fibrosis Patients. **Open Access Dissertations**. Paper 328.
- Bruno, M.E.C. and T.J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 3003-3010.
- Bukhtiyarova M., R. Yang and B. Ray. 1994. Analysis of pediocinAcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in apediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. **Appl Environ. Microbiol** 60: 3405–3408.
- Chen, Y., R. Shapira, M. Eisenstein and T.J. Montville. 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. **Appl. Envi. Microbiol.** 63: 524-531.
- Chan, Y.-C, J.-L Wu, H.-P. Wu, K.-C. Tzeng, and D.-Y. Chuang. 2011. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. **BMC Microbiol.** 11: 99.
- Chen, H. and D.G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** 2: 82-100.

- Cintas, L.M., P. Casaus, L.S. Havarstein, P.E. Hernandez and I.F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4321-4330.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Conner, D.E. 1993. Naturally occurring compounds, pp. 441-468. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Foods, 2nd edition**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Cotter, P.D., C. Hill and R. P. Ross. 2005. Food microbiology: Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology.** 3: 777-788.
- Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-159. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- De Vuyst, L.D. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp. 91-130.
- De Ruyter, O.P. Kuipers and W.M. de Vos., 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. **Appl. Environ Microbiol.** 62:3662 – 7.
- Earnshaw, R.G., 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems, pp. 211-232. In. B.J.B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Elsevier Applied Science, London and New York.

- Eichenbaum, Z., J. Michael, Federle, D. Marra, W.M. de Vos, O.P. Kuipers, M. Kleerebezem and J.R. Scott., 1998. Use of the Lactococcal *nisA* Promoter To Regulate Gene Expression in Gram-Positive Bacteria: Comparison of Induction Level and Promoter Strength. **Appl Environ Microbiol.** 64: 2763-2769.
- Eklund, T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. **Int. J. Food Microb.** 1: 179-185.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microb. Reviews.** 24: 85-106.
- Folli, C., I. Ramazzina, P. Arcidiaco, M. Stoppini and R. Berni, 2003. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. **FEMS Microb. Letters.** 221: 143-149.
- Fermentas Inc. 2011. **Restriction Enzymes.** Available Source: <http://www.fermentas.com>, April 28, 2011.
- Fortaine, E.A., E. Clajdon and D. Tayler-Robinson. 1996. Lactobacilli from women with/without bacteria vaginosis and observation on the significance of hydrogen peroxide. **Curr. Microbiol.** 60: 253-260.
- Fremaux, C., C. Ahn and T. R. Kleanhammer. 1993. Molecular Analysis of the Lactacin F Operon. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 3906-3915.
- Fuglsang, A., 2003. Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 312:285–291.
- Ganzle, M.G., S. Weber and W.P. Hammes. 2000. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **Int. J. Food Microbiol.** 46:207-217.

- _____, A. Holtzel, J. Walter, G.Jung and W.P. Hammes. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 4352-4333.
- Garneau, S., Martin N.I. and J.C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie.** 84: 577–592.
- Gilliand, S.E. and M.L. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative culture. **J. Food Prot.** 40: 820-823.
- Hanahan, D. 1985. **DNA Cloning: A Practical Approach** (Glover, D.M., ed.), Vol. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia.
- Hamdan, I.Y. and E.M. Mikolajcik. 1974. Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Antibiot.** 27: 631-636.
- Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol.** 173: 7491-7500.
- Helander, I.M., A. von Wright, T.M. M. Sandholm. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends Food Sci. Technol.** 8: 146-150.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J.M. Martinez, J.M. Rodriguez, I.F. Nes, P.E. Hernandez and L.M. Cintas. 2001. *Enterococcus faecium* p21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enteriocin A and enterocin B. **Food Microbiol.** 18: 115-131.

- Holck, A., L. Axelsson, S.E. Birkeland, T. Aukrust and H. Blom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. **J. General Microb.** 138: 2715-2720.
- Holo, H. and I.F. Nes. 1989. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 3119-3123.
- Hühne, K., Axelsson, L., Holck A. and L. Krockel. 1996 . Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. **Microbiology.** 142: 1437–1448.
- Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. **Appl. Microbiol.** 27:85-123.
- Ivanova, I., P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova and X. Dousset. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage. **Biocatalysis.** 41: 47-53.
- Jay, J.M.. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525- 532.
- _____. 2000. Antimicrobial component from lactic acid bacteria. **Modern Food Microbiology**, 6th edition. Gaithersburg, Md., Aspen.
- Jiménez-Díaz, R., J.L. Ruiz-Barba, D.P. Cathcart, H. Holo, I.F. Nes, K.H. Sletten and P.J. Warner. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4459-4463.

- Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helvicin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.** 167: 439-446.
- Kabara, J.J.. 1993. Medium-chain fatty acids and esters, pp. 307-342. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Foods, 2nd edition**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kabuki, T., S.Tadao, K. Yasushi, U. Junko and I. Takatoshi. 1997. Production, purification and characterization of reuterin6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Int. J. Food Microb.** 34: 145-156.
- Kang, J.H. and M.S. Lee. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **J. Appl. Microbiol.** 98: 1169-1176.
- Kashket, E.R.. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiol. Rev.** 46: 233-244.
- Kawai, Y., T. Saito, T. Toba, S.K. Samant and T. Itoh. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. **Biosci Biotechnol Biochem.** 58: 1218-1221.
- _____, I. Yasuyuki, U. Koichiro, K. Haruki, S. Tadao and I. Takatoshi. 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. **Food Microb.** 18: 407-415.
- Kitano, H. 2002. Computational systems biology. **Nature.** 420: 206-210.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev.** 12 : 39-86.

- Klein, G.P., Alexander, B. Christine and R. Gerhasd. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microb.* 41: 103-125.
- Kong, S. and A.J. Davison. 1980. The role of interactions between O_2 , H_2 , $OH^\cdot$, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204:13-29.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680–685.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-163.
- Maldonado, A., J.L. Ruiz-Barba and R. Jiménez-Díaz. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 383-389.
- Mathiesen, G., E. Sørvig, J. Blatny, K. Naterstad, L. Axelsson and V.G.H. Eijsink. 2004. High-level gene expression in *Lactobacillus plantarum* using a pheromone-regulated bacteriocin promoter. *Lett. in App. Microbiol.* 39:137–143.
- McAuliffe, O., R.P. Ross and C. Hill. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Mibrob. Reviews.* 25: 285-308.
- McEwen, S.A. and P.J. Fedorka-Cray. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34: 93-106.
- Meselson M. and Yuan R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*. 217:1110 - 1114

- Messens, W. and L. De Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-a review. **Int. J. Food Microbiol.** 64: 193-198.
- Meyer, J.N., H. Holo, L.S. Havarstein, K. Sletten and I.F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **J. Bacteriol.** 174: 5686-5692.
- Michael R., Mulvey, G. Soule, D. Boyd, W. Demczuk, R. Ahmed and the Multi-provincial Salmonella Typhimurium Case Control Study Group. 2009. Characterization of the First Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Salmonella Isolate Identified in Canada. **J. Clin. Microbiol.** 41: 460-462
- Mierau, I. and M. Kleerebezem. 2005. 10 years of the nisin controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 68: 705–717.
- Moll, G., H. H. Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings, and A. J. M. Driessen. 1998. Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. **J. Bacteriol.** 180: 96-99.
- Moon Gi-S, Pyun Yu-R and Wang JK. 2006. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. **Int J. Food Microbiol.** 108: 136–140
- Motlagh, A.M., M.C. Johnson and B. Ray. 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. **J. Food. Prot.** 54: 873-878.
- Mortvedt, C.I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten and I.F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1829-1834.

- Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 114-121.
- _____ and J.B. Luchansky. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins, pp. 41-61. *In* D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria** Academic Press Inc., CA.
- Naghmouchi K., E. Kheadr, C. Lacroix and I. Fliss. 2007. Class I/ Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **J. Food Microbiol.** 24 :718-727.
- Nes, I.F., L.S. Håvarstein and H. Holo. 1995. Genetics of non-lantibiotic bacteriocins; in Ferretti J.J., Gilmore M.S., Klaenhammer T.R. and Brown F. (eds) : **Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci. Developments in Biological Standards**. Basel, Karger. 85, pp 645–651.
- Niku-Paavola, M.L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microbiol.** 86: 29-35.
- Nilson, T.. 1999. Novel enterococcal bacteriocins ; optimisation of production, purification, biochemical and genetic characterisation. PhD thesis, Agricultural University of Norway, As, Norway. Cited R.P. Ross, S. Morgan and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int.J. Food Microb.** 79: 3-16.
- Nitisinprasert, S., V. Nilphai, P. Bunyun, P. Sukyai, K. Doi and K. Sonomoto. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 34: 387-400.

- Nizo the food researcher. 2007. Strains and plasmids for the NICE®system. <http://www.nizo.com>.
- Nyquist O. Ludvig. A. McLeod. D. A. Brede. L. Snipen . A. Aakra and I. F. Nes. 2011. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* with emphasis on strains from meat. *Mol Genet Genomics*. 285: 297-311.
- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African J. of Biotechnol.** 2: 219-227.
- Oppegård, C., G. Fimland, L.Thorbæk, and J. Nissen-Meyer. 2007. Analysis of the Two-Peptide Bacteriocins Lactococcin G and Enterocin 1071 by Site-Directed Mutagenesis. **Appl Environ Microbiol.** 73: 2931–2938.
- Osmanagaoglu O., Y. Beyatli , U. Gündüz . 2000. Cloning and expression of a plasmid–linked pediocin determinant trait of *Pediococcus acidilactici* F. **J. Basic Microbiol.** 40:41–49.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 139-159. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects, 2nd edition**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Pascalle, G. G. A., de Ruyter, O. P. Kuipera and M.M W. DE VOS. 1996. Controlled Gene Expression Systems for *Lactococcus lactis* with the Food-Grade Inducer Nisin. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3662-3667.
- Pavan, S., P. Hols, J. Delcour, M. C. Geoffroy, C. Granette and M. Kleerebezem *et al.*. 2000. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vi vo biological effects. **Appl Environ Microbiol.** 66:4427–32.

- Piard, J.C., P.M. Muriana, M.J. Desmazeaud and T.R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CNRZ481. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 279-284.
- Pilet, M.F., X. Dousset, R. Barre, G. Novel, M. Desmazeaud and J.C. Piard. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.** 58: 256-262.
- Reddy, G.V., K.M. Shahani, B.A. Friend and R.C. Chandan. 1983. Natural antibiotic activity of *L. acidophilus* and *bulgaricus*: III: production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. **Cult. Dairy Prod. J.** 18:15-19.
- Sablon E. , B. Contreras and E.Vandamme. 2000. Antimicrobial Peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, **Genetics and Biosynthesis. Biotechnology**, 68 : 21-60.
- Sahl, H.G. and G. Bierbaum. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annu Rev. Microbiol.** 52:41-79.
- Sambrook., J., E.F. Fritsch and T. Molnar. 1989. **Molecular Cloning : a Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schillinger, U. and F.K. Lucke, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55: 1901-1906.
- Serror, P., T. Sasaki, S.D. Ehrlich and E. Maguin. **2002.** Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 46–52.

- Silva, M., N.V. Jacobus, C. Deneke and S.L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31: 1231-1233.
- Smulders, F.J.M., P. Barendsen, J.G. van Logtestijn, D.A.A. Mossel and G.M. van Der Marel. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. **J. Food Technol.** 21: 419-436.
- SØrvig, E., G. Sonja, N. Kristine, M. Geir, G.H. Vincent Eijsink and L. Axelsson. 2003. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. **FEMS Microbiology Lett.** 229: 119-126
- Sukyai, P. 2003. Detection and partial characterization of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5, KUB-AC16 and KUB-AC20. **M.S. thesis**, Kasetsart University.
- Suma, K., M.C. Misra and M.C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. **Int. J. Food Microbiol.** 40: 17-25.
- Talarico, T.L. and W.J. Dobrogosz. 1989. Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 674-679.
- Toba, T., S.K. Samant, E. Yoshioka and T. Itoh. 1991. Reuterin6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Letters in App. Microbiol.** 13: 281-286.
- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against gram-negative bacteria. **Enz. And Microb. Techno.** 36: 318-326.

- Turcotte C., L. Christophe, K. Ehab, G. Louis and F. Ismaïl. 2003. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. **Int. J. Food Microbiol.** 90: 283-293.
- Van Belkum, M.J. and M.E. Stiles. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. **Nat. Prod. Rep.** 17: 323-335.
- Vaughan, E.E., C. Daly and G.F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. **J. Appl Bacteriol.** 73: 299-308.
- Vieira, J. and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene.** 19: 259–268.
- Voget S., B. Klippel, D. Rolf and G. Antranikian. 2011. Complete Genome Sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4. **J. Bacteriol.** 193: 3403–3404.
- Von Wright, A., S. Tynkkynen, and M. Suominen, 1987. Cloning of a *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* chromosomal fragment associated with the ability to grow in milk. **Appl. Environ. Microbiol.** 53, 1584–1588.
- Wilaipun, P., T. Zendo, M. Sangjindavong, S. Nitisinprasert, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama and K.Sonomoto. 2004. The two-synergistic peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from Thai fermented fish (Pla-ra). **Science Asia.** 30: 115-122.
- Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel. 1995. **The genera of Lactic acid bacteria 2ed.** Blackie Academic & Professional, Glasgow.

- Yamabhai M, S Emrat, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, and Buranabanyat B., 2008. Secretion of recombinant Bacillus hydrolytic enzymes using Escherichia coli expression systems. **J. Biotechnol.** **133**: 50-57
- Zhou, X.X., W. F. Li , Y. J. Pan and G. X. Ma. 2005. The nisin-controlled gene expression system : Construction, application and improvements. **Biotechnology Advances.** **24**: 285-295.





1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. Luria-Bertani medium

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ในกรณีที่เป็อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ให้เติม agar 1.5 % ของปริมาตรอาหาร

1.2 SOC

Bacto-tryptone	1	กรัม
Bacto-yeast extract	0.25	กรัม
NaCl	0.025	กรัม
2 M Glucose	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและพลาสมิด

2.1 lysis buffer

ประกอบด้วย 50 mM EDTA และ 0.1 M NaCl

2.2 TE buffer

ประกอบด้วย 1 mM EDTA และ 10 mM Tris-HCl ,pH 8.0

2.3 Solution A

ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH8.0 , 10 mM EDTA , 50 mM NaCl และ 20%(W/V) Sucrose

2.4 Solution B

ประกอบด้วย 0.2 M NaOH และ 1% (W/V) SDS

2.5 Solution C

ประกอบด้วย 5 M Potassium acetate และ Glacial acetic acid 11.5 มิลลิลิตร ปรับ
ปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ





ภาคผนวก ข

เทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีวิเคราะห์

1. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อปริมาตรรวม 300 ไมโครลิตรแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนกรัม ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Bio Aqarius) แล้วคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{280} \times 50 \times \text{ค่าความเจือจาง}$$

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye ความเข้มข้น 6 เท่า แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใน 1x TBE buffer ความต่างศักย์คงที่ 50 โวลต์ หรือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที และ 40 นาที ตามลำดับ ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-transilluminator (Vilber Lourmat) และบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพ

2. การคำนวณหาขนาดของยีนเคราตินเนส

1 กรดอะมิโน = 3 เบส = 110 ดาลตัน

โปรตีน KAC5 มีขนาด 4,721.95 ดาลตัน

จึงประกอบด้วย กรดอะมิโน ซึ่งเท่ากับเบสทั้งหมด 129 คู่เบส

3. การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลโดยใช้ Nucleospin Extract II®

สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยเติมบัฟเฟอร์ NT2 ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักเจล นำบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มาใส่ในหลอด nucleospin และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่านเมมเบรนทิ้ง เติimb บัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อเทสารละลายที่ผ่านเมมเบรนทิ้ง แล้วนำหลอด nucleospin ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 2 นาที นำคอลัมน์ส่วนบนไปวางบนหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer NE3 หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

4.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

3x Tris-Tricine Gel Buffer (pH 8.45)

3 M Tris-HCl, pH 8.45

0.3 % (w/V) SDS

2x Tricine Sample Buffer (TSB)

100 mM Tris-HCl, pH 6.8

24 % (w/V) Glycerol

8 % (w/V) SDS

5 % (V/V) Mercaptoethanol

0.02 % (w/V) Bromophenol Blue

→ 30min at 40°C

Cathode Buffer (pH 8.25)

0.1 M Tris

0.1 M Tricine

0.1 % (w/V) SDS

5x Anode Buffer

Tris-HCl, pH 8.9

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจิราภรณ์ แดงทอง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 กุมภาพันธ์ 2526
สถานที่เกิด	อ่างทอง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนสนับสนุนและค้นคว้าวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์จาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (2549)