



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

.....
พันธุ์วิศวกรรม

.....
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลน และการแสดงออกของยีน Salvicin K และ antimicrobial like bacteriocin β ของ
เชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4

Cloning and Expression of Salvicin K and Antimicrobial Like Bacteriocin β Genes of
Lactobacillus salivarius K4

นางผู้วิจัย นางสาวกรรณิกา ทองขาว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(.....
อาจารย์เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(.....
รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(.....
รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลน และการแสดงออกของยีน Salvicin K และ antimicrobial like bacteriocin β ของเชื้อ

Lactobacillus salivarius K4

Cloning and Expression of Salvicin K and Antimicrobial Like Bacteriocin β Genes of

Lactobacillus salivarius K4

โดย

นางสาวกรรณิกา ทองขาว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2552

กรณีศึกษา ทองขาว 2552: การโคลน และการแสดงออกของยีน Salvicin K และ antimicrobial like bacteriocin β ของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์เกียรติทิพย์ ชวงส์โกมล, Ph.D. 120 หน้า

แบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ แบคทีเรียโอซิน Salvicin K (sal K) และ antimicrobial like bacteriocin β (alb β) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 ในลำไส้ของไก่ โดยพบว่า salvicin K และ alb β มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, Abp118 α และ Abp118 β ซึ่งจำแนกจากลำไส้ของมนุษย์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแลคติกแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *L. sakei* และ *Leuconostoc* sp. การศึกษาการแสดงออกของยีน *active/sal K* และ *active/alb β* ใน *E. coli* โดยใช้พลาสมิด pGEX4T-1 ซึ่งเป็น glutathione-S-transferase (GST) fusion system pTYB1 และ pTYB12 ซึ่งเป็น intein fusion system ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีน *active/sal K* เมื่อใช้ GST fusion system และพบการแสดงออกของโปรตีน *active/alb β* เมื่อใช้ GST fusion system แต่โปรตีนที่ได้มีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ถูกต้อง เมื่อใช้ pTYB1 และ pTYB12 เป็น expression vector ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนที่มี *active/sal K* และพบการแสดงออกของโปรตีน *active/alb β* ที่มีแควคิวิตี เมื่อใส่ยีน *active/alb β* ใ่วางปลายหมู่กรดอะมิโนของโปรตีนที่แสดงออก (pTYB1) โดยแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และพบว่า เมื่อใส่ *active/sal K* และ *active/alb β* ใ่วางปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนที่มีการแสดงออก (pTYB12) ไม่พบว่าโปรตีนมีแควคิวิตี เนื่องจากมีการตกตะกอนของโปรตีน

ผลจากการทำ error prone PCR ของยีน *active/alb β* โดยใช้ pTYB1 เป็น expression vector พบว่าเกิดการกลายพันธุ์อย่างสุ่มบนยีน *active/alb β* และไม่พบการแสดงออกของโปรตีนเนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนได้อย่างสมบูรณ์

Kannika Thongkhao 2009: Cloning and Expression of Salvicin K and Antimicrobial Like Bacteriocin β Genes of *Lactobacillus salivarius* K4. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Kiattawee Choowongkamon, Ph.D. 120 pages

Bacteriocin is an antimicrobial protein produced by bacteria to inhibit the growth of similar bacteria. Two isoforms of bactericins, Salvicin K (sal K) and antimicrobial like bacteriocin β (alb β), were identified from *Lactobacillus salivarius* K4 which was isolated from a chicken intestine. These bacteriocins are similar to the bacteriocins from *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 which was isolated from the human gastrointestinal tract, called Abp118 α and Abp118 β . These bacteriocins have the inhibiting activity against other lactic acid bacteria such as *Lb. sakei* and *Leuconostoc* sp. In this study, we reported the expression of sal K and alb β bacteriocin in *E. coli* using both the Glutathione-S-transferase (GST) fusion system (pGEX4T-1) and the intein fusion systems (pTYB1 and pTYB12). The results showed that the active sal K bacteriocin cannot be expressed in pGEX4T-1 expression vector and pTYB1 expression vector. The active alb β bacteriocin can be expressed in pGEX4T-1 expression vector but its amino acid sequence was incorrect. The active alb β bacteriocin can be expressed in the intein fusion protein and can inhibit *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T if the alb β bacteriocin was at the N-terminus of fusion protein (pTYB1). However, the fusion proteins that the sal K and alb β bacteriocin were at the C-terminus of fusion protein (pTYB12) were aggregated and had no activity.

For the error prone PCR experiment, the mutated of alb β bacteriocin were cloned into pTYB1 expression vector. The results showed that the randomly mutated *alb* β genes were can be generated. However, there is no protein expression on all isolated mutant plasmids. This may due to the no full-length of alb β bacteriocin was generated.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ. ดร. สุนิย์ นิธิสินประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ประธานการสอบที่ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์และ ขอขอบพระคุณ ดร. คมแข พิลาสสมบัติ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสำหรับการทำวิจัยและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร ผู้ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย ขอกราบขอขอบคุณอาจารย์ในสาขาพันธุ์วิศวกรรมทุก ท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ขอขอบคุณคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความรู้ และเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จ

ขอขอบคุณ นางสาวอนุสรณ์ วิเศษสิงห์ และนายกัญจน์ คิลป์ประสิทธิ์ สำหรับคำปรึกษา ในการทำวิทยานิพนธ์และคำแนะนำในการทำวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณเพื่อนๆ โดยเฉพาะ นางสาวปิยฉัตร มีสวัสดิ์ ซึ่งคอยให้คำปรึกษาในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ให้กำลังใจ ตลอดจน คอยช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องจนงานสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณเพื่อนสมาชิกในห้องปฏิบัติการ Protein structure and bioinformatics และเพื่อนๆ ในสาขาพันธุ์วิศวกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรัก ความปรารถนา ดี และให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณกำลังใจ และความห่วงใยทุกเวลาจากพี่ น้อง ในครอบครัว ทองขาว

กรรณิกา ทองขาว

มีนาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	36
อุปกรณ์	36
วิธีการ	38
ผลและวิจารณ์	60
ผล	60
วิจารณ์	97
สรุปและข้อเสนอแนะ	104
สรุป	103
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107
ภาคผนวก	116
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่ผลิตโดย LAB	11
2	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class II ที่ผลิตโดย LAB	15
3	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb	18
4	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน IIc	19
5	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน III	19
6	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน IV	20
7	Homologue ของ ORFs จากแบคทีเรียโอซิน ABP-118 ที่ได้จากเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> UCC118	22
8	เปปไทด์แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป inactive form จากแบคทีเรียโอซิน ABP-118 ที่ได้จากเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> UCC118	23
9	ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร	28
10	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน <i>inactive/sal K</i> , <i>active/sal K</i> , <i>inactive/alb β</i> และ <i>active/alb β</i> สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นในดีเอ็นเอพาหะทั้งสามประเภท ได้แก่ pGEX4T-1, pTYB1 และ pTYB12 โดย F หมายถึง forward primer และ R หมายถึง reverse primer ค่า T_m คือค่าที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่กลายเป็นสายเดี่ยว	40
11	องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหาลำดับประกอบของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error prone PCR	57
12	แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับอะมิโนในยีน <i>alb β</i> ที่ได้จาก pGEM <i>inactive/alb β</i>	66
13	สรุปปริคอมมิแนนท์พลาสติกทั้งหมด	96

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างเปปไทด์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน (รูปบน) จะทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง)	6
2	Nisaplin™ คือ nisin A ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> ซึ่งผลิตโดยบริษัท Aplin and Barrett Ltd ประเทศอังกฤษ มีชื่อทางการค้าคือ Danisco's natural food	7
3	การเกิด lantionine residues โดยเกิดการ dehydrated ของกรดอะมิโน serine (Ser) และ threonine เกิดเป็น dehydroalanine (Dha) และ dehydrobutyline (Dhb) ตามลำดับ เมื่อ Dha หรือ Dhb จับกับ cysteine (Cys) จะเกิดโครงสร้างที่เป็นวง (ring) หรือ modified peptide หรือ lantibiotic การจับคู่ระหว่างกรดอะมิโน threonine (Thr) และ cysteine (Cys) ส่งผลให้เกิดโครงสร้าง β -methyllanthionine การเกิด bridge ของ lantibiotic และ β -methyllanthionine จะส่งผลให้เกิดโครงสร้าง Ala-S-Ala (alanine-S-alanine) and Abu-S-Ala (aminobutyrate-S-alanine) ตามลำดับ	10
4	การยับยั้งของแลนติไบโอติกแบบเอ และแบบบี	12
5	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIa โดยใช้โปรแกรม Clustas W เมื่อ CurA คือ curvacin A, EntP คือ enterocin P, BavMN คือ bavaricin MN, Div41 คือ divercin V41, EntA คือ enterocin A, Mun คือ muntcidin, SakP คือ sakacin P, PedA คือ pediocin PA-1, MesY คือ mesentericin Y105, LeuA คือ leucocin A, CarB2 คือ carnobacteriocin B2	14
6	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIb โดย LafA, LafX: lactacin F; PlnE, plantaricin EF, PlnJ, PlnK: plantaricin JK; LcnG α , LcnG β : lactococcin G	16
7	แสดงการเสริมฤทธิ์กันของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb เมื่อมีการรวมกันของเปปไทด์สองสายได้แก่ ABP118 α และ ABP118 β	17

ภาพที่		หน้า
8	GxxxG motif จากแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb	17
9	กลุ่มยีนควบคุมการสังเคราะห์ class II แบคทีเรียโอซินใน <i>L. salivarius</i> UCC11 ประกอบด้วย 18 ORF ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่ง ORF 3, 4, 5, 6, 7 และ 9 มีลักษณะเป็น เปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และมีตำแหน่ง GG คล้ายกับ class II bacteriocin	21
10	การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน	24
11	กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic	25
12	กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่ 2	26
13	บทบาทของแบคทีเรียโอซินในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร โดยอาจใช้ในรูปแบบการเติมเชื้อตั้งต้นที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินลงไปในการอาหาร ให้เป็นอาหารหมัก (ซาย) หรือใช้ในรูปแบบส่วนผสมที่เป็นผงเติมลงไปในการอาหาร ซึ่งใช้เติมได้ทั้งในอาหารหมักและอาหารทั่วไป (ขวา)	27
14	แผนภาพแสดงการทำโปรตีนที่มี GST fusion protein ให้บริสุทธิ์	31
15	องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pGEX4T-1 ซึ่งภายในประกอบด้วย Ori ของพลาสมิด pBR322 มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน <i>lac I</i> และ glutathione-S-transferase ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อช่วยในการทำให้บริสุทธิ์ อีกทั้งยังช่วยให้โปรตีนเป้าหมายมีการหมุนพับที่ถูกต้อง	31
16	Intein fusion protein ทั้งสองแบบ คือ N-terminal fusion protein และ C-terminal fusion protein และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อใช้ intein fusion system	33
17	องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ซึ่งมี intein อยู่ทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ภายในพลาสมิดประกอบด้วยยีน <i>lacI</i> ยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในฟาจ M13 และ intein	33
18	องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pTYB12 ซึ่งมี intein อยู่ทางด้านปลายหมู่กรดอะมิโน ภายในพลาสมิดประกอบด้วยยีน <i>lacI</i> ยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในฟาจ M13 และ intein	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะของเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน inactive form และ active form โดย inactive form คือมีเปปไทด์ที่มี leader peptide อยู่ในสายเปปไทด์ มี นิวคลีโอไทด์ GG ซึ่งเป็นตำแหน่งตัด (cleavage site) ที่ทำให้แบคทีเรียโอซิน เปลี่ยนเป็น active form	39
20	ภาพของพลาสมิด pGEMinactive/sal K (3,206 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้น การจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน แบคทีเรียโอซิน inactive/sal K (206 bp)	42
21	ภาพของพลาสมิด pGEMinactive/alb β (3,210 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้น การจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน แบคทีเรียโอซิน inactive/alb β (210 bp)	43
22	ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซินยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ BamHI และ XhoI โดยเชื่อมต่อยีนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEX4T-1 บริเวณตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ XhoI	44
23	แผนภาพของพลาสมิด pGEXactive/sal K (5,113 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้น การจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน แบคทีเรียโอซิน active/sal K (144 bp)	45
24	ภาพของพลาสมิด pGEXactive/alb β (5,113 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการ จำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน แบคทีเรียโอซิน active/sal K (144 bp)	45
25	ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซินยีน inactive/sal K, active/sal K, inactive/alb β และ active/alb β ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI	49
26	ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซิน inactive/sal K, active/sal K, inactive/alb β และ active/alb β ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI เข้าสู่ ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเดียวกัน	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	แผนภาพของพลาสมิด pTYB1 <i>inactive/sal K</i> (7,645 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>inactive/sal K</i> (206 bp)	50
28	แผนภาพของพลาสมิด pTYB1 <i>active/sal K</i> (7,579 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>active/sal K</i> (144 bp)	50
29	แผนภาพของพลาสมิด pTYB1 <i>inactive/alb β</i> (7,649 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>inactive/alb β</i> (210 bp)	51
30	แผนภาพของพลาสมิด pTYB1 <i>active/alb β</i> (7,579 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>active/alb β</i> (144 bp)	51
31	แผนภาพของพลาสมิด pTYB12 <i>inactive/sal K</i> (7,583 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>inactive/sal K</i> (206 bp)	52
32	แผนภาพของพลาสมิด pTYB12 <i>active/sal K</i> (7,521 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>active/sal K</i> (144 bp)	52
33	แผนภาพของพลาสมิด pTYB12 <i>inactive/alb β</i> (7,589 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>inactive/alb β</i> (210 bp)	53
34	แผนภาพของพลาสมิด pTYB12 <i>active/alb β</i> (7,521 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และขึ้น เบสเทอร์ริโอซิน <i>active/alb β</i> (144 bp)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
35	ขนาดของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ <i>HindIII</i> ซึ่งจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel	60
36	ขนาดของดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรียโอซิน <i>inactive/sal K</i> , <i>active/sal K</i> , <i>inactive/alb β</i> และ <i>active/alb β</i> ซึ่งมีขนาด 206, 144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน <i>active/alb β</i> ซึ่งมีขนาด 144 bp ตรวจสอบขนาดของโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose	62
37	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน <i>inactive/sal K</i> , <i>active/sal K</i> , <i>inactive/alb β</i> และ <i>active/alb β</i> จาก <i>Lb. salivarius</i> K4 โดยแบคทีเรียโอซินที่เป็น inactive form จะประกอบด้วย leader peptide เมื่อมีการตัด leader peptide ออกไป โดยใช้ตำแหน่งกรดอะมิโน GG (บริเวณลูกศรชี้) เป็นตำแหน่งจดจำทำให้เปปไทด์แบคทีเรียโอซินกลายเป็น <i>active/sal K</i> และ <i>active/alb β</i> ดังแสดงในกล่องสี่เหลี่ยม	63
38	การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของพลาสมิด pGEM <i>inactive/sal K</i> และ pGEM <i>inactive/alb β</i> โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 206 bp ที่ได้จากการทำพีซีอาร์เป็น positive control พบว่า ยีนที่ได้จากการตรวจสอบมีขนาดเท่ากับขนาดของ positive control	65
39	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน <i>sal K</i> จากเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 กับ pGEM <i>inactive/sal K</i> โดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/)	65
40	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน <i>alb β</i> จากเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 กับ pGEM <i>inactive/alb β</i> โดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/)	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
41	ผลการทำโคโลนีพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEXactive/sal K และ pGEXactive/alb β ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน active/sal K และยีน active/alb β เป็น positive control โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis	68
42	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pGEXactive/sal K และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน sal K จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	68
43	การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEXactive/sal K	69
44	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pGEX active/alb β และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alb β จากพลาสมิด pGEMactive/alb β พบว่า ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์แรกของยีน active/alb β ขาดหายไป 1 ตำแหน่ง	69
45	การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEXactive/alb β	69
46	12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน GST active sal K และ GST active alb β เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pGEX4T-1 expression vector ซึ่งมีโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน	70
47	การทำโคโลนีพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB12inactive/sal K pTYB12active/sal K, pTYB12inactive/alb β และ pTYB12active/alb β ขึ้นยีน ที่ได้มีขนาด 206,144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis	72
48	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12inactive/sal K และลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ inactive/sal K จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	73
49	การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12inactive/sal K	73
50	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12active/sal K และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ active/sal K จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	74
51	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12active/sal K และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ active/sal K จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
52	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12 <i>inactive</i> / <i>alb</i> β และลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ <i>inactive</i> / <i>alb</i> β จาก pGEM <i>inactive</i> / <i>alb</i> β	75
53	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12 <i>inactive</i> / <i>alb</i> β และลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ <i>inactive</i> / <i>alb</i> β จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	75
54	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12 <i>active</i> / <i>alb</i> β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>active</i> / <i>alb</i> β จาก pGEM <i>active</i> / <i>alb</i> β	76
55	การแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12 <i>active</i> / <i>alb</i> β	76
56	12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused active sal K และ intein fused active <i>alb</i> β ขนาดของโปรตีนประมาณ 60 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน	77
57	12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused inactive sal K จากพลาสมิด pTYB12 <i>inactive</i> / <i>sal K</i> ซึ่งมีขนาดขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน	78
58	12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused inactive <i>alb</i> β ซึ่งมีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน	79
59	เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน intein fused active sal K จากพลาสมิด pTYB12 <i>active</i> / <i>sal K</i> ที่มี pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 1mM IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
60	เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน intein fused active alb β จากพลาสมิด pTYB12 ^{active} /alb β ที่มี pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 1mM IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ	81
61	12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused inactive sal K ที่ได้จาก pTYB12 ^{inactive} /sal K ให้บริสุทธิ์ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์พบว่าโปรตีนเกิดขึ้นสองขนาดคือขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน	82
62	12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused inactive alb β ที่ได้จาก pTYB12 ^{inactive} /alb β ให้บริสุทธิ์ พบว่าเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วโปรตีนที่ได้มี 2 ขนาดคือ ขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน	83
63	12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused active alb β ที่ได้จาก pTYB12 ^{active} /alb β ให้บริสุทธิ์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนขนาด 60 กิโลดาลตัน	84
64	ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1 ^{active} /sal K โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis	86
65	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB1 ^{active} /sal K และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>active</i> /sal K จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	86
66	ผลการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1 ^{active} /sal K	87
67	การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1 ^{active} /alb β โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ขึ้นยีนที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 144 bp	87
68	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB1 ^{active} /alb β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>active</i> /alb β จาก <i>Lb. salivarius</i> K4	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
69	การแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1 <i>active/alb β</i>	88
70	12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน active alb β fused intein จากพลาสมิด pTYB1 <i>active/alb β</i> ซึ่งมีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB1 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน	89
71	เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน <i>active/alb β</i> ที่มี pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวเหนี่ยวนำ	90
72	12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน active alb β fused intein ขนาด 60 กิโลดาลตัน ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1 <i>active/alb β</i> ให้บริสุทธิ์	91
73	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ active alb β fused intein ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenterodides</i> TISTR 942 ^T เทียบกับ Intein, 1 : active alb β fused intein ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร 1/2 -1/16 : active alb β fused intein ที่ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ตามลำดับ	92
74	โคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมิวแทนต์ pTYB1 <i>active /albβ</i> D25 ที่ได้จากการทำ error prone PCR โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 144 bp	93
75	12% SDS-PAGE แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลาย D25 active alb β fused intein โดยมีพลาสมิด pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ผลการศึกษาไม่พบการแสดงออกของยีนกลายของโปรตีน active alb β fused intein	94
76	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง <i>active/alb β</i> จาก <i>Lb. salivarius</i> K4 กับ ยีนกลายพันธุ์ D25 ของ <i>active/alb β</i>	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 77 แสดงผลการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีนกลาย D25 ของพลาสมิด
pTYB1*active/alb* β

95

การโคลน และการแสดงออกของยีน Salvicin K และ antimicrobial like bacteriocin β ของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4

Cloning and Expression of Salvicin K and Antimicrobial Like Bacteriocin β Genes of *Lactobacillus salivarius* K4

คำนำ

การถนอมอาหารหรือ food preservation เป็นสิ่งที่อยู่คู่กับมนุษย์มาช้านาน ซึ่งเป้าหมายของการถนอมอาหารคือการหยุดหรือชะลอการเน่าเสียของอาหาร การถนอมอาหารโดยปกติจะเป็นการป้องกันการเติบโตของแบคทีเรีย รา และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การเก็บรักษาอาหารหรือการถนอมอาหารโดยวิธีทางชีวภาพเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อมนุษย์ได้นำการหมักมาใช้ เช่น การหมักเบียร์ การทำขนมปัง ไวน์ โยเกิร์ต ชีส และเนย ในขณะที่การถนอมอาหารในปัจจุบันพบว่ามีสารเคมีถนอมอาหารหรือสารกันบูด ซึ่งสารกันบูดดังกล่าวเป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เช่น sodium benzoate หรือ sodium nitrate ซึ่งสารเหล่านี้สามารถตกค้างในร่างกายของผู้บริโภคได้ ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญกับการรักษาสุขภาพมากขึ้น ผู้บริโภคนั้นการใช้สารจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลตกค้างในร่างกายของผู้บริโภคเนื่องจากร่างกายสามารถกำจัดสารเหล่านี้ออกจากร่างกายได้เอง ตัวอย่างสารถนอมอาหารที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสารดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีการปนเปื้อนในอาหารได้ และมีความปลอดภัย

แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกจากแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งแบคเทอริโอซินเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์โดยไรโบโซม และสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นในสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Klaenhammer, 1993) ปัจจุบันได้มีการนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมาผลิตเป็นสารถนอมอาหารแล้ว ได้แก่ nisin และ lactacin 3147 นอกจากแบคเทอริโอซินจะใช้เป็นสารถนอมอาหารแล้วยังทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติก (probitics) คือ ช่วยปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในมนุษย์และสัตว์ และช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ (Soomro *et al.*, 2002)

อย่างไรก็ตามการสกัดแบคทีเรียโอสินจากธรรมชาติในปัจจุบันต้องใช้เวลาทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน และแบคทีเรียโอสินที่ได้มีปริมาณน้อยมาก จึงมีการพัฒนาการผลิตแบคทีเรียโอสินในสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น *Escherichia coli* (*E. coli*) ซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแบคทีเรียโอสินได้ในปริมาณที่สูงขึ้นและรวดเร็วยิ่งขึ้น อีกทั้งการศึกษากายการทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตให้สูงขึ้นได้

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตแบคทีเรียโอสินให้ได้ปริมาณมากขึ้นโดยใช้ *E. coli* expression system และการหา expression vector ที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอสิน Salvicin K (Sal K) และ antimicrobial like bacteriocin β (alb β) รวมถึงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี error prone PCR เพื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์

วัตถุประสงค์

1. การโคลน การแสดงออกของยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* จาก *L. salivarius* K4 โดยใช้ pGEX4T-1, pTYB1 และ pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ โดยทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเชื้อ *E. coli*
2. ศึกษาการทำให้โปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ และการตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ได้จากยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β*
3. การโคลน และการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี error prone polymerase chain reaction (error prone PCR) และการตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การตรวจเอกสาร

1. เปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs)

เปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพ เป็นโปรตีนขนาดเล็ก หรือเปปไทด์มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน มีบทบาทในการต้านเชื้อจุลชีพได้อย่างกว้าง (broad spectrum) เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา เป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์และไรโบโซม (Beutler, 2004; Hancock and Sahl, 2006) โดยธรรมชาติอันที่เป็นรหัสของเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพจำแนกได้หลายชนิด เปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพที่พร้อมทำงาน โดยปกติประกอบด้วยกรดอะมิโน 12-100 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิเป็นบวก มีโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก (amphiphatic) หรือเปปไทด์ที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Yeaman and Yount, 2007; Linde *et al.*, 2008; Sang and Blecha, 2008) ตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก (Willey *et al.*, 2007; Field *et al.*, 2008) เชื้อรา (Duquesne *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007) พืช (Mygind *et al.*, 2005) แมลง (Colgrave *et al.*, 2008; Ireland *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2008) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Selsted and Ouellette, 2005; Lehrer, 2007) และมนุษย์ (Brogden, 2005) เป็นต้น

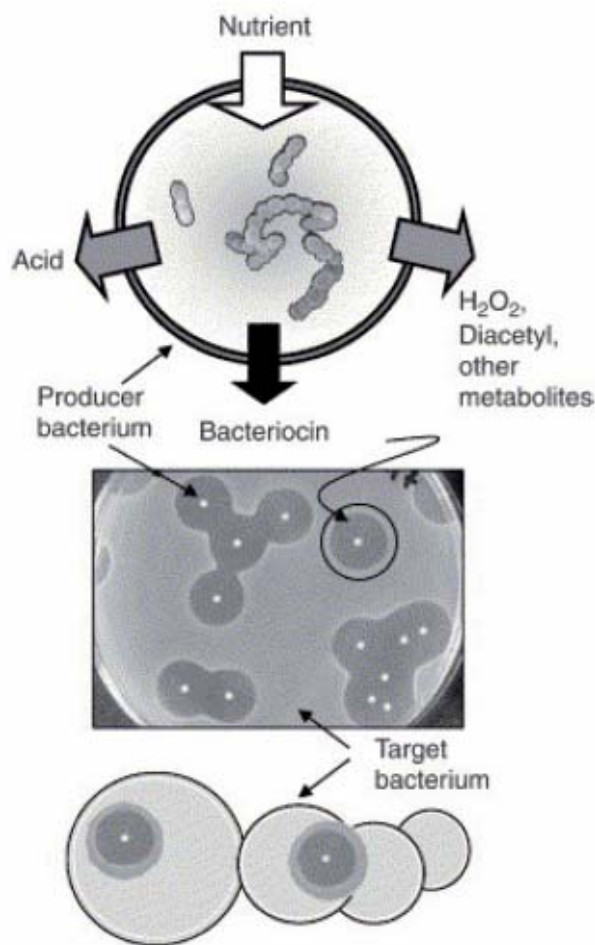
2. แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) และแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นแท่งหรือรูปร่างกลม และมีค่า G + C content น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักเทอโมฟิลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก แบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล อะเซโทอิน (acetoin) กรดอินทรีย์ และแบคทีเรียโอซิน (Holzapfel *et al.*, 1995) ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Leuconostoc* sp. เป็นต้น แบคทีเรียกรดแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหาร และถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมนลงในอาหาร

ภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (Stiles and Hastings, 1991), (ศศิวิมล และอดิสร, 2548)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อใน กระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไข่กรอกหมัก นมเปรี้ยว เบียร์ และไวน์ เป็นต้น กิจกรรมหลักของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อผลิตภัณฑ์อาหารคือ เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสม ของอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ กรดแลคติก กรดแอซิดิก เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติเฉพาะ นอกจากนั้นยังได้ผลิตภัณฑ์ บางอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น สารแบคเทอริโอซิน กลุ่มแบคทีเรีย กรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการ ประยุกต์ทางด้านอาหาร การสร้างแบคเทอริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียกรดแลคติกเองคือ แบคเทอริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆ (Jack *et al.*, 1995)

ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างเปปไทด์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน (รูปบน) จะทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง)

ที่มา : Deegan *et al.* (2006)

ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินบางชนิดมีขายในรูปแบบผงแห้ง เช่น นินซิน (nisin) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ (บริษัท Aplin and Barrett Ltd., UK) ซึ่งผลิตโดย *Lactococcus lactis* ดังภาพที่ 2 และเพดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ALTA™ 2431 (บริษัท Quest International, Australia) ซึ่งผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* โดยองค์การทางอาหารและยา (Food and Drug Administration) ได้ยอมรับว่า Nisaplin™ สามารถใช้ในรูปแบบของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ (O' Sullivan *et al.*, 2002)



ภาพที่ 2 Nisaplin™ คือ nisin A ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ซึ่งผลิตโดยบริษัท Aplin and Barrett Ltd ประเทศอังกฤษ มีชื่อทางการค้า คือ Danisco's natural food

ที่มา: Anonymous (2008)

แบคทีเรียโอซินเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์โดยไรโบโซม โดยแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน (active form) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 กรดอะมิโน แบคทีเรียโอซินโดยส่วนใหญ่จะมีประจุสุทธิเป็นบวก หรือเป็นกรดอย่างอ่อน และในสายเปปไทด์ประกอบไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิก ด้วยมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับสารปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินมีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าสารปฏิชีวนะ โดยมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้นแบคทีเรียที่มียีนแบคทีเรียโอซินจะสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินเพื่อทำลายเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มียีนภูมิคุ้มกันแบคทีเรียโอซินได้ ในขณะที่เดียวกันจะไม่ทำลายเซลล์ของแบคทีเรียผู้ผลิตแบคทีเรียโอซินเนื่องจากการสร้างภูมิคุ้มกัน

แบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งขนาดโมเลกุล สมบัติทางเคมีและกายภาพ (physiochemical properties) กลไกการยับยั้ง (mode of action) และชนิดของแบคทีเรียที่ถูกระงับ (inhibitory spectrum) การจัดจำแนกสารแบคทีเรียโอซินอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล การทนความร้อน การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (enzyme sensitivity) การดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translation modification) และกลไกการยับยั้ง

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน

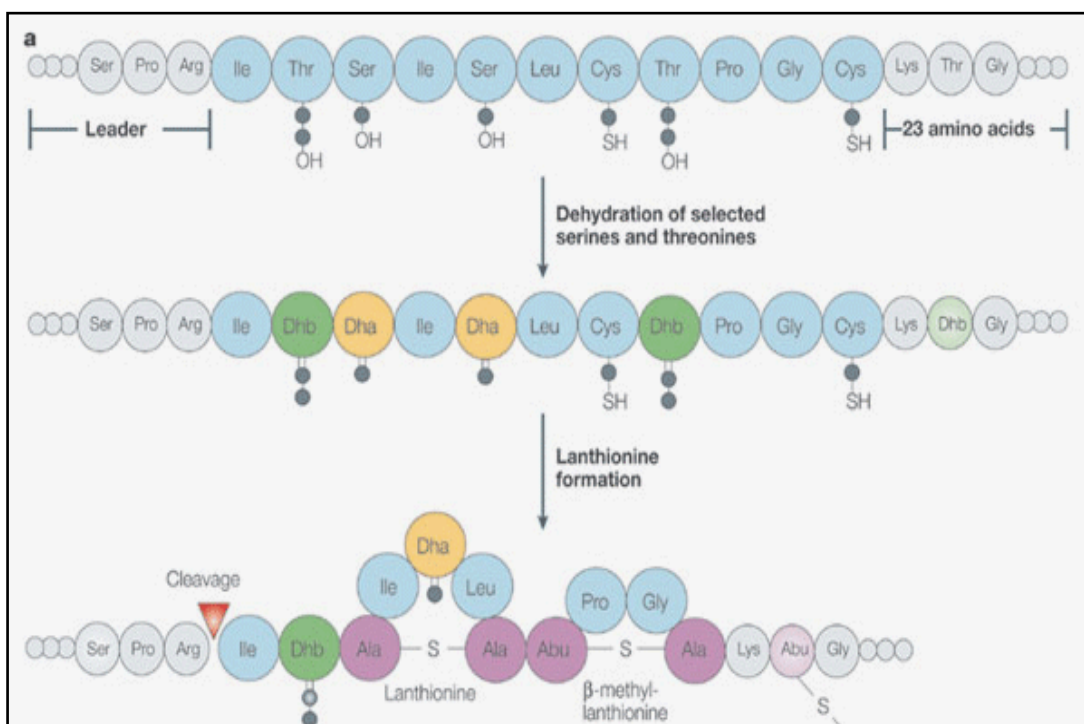
Klaenhammer (1988) และ Nes *et al.* (1996) จำแนกแบคทีเรียโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวกออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (Class I) เป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน เรียกแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ว่าแลนทิไบโอติก (lantibiotic) เนื่องจากประกอบด้วยอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไทโอนีน (lantionine), แอลฟาเมธิลแลนไทโอนีน (α -methyl-lantionines) ที่อยู่ในรูปของดีไฮโดรอลานีน (dehydroalanine) และดีไฮโดรบูทีรีน (dehydrobutyrine) ตามลำดับ ดังภาพที่ 3 แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้แรกเริ่มจะถูกสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปของสายเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (prepeptide) จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการดัดแปลงสายเปปไทด์ในกระบวนการดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัสเพื่อให้ได้สายเปปไทด์ที่พร้อมทำงานซึ่งประกอบด้วย dehydroalanine และ dehydrobutyrine ผลจากการเกิดโครงสร้างไซโออีเธอร์ระหว่างอะมิโนซิสเทอีนและอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีนจะเกิดวงแหวนแลนไทโอนีน (lantionine rings) (McAuliffe *et al.*, 2001) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มแลนทิไบโอติกสามารถแบ่งออกเป็นแบบย่อยได้ 2 แบบ ตามโครงสร้างและหน้าที่ ดังนี้

แบบเอ (Type A) McAuliffe *et al.* (2001) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ด้วยวิธี Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่า แบคทีเรียโอซินแลนทิไบโอติกแบบเอมีลักษณะเป็นเปปไทด์ที่เป็นสายยาวไม่คงรูป มีประจุสุทธิเป็นบวก และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เป็นสารนอมอาหาร เช่น nisin subtilin และ epidermin

แบบบี (Type B) เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กและมีรูปร่างเป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูปประกอบด้วยประจุสุทธิที่เป็นบวก หรือไม่มีประจุ มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอซาซิดิน (mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ (Brotz *et al.*, 1998) ภาพที่ 4

อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ (Cotter *et al.*, 2005) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อนี้คือ ไนซิน (nisin) อีพิดิเดมิน (epidermin) สเตเรปดิน (streptin) เปป 5 (pep 5) แลคติกซิน 481 (lacticin 481) เมอซาซิดิน (mersacidin) แอลทีเอ็นเอ 2 (LtnA 2) ไซโตไลซิน (cytolysin) แลคโตซิน S (lactocin S) ซินนามัยซิน (cinnamycin) และ ซับแลนซิน (sublancin)



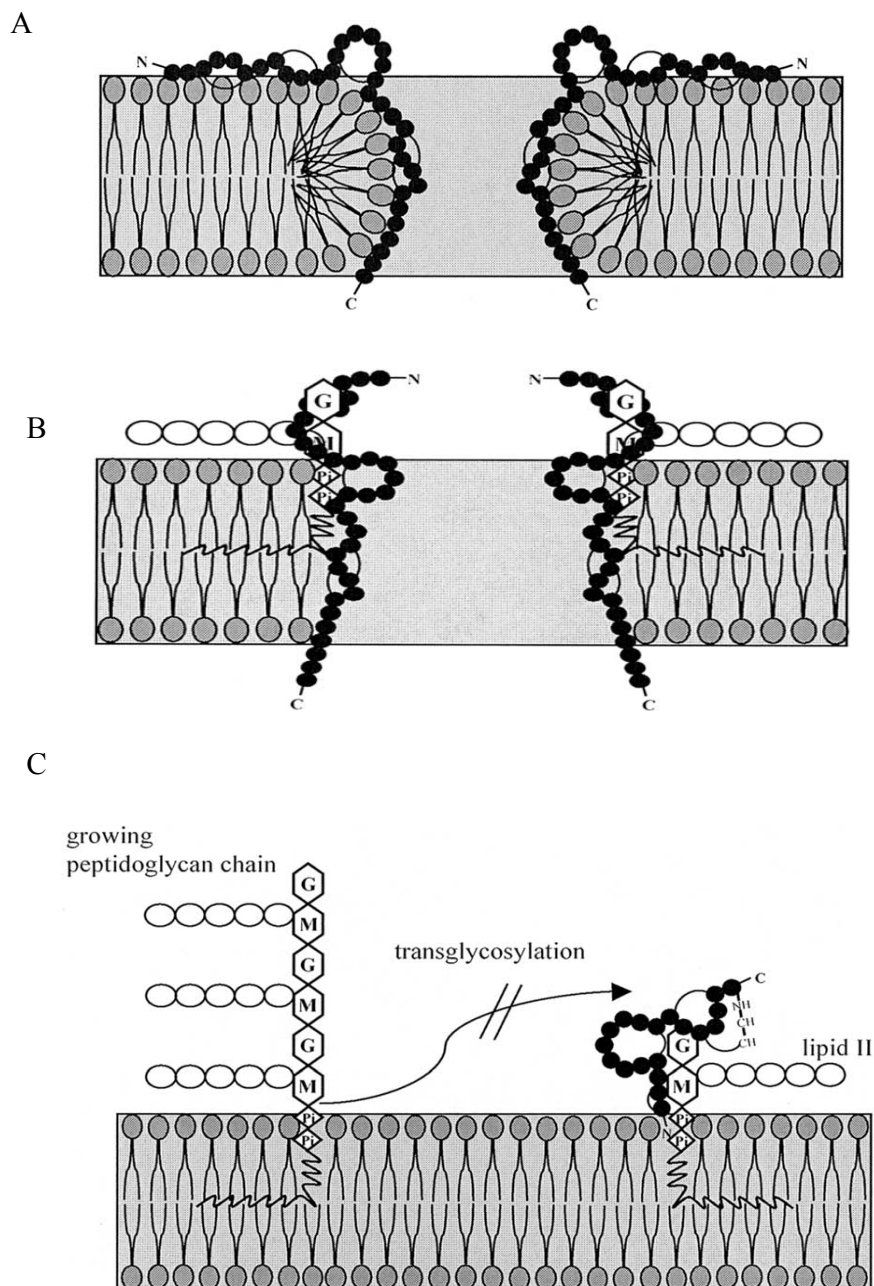
ภาพที่ 3 การเกิด lanthionine residues โดยเกิดการ dehydrated ของกรดอะมิโน serine (Ser) และ threonine เกิดเป็น dehydroalanine (Dha) และ dehydrobutyline (Dhb) ตามลำดับ เมื่อ Dha หรือ Dhb จับกับ cysteine (Cys) จะเกิดโครงสร้างที่เป็นวง (ring) หรือ modified peptide หรือ lantibiotic การจับคู่ระหว่างกรดอะมิโน threonine (Thr) และ cysteine (Cys) ส่งผลให้เกิดโครงสร้าง β -methyl-lanthionine การเกิด bridge ของ lantibiotic และ β -methyl-lanthionine จะส่งผลให้เกิดโครงสร้าง Ala-S-Ala (alanine-S-alanine) and Abu-S-Ala (aminobutyrate-S-alanine) ตามลำดับ

ที่มา: Cotter *et al.* (2005)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่ผลิตโดย LAB

Lantibiotic	Producing strain
Nisin A	<i>L. lactis</i> NIZOR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454
Nisin Z	<i>L. lactis</i> N8, NIZO22186
Lactocin S	<i>L. sake</i> 145
Lactococcin	<i>L. lactis</i> ADRI85L030
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481, ADRIA85LO30
Cytolysin	<i>E. faecalis</i> DS16
Lacticin 3147	<i>L. lactis</i> DPC3147
Salvaricin A	<i>Streptococcus salvarius</i> 20P3
Streptococcin A-FF2	<i>S. pyrogens</i> FF22
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Variacin 8	<i>Micrococcus varians</i> MCV8

ที่มา : Ouwehand (1998); McAuliffe *et al.* (2001)



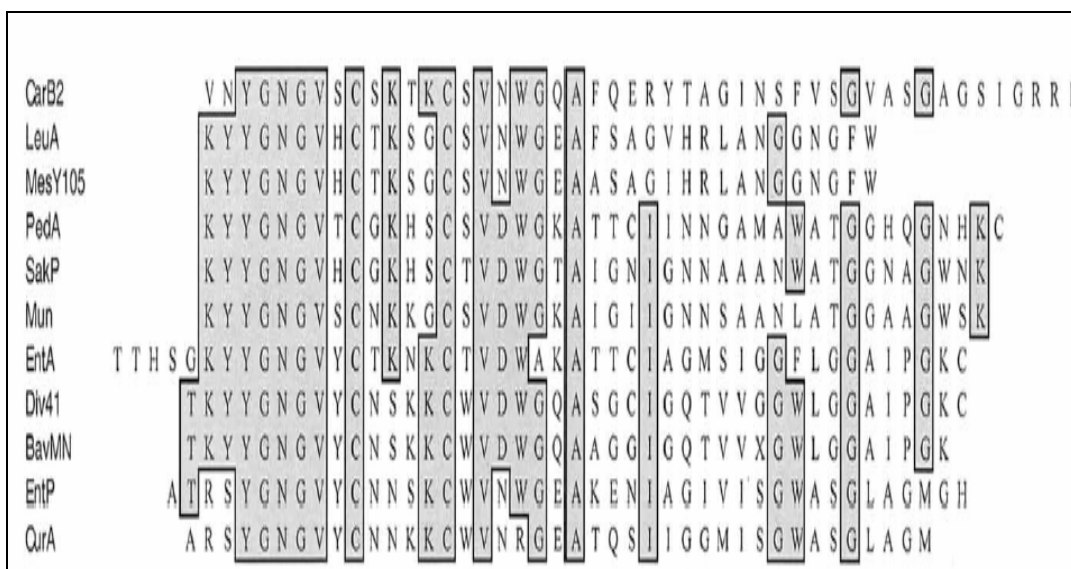
ภาพที่ 4 การยับยั้งของแลนติไบโอติกแบบเอ และแบบบี

- A. Nisin, epidermin, Pep5 ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์
- B. Nisin และ epidermin ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์
- C. Mersacidin และ actagardine

ที่มา : Wiedemann *et al.* (2001)

กลุ่มที่ 2 (Class II) เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดที่ไม่มีการดัดแปลงสายเปปไทด์หลังการแปลรหัส (unmodified peptide) มีประจุเป็นบวก (cationic) และเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) สายเปปไทด์จะมีความยาวประมาณ 20-60 กรดอะมิโนและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน มีสมบัติเป็นแอมฟิพาติก (amphiphatic) ไม่มีกรดอะมิโน lantionine เป็นองค์ประกอบ โดยส่วนใหญ่ภายในสายเปปไทด์ประกอบด้วย double glycine-type leader (Gly^{-2} - Gly^{-1}) สามารถทนต่อความร้อนได้ดีโดยทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นาน 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียสได้นาน 15 นาที (Eijsink *et al.*, 2002) แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้จะเหนียวทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายมีคุณสมบัติให้น้ำซึมผ่านได้ (permeability) ส่งผลให้สารเมตาบอไลต์ในเซลล์รั่วออกจากเซลล์ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จำกัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. และ *Clostridium* sp. (Hechad and Sahl, 2002) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้สามารถแบ่งตามลักษณะของโครงสร้างพื้นฐาน (primary structure) ออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่ม IIa เป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีบริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ประกอบด้วยกรดอะมิโน YGNV และภายในสายเปปไทด์ประกอบด้วยอะมิโนซิสเทอีนสองตำแหน่งเพื่อใช้ในการสร้างสะพานไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) (Eijsink *et al.*, 1998, ภาพที่ 5) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria* sp. แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า pediocin-like peptide แบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม LAB แต่มีการศึกษาพบแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ในแบคทีเรียกลุ่มอื่น เช่น *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus coagulans* และ *Listeria innocua* ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ pediocin AcH/PA-1 sakasin A และ sakasin P เป็นต้น (Ennahar *et al.*, 2000) ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อดัดแปลงที่ใช้ในการหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนิคมนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร (Ennahar *et al.*, 1999)



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIa โดยใช้โปรแกรม Clustal W เมื่อ CurA คือ curvacin A, EntP คือ enterocin P, BavMN คือ bavaricin MN, Div41 คือ divercin V41, EntA คือ enterocin A, Mun คือ muntcidin, SakP คือ sakacin P, PedA คือ pediocin PA-1, MesY คือ mesentericin Y105, LeuA คือ leucocin A, CarB2 คือ carnobacteriocin B2

ที่มา : Hechard and Sahl (2002)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIa และแบคทีเรียผู้ผลิต

Bacteriocin	Producer
Leucocin A/B-Tal la	<i>Leu. gelidum</i>
Mesentericin Y 105	<i>Leu. carnosum</i>
Carnobacteriocin B2	<i>Carnobacterium divergens</i>
Curvacin A	<i>Lb. plantarum</i>
Divercin V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41
Enterocin A	<i>Enterococcus faecium</i> CTC 492
Leucocin A	<i>Leu. gelidum</i> UAL187
Pediocin PA-1/AcH	<i>P. acidilactici</i>
Plantaricin 423	<i>Lb. plantarum</i> 423
Sakacin P	<i>Lb. sakei</i> 790

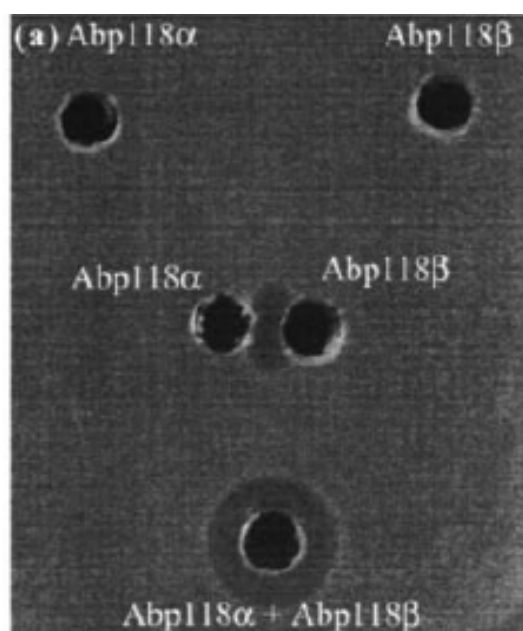
ที่มา : Ennahar *et al.* (1999); Drider *et al.* (2006)

กลุ่ม IIb เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่กลไกการยับยั้งเชื้อเป้าหมายต้องการการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สาย (Two-peptide bacteriocins) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ค่อนข้างมีความแตกต่างกัน ดังภาพที่ 6 กลไกการยับยั้งเชื้อเป้าหมายที่เหมาะสมอาศัยเปปไทด์สองสายและใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เปปไทด์ทั้งสองสายจะช่วยเสริมฤทธิ์ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งมากขึ้น ดังภาพที่ 7 บางกรณีเปปไทด์สายใดสายหนึ่งอาจไม่สามารถหรือมีความสามารถน้อยมากในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย เช่น lactococcin G ซึ่งผลิตจาก *Lactococcus lactis* (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่เรียกว่า GxxxG motif ดังภาพที่ 8 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด transmembrane helices คล้ายกับในกรณีของ AxxxA หรือ SxxxS motif ซึ่งเป็นตัวกลางในการเกิด helix-helix interaction ในเมมเบรนโปรตีน (Senes *et al.*, 2004) ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ดังแสดงในตารางที่ 3

LafA	RNNWQTNVGGAVGSAMIGATVGGTICGPACAVAGAHYLPILWTGVTAATGGFGKIRK-
LafX	-----NRWGDTVLSAASGAGTGIAKACKSFGPWGMAICGVGGAAGGYFGYTHN-
PlnE	-----FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR-----
PlnF	-----VFHAYSARGVRNNYKSAVG PADWVISAVRGFIHG-----
PlnJ	-----GAWKNFWSSLRKGFYDGEAGRAIRR-----
PlnK	-----RRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLGGSRDYNK-----
LcnGα	-----GTWDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH-----
LcnGβ	-----KKWGWLAWVDPAYEFIKGFGKGAIKEGNKDKWKNI-----

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIb โดย LafA, LafX: lactacin F; PlnE, plantaricin EF, PlnJ, PlnK: plantaricin JK; LcnG α , LcnG β : lactococcin G.

ที่มา : Hechard and Sahl (2002)



ภาพที่ 7 แสดงการเสริมฤทธิ์กันของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb เมื่อมีการรวมกันของ เปปไทด์สองสายได้แก่ ABP118α และ ABP118β

ที่มา : Flynn *et al.* (2002)

Lactococcin G	LcnG-α	GTWDDIGGGIGRVAYWVSKAMGNMSDVNQASRINRKKKH
	LcnG-β	KKWGLAWVDPAYEFIKSGPKGAIKEGNKDKWKNI
Lactococcin Q	LcnQα	SIWDDIGGGVGKAAAYWVSKAMGNMSDVNQASRINRKKKH
	LcnQβ	KKWGLAWVEPAGFEFLKSGPKGAIKEGNKDKWKNI
Enterocin 1071	Entα	ESVFSKIENAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH
	Entβ	GPWKLPWLQPAYDFVTGLAKGIGKEGNKNKWKNV
Plantaricin EF	PlnE	FNRCGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR
	PlnF	VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFIHG
Plantaricin JK	PlnJ	GAWNFWSSLRKGFYDGEAGRAIRR
	PlnK	RRSRKNGIGYAIGYAFSAVERAVLGGSRDYNK
Plantaricin S	Plsα	RNKLAYNMGHYAGKATIFGLAANALLA
	Plsβ	KKKQSWYAAAAGDAIVSFGEGLNAW
Plantaricin NC8	PLNC8α	DLTTKLWSSWGYLGGKKARWNLKHPYVQF
	PLNC8β	SVPTSVYTLGILKLSAYKHKRTIEKSFNKGIFYH
Lactacin F	LafA	RNNWQTNVGGAVGSAMIGATVGGTICGPACAVAGAHYLPILWTGVTAATGGFGKIRK
	LafX	NRWGDTVLSAASGAGTGILACKSPGPWGMALCGVGCATGCGYFCYTHN
Brochocin-C	BrcA	YSSKDCLKDIGKIGAGTVAGAAGGGGLAAGLGAIPGAFVGAHFGVIGGSAACISGLLGN
	BrcB	KINWGNVGGSCVGGAVIGGALGGLGGAGGGCITCAIGSIWDQW
Thermophilin 13	ThmA	YSGKDCDKDMGGYALAGAGSGALWGAPAGGVGALPGAFVGAHVGAIAAGGFACMGGMIGNKFN
	ThmB	QINWGSVVGHICIGGAIIGGAFSGGAAAGVGCIVGSGKAIINGL
ABP-118	Abp118α	KRGPNVCVGNELGGLFAGAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL
	Abp118β	KNGYGGSGNRWVHCGAGIVGGALIGAIGCPWSAVAAGISGGFTSCR
Salivaricin P	Sln1	KRGPNVCVGNFLGGLFAGAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL
	Sln2	KNGYGGSGNRWVHCGAGIVGGALIGAIGCPWSAVAAGISGGFASCH
Mutacin IV	NlmA	KVSGGEAVAAIGICATASAAIGGLACATLVTPYCVGTWGLIRSH
	NlmB	DKQAADTFLSAVGGAASGFTYCASNGVWHPYILAGCAGVGAVGVSVPFH
Lactocin 705	705α	GMSGYIQGTFPDLFGYLGHSIAANKHKKGRLEGY
	705β	GFWGGGLGYTAGRVGAAYGHAQASANNHHSPING

ภาพที่ 8 GxxxG motif จากแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb

ที่มา : Oppegard *et al.* (2008)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม class IIb

Bacteriocin	Producer strain
ABP118 (Abp 118 α and β)	<i>Lb. salivarius</i> UCC118
Enterocin 1071A and 1071B	<i>E. faecalis</i> BFE1071
Enterocin L50A and L50B	<i>E. faecium</i> L50
Lactacin F (LafX and LafA)	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088
Lactocin 705 α and β	<i>Lb. casei</i> CRL505
Lactococin G α and β	<i>Lc. Lactis</i> LMG2081
Lactococin M and N	<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i> 9B4
Plantaricin E and F	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantaricin J and K	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantaricin S α and β	<i>Lb. plantarum</i> PLCO10
Thermophilin 13 A and B	<i>S. thermophilus</i> SFi13
Lacticin 3147 A1 and A2	<i>Lc. Lactis</i> DPC3147
Plantaricin W α and β	<i>Lb. plantarum</i> LMG2379

ที่มา : Garneau *et al.* (2002)

กลุ่ม IIc เป็นแบคทีเรียโอซินที่ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม IIa และ IIb เป็นการทำงานระหว่างเปปไทด์สองสายขึ้นไปหรือเป็นวง (cyclic peptides) เช่น Enterocin AS-48 (Folli *et al.*, 2003) แบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIc สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มแบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนหนึ่งตัว (thiobiotics) หรือสองตัว (Cystibiotics) เป็นองค์ประกอบ ส่วนกลุ่มที่สองไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ lactococcin A และ acidacin B (Oscariz and Pisabarro, 2001) แบคทีเรียโอซินที่ได้จากกลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน class IIc

Bacteriocin	Producer strain
Cerein 7/8	<i>Bacillus cereus</i> Bc7
Enterocin B	<i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> CECT 492
Lactococcin A	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2130
Lactococcin B	<i>Lactococcus cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> WM4

ที่มา : Oscáriz and Pisabarro (2001)

กลุ่มที่ 3 (Class III) เป็นเปปไทด์ขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนทานต่อความร้อน และเป็นกลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ไม่ค่อยได้รับความสนใจในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *lactobacillus* sp. ตารางที่ 5 ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ helveticin J และ lacticin B เป็นต้น

ตารางที่ 5 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน class III

Bacteriocin	Producer strain
Acidophilucine A	<i>Lb. acidophilus</i>
Caseicin 80	<i>Lb. casei</i> B80
Helveticin J	<i>Lb. heviticus</i>
Helveticin V-1829	<i>Lb. heviticus</i>

ที่มา : Ouwehand (1998)

กลุ่มที่ 4 (class IV) เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งโครงสร้างมีคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม โดยต้องการคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันในการออกฤทธิ์ เช่น lactocin 27 เป็นต้น (Van and Stiles, 2000)

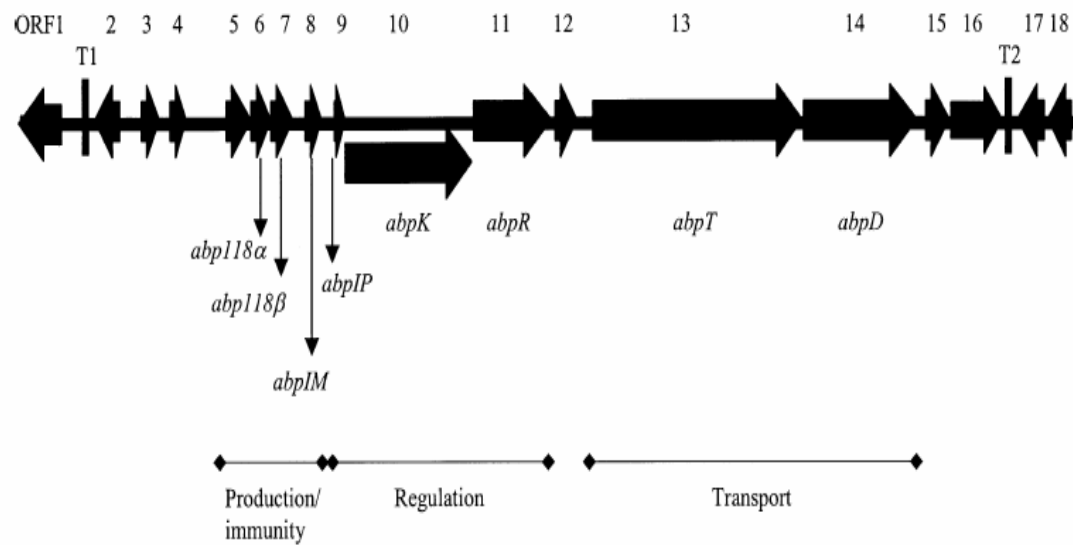
ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่พบอยู่ใน class IV

Bacteriocin	Producer strain
Lactocin 27	<i>Lb. helveticus</i>
Leuconocin S	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
Pediocin SJ-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>

ที่มา : Ouwehand (1998)

3. การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินใน class II

แบคทีเรียโอซินโดยส่วนใหญ่จะมีการสังเคราะห์ในรูปของสายเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ประกอบด้วย N-terminal peptide โดยเฉพาะใน class II พบว่ามี double glycine เป็น leader peptide มีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยแบคทีเรียโอซิน และเป็นบริเวณจดจำสำหรับระบบการขนส่งสายเปปไทด์ออกนอกเซลล์ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มยีน (cluster) ดังภาพที่ 9 ประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งเป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากแบคทีเรียโอซิน ยีนสำหรับโปรตีนขนส่ง ATP binding cassette (ABC) transport protein ทำหน้าที่ขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ และยีนที่ช่วยในการจับกันระหว่างแบคทีเรียโอซินกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound accessory protein) (Nes *et al.*, 1996)



ภาพที่ 9 กลุ่มยีนควบคุมการสังเคราะห์ class II แบคทีริโอซินใน *L. salivarius* UCC118 ประกอบด้วย 18 ORF ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่ง ORF 3, 4, 5, 6, 7 และ 9 มีลักษณะเป็นเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และมีตำแหน่ง GG คล้ายกับ class II bacteriocin

ที่มา : Flynn *et al.* (2002)

ตารางที่ 7 Homologue ของ ORFs จากแบคทีเรียโอซิน ABP-118 ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* UCC118

ORF (gene)	Size (aa)	Homologue
ORF 1	150	Accessory transport protein, brochocin-C system
ORF 2	87	No homologues
ORF 3	57	Presalivaricin B of <i>Lactobacillus salivarius</i> M6
ORF 4	50	No homologues
ORF 5	85	No homologues
ORF 6	64	BlpJ, auto-induced peptide of <i>Streptococcus pneumoniae</i>
ORF 7	68	Plantaricin 1.25b of <i>Lactobacillus plantarum</i>
ORF 8	55	No homologues
ORF 9	38	Competence pheromone of <i>Streptococcus gordonii</i>
ORF 10	429	Histidine kinase, carnobacteriocin A system
ORF 11	264	Response regulator, carnobacteriocin A system
ORF 12	79	No homologues
ORF 13	719	ABC transporter, plantaricin A system
ORF 14	384	Accessory transport protein, sakacin A system
ORF 15	76	No homologues
ORF 16	174	No homologues
ORF 17	88	No homologues
ORF 18	80	No homologues

ที่มา : Flynn *et al.* (2002)

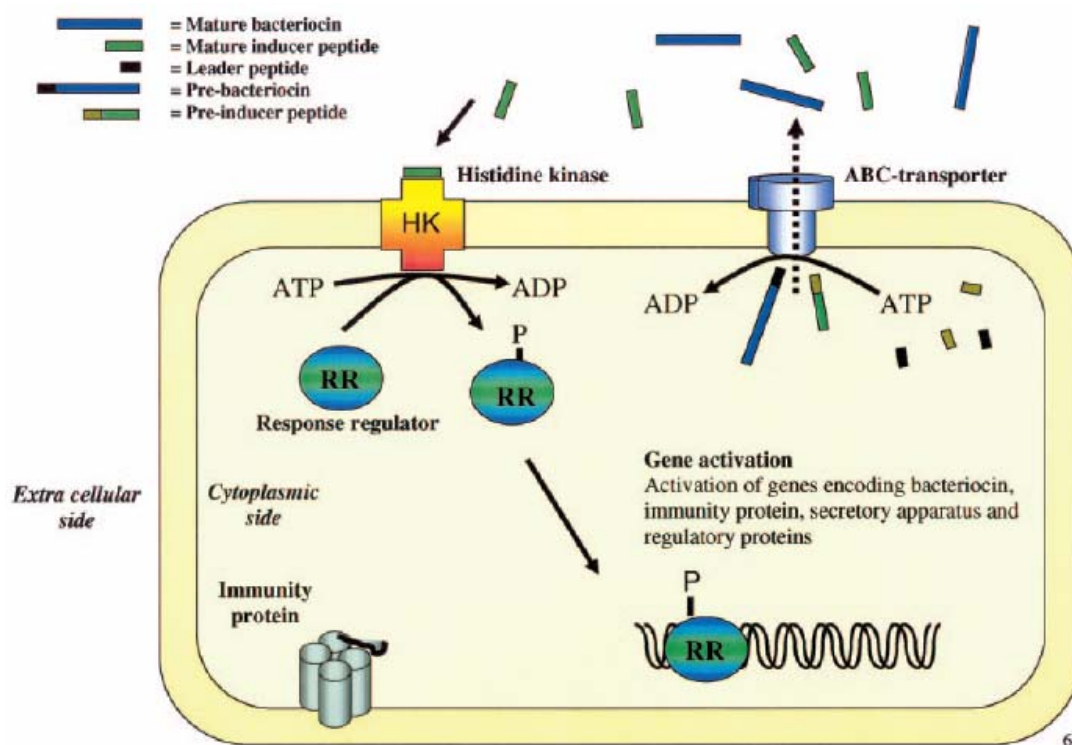
ตารางที่ 8 เปปไทด์แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป inactive form จากแบคทีเรียโอซิน ABP-118 ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* UCC118

Protein		Amino acid sequence of pre-peptides	
		Leaded peptides	Mature peptides
		↓	
ORF3	MNNFIQVDKKELAHIIIGG		RNSYDYIDSGQFGYDIGCTIANTIF FKRLRHSNQNIC
ORF4	VLKKLWNIWLDGG		LIRGRKRYVIIPIFAIFLPLSMWLSD NEGMSYLDYI
ORF5	MLKKLWETWLDGG		FIRGKKRYVIAPVIWALLIPLGIWL FGNEEMSYLDYIQTTPKMIIVTIFCL VGGSTLLYLLDTAMKVNKHMKG
ORF6	MMKEFTVLTECELAKVDGG		KRGPNVCVGNFLGGLFAGAAAGVP LGPAGIVGGANLGMVGGALTCL
(Abp118 α)			
ORF7	MKNLDRFTIMTEDNLASVNGG		KNGYGGSGNRWVHCGAGIVGGA LIGAIGGPWSAVAGGISGGFTSCR
(Abp118 β)			
ORF9	MKFEVLTEKKLQKIAGG		ATKKGGFKRWQCIFTFFGVCK
(AbpIP)			

ที่มา : Flynn *et al.* (2002)

การควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Histidine protein kinase (HPK), Response regulator (RR) และ Induction factor's peptide (IF) ซึ่งทำหน้าที่เสมือนตัวส่งสัญญาณซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน โดย IF จะถูกส่งออกนอกเซลล์พร้อมกับแบคทีเรียโอซินด้วย ABC-transporter และ accessory protein จากนั้น IF ที่ผลิตขึ้นจะเกิดการสะสมและจับกับ HPK บนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันและเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RR และ RR จะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 10

แบคทีเรียโอซินถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในรูปเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงานและจะถูกแยกส่วน N-terminal leader ออก โดยผ่านการตัดแปลงหลังกระบวนการ post-translation modification ซึ่งทำให้เปปไทด์อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน ส่วน N-terminal leader ของแบคทีเรียโอซินอาจมีลักษณะเป็น Gly⁻²-Gly⁻¹ หรือ signal peptide (Worobo *et al.*, 1995)



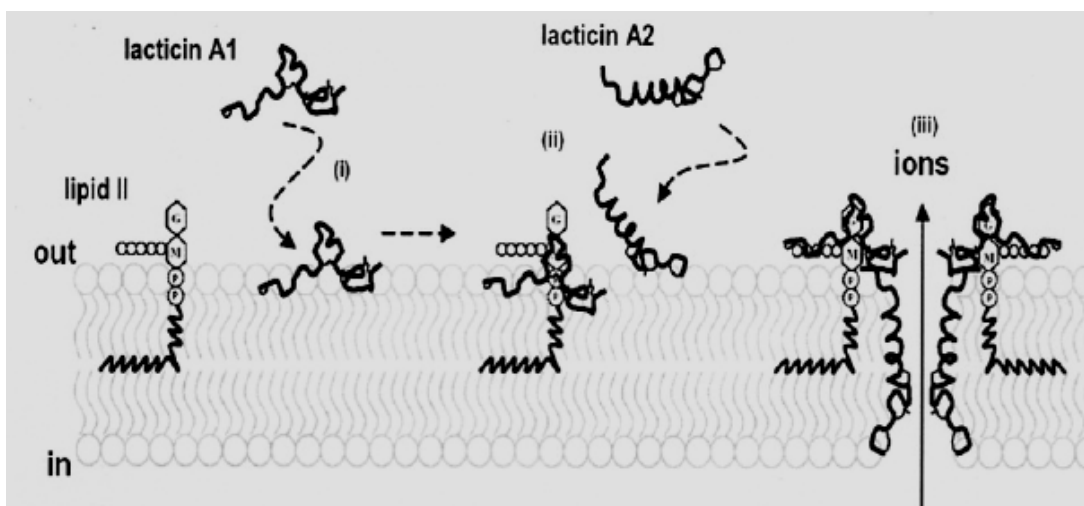
ภาพที่ 10 การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

ที่มา : Drider *et al.* (2006)

4. กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซิน

กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินกลุ่ม lantibiotic เรียกว่า wedge-like model โดยเกิดจากการจับกันระหว่างด้าน N-terminal ที่มีขั้วและประจุบวก (polar and positive charge) กับส่วนที่เป็นตัวรับ (receptor) ซึ่งเป็นประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งการจับของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะจับกับตัวรับที่มีความจำเพาะกับส่วน N-terminal เท่านั้น จากนั้นส่วนที่เป็นรอยพับ (hinge) ของด้าน C-terminal ที่มีความเป็น hydrophobic จะเกิดการบิดและแทรกส่วนที่เป็น C-terminal เข้าไป

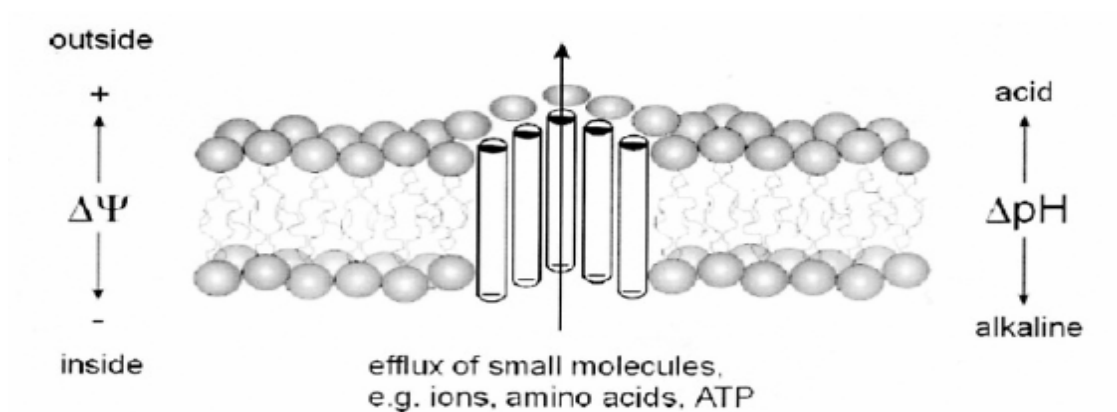
ในเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่กระบวนการ aggregation ทำให้ผนังเซลล์เป็นรู ส่งผลให้การผ่านเข้าออกของสารภายในเซลล์เสียสมดุลย์ และเซลล์ตายในที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 11 (Gert *et al.*, 1999)



ภาพที่ 11 กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic

ที่มา : Imke *et al.* (2006)

กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่ 2 เกิดจากมัดของ α -helix peptides รวมตัวกันในลักษณะที่เรียกว่า barrel-stave like pore กับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กภายในเซลล์สามารถไหลออกสู่ภายนอกเซลล์รวมทั้งมีการกระจายตัวด้วย protein motive force (PMF) ทำให้ศักย์ไฟฟ้าของเซลล์และ pH มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้มีการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ ATP มีการสะสมหรือสูญเสียไอออนและสารเมตาบอไลต์อื่นๆ การสูญเสีย PMF ส่งผลให้มีระดับของ ATP ภายในเซลล์ต่ำ ไม่เกิดการขนส่งสารอาหารภายในเซลล์ และเซลล์ไม่สามารถรักษาระดับของโคเฟคเตอร์ได้เช่น โปแทสเซียมและแมกนีเซียม เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและเซลล์ตายในที่สุด ดังภาพที่ 12

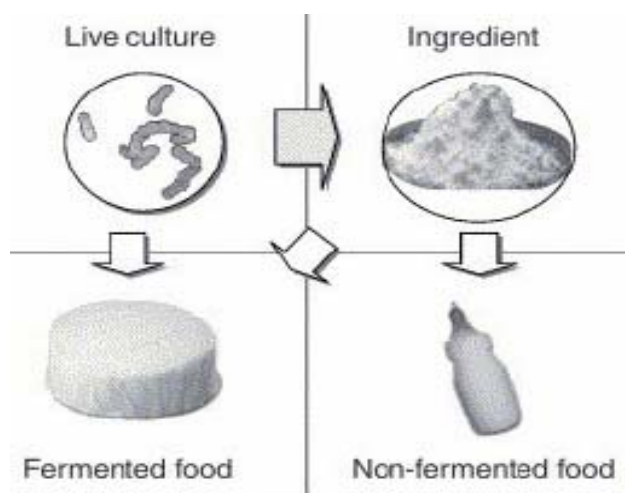


ภาพที่ 12 กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่ 2

ที่มา : Gert *et al.* (1999)

5. การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

แบคทีเรียโอซินได้เข้ามามีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหารคือการใช้แบคทีเรียโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซิน ผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 บทบาทของแบคทีเรียโอสซินในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร โดยอาจใช้ในรูปการเติมเชื้อตั้งต้นที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอสซินลงไปในอาหาร ให้เป็นอาหารหมัก (ซาย) หรือใช้ในรูปส่วนผสมที่เป็นผงเติมลงไปในอาหาร ซึ่งใช้เติมได้ทั้งในอาหารหมักและอาหารทั่วไป (ขาว)

ที่มา : Deegan *et al.* (2006)

แบคทีเรียโอสซินสามารถใช้เติมลงในอาหาร อาจใช้ในรูปแบบที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ได้นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเอง เช่น โอสซินสามารถเตรียมได้จากการหมักน้ำนมที่ไม่มีไขมันโดยใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งสร้างโอสซินได้ การเติมโอสซินลงในอาหารนอกจากจะช่วยป้องกันการเน่าเสียของอาหารแล้วยังช่วยเพิ่มอายุการเก็บของอาหารให้ยาวนานขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 9 (Choi and Park, 2000) และ (Cutter and Siragusa, 1995)

ตารางที่ 9 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร

Producer strain	Bacteriocin
<i>Lactococcus</i> sp.	Nisin Lacticin 3147 Lacticin 481 Lactococcin A, B และ M
<i>Lactobacillus</i> sp.	Lactocin 27 Sakacin A Sakacin B Plantaricin C
<i>Pediococcus</i> sp.	Pediocin A Pediocin PA-1/AcH
<i>Leuconostoc</i> sp.	Leucocin A-UAL 187
<i>Enterococcus</i> sp.	Enterocin A
<i>Carnobacterium</i> sp.	Carnocin U149 Piscicolin 126 Divercin V41

ที่มา : O'Sullivan *et al.* (2002)

6. แบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4

Pilasombut (2006) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียโอซินได้ 2 ชนิด คือ FK12 และ FK15 โดย แบคทีเรียโอซิน FK12 มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียโอซิน presalivaricin B (sal B) (accession No. CAB 63019, 96% homology และ bacteriocin-like prepeptide (accession No. AAM 61775, 94% homology) แบคทีเรียโอซิน FK12 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4438.84 ดาลตัน ส่วน FK15 หรือ Salvicin K (*sal K*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ bactericin abp 118 α ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* supsp. *salivarius* UCC118 (64% identity) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4346.10 ดาลตัน จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า แบคทีเรียโอซิน Sal K สามารถยับยั้ง

การเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบที่เป็นแกรมบวกได้หลายชนิด ได้แก่ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T and *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *E.coli* JM109 และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ

Pilasombut (2006) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ไก่ จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียโอซินชนิด FK22 หรือ antimicrobial like bacteriocin β (*alb* β) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4331.70 ดาลตัน และมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของ bacteriocin *abp* 118 β ที่ได้แยกได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ bacteriocin *abp* 118 β 98% แบคทีเรียโอซิน *alb* β สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้บางชนิด เช่น *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *Bacillus coagulans* JCM 2257^T แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

7. การผลิตแบคทีเรียโอซินโดยใช้ระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli*

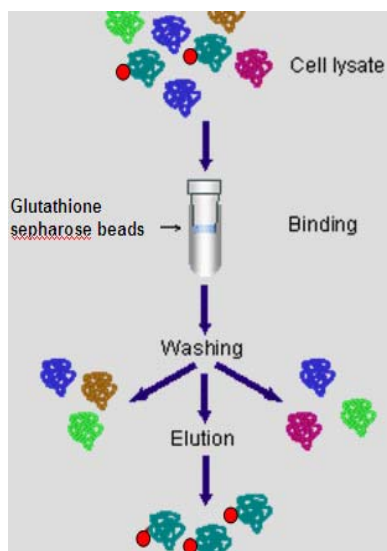
การผลิตโปรตีนโดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านยังคงได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่มาก เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่าย อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการผลิตโปรตีนสั้น มีขั้นตอนน้อยในการทำให้บริสุทธิ์ แต่การผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอซิน หรือเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดอื่นเป็นเรื่องยาก เนื่องจากสายเปปไทด์มีประจุเป็นบวกและเป็นพิษต่อเซลล์ ถูกทำลายได้ง่ายโดยโปรตีนบางชนิด หรืออาจการตกตะกอนของโปรตีนเนื่องจากการม้วนพับ (folding) ที่ไม่ถูกต้องจึงได้มีการแก้ปัญหาโดยใช้โปรตีนตัวเชื่อม (fusion protein) ซึ่งโปรตีนตัวเชื่อมจะส่งเสริมให้โปรตีนที่ต้องการมีการม้วนพับที่ถูกต้องและไม่ถูกทำลายโดยโปรตีนบางชนิด อีกทั้งยังช่วยลดขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนตัวเชื่อมมีหลายชนิด ได้แก่ glutathione-S-transferase (GST), intein, maltose binding protein (MBP) และ thioredoxin เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ผลการเชื่อมโปรตีนที่ต้องการกับโปรตีนตัวเชื่อมแต่ละชนิดอาจให้ผลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนตัวเชื่อมและโปรตีนแต่ละชนิด ปัจจุบันยังไม่มีโปรตีน

ตัวเชื่อมชนิดใดที่มีความเหมาะสมและสามารถใช้ได้กับโปรตีนทุกชนิด (Hammarstrom *et al.*, 2002) เช่น ในการศึกษาของ Chen *et al.* (2007) โดยศึกษาการผลิตเปปไทด์ด้านแบคทีเรียชนิด ABP-CM 4 และ ABP-CMt ที่ได้จากหนอนไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* ซึ่งเปปไทด์ดังกล่าวเป็นสายเปปไทด์มีประจุบวกสูง และสามารถต่อต้านแบคทีเรียและเราได้หลายชนิด เมื่อทำการศึกษการแสดงออกของโปรตีนโดยเปรียบเทียบการใช้ GST และ intein เป็นโปรตีนตัวเชื่อม พบว่าการใช้ GST เป็นตัวเชื่อมไม่มีการแสดงออกของโปรตีน แตกต่างจากการผลการใช้ intein เป็นตัวเชื่อมซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกต้อง ตัวอย่างการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยใช้โปรตีนตัวเชื่อม ได้แก่ cecropin (Xu *et al.*, 2007) β -defensin (Diao *et al.*, 2007) perinerin (Zhuo *et al.*, 2007) pediocin และ PA-1 (Moon *et al.*, 2006) เป็นต้น

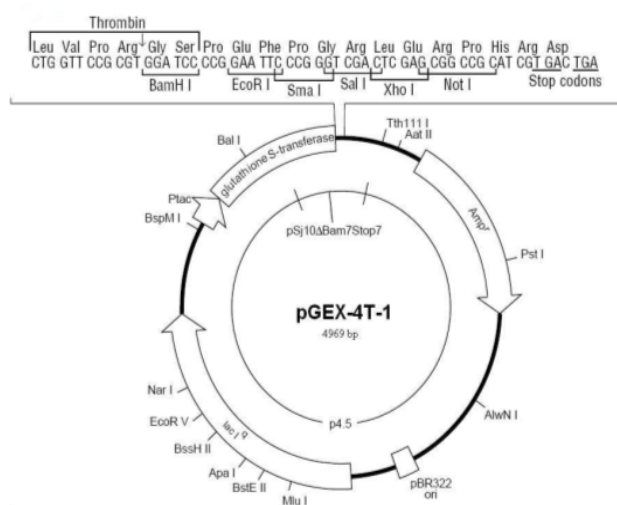
8. Glutathione-S-transferase (GST) fusion system

GST เป็นโปรตีนตัวเชื่อมที่เหมาะสมและง่ายในการศึกษาการแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์ และการตรวจสอบโปรตีนตัวเชื่อม เป็นโปรตีนที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST fusion protein โดยทั่วไปจะมีตำแหน่งตัดด้วย thrombin เพื่อแยกโปรตีนตัวเชื่อมออกจากโปรตีนที่สนใจ ภาพที่ 14 พลาสมิด pGEX4T-1 เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มี GST fusion protein ประกอบด้วย T7/lac โปรโมเตอร์เป็นควบคุมให้มีการแสดงของโปรตีน ยีน *lac I* เป็นรหัสของ lac repressor ภายในดีเอ็นเอพาหะมีตำแหน่งเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pBR322 มียีน *bla* ซึ่งเป็นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ดังภาพที่ 15 การทำให้โปรตีนที่เชื่อมต่อกับ GST บริสุทธิ์ทำได้โดยการใช้ glutathione sepharose beads ซึ่งจะจับกับ GST ไว้ไม่ให้สามารถผ่านคอลัมน์ไปได้ ในขณะที่โปรตีนอื่นที่ไม่ได้ต่อกับ GST จะสามารถผ่านคอลัมน์ไปได้ สามารถกำจัด GST ออกจากโปรตีนเป้าหมายได้โดยใช้ thrombin ซึ่งมีตำแหน่งตัดดังนี้ Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser โดย thrombin จะตัดบริเวณระหว่าง Arg และ Gly ส่งผลให้โปรตีนเป้าหมายหลุดออกจาก GST ได้ การศึกษาการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ pGEX4T-1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ เช่น การศึกษาของ Cao *et al.* (2008) โดยการศึกษาการแสดงออกของยีน β -defensin 4 จากมนุษย์ พบว่า β -defensin 4 สามารถแสดงออก และทำให้บริสุทธิ์ได้อีก ทั้งยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่น แตกต่างจาก Chen *et al.* (2007) ซึ่งศึกษาการผลิตเปปไทด์ด้านแบคทีเรียชนิด ABP-CM 4 และ ABP-CMt โดยใช้ pGEX4T-1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งไม่พบการแสดงออกของโปรตีน



ภาพที่ 14 แผนภาพแสดงการทำโปรตีนที่มี GST fusion protein ให้บริสุทธิ์

ที่มา: Anonymous (2008)



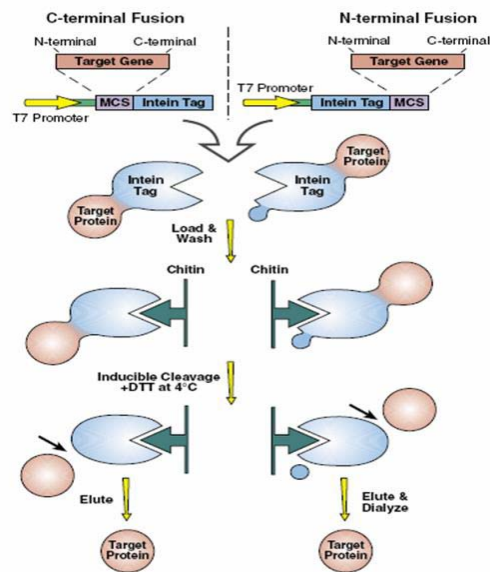
ภาพที่ 15 องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pGEX4T-1 ซึ่งภายในประกอบด้วย Ori ของพลาสมิด pBR322 มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน *lac I* และ glutathione-S-transferase ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อช่วยในการทำให้บริสุทธิ์ อีกทั้งยังช่วยให้โปรตีนเป้าหมายมีการม้วนพับที่ถูกต้อง

ที่มา: Anonymous (2008)

9. Intein fusion system

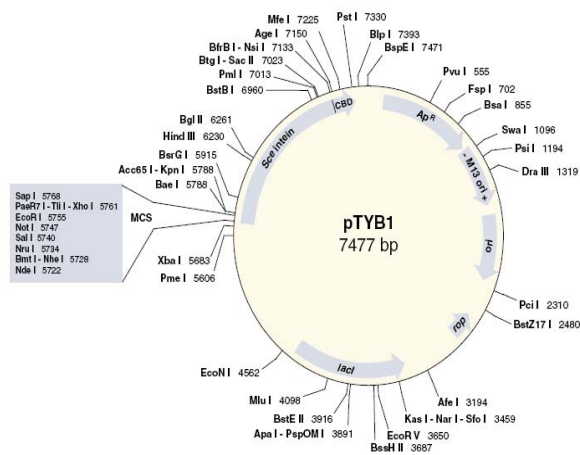
Intein fusion system เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้การตัดด้วยตัวเอง (self-cleavage) ด้วย splicing element ที่เรียกว่า intein เพื่อแยกโปรตีนเป้าหมายออกจาก affinity tag โดยใช้ DTT, β -mercaptoethanol หรืออะมิโนซิสเทอีน ภาพที่ 16 คืออินเอพาทะที่มี intein เป็น fusion protein เช่น กลุ่มอินเอพาทะ pTYB ซึ่งอินเอพาทะในกลุ่มนี้มี T7/lac โปรโมเตอร์เป็นควบคุมให้มีการแสดงของโปรตีน ยีน *lac I* เป็นรหัสของ lac repressor ภายในอินเอพาทะมีตำแหน่งเริ่มต้นการสังเคราะห์อินเอพาทะจากอินเอพาทะของฟาจ M13 มียีน *bla* ซึ่งเป็นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ภาพที่ 17 และ ภาพที่ 18

อินเอพาทะ pTYB ใช้สำหรับการทำโคลนนิ่ง การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* พลาสมิดในกลุ่ม pTYB มีหลายชนิด ได้แก่ pTYB1 pTYB2 pTYB11 และ pTYB12 ซึ่งพลาสมิดทั้ง 4 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มี intein อยู่บริเวณปลาย C ของ fusion protein ได้แก่ pTYB1 และ pTYB2 เป็นกลุ่มที่มี intein อยู่บริเวณปลาย N ของ fusion protein ได้แก่ pTYB11 และ pTYB12 การทำให้โปรตีนที่ต่ออยู่กับ intein บริสุทธิ์ทำได้โดยนำโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ intein ผ่านคอลัมน์ chitin beads โปรตีนส่วนที่เป็น intein จะจับกับ chitin beads ทำให้ติดอยู่กับ chitin beads ในขณะที่โปรตีนอื่นๆ ไม่สามารถจับกับ chitin beads ได้ เมื่อในสารละลายมี DTT, β -mercaptoethanol หรือ cysteine อยู่ในสารละลายจะทำให้ intein เกิดการตัดเอาโปรตีนเป้าหมายออกจาก intein ได้ การผลิตโปรตีนโดยใช้ intein เป็น fusion protein เช่น การศึกษาของ Diao *et al.* (2007) โดยทำการศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ β -defensin ของมนุษย์ พบว่า เปปไทด์ β -defensin สามารถแสดงออกได้ เช่นเดียวกันกับ Chen *et al.* (2007) ซึ่งศึกษาการผลิตเปปไทด์ด้านแบคทีเรียชนิด ABP-CM 4 และ ABP-CMt โดยใช้ pTYB11 เป็นอินเอพาทะ พบว่าเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับ intein มีการแสดงออกและสามารถผลิตเปปไทด์ได้สำเร็จ



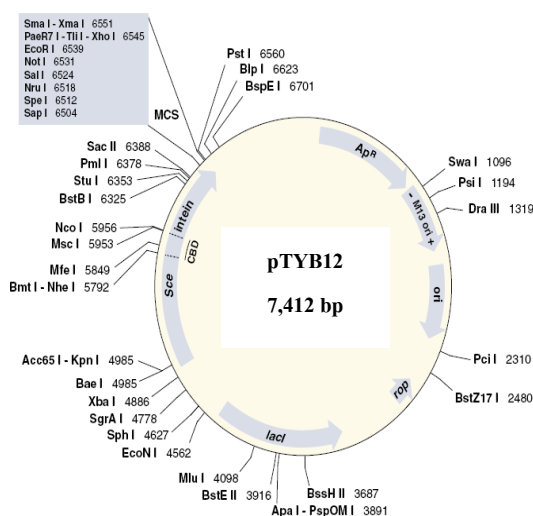
ภาพที่ 16 Intein fusion protein ทั้งสองแบบ คือ N-terminal fusion protein และ C-terminal fusion protein และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อใช้ intein fusion system

ที่มา: Anonymous (2006)



ภาพที่ 17 องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ซึ่งมี intein อยู่ทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ภายในพลาสมิดประกอบด้วยยีน lacI ยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในฟาจ M13 และ intein

ที่มา: Anonymous (2006)



ภาพที่ 18 องค์ประกอบของดีเอ็นเอพาหะ pTYB12 ซึ่งมี intein อยู่ทางด้านปลายหมู่กรด อะมิโน ภายในพลาสมิดประกอบด้วยยีน lacI ยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในฟาจ M13 และ intein

ที่มา: Anonymous (2006)

10. การกลายแบบสุ่ม (random mutagenesis)

การกลายแบบสุ่ม เป็นวิธีการหนึ่งในการวิวัฒนาการโดยตรง (Directed evolution) ซึ่งเป็นเครื่องมือในด้านชีววิทยาโมเลกุลที่กำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน การกลายแบบสุ่มเป็นวิธีการสร้างห้องสมุดยีนให้มีความหลากหลายแล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้องการสามารถจำแนกได้หลายแบบขึ้นอยู่กับวิธีการขึ้นพื้นฐาน ในปัจจุบันเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในงานด้านไบโอคาตาไลซิส (biocatalysis) และงานวิจัย การกลายพันธุ์ (mutation) สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ที่ตำแหน่งจำเพาะโดยใช้เทคนิค site directed mutagenesis หรือชักนำให้เกิดการกลายทั้งหมดในยีนได้ด้วยเทคนิค random mutagenesis (Neylon *et al.*, 2004) การทำให้เกิดการกลายแบบสุ่มมีหลายวิธี ได้แก่ DNA shuffling และ error prone PCR เป็นต้น

11. การทำให้เกิดการกลายแบบสุ่มโดยวิธี error prone PCR

Error prone PCR เป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายเนื่องจากการคัดลอกดีเอ็นเอที่ผิดพลาด และการเติมสิ่งก่อกลายพันธุ์ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่นการเติม Mn^{2+} หรือ Mg^{2+} (Cadwell และ Joyce, 1991; Leung *et al.*, 1989) การทำให้เกิดการกลายโดยวิธี error prone PCR สามารถทำได้โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนที่ต้องการทำให้เกิดการกลายโดยละเอียด (Kim *et al.*, 2003) ผลจากการทำ error prone PCR สามารถทำให้โปรตีนมีความสามารถในการทนทานต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ และทำให้ครึ่งชีวิต (half-life) ของโปรตีน subtilisin S41 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เพิ่มขึ้น 120 เท่า อีกทั้งยังทำให้ T_m (melting temperature) ของสายพันธุ์กลายเพิ่มขึ้นสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wide type) ถึง 25 °C หลังจากการทำ error prone PCR 8 รอบ (Wintrode *et al.*, 2001) ในขณะที่การศึกษาการทนต่อความร้อนของโปรตีน peroxidase จากเชื้อรา พบว่าเอนไซม์สามารถทนต่อความร้อนได้สูงขึ้น 110 เท่า เมื่อทำการทำให้เกิดการกลายโดยใช้วิธี error prone PCR ร่วมกับการทำ DNA shuffling (Cherry *et al.*, 1999).

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer
2. เครื่อง PCR Thermal cycler
3. เครื่องเหวี่ยง
4. เครื่องปั่นแห้งแบบสุญญากาศ
5. เครื่องบดสาร
6. ตู้incuเบเตอร์
7. ตู้อบไอร้อน
8. ตู้ปลอดเชื้อ
9. ตู้เย็น
10. ตู้แช่แข็ง -20 °C และ -80 °C
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
12. เครื่องคอมพิวเตอร์
13. เครื่องทำแห้งสารละลาย
14. เครื่องชั่ง
15. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส
16. เครื่องคิเอ็นเออิเล็กโตรโฟรีซิสแนวนอน
17. เครื่องโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวตั้ง
18. ไมโครไปเปปท์
19. pH มิเตอร์

2. สารเคมี

1. *Lactobacillus salivarius* K4 (ดร. คมแข พิลาสสมบัติ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
2. *L. sakei* supsp. JCM1157^T (รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ คณะเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน)
3. *Leu. mesenteroides* subsp. *Mesenterodidels* TISTR 942^T (ดร. คมแข พิลาสสมบัติ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
4. *E. coli* strain DH5 α
5. *E. coli* BL21 (DE3) (promega, USA)
6. pGEM-T[®] easy vector (promega, USA)
7. pGEX4T1 (GE healthcare)
8. pTYB1 และ pTYB12 (New England Biolab, UK)
9. เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NdeI* *BamHI* และ *XhoI* (Fermentus, USA)
10. เอนไซม์ T4 DNA ligase และ *Taq* polymerase (fermentus, USA)
11. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดพลาสมิด (Fermentus, USA)
12. ชุดสำเร็จสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Qiagen, USA)
13. ดีเอ็นเอไพรมเมอร์ (Fermentus, USA)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth)
15. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
16. แลคโตส
17. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentus, USA)
18. Chitin beads (New England Biolab, UK)
19. 1, 4-Dithiothreitol (DTT) (Fermentus, USA)
20. Glutathione sepharose beads (GE healthcare, UK)
21. Glutathione S-transferase (GE healthcare, UK)

วิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

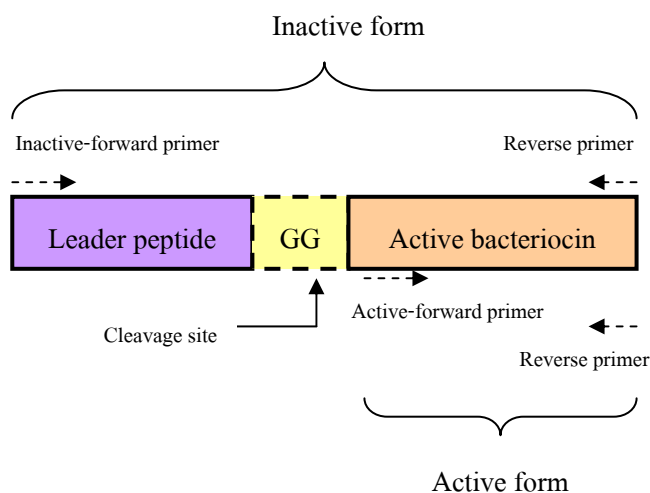
Lb. salivarius K4, *L. sakei* supsp. JCM1157^T และ *Leu. mesenteroides* subsp. *Mesenterodidels* TISTR 942^T เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาพไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และสายพันธุ์ BL21(DE3) เลี้ยงในอาหารสูตร BL ในสภาพต้องการอากาศ และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. การสกัด DNA จาก *Lb. salivarius* K4 (ดัดแปลงจาก Carolissen-Mackay *et al.*, 1997)

เลี้ยง *Lb. salivarius* K4 ในอาหาร MRS 3 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมน้ำละลาย TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) ผสมกับ 0.67% sucrose ผสมให้เข้ากัน เติม lysozyme (70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 20% SDS 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม RNase 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมน้ำละลายฟีนอล 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดไปมา ปั่นแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส เติม phenol : chloroform (1:1) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส เติม chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส เติม isopropanol 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำ และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator

3. การออกแบบไพรเมอร์ สำหรับสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน sal K และ alb β

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 เทียบกับฐานข้อมูลของ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 ในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* และเนื่องจากยีนแบคทีเรียโอซินภายในเซลล์จะอยู่ในรูปแบบที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) เพราะมียีนที่เป็นรหัสของส่วนที่เป็น leader peptide ในกระบวนการขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์จะมีการตัดเปปไทด์แบคทีเรียโอซินที่ตำแหน่งกรดอะมิโน GG เพื่อกำจัด leader peptide ส่งผลให้แบคทีเรียโอซินอยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (active form) ดังนั้นในการออกแบบไพรเมอร์จึงได้มีการออกแบบให้ได้ยีนที่ยืนยันทิ้งทั้งในรูปของ inactive form และ active form โดยออกแบบไพรเมอร์บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดแบคทีเรียโอซินในรูป inactive form เพื่อสร้างแบคทีเรียโอซินในรูป inactive form และออกแบบไพรเมอร์หลังตำแหน่งกรดอะมิโน GG ของ leader peptide เพื่อสร้างแบคทีเรียโอซินในรูป active form ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ลักษณะของเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน inactive form และ active form โดย inactive form คือมีเปปไทด์ที่มี leader peptide อยู่ในสายเปปไทด์ มีนิวคลีโอไทด์ GG ซึ่งเป็นตำแหน่งตัด (cleavage site) ที่ทำให้แบคทีเรียโอซินเปลี่ยนเป็น active form

ตารางที่ 10 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ชิ้นแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นยีนในดีเอ็นเอพลาสมิดทั้งสามประเภท ได้แก่ pGEX4T-1, pTYB1 และ pTYB12 โดย F หมายถึง forward primer และ R หมายถึง reverse primer ค่า T_m คือค่าที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่กลายเป็นสายเดี่ยว

Primer	Sequence (5' → 3')	T_m
Inactive-salK -pTYB-F	TACATATGAAAGAATTTACAGTATTAACAG	59.2
Active-salK-pTYB-F	CGCATATGAAACGTGGTCCTAACTGTGT	62.3
Active-salK-pGEX-F	CGCCATGGGATCCAAACGTTATCCTAATTGT	62.7
salK-R (stop)	TTCTCGAGCTATAAACAAGAAATTGC _ _ _	60.4
salK-R (non stop)	CCCTCGAGTAAACAAGAAATTGCTCCGGCCACCAT _ _ _	64.2
Active-β-pTYB-F	TACATATGAAAAATTTAGATAAGAGATACACA	59.4
Inactive-β-pTYB-F	GCCATATGAAAAATGGTTATGGTGGTAGTG	61.6
Active-β-pGEX-F	CGCCATGGGATCCAAAAATGGCTATGGTGGA	63.8
β-R (stop)	TTCTCGAGTTAACGACAACCTTTTAT _ _ _	60.0
β-R (non stop)	CGCTCGAGACGACAACCTTTTATACCACCAG _ _ _	62.7

หมายเหตุ

Melting temperature (T_m) คำนวณโดยใช้สมการ $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

..... แสดงลำดับเบสของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

— แสดงลำดับเบสของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

_ _ แสดงลำดับเบสของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*

สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเชื่อมต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพลาสมิด pGEX4T-1 ใช้คู่ไพร์เมอร์ดังต่อไปนี้คือ ยีน *active/sal K* ใช้ไพร์เมอร์ active-salK-pGEX-F และ salK-R (stop) ยีน *active/alb β* ใช้ไพร์เมอร์ Active-β-pGEX-F และ β-R (stop)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเชื่อมต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพลาสมิด pTYB1 ใช้คู่ไพร์เมอร์ดังต่อไปนี้คือ ยีน *inactive/salK* ใช้ไพร์เมอร์ inactive-salK-pTYB-F และ salK-R (non stop) ยีน *active/sal K* ใช้ไพร์เมอร์ Active-salK-pTYB-F และ salK-R (non stop) ยีน *inactive/alb β* ใช้

ไพรเมอร์ Inactive- β -pTYB-F และ β -R (non stop) ยีน *active/alb* β ใช้ไพรเมอร์ Active- β -pTYB-F และ β -R (non stop)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเชื่อมต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพลาสมิด pTYB12 ใช้ไพรเมอร์ ดังต่อไปนี้คือ ยีน *inactive/sal K* ใช้ไพรเมอร์ inactive-salK-pTYB-F และ salK-R (stop) ยีน *active/sal K* ใช้ไพรเมอร์ Active-salK-pTYB-F และ salK-R (stop) ยีน *inactive/alb* β ใช้ไพรเมอร์ Inactive- β -pTYB-F และ β -R (stop) ยีน *active/alb* β ใช้ไพรเมอร์ Active- β -pTYB-F และ β -R (stop)

3. การเพิ่มปริมาณ ยีนแบคทีเรียโอซิน *sal K* และ *alb* β

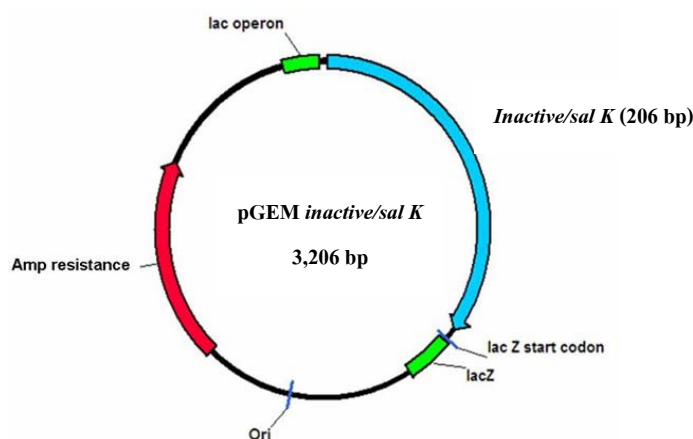
ทำการเพิ่มปริมาณยีนแบคทีเรียโอซิน *sal K* และ *alb* β โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) หรือปฏิกิริยาถูกละลายโดยใช้ไนมิคส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 11 และสารละลายที่ใช้ใน กระบวนการพีซีอาร์ประกอบด้วย 1X *Taq* บัฟเฟอร์, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2U *Taq* DNA polymerase, 10 pmole ไพรเมอร์ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 30 รอบ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้น pre-denaturation	94 °C	5 นาที
ขั้น denature	94 °C	30 วินาที
ขั้น annealing	50 °C	30 วินาที
ขั้น extension	72 °C	1 นาที
ขั้น last-extension	72 °C	10 นาที

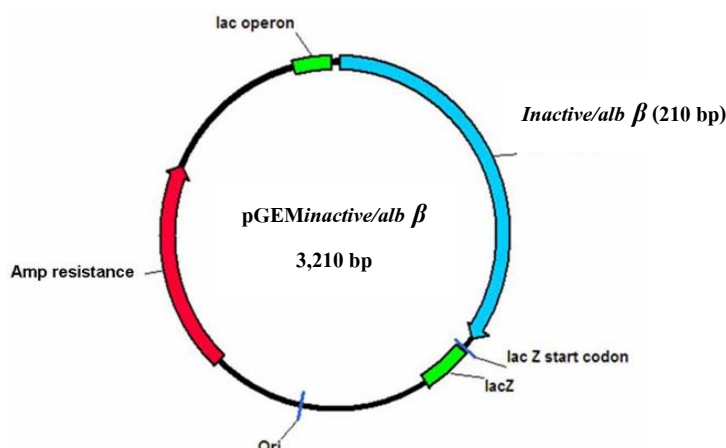
ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และทำให้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (Qiagen, USA)

4. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEMT[®]-easy vector

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เชื่อมต่อกับ pGEMT[®] โดยใช้ pGEMT[®]-easy vector kit (Promega, USA) ซึ่งประกอบด้วย 2X Rapid Ligation Buffer, 50 ng pGEMT[®]-easy vector, PCR product, 3U T4 DNA ligase ทำการผสมส่วนผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °Cข้ามคืน ทำการย้ายส่วนผสมเข้าสู่คอมพิเทนที่เซลล์ชนิด DH5 α โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) แล้วทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนบนอาหารแข็งสูตร LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-Gal บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ทำการตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธีโคโลนีพีชีอาร์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 20 ซึ่งแสดงโครงสร้างของพลาสมิด pGEMinactive/sal K และภาพที่ 21 ซึ่งแสดงโครงสร้างของพลาสมิด pGEMinactive/alb β



ภาพที่ 20 ภาพของพลาสมิด pGEMinactive/sal K (3,206 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และชิ้นแบคทีริโอซิน inactive/sal K (206 bp)



ภาพที่ 21 ภาพของพลาสมิด pGEMinactive/ $\alpha\beta$ (3,210 bp) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนเบคเทอริโอซิน inactive/ $\alpha\beta$ (210 bp)

5. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEX4T-1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ

5.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีนเบคเทอริโอซิน active/sal K และ active/ $\alpha\beta$

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (Fermentas, USA) ร่วมกับเอนไซม์ *Xho*I (Fermentas, USA) จากนั้นจึงบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel จากนั้นจึงทำการกำจัดสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ออกไปโดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ 1/10 เท่าของปริมาตร จากนั้นเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำสารละลายมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70 % ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

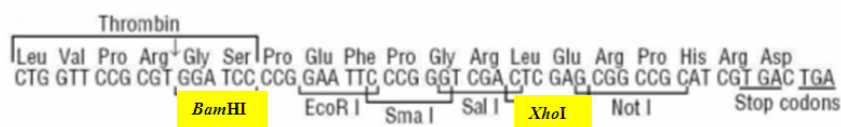
5.2 การเตรียมพลาสมิด pGEX4T-1 expression vector

เพิ่มจำนวนพลาสมิด pGEX4T-1 expression vector (GE healthcare) ให้ได้ปริมาณมากโดยการโยกย้าย (transform) เข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock

transformation เลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มี แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง สกัดแยกพลาสมิด pGEX4T-1 จากเซลล์โดยวิธี alkaline lysis method (Sambrook and Russell, 2001) จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อทำให้ ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอล บริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่น ตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอน พลาสมิด pGEX4T-1 ด้วยน้ำกลั่นที่มี RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วย วิธี electrophoresis บน 1% agarose gel

5.3 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pGEX4T-1 expression vector

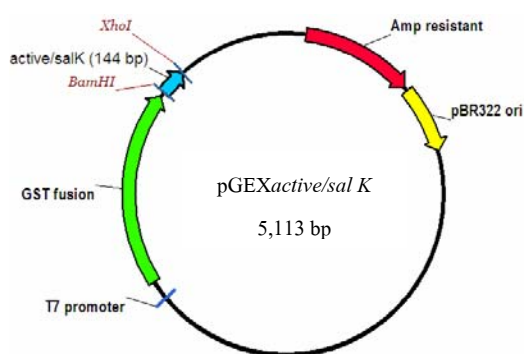
การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pGEX4T-1 expression vector โดยการใช้เอนไซม์ *Bam*HI ร่วมกับเอนไซม์ *Xho*I ดังภาพ 22 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกตัดได้สมบูรณ์ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอ เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติม เอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมา ปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลาย ตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel



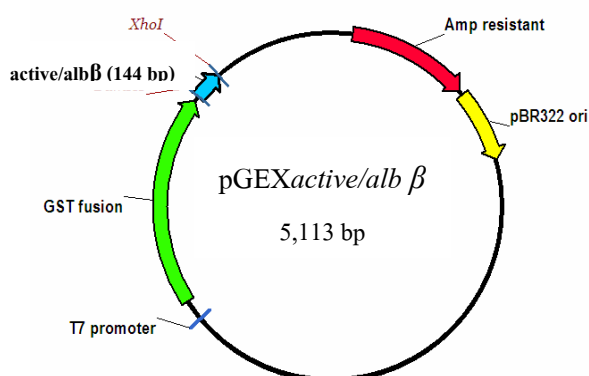
ภาพที่ 22 ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซินอินที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I โดยเชื่อมต่อกับอินเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEX4T-1 บริเวณตำแหน่ง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

5.4 การเชื่อมดีเอ็นเอยีนแบคทีเรียโอซิน *active/sal K* และ *active/alb β* เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pGEX4T-1 Expression vector

เชื่อมต่อดีเอ็นเอยีนแบคทีเรียโอซิน *active/sal K* และ *active/alb β* เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pGEX4T-1 expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โครงสร้างของพลาสมิด pGEX*active/sal K* ดังภาพ 23 และโครงสร้างของพลาสมิด pGEX*active/alb β* ดังภาพ 24



ภาพที่ 23 แผนภาพของพลาสมิด pGEX*active/sal K* (5,113 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *active/salK* (144 bp)



ภาพที่ 24 ภาพของพลาสมิด pGEX*active/alb β* (5,113 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *active/sal K* (144 bp)

5.5 การโยกย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

โดยนำส่วนผสม ligation นำมาเติมลงใน *E. coli* competent cells สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดไมโครทิวป์แช่น้ำแข็งทันที นาน 30 นาที โยกย้ายดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 2 นาที จากนั้นเติม LB Broth medium ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.6 การคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งคาดว่ามีความพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธีการสุ่ม นำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB Broth มาปั่นตกตะกอนเซลล์ แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis method โดยเทอาหารเก่าทิ้งแล้วเติมสารละลาย I (solution I; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วเติมสารละลาย II (solution II; 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วเติมสารละลาย III (solution III; 5M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดเก็บส่วนใสให้หมดใหม่ ทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อที่มี RNaseA ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อขจัด อาร์เอ็นเอ ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel

5.7 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน *active/sal K* และ *active/alb β* ย้ายเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 µg/µl นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตรประมาณ 0.6-0.8 ทำการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 0.2 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ผ่านไปจนครบ 4 ชั่วโมง ศึกษาขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 12% acrylamide gel (Sambrook and Russell, 2001)

5.8 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ glutathione sepharose beads

ทำการย้ายพลาสมิด pGEX4T1 ที่มียีน *active/sal K* และ *active/alb β* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.6-0.8 ทำการเติมตัวเหนี่ยวนำเพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 0.2 % และเลี้ยงต่อเนื่องจากที่อุณหภูมิเดิมจนครบ 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาทำให้เซลล์แตกในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) (NaCl 140 มิลลิโมลาร์, KCl 2.7 มิลลิโมลาร์, Na₂HPO₄ 10 มิลลิโมลาร์, KH₂PO₄ 1.8 มิลลิโมลาร์ (pH 7.3)). โดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปทำให้บริสุทธิ์ โดยนำส่วนใสผ่าน glutathione sepharose bead แล้วล้างด้วย wash buffer (Tris HCl 0.1 โมลาร์, NaCl 0.5 โมลาร์, pH 8.5) จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีนออกจาก beads ด้วย glutathione elution buffer (0.154 กรัม reduced glutathione ซึ่งละลายใน 50 มิลลิลิตร ของ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0) จากนั้นจึงทำการลดปริมาตรสารละลายโปรตีนด้วยเครื่อง freeze dryer จากนั้นจึงทำการตัดแบคเทอริโอซินเปปไทด์ออกจากโปรตีน glutathione S-transferase ด้วย thrombin (bovine thrombin) โดยการเติม

โปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ลงในสารละลายที่มีทรอมบินเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ acrylamide 12%

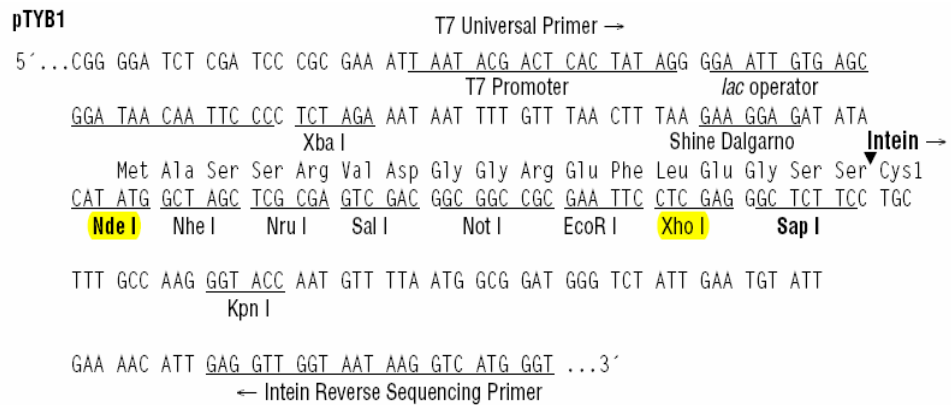
6. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pTYB1 และ pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ

6.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* โดยใช้พลาสมิด pTYB1 และ pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ

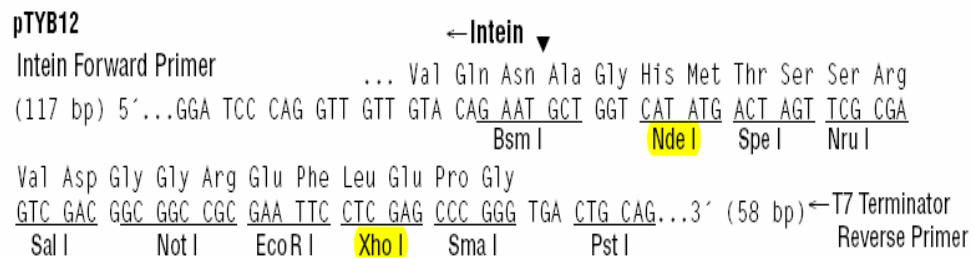
นำชิ้นพีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* (Fermentas, USA) ร่วมกับเอนไซม์ *XhoI* (Fermentas, USA) จากนั้นจึงบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel จากนั้นจึงทำการกำจัดสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ออกไปโดยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

6.2 การเตรียมพลาสมิด pTYB1 และ pTYB12 expression vector

การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 และ pTYB12 expression vector โดยการใช้เอนไซม์ *NdeI* พร้อมกับเอนไซม์ *XhoI* ดังแสดงในภาพที่ 25 และภาพที่ 26 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เพื่อให้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel



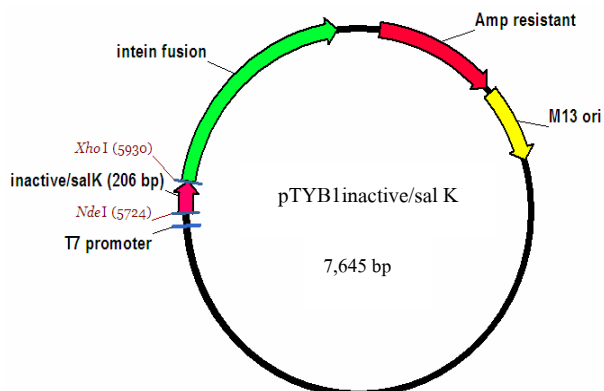
ภาพที่ 25 ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรีย *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI*



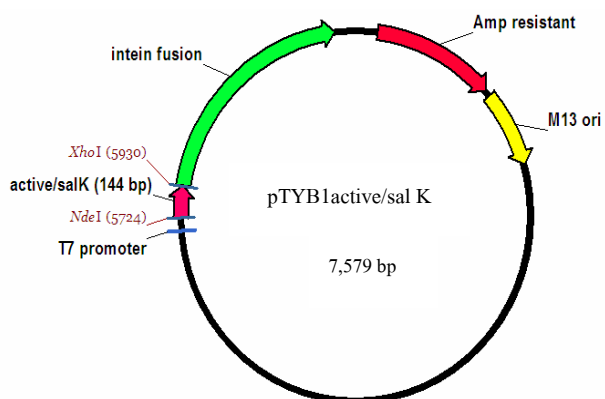
ภาพที่ 26 ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรีย *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI*

6.3 การเชื่อมดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรีย *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* เข้ากับพลาสมิด pTYB1 และ pTYB12 Expression vector

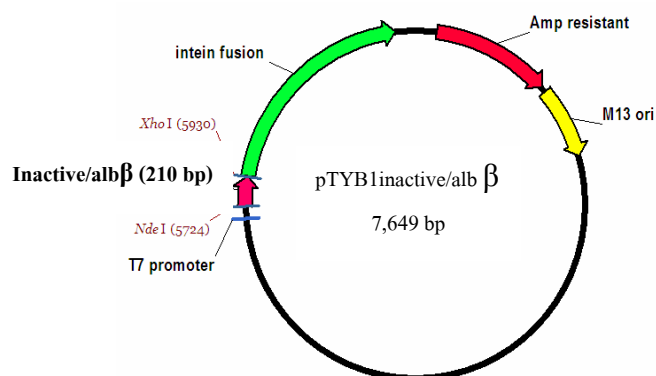
เชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรีย *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดังภาพ 27 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB1*inactive/sal K* ภาพ 28 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB1*active/sal K* ภาพ 29 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB1*inactive/alb β* และภาพ 30 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB1*active/alb β*



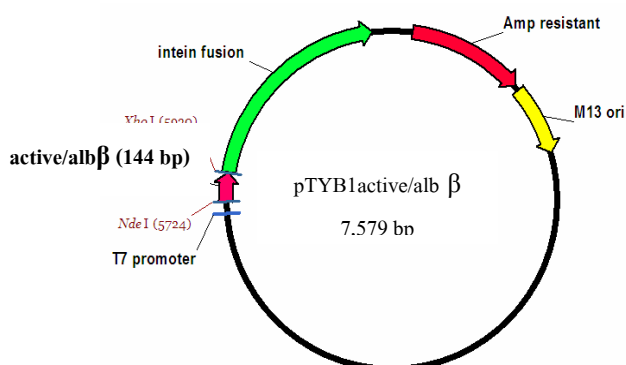
ภาพที่ 27 แผนภาพของพลาสมิด pTYB1inactive/sal K (7,645 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน inactive/sal K (206 bp)



ภาพที่ 28 แผนภาพของพลาสมิด pTYB1active/sal K (7,579 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน active/sal K (144 bp)

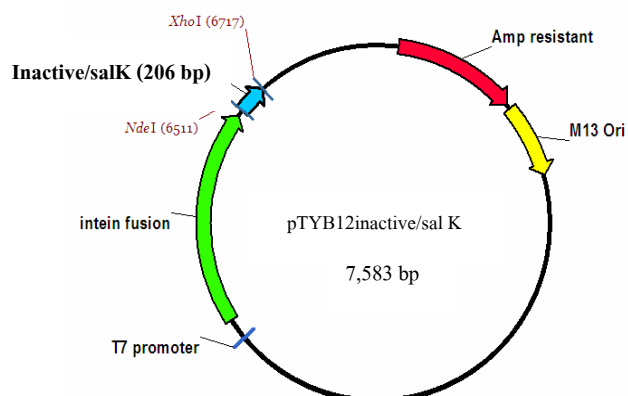


ภาพที่ 29 แผนภาพของพลาสมิด pTYB1inactive/alb β (7,649 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน inactive/alb β (210 bp)

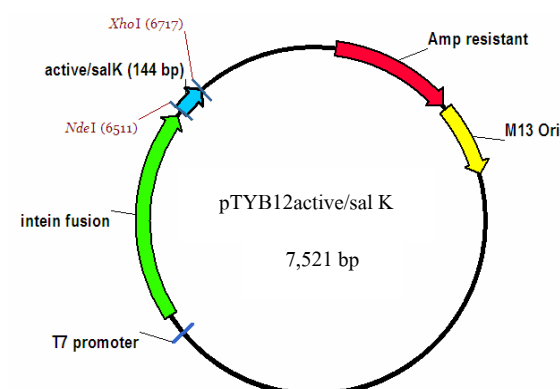


ภาพที่ 30 แผนภาพของพลาสมิด pTYB1active/alb β (7,579 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน active/alb β (144 bp)

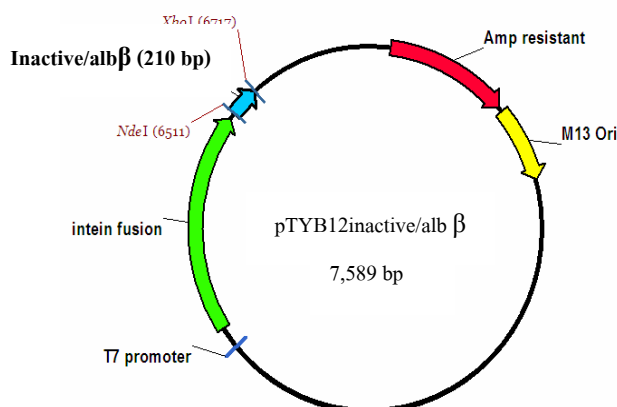
เชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรียโอซิน inactive/sal K, active/sal K, inactive/alb β และ active/alb β ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับพลาสมิด pTYB1 expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดังภาพ 31 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB12inactive/sal K ภาพ 32 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB12active/sal K ภาพ 33 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB12inactive/alb β และภาพ 34 แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pTYB12active/alb β



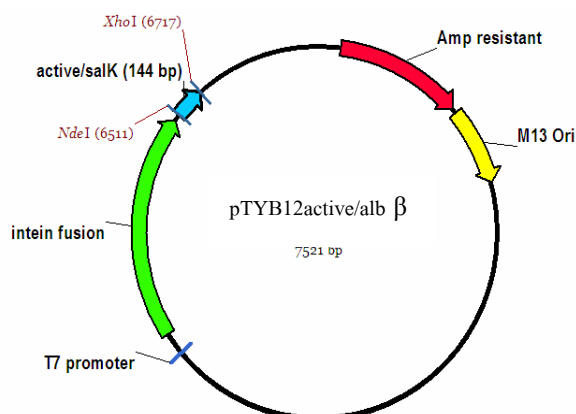
ภาพที่ 31 แผนภาพของพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* (7,583 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K* (206 bp)



ภาพที่ 32 แผนภาพของพลาสมิด pTYB12*active/sal K* (7,521 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *active/sal K* (144 bp)



ภาพที่ 33 แผนภาพของพลาสมิด pTYB12*inactive/alb β* (7,589 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/alb β* (210 bp)



ภาพที่ 34 แผนภาพของพลาสมิด pTYB12*active/alb β* (7,521 bp) ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีนแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* (144 bp)

6.4 การโยกย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

โดยนำส่วนผสม ligation นำมาเติมลงใน competent cells (*E. coli* สายพันธุ์ DH5α) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดไมโครทิวป์แช่น้ำแข็งทันที นาน 30 นาที โยกย้ายดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วแช่

น้ำแข็งทันที นาน 2 นาที จากนั้นเติม LB Broth medium ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

6.5 การคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธีการสุ่ม นำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB Broth มาปั่นตกตะกอนเซลล์ แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis method โดยเทอาหารเก่าทิ้งแล้วเติมสารละลาย I (solution I; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วเติมสารละลาย II (solution II; 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วเติมสารละลาย III (solution III; 5M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดเก็บส่วนใสใส้หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยน้ำกลั่นที่มี RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel

6.6 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ย้ายเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตรประมาณ 0.6-0.8 ทำการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 0.2 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ผ่านไปจนครบ 4 ชั่วโมง ศึกษาขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide

6.7 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ chitin beads

ทำการย้ายพลาสมิด pTYB1 และ pTYB12 ที่มียีนแบคทีเรียโอซินเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6-0.8 ทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 0.2% และเลี้ยงต่อเนื่องที่อุณหภูมิเดิมจนครบ 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาทำให้เซลล์แตกในสารละลายในสารละลาย lysis buffer ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF (20 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication กำจัดเศษเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแล้วผ่าน chitin beads ล้างคอลัมน์ด้วย column buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) ทำการตัดแบคทีเรียโอซินเปปไทด์ออกจาก intein โดยใช้ cleavage buffer ที่มี DTT ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (20 mM Tris-HCl pH 7.5-8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM 1, 4-Dithiothreitol, DTT) โดยการเติม cleavage buffer ลงในคอลัมน์และบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide และทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

7. การคืนสภาพโปรตีน

เก็บเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงโดยการนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วละลายตะกอนของเซลล์ด้วย buffer A ที่มี (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA และ 10 mM NaCl) เติม PMSF ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส และตะกอนไว้ จากนั้นละลายตะกอนโดยการเติม buffer B (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 20 mM NaCl, 5 mM EDTA และ 25% (w/v) sucrose) จากนั้นเติม PMSF ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกอีกครั้งเพื่อล้างตะกอนโปรตีนโดยใช้เครื่อง sonicator แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส และตะกอนไว้ ละลายตะกอนโดยใช้ 8 โมลาร์ ยูเรียจนกระทั่งตะกอนละลายหมด จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปกำจัดยูเรียโดยใช้วิธี dialysis โดยทำการ dialysis ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl แล้วทำการลดปริมาตรของสารละลายด้วยเครื่อง freeze dryer ตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยใช้ 12% SDS-PAGE

8. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutagenesis) การโคลนนิ่ง และการแสดงออกของมิวแทนต์แบคทีเรียโอซิน

8.1 การทำให้ยีน *alb β* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้วิธี error prone PCR

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error prone PCR ทำโดยการดัดแปลงจากวิธีการของ Miyazaki *et al.* (1999) โดยทำการศึกษาสถานะของสารละลายที่เหมาะสมในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยการเปรียบเทียบสารละลายที่ใช้สำหรับทำ error prone PCR โดยให้สารละลายแต่ละชนิดมีส่วนประกอบดังตารางที่ 11 และใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 10 เป็นไพรเมอร์สำหรับการศึกษา การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error prone PCR สถานะที่เหมาะสมในการทำฟิซอร์คือ 95 °C 1 นาที, 54 °C 30 วินาที, 68 °C 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วย 68 °C 10 นาที ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใส

ทั้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ตรวจสอบขนาดของ ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหาลำดับประกอบของสารละลายที่เหมาะสม สำหรับทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error prone PCR

Buffer	A	B	C	D
primer	10 pmole primer	10 pmole primer	10 pmole primer	10 pmole primer
dATP	0.2 mM dATP	0.2 mM dATP	0.2 mM dATP	0.2 mM dATP
dGTP	0.2 mM dGTP	0.2 mM dGTP	0.2 mM dGTP	0.2 mM dGTP
dTTP	1 mM dTTP	1 mM dTTP	1 mM dTTP	1 mM dTTP
dCTP	1mM dCTP	1mM dCTP	1mM dCTP	1mM dCTP
MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	7 mM MgCl ₂
MnCl ₂	1 mM MnCl ₂	1.5 mM MnCl ₂	1 mM MnCl ₂	0.15 mM MnCl ₂
<i>Taq</i>	5 U <i>Taq</i>	5 U <i>Taq</i>	5 U <i>Taq</i>	5 U <i>Taq</i>
polymerase	polymerase	polymerase	polymerase	polymerase

8.2 การเตรียมชิ้นยีนกลายพันธุ์ *active/alb β* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีนกลายพันธุ์ แบคทีเรียโอชิน โดยมีพลาสมิด pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอกลายพันธุ์ของยีน *active/alb β* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* (Fermentus, USA) จากนั้นจึงบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำ ดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบแถบ และขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตร นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน คูส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70% ทำตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel

8.3 การเชื่อมดีเอ็นเอยีนกลายพันธุ์แบคทีเรียโอซิน *active/alb β* ที่ได้จากการทำ error prone PCR เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector

นำยีนกลายพันธุ์ *active/alb β* เชื่อมต่อกับ pTYB1 expression vector ซึ่งตัดด้วย เอนไซม์เดียวกันเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจึงทำการย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้วิธี heat shock จากนั้นจึงทำการเก็บโคโลนีที่ได้จำนวน 109 โคโลนีไปตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์และสุ่มบางโคโลนีไปทำการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

8.4 การแสดงออกของมิวแทนต์โปรตีน

นำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีนกลายพันธุ์แบคทีเรียโอซิน *active/alb β* ย้ายเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.6-0.8 ทำการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 0.2 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ผ่านไปจนครบ 4 ชั่วโมง ศึกษาขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide

9. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี spot on lawn

ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hoover and Harlender (1993) โดยมีเชื้อ *L. sakei* supsp. JCM1157^T เป็นเชื้อเป้าหมาย ทำการเพาะเชื้อด้วยกล้ำเชื้อ 1% ในอาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเป้าหมาย 10 ไมโครลิตร ในอาหารกึ่งแข็ง MRS ซึ่งประกอบด้วยวุ้น 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเททับบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง MRS ประกอบด้วยวุ้น 1.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) รอให้ผิวหน้าวุ้นแห้ง ทำการหยดตัวอย่างแบคทีเรียโอซินลงไปบน

หน้าวุ้น โดยเจือจางเป็น 2 เท่า (two folds serially diluted) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการณ์เกิดบริเวณใส (zone of inhibition) บันทึกค่ากิจกรรมการยับยั้งในหน่วย AU/ml โดยคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าการเจือจางสูงสุดที่แสดงบริเวณใส} \times 100}{\text{ปริมาณแบคทีเรียไอซัน (ไมโครลิตร)}}$$

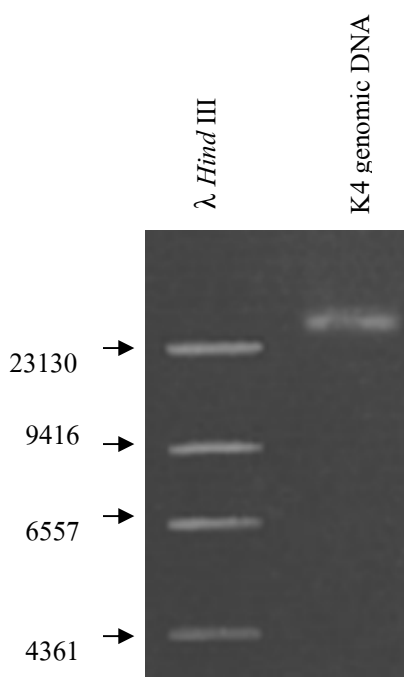
ปริมาณแบคทีเรียไอซัน (ไมโครลิตร)

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การสกัด DNA จาก *Lb. salivarius* K4

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาณ 3 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไม่ต้องการอากาศ เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อทำการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอและทำการเปรียบเทียบขนาดโดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ *Hind* III ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis และตรวจดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator พบว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ภาพที่ 35



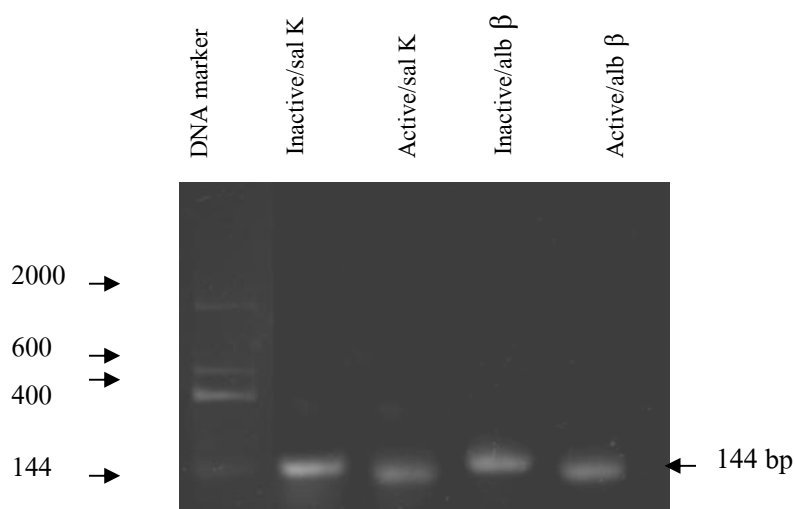
ภาพที่ 35 ขนาดของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ *Hind* III ซึ่งจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel

2. การออกแบบไพรเมอร์ สำหรับสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน sal K และ alb β

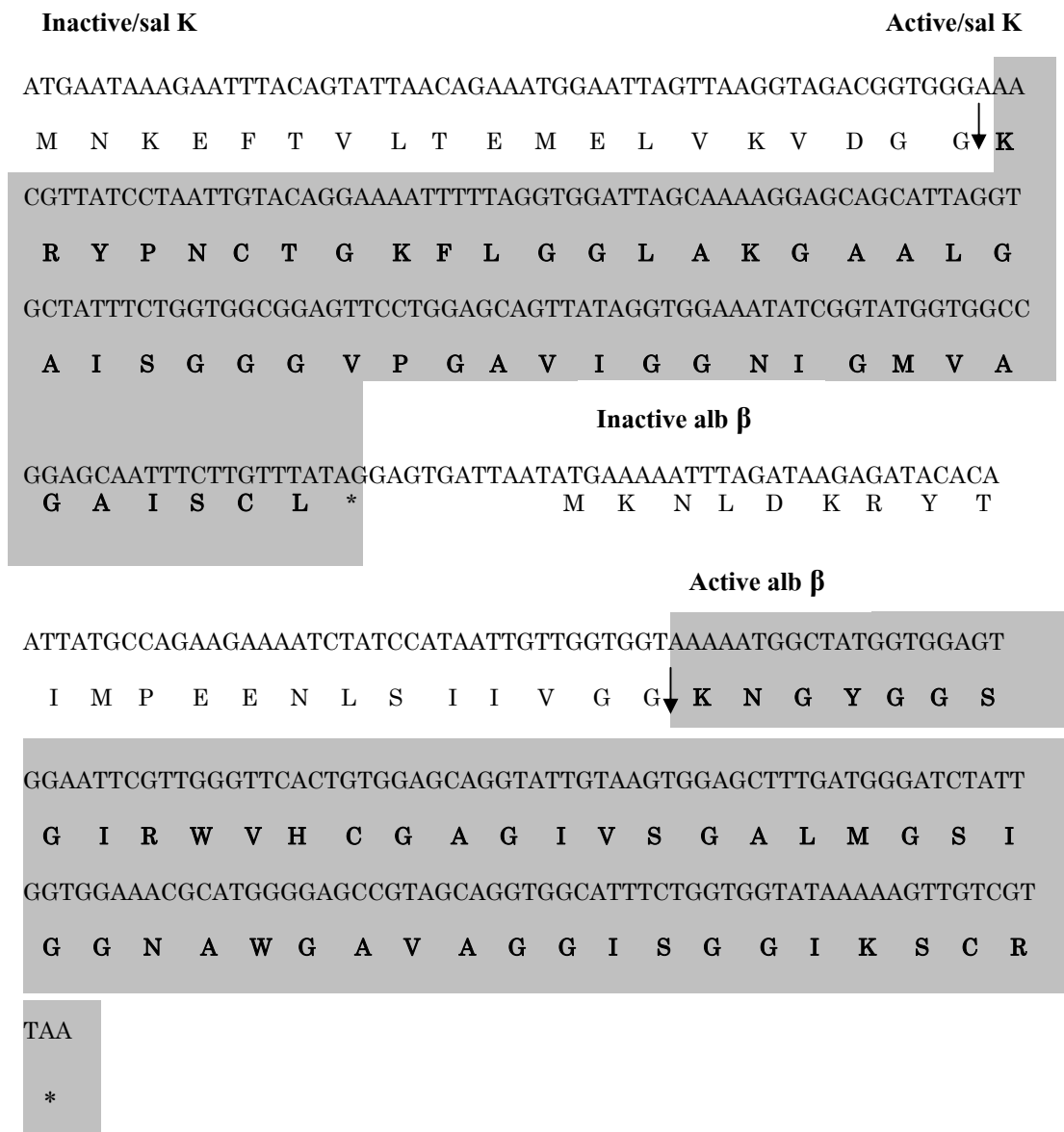
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 เทียบกับฐานข้อมูลของ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 ในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ผลการออกแบบไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 11

3. การเพิ่มปริมาณยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β*

การเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอซินในเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยวิธีพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะในตารางที่ 10 พบว่า ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดของยีนดีเอ็นเอเท่ากับ 206, 144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ดังภาพที่ 36 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ดังแสดงในภาพ 37



ภาพที่ 36 ขนาดของดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* ซึ่งมีขนาด 206, 144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *active/alb β* ซึ่งมีขนาด 144 bp ตรวจสอบขนาดของโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose

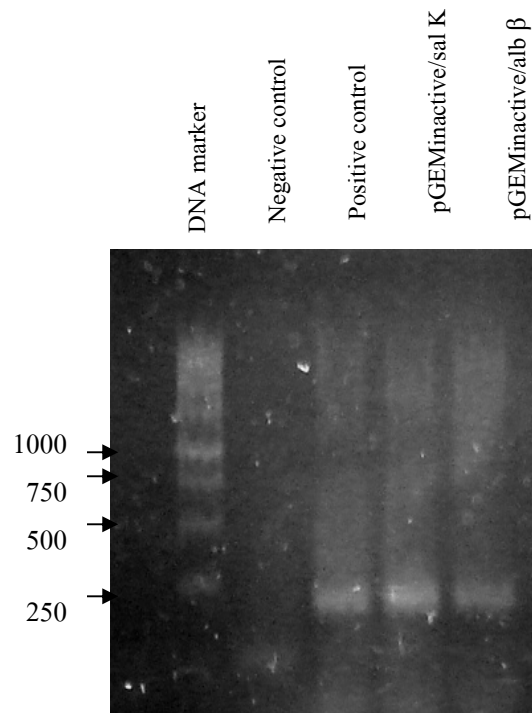


ภาพที่ 37 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/alb β* และ *active/alb β* จาก *Lb. salivarius* K4 โดยแบคทีเรียที่เป็น *inactive form* จะประกอบด้วย leader peptide เมื่อมีการตัด leader peptide ออกไป โดยใช้ตำแหน่งกรดอะมิโน GG (บริเวณลูกศรชี้) เป็นตำแหน่งจดจำทำให้เปปไทด์แบคทีเรียกลายเป็น *active/sal K* และ *active/alb β* ดังแสดงในกล่องสีเทา

4. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEMT[®]-easy vector

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K* และ *inactive/alb β* โดยใช้ pGEMT[®]-easy vector ผลจากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM*inactive/sal K* และ pGEM*inactive/alb β* โดยใช้วิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์และทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าขนาดของยีนที่ได้ตรงกับขนาดของยีน *inactive/sal K* และ *inactive/alb β* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ดังภาพที่ 38 และผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pGEM*inactive/sal K* และ pGEM*inactive/alb β* โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก พลาสมิด pGEM*inactive/sal K* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 100% ดังภาพที่ 39

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/alb β* ที่ได้จากพลาสมิด pGEM*inactive/alb β* กับยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/alb β* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงไป 3 นิวคลีโอไทด์ ส่งผลให้ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/alb β* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซิน *inactive/alb β* ที่ได้จากพลาสมิด pGEM*inactive/alb β* เท่ากับ 95% ดังภาพที่ 40 ซึ่งผลจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสามตำแหน่ง เมื่อทำการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนสามตำแหน่ง ดังภาพ 41 ซึ่งตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงมีดังนี้ N3K, H4N และ V41I ดังตารางที่ 12



ภาพที่ 38 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของพลาสมิด pGEMinacitve/sal K และ pGEMinacitve/alb β โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 206 bp ที่ได้จากการทำพีซีอาร์เป็น positive control พบว่า ซีนียันที่ได้จากการตรวจสอบมีขนาดเท่ากับขนาดของ positive control

```

pGEMinacitve/ sal K  ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCGCATGGTAGGATCCATGAATAAAGAATTACAGTA  60
K4 inacitve/ sal K  -----ATGAATAAAGAATTACAGTA  21
                      *****

pGEMinacitve/ sal K  TTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAACGTTATCCTAATTGTACAGGA  120
K4 inacitve/ sal K  TTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAACGTTATCCTAATTGTACAGGA  81
                      *****

pGEMinacitve/ sal K  AAATTTTtaggtggattagcAAAAGGAGCAGCATTAGGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTT  180
K4 inacitve/ sal K  AAATTTTtaggtggattagcAAAAGGAGCAGCATTAGGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTT  141
                      *****

pGEMinacitve/ sal K  CCTGGAGCAGTTATAGGTGGAATATCGGTATGGTGGCCGGAGCAATTTCTTGTATTATAG  240
K4 inacitve/ sal K  CCTGGAGCAGTTATAGGTGGAATATCGGTATGGTGGCCGGAGCAATTTCTTGTATTATAG  201
                      *****

```

ภาพที่ 39 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *sal K* จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กับ pGEMinacitve/sal K โดยใช้โปรแกรม ClustalW

```

pGEMbeta      ATGGCGGCGCGGGAATTCGATTCGCCATGGTAGGATCCATGAACCATTTAGATAAGAGA 60
K4beta        -----ATGAAAAATTTAGATAAGAGA 21
                *****

pGEMbeta      TACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTTGGTGGTAAAAATGGCTATGGT 120
K4beta        TACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTTGGTGGTAAAAATGGCTATGGT 81
                *****

pGEMbeta      GGAAGTGGAAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGTGGAGCTTTGATGGGA 180
K4beta        GGAAGTGGAAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGTGGAGCTTTGATGGGA 141
                *****

pGEMbeta      TCTATTGGTGGAAACGCATGGGAGCCGTAGCAGGTGGCAATTTCTGGTGGTATAAAAAAGT 240
K4beta        TCTATTGGTGGAAACGCATGGGAGCCGTAGCAGGTGGCAATTTCTGGTGGTATAAAAAAGT 201
                *****

pGEMbeta      TGTCGTTAACTCGAGAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCGCCCTGCAGGTCGACCATATGG 300
K4beta        TGTCGTTAA----- 210
                *****

```

ภาพที่ 40 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *alb β* จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กับ *pGEMinactive/alb β* โดยใช้โปรแกรม ClustalW

ตาราง 12 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับอะมิโนในยีน *alb β* ที่ได้จาก *pGEMinactive/alb β*

ลำดับอะมิโน	Albβ	pGEMinactive/albβ
3	N	K
4	H	N
41	V	I

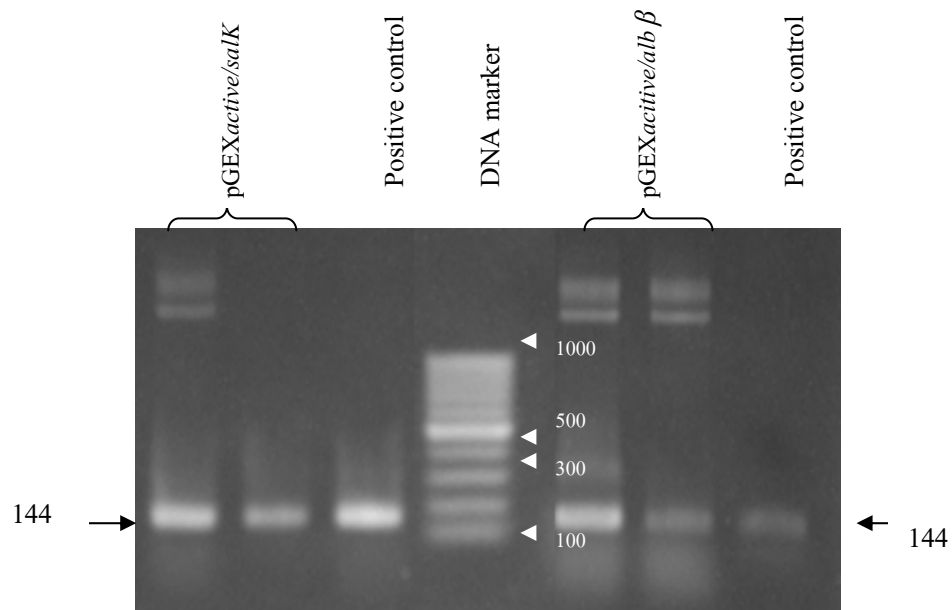
5. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียในพลาสมิด *pGEX4T-1*

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ *pGEX4T-1* เป็น expression vector พบว่ายีนแบคทีเรียทั้ง *active/sal K* และ *active/alb β* สามารถแทรกเข้าสู่ในพลาสมิด *pGEX4T-1* ได้สำเร็จและเรียกกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *pGEXactive/sal K* และ *pGEXactive/alb β* ตามลำดับโดยตรวจสอบได้จากการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ และการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนมีขนาดเท่ากับขนาดของยีน *active/sal K* และ *active/alb β* คือมีขนาดเท่ากับ 144 bp ดังภาพ 42 เมื่อทำการสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด *pGEXactive/sal K* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ยีน *sal K* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ดังภาพที่ 43 และเมื่อทำ

การแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้ตรงกับลำดับอะมิโนของเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน sal K ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ดังภาพที่ 44

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEXactive/*alb β* เมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซินที่ได้จากพลาสมิด pGEXactive/*alb β* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซิน pGEMactive/*alb β* พบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ชนิด adenine (A) 1 ตำแหน่ง และเป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์หลังจากตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI ดังภาพ 45 ส่งผลให้เกิด frame shift ทำให้ไม่สามารถแปลรหัสยีนแบคทีเรียโอซิน *alb β* ได้ และพบว่าเมื่อทำการแปลรหัสสามารถแปลรหัสกรดอะมิโนได้เพียง 18 กรดอะมิโน คือ KMAMVE VEFVGFTVEQVL และลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวไม่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากแบคทีเรียโอซิน *alb β* ดังภาพ 46

เมื่อนำพลาสมิด pGEXactive/*sal K* และ pGEXactive/*alb β* ที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทดสอบการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณที่มาก ซึ่งขนาดของโปรตีนที่แสดงออกควรมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน ผลการตรวจสอบขนาดของโปรตีนหลังจากทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยน้ำตาลแลคโตสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GST active *sal K* ขนาด 30 กิโลดาลตันจากพลาสมิด pGEXactive/*sal K* แต่พบการแสดงออกของโปรตีน GST active *alb β* จากพลาสมิด pGEXactive/*alb β* แต่เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากพลาสมิด pGEXactive/*alb β* มีลำดับที่ไม่ถูกต้อง และมีตำแหน่งของ stop codon ทำให้โปรตีนที่มีการแสดงออกมีขนาดต่ำกว่า 30 กิโลดาลตัน และมีขนาดของโปรตีนใกล้เคียงกับขนาดของ GST fusion protein ซึ่งใช้เป็น tag ของแบคทีเรียโอซินเปปไทด์ ดังภาพที่ 47



ภาพที่ 41 ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEXactive/sal K และ pGEXactive/alb β ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *active/sal K* และยีน *active/alb β* เป็น positive control โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis

```

pGEXactive/sal K  AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAAATTTTAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATT  60
K4 active/sal K  AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAAATTTTAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATT  60
*****

pGEXactive/sal K  GGTGCTAATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG  120
K4 active/sal K  GGTGCTAATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG  120
*****

pGEXactive/sal K  GCCGGAGCAATTTCTTGTATTATAG  144
K4 active/sal K  GCCGGAGCAATTTCTTGTATTATAG  144
*****

```

ภาพที่ 42 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pGEXactive/sal K และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sal K* จาก *Lb. salivarius* K4

AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTATAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAA
 K R Y P N C T G K F L G G L A K G A A L
 GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG
 G A I S G G G V P G A V I G G N I G M V
 GCCGGAGCAATTTCTTGTATTATAG
 A G A I S C L *

ภาพที่ 43 การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEX $_{active}/sal K$

pGembeta	AAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT 60
pGEXbeta	-AAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT 59

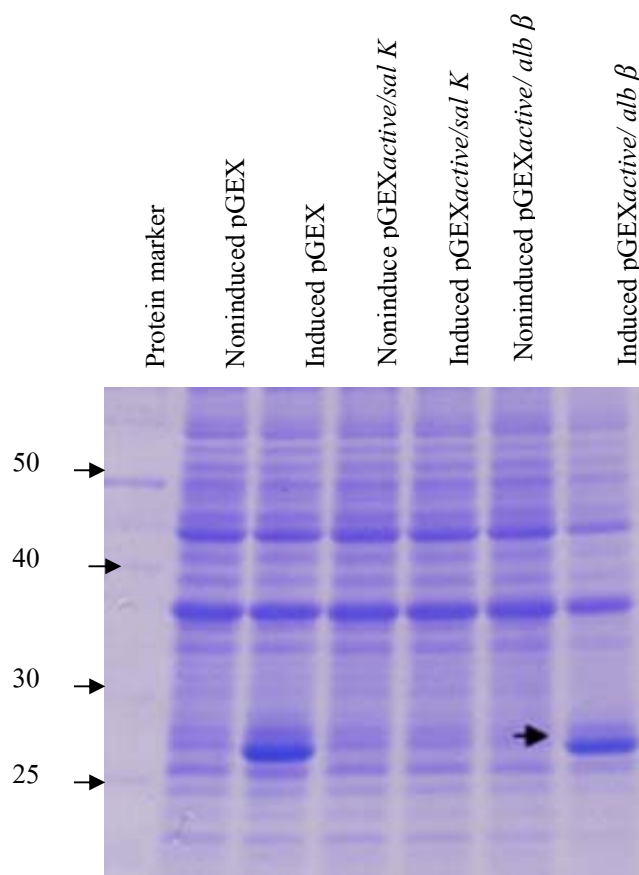
pGembeta	GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 120
pGEXbeta	GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 119

pGembeta	GGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA 144
pGEXbeta	GGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA 143

ภาพที่ 44 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pGEX $_{active}/alb \beta$ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $alb \beta$ จากพลาสมิด pGEM $_{active}/alb \beta$ พบว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์แรกของยีน $active/alb \beta$ ขาดหายไป 1 ตำแหน่ง

AAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTGTAAGT
 K M A M V E V E F V G F T V E Q V L * V
 GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT
 E L * W D L L V E T H G E P * Q V A F L
 GGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA
 V V * K V V V *

ภาพที่ 45 การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEX $_{active}/alb \beta$



ภาพที่ 46 12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน GST active sal K และ GST active alb β เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pGEX4T-1 expression vector ซึ่งมีโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

6. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียในพลาสมิด pTYB12 expression vector

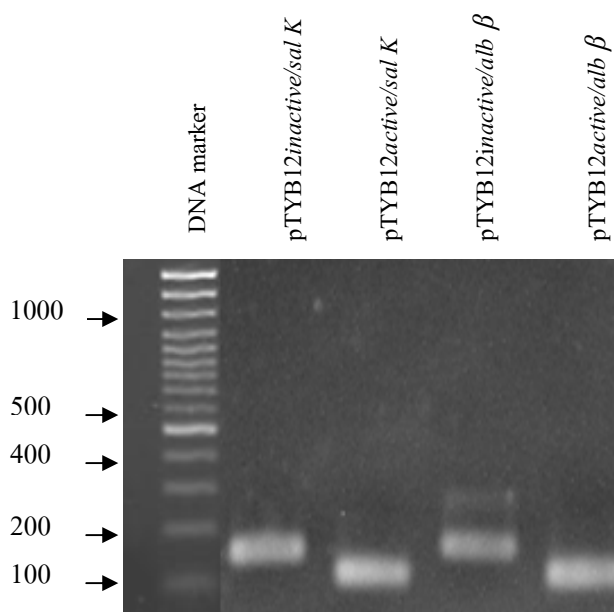
การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pTYB12 เป็น expression vector พบว่ายีนแบคทีเรียทั้ง *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/ alb β* และ *active/ alb β* สามารถแทรกเข้าไปอยู่ในพลาสมิด pTYB12 ได้สำเร็จ โดยตรวจสอบด้วยการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ และทำการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเท่ากับขนาดของยีน *inactive/sal K*, *active/sal K*, *inactive/ alb β* และ

active/alb β คือมีขนาด 206, 144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ ดังภาพ 48 และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) พบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีเรียโอซินที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive/sal K* ที่ได้จากพลาสมิด pGEM*inactive/sal K* ดังภาพที่ 49 ภาพที่ 50 แสดงลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน *inactive/sal K* ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active/sal K* จากพลาสมิด pTYB12*active/sal K* ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active/sal K* ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ดังภาพที่ 51 และภาพที่ 52 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากยีน แบคทีเรียโอซิน *active/sal K* ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*active/sal K* ผลจากการตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive/alb β* ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*inactive/alb β* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pGEM*inactive/alb β* ดังภาพที่ 53 เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ลำดับกรดอะมิโนดังภาพ 54 เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active/alb β* ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*active/alb β* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pGEM*active/alb β* ดังภาพที่ 55 และภาพที่ 56 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*active/alb β*

เมื่อนำพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วไปทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก และทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่าพลาสมิด pTYB12*active/sal K* และ pTYB12*active/alb β* มีการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งขนาดของโปรตีนที่ได้มีขนาดเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 57 ในขณะที่ขนาดของโปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* และ pTYB12*inactive/alb β* มีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน ดังภาพ 58 และภาพที่ 59

นำพลาสมิด pTYB12*active/sal K* และ pTYB12*active/alb β* มาเลี้ยงในอาหารสูตร LB broth 10 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลินเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการเปรียบเทียบตัวเหนี่ยวนำระหว่าง 0.2% แลคโตส และ 1 มิลลิโมลาร์ IPTG พบว่า จากการใช้ตัวเหนี่ยวนำที่แตกต่างกัน พบว่าผลการแสดงออกของโปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกัน ดังภาพที่ 60 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพที่ 61 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ 1 มิลลิโมลาร์ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ

นำพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K*, pTYB12*active/sal K*, pTYB12*inactive/alb β* และ pTYB12*active/alb β* มาเลี้ยงในปริมาณที่มากเพื่อเตรียมสำหรับทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ chitin beads พบว่า สามารถทำให้โปรตีน intein fused inactive sal K จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* และ intein fused active alb β จากพลาสมิด pTYB12*inactive/alb β* บริสุทธิ์ได้ ดังภาพที่ 62 แสดงการทำโปรตีน intein fused inactive sal K ให้บริสุทธิ์ โดยโปรตีนทั้งสองมี intein เชื่อมต่ออยู่บริเวณปลาย หมู่อะมิโนของโปรตีน และภาพที่ 63 แสดงการทำโปรตีน intein fused inactive alb β ให้บริสุทธิ์ เมื่อนำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่าไม่พบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ เนื่องจากโปรตีนทั้งสองอยู่ในรูปที่สายเปปไทด์ยังไม่พร้อมทำงาน ในขณะที่โปรตีนที่ได้จาก intein fused active sal K จากพลาสมิด pTYB12*active/sal K* และ intein fused active alb β จากพลาสมิด pTYB12*active/alb β* เกิดการตกตะกอน เนื่องจากการม้วนพับของโปรตีนที่ไม่ถูกต้อง ดังภาพที่ 64 หลังจากการคืนสภาพโปรตีน intein fused active sal K และ intein fused active alb β พบว่าโปรตีนทั้งสองยังคงตกตะกอนและไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้



ภาพที่ 47 การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB12*inactive/sal K*, pTYB12*active/sal K*, pTYB12*inactive/alb β* และ pTYB12*active/alb β* ขึ้นยีนที่ได้มีขนาด 206, 144, 210 และ 144 bp ตามลำดับ ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis

```

inactive/salK      ATGAATAAAGAATTTACAGTATTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAA 60
pTYB12inactive/salK ATGAATAAAGAATTTACAGTATTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAA 60
*****

inactive/salK      CGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTATAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAGGT 120
pTYB12inactive/salK CGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTATAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAGGT 120
*****

inactive/salK      GCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTGGCC 180
pTYB12inactive/salK GCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTGGCC 180
*****

inactive/salK      GGAGCAATTTCTTGTTTATAG 201
pTYB12inactive/salK GGAGCAATTTCTTGTTTATAG 201
*****

```

ภาพที่ 48 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *inactive/sal K* จาก *Lb. salivarius* K4

```

ATGAATAAAGAATTTACAGTATTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAA
M N K E F T V L T E M E L V K V D G G K

CGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTATAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAGGT
R Y P N C T G K F L G G L A K G A A L G

GCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTGGCC
A I S G G G V P G A V I G G N I G M V A

GGAGCAATTTCTTGTTTATAG
G A I S C L *

```

ภาพที่ 49 การแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K*

```

active/salK      AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTtaggtggattagcaaaaggagcagcatta 60
pTYB12active/salK AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTtaggtggattagcaaaaggagcagcatta 60
*****

active/salK      GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG 120
pTYB12active/salK GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG 120
*****

active/salK      GCCGGAGCAATTTCTTGTTTATAG 144
pTYB12active/salK GCCGGAGCAATTTCTTGTTTATAG 144
*****

```

ภาพที่ 50 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*active/sal K* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *active/sal K* จาก *Lb. salivarius* K4

```

AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAATTTTtaggtggattagcaaaaggagcagcatta
K R Y P N C T G K F L G G L A K G A A L

GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG
G A I S G G G V P G A V I G G N I G M V

GCCGGAGCAATTTCTTGTTTATAG
A G A I S C L *

```

ภาพที่ 51 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*active/sal K* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *active/sal K* จาก *Lb. salivarius* K4

```

pGEMinactivebeta      ATGAACCATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT 60
pTYB12inactivebeta    ATGAACCATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT 60
*****

pGEMinactivebeta      GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT 120
pTYB12inactivebeta    GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT 120
*****

pGEMinactivebeta      ATAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC 180
pTYB12inactivebeta    ATAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC 180
*****

pGEMinactivebeta      ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA 210
pTYB12inactivebeta    ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA 210
*****

```

ภาพที่ 52 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*inactive*/*alb* β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *inactive*/*alb* β จาก pGEM*inactive*/*alb* β

```

ATGAACCATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT
M N H L D K R Y T I M P E E N L S I I V

GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT
G G K N G Y G G S G I R W V H C G A G I

ATAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC
I S G A L M G S I G G N A W G A V A G G

ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA
I S G G I K S C R *

```

ภาพที่ 53 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*inactive*/*alb* β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *inactive*/*alb* β จาก *Lb. salivarius* K4

```

pGEMactivebeta      AAAAATGGCTATGGTGGGAAGTGGGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT 60
pTYB12activebeta    AAAAATGGCTATGGTGGGAAGTGGGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT 60
                      *****

pGEMactivebeta      GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 120
pTYB12activebeta    GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 120
                      *****

pGEMactivebeta      GGTGGTATAAAAAAGTTGTCGTTAA 144
pTYB12activebeta    GGTGGTATAAAAAAGTTGTCGTTAA 144
                      *****

```

ภาพที่ 54 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB12*active/alb* β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *active/alb* β จาก pGEM*active/alb* β

```

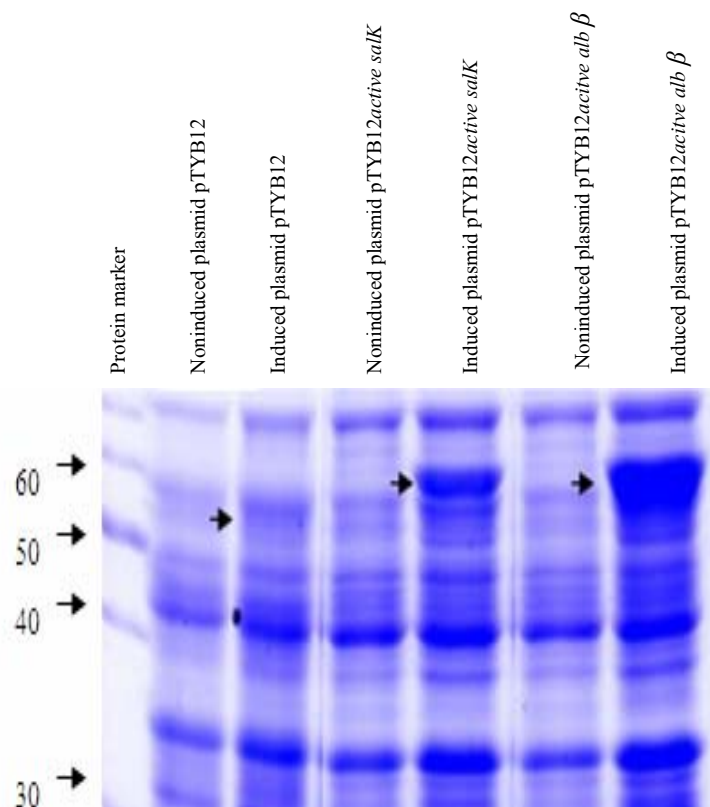
AAAAATGGCTATGGTGGGAAGTGGGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT
K  N  G  Y  G  G  S  G  I  R  W  V  H  C  G  A  G  I  I  S

GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT
G  A  L  M  G  S  I  G  G  N  A  W  G  A  V  A  G  G  I  S

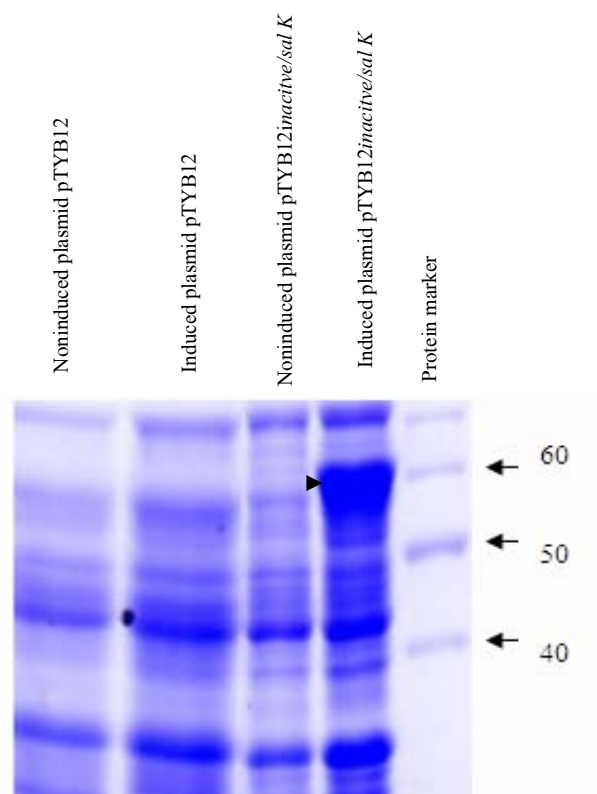
GGTGGTATAAAAAAGTTGTCGTTAA
G  G  I  K  S  C  R  *

```

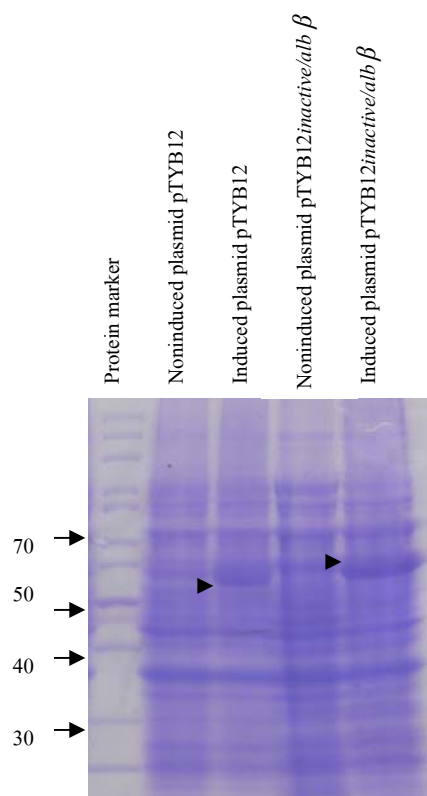
ภาพที่ 55 การแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB12*active/alb* β



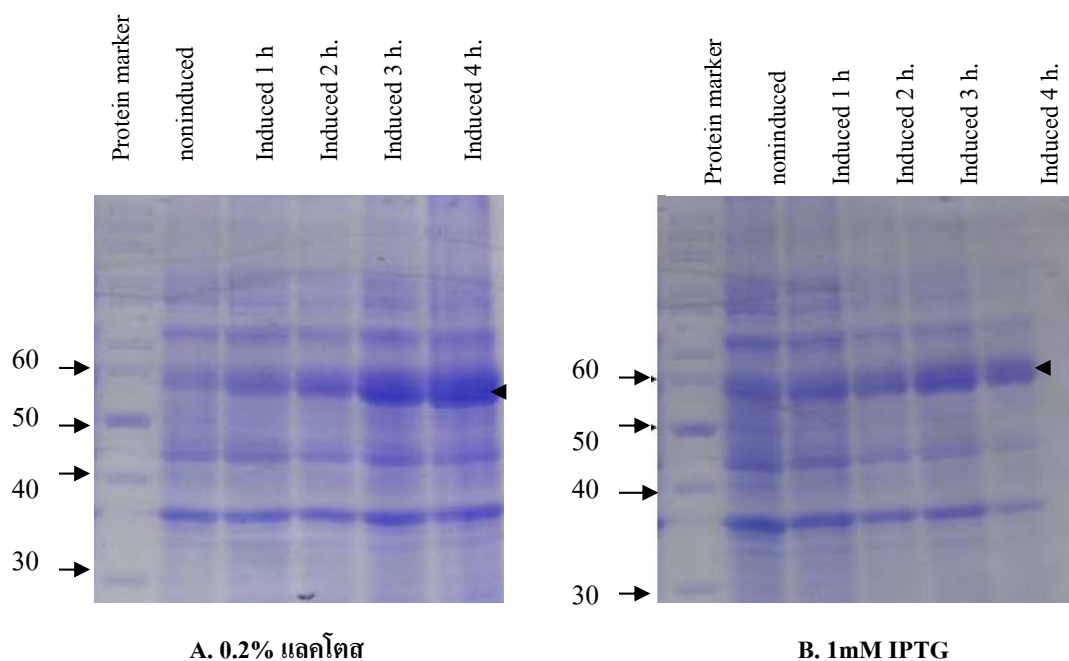
ภาพที่ 56 12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused active sal K และ intein fused active alb β ขนาดของโปรตีนประมาณ 60 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน



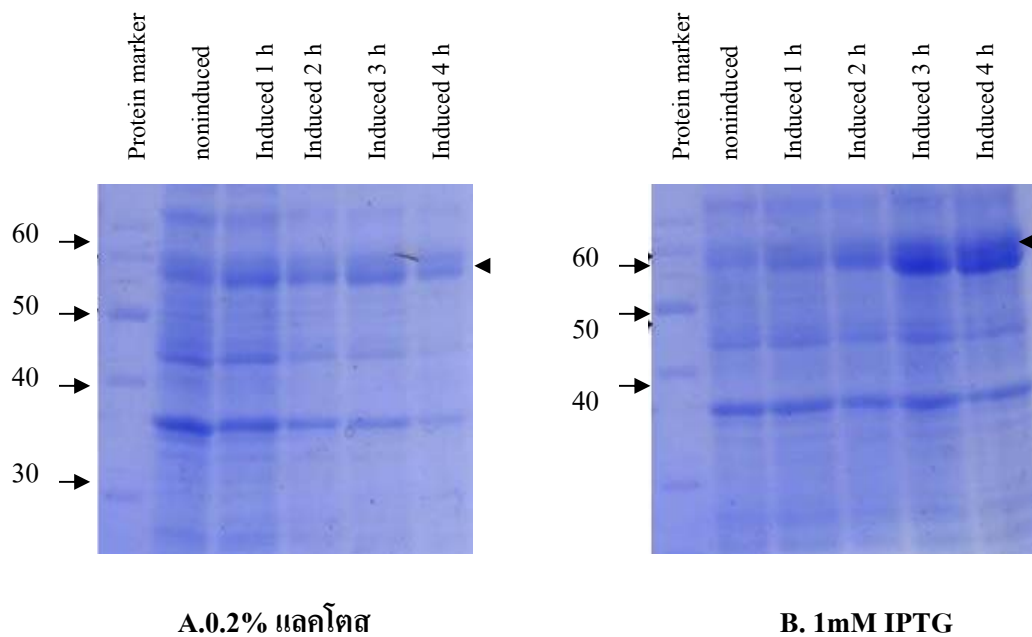
ภาพที่ 57 12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused inactive sal K จากพลาสมิด pTYB12*inactive/sal K* ซึ่งมีขนาดขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน



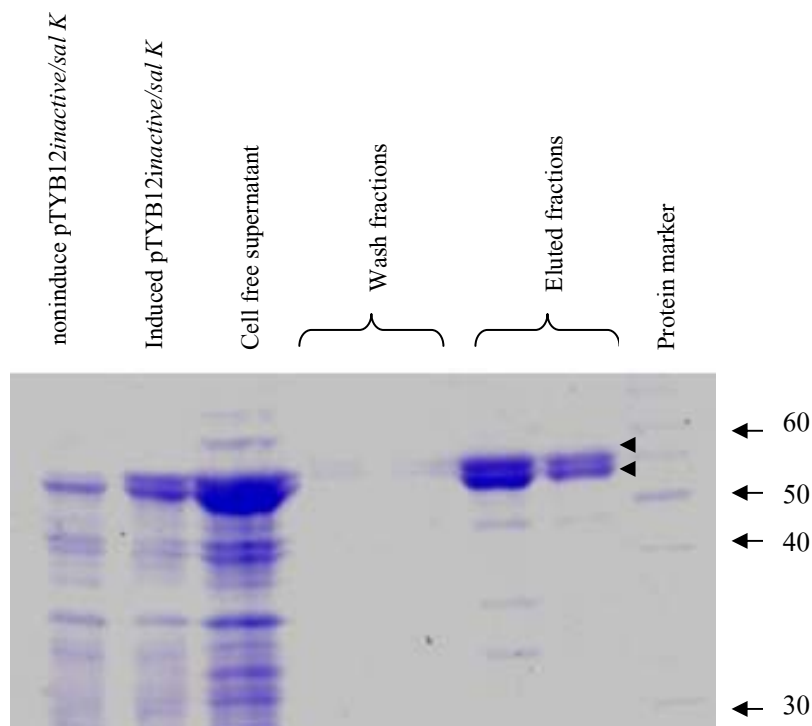
ภาพที่ 58 12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน intein fused inactive alb β ซึ่งมีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB12 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน



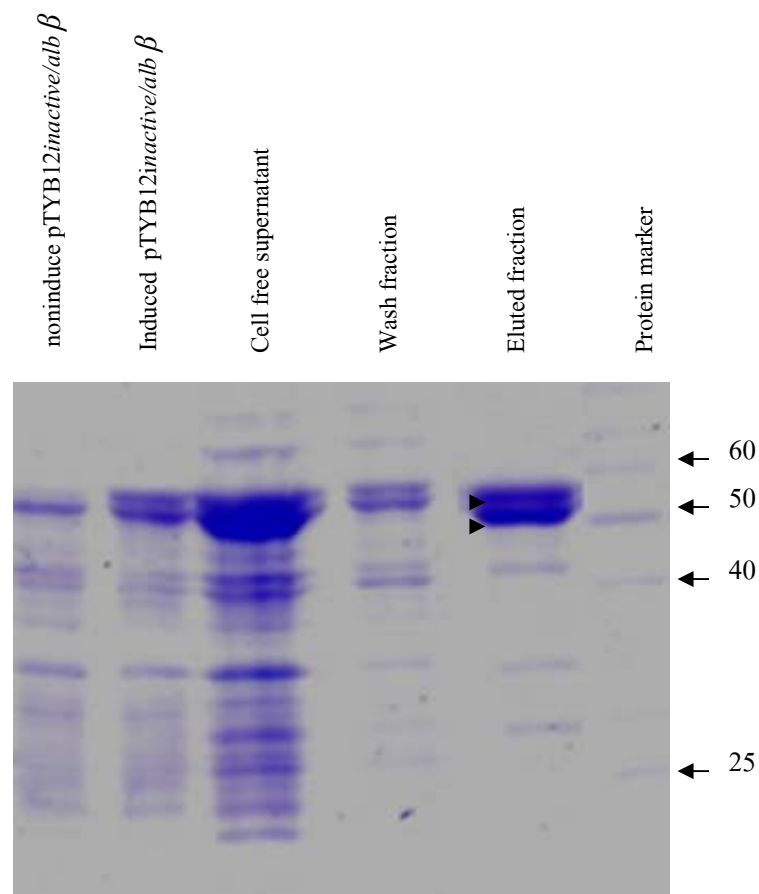
ภาพที่ 59 เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน intein fused active sal K จากพลาสมิด pTYB12*active/sal K* ที่มี pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ 1mM IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ



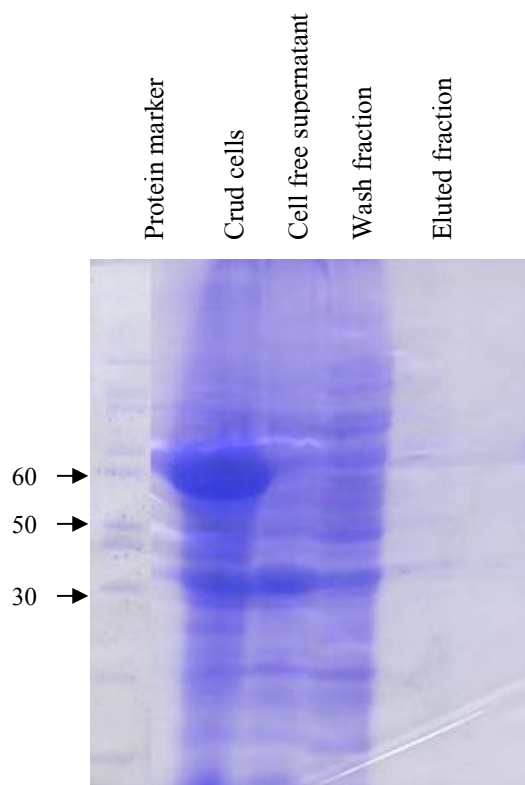
ภาพที่ 60 เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน intein fused active alb β จากพลาสมิด pTYB12 $_{active/alb \beta}$ ที่มี pTYB12 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ 0.2% แลคโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ 1mM IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ



ภาพที่ 61 12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused inactive sal K ที่ได้จาก pTYB12*inactive/sal K* ให้บริสุทธิ์ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์พบว่าโปรตีนเกิดขึ้นสองขนาดคือขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 62 12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused inactive alb β ที่ได้จาก pTYB12inactive/alb β ให้บริสุทธิ์ พบว่าเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วโปรตีนที่ได้มี 2 ขนาดคือ ขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 63 12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน intein fused active alb β ที่ได้จาก pTYB12*active/alb β* ให้บริสุทธิ์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนขนาด 60 กิโลดาลตัน

7. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียในพลาสมิด pTYB1 expression vector

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pTYB1 เป็น expression vector พบว่ายีนแบคทีเรีย *active/sal K* และ *active/alb β* สามารถแทรกเข้าไปอยู่ในพลาสมิด pTYB1 ได้สำเร็จโดยตรวจสอบได้จากการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ และทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้บน 1% agarose ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 144 bp ดังภาพ 65 ซึ่งแสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1*active/sal K* พบว่าชิ้นยีนที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 144 bp เมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของยีน *active/sal K* จากพลาสมิด pTYB1*active/sal K*

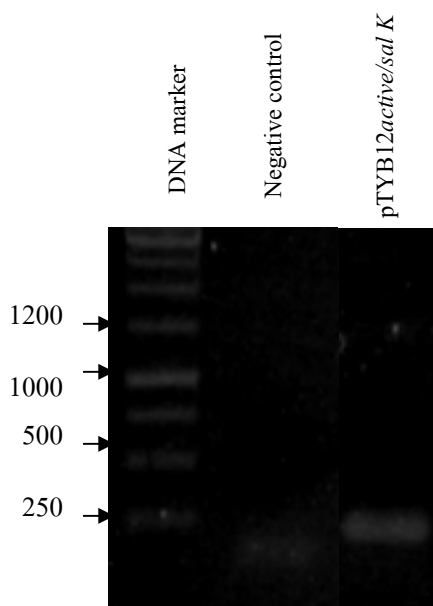
เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active/sal K* จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองมีความไม่ตรงกัน ดังภาพที่ 66 เมื่อทำการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1 *active/sal K* พบว่ามีการแปลรหัสเกิดขึ้นแต่เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องส่งผลให้ลำดับอะมิโนที่แปลรหัสได้เปลี่ยนแปลงไปและเกิด stop codon ขึ้นในสายเปปไทด์ ส่งผลให้การแปลรหัสไม่สมบูรณ์ ดังภาพ 67

ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1*active/alb β* พบว่าชิ้นยีนที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 144 bp ดังภาพ 68 เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *active/alb β* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pGEM*active/alb β* ดังภาพที่ 69 เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ลำดับกรดอะมิโน ดังภาพ 70

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพบว่าพลาสมิด pTYB1*active/sal K* ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนขนาด 60 กิโลดาลตัน ในขณะที่พลาสมิด pTYB1*active/alb β* พบมีการแสดงออกของโปรตีนขนาด 60 กิโลดาลตัน ดังภาพ 71

เมื่อนำพลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนมาเลี้ยงในอาหารสูตร LB broth 10 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลินเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการเปรียบเทียบตัวเหนี่ยวนำระหว่าง 0.2% แลคโตส และ 1 มิลลิโมลาร์ IPTG พบว่า จากการใช้ตัวเหนี่ยวนำที่แตกต่างกันแต่ผลการแสดงออกของโปรตีนไม่มีความแตกต่างกัน ดังภาพที่ 72

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จากพลาสมิด pTYB1*active/alb β* ดังภาพ 73 โดยสามารถทำโปรตีน *active alb β fused intein* ให้บริสุทธิ์ได้โดยโปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 2.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าโปรตีนที่ได้ซึ่งอยู่ในรูป *active alb β fused intein* ซึ่งมี intein เชื่อมต่อที่บริเวณปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน *active alb β fused intein* และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบชนิด *Leuconostoc* sp. แต่ไม่ยับยั้งในเชื้อ *L. sakei* ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี two folds serially dilution ดังภาพ 74



ภาพที่ 64 ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1*active/sal K* โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis

```

active/salK      AAACGTTATCCTAATTGTACAGGAAAAATTTTAGGTGGATTAGCAAAAAGGAGCAGCATT 60
pTYB1active/salK AAACGTGGTCCTAACTGT-CAGGAAAAATTTTAGGTGGATTAGCAAAAAGGAGCAGCATT 59
*****  *****  ***  *****

active/salK      GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG 120
pTYB1active/salK GGTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTG 119
*****

active/salK      GCCGGAGCAATTCTTGTTTATAG 144
pTYB1active/salK -----AGCACITACTTGTTTATAA 138
*****

```

ภาพที่ 65 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB1*active/sal K* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *active/sal K* จาก *Lb. salivarius* K4

AAACGTGGTCCTAACTGTCAGGAAAATTTTATAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAG

K R G P N C Q E N F * V D * Q K E Q H *

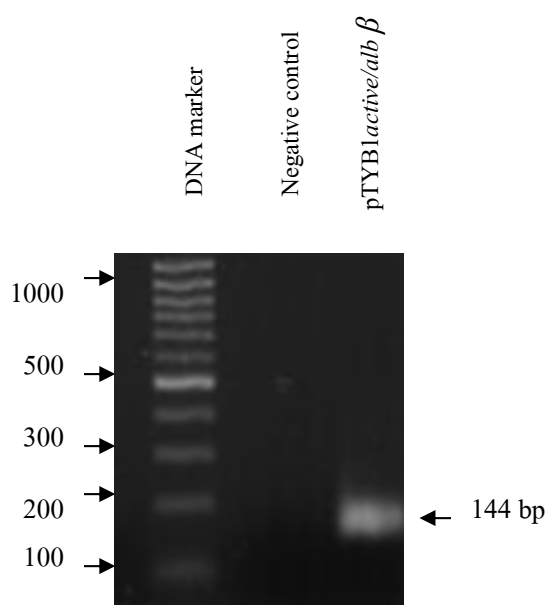
GTGCTATTTCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTGA

V L F L V A E F L E Q L * V E I S V W *

GCACTTACTTGTTTATAA

A L T C L *

ภาพที่ 66 ผลการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1*active/sal K*



ภาพที่ 67 การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1*active/alb β* โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ขึ้นยีนที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 144 bp


```

active/beta      AAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTGTAAGT 60
pTYB1active/beta AAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTGTAAGT 60
*****

active/beta      GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 120
pTYB1active/beta GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT 120
*****

active/beta      GGTGGTATAAAAAGTTGTCGTAA 144
pTYB1active/beta GGTGGTATAAAAAGTTGTCGT--- 141
*****

```

ภาพที่ 68 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพลาสมิด pTYB1*active/alb* β และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *active/alb* β จาก *Lb. salivarius* K4

```

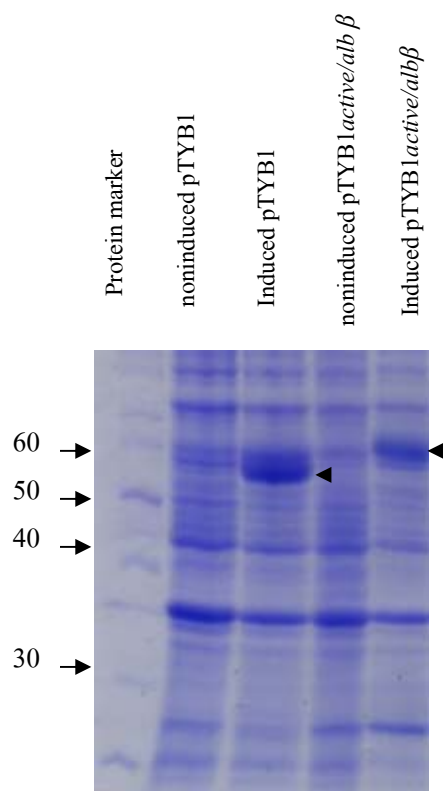
AAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTATAAGT
K N G Y G G S G I R W V H C G A G I I S

GGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCT
G A L M G S I G G N A W G A V A G G I S

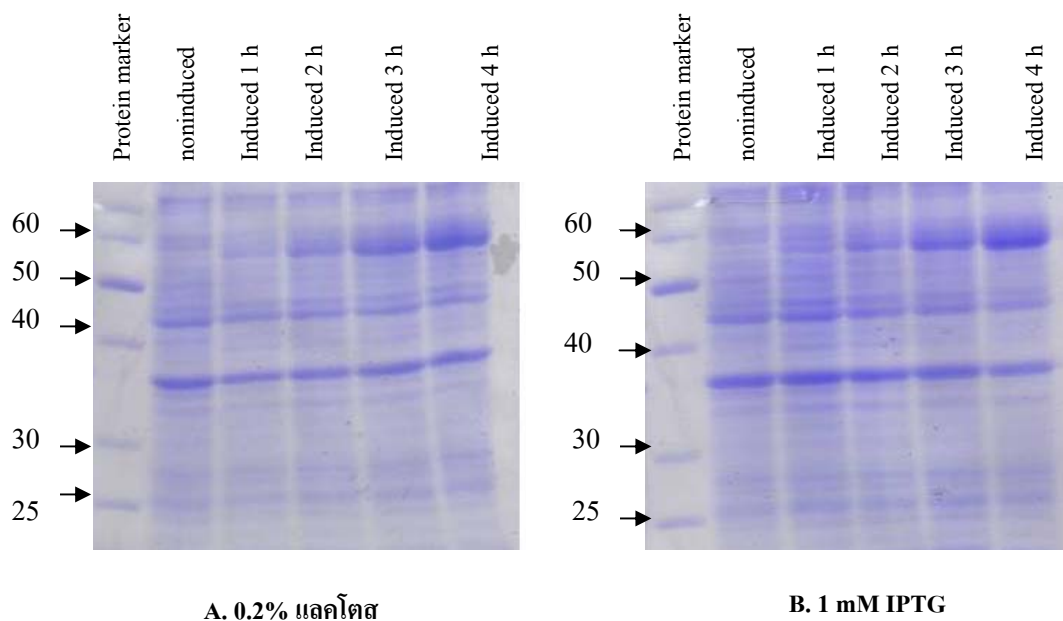
GGTGGTATAAAAAGTTGTCGT
G G I K S C R

```

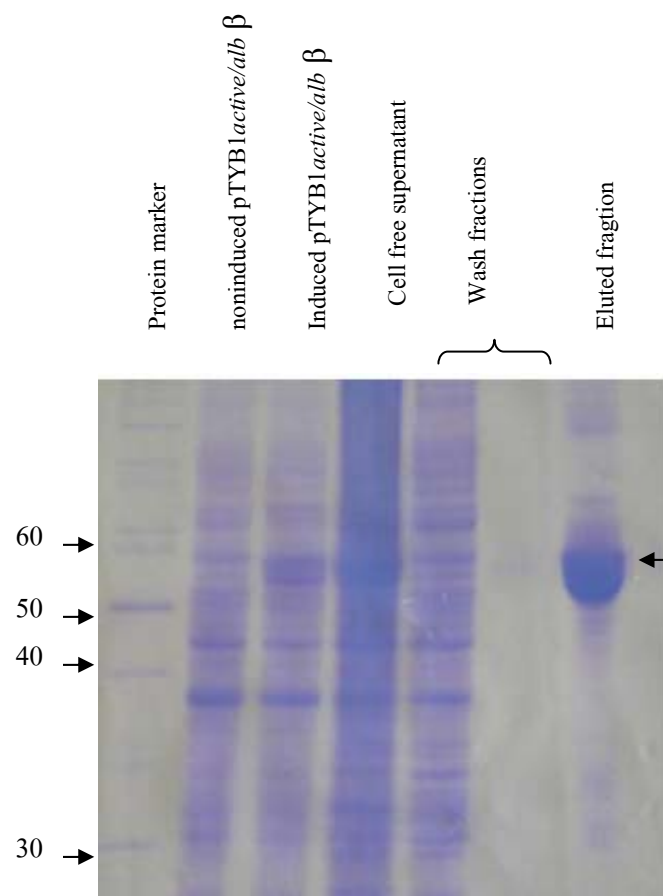
ภาพที่ 69 การแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1*active/alb* β



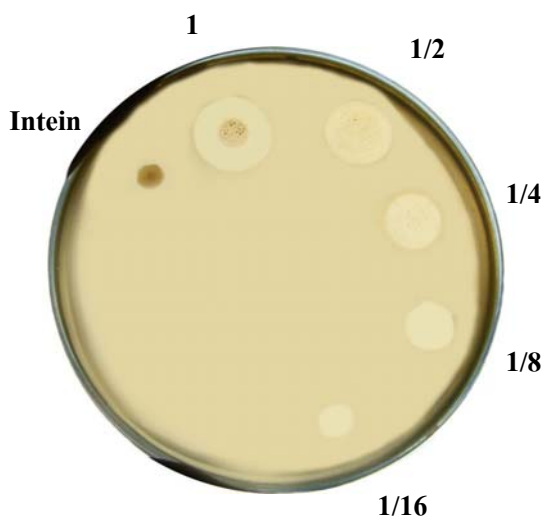
ภาพที่ 70 12% SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของโปรตีน active alb β fused intein จากพลาสมิด pTYB1 active/alb β ซึ่งมีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนจาก pTYB1 expression vector ซึ่งมีโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 71 เปรียบเทียบการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* ที่มี pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ภาพ A แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ 0.2% แอลโดสเป็นตัวเหนี่ยวนำ และภาพ B แสดงการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวเหนี่ยวนำ



ภาพที่ 72 12% SDS-PAGE แสดงผลการทำโปรตีน active alb β fused intein ขนาด 60 กิโลดาลตัน ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1active/alb β ให้บริสุทธิ์

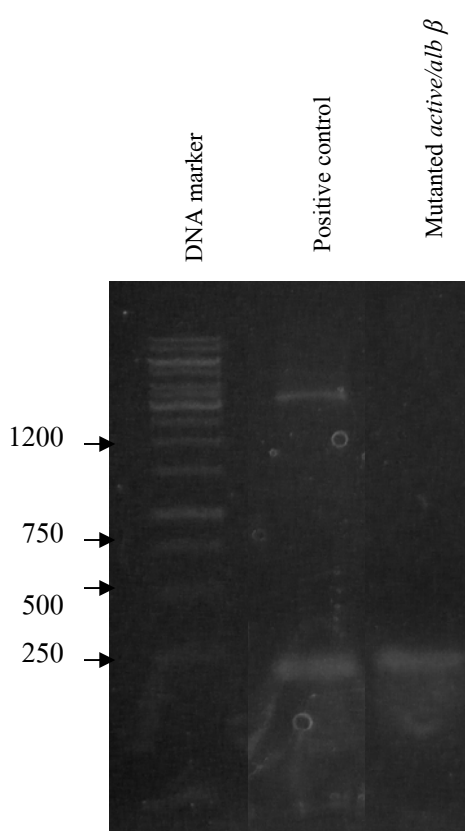


ภาพที่ 73 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ active alb β fused intein ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942^T เทียบกับ Intein, 1 : active alb β fused intein ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1/2 -1/16 : active alb β fused intein ที่ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ตามลำดับ

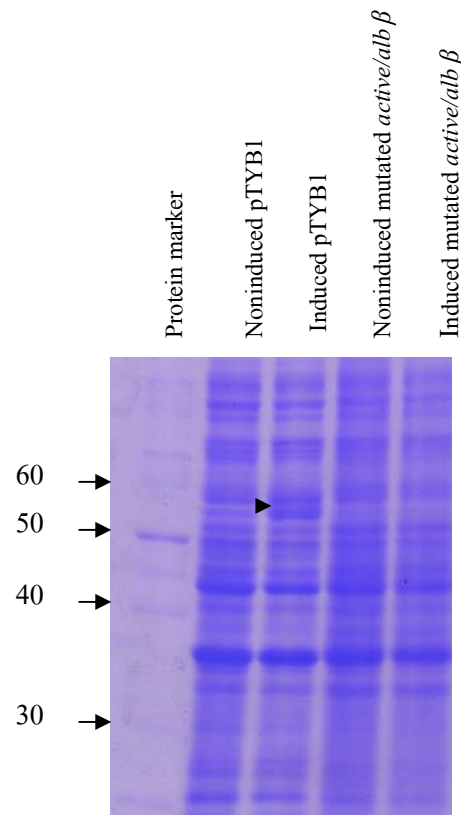
8. การสร้างสายพันธุ์กลายของแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* ที่มีพลาสมิด pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะโดยใช้เทคนิค Error prone PCR

ผลการสร้างสายพันธุ์กลายของแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* ที่มีพลาสมิด pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้เทคนิค error prone PCR หลังจากทำการเชื่อมชิ้นยีนกลายพันธุ์ที่ได้จากกระบวนการ error prone PCR เข้ากับพลาสมิด pTYB1 แล้วทำการโยกย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α พบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นหลายโคโลนี จึงได้ทำการเก็บโคโลนีเพื่อจะนำมาตรวจสอบหา pTYB1*active/alb β* ทั้งหมด 109 พลาสมิด เมื่อทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์พบว่าสามารถนำชิ้นยีนกลายพันธุ์ *active/alb β* เข้าสู่พลาสมิด pTYB1 ได้สำเร็จมีจำนวนเพียง 25 โคโลนีและจากการทำพีซีอาร์พบว่าชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเท่ากับ 144 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับชิ้นยีน *active/alb β* ดังภาพที่ 75 และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพบว่ายีนกลายของ *active/alb β* ไม่พบว่ามีการผลิตโปรตีนแบคทีเรียโอซิน ในดังภาพที่ 76 จึงได้ทำการสุ่มนำบางโคโลนีไปทำการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการสุ่มตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดยีนกลายพันธุ์ pTYB1*active/alb β* D25 พบที่มีการเปลี่ยนแปลง

ลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นทั่วทั้งชิ้นยีน ดังภาพที่ 77 และเมื่อทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นลำดับอะมิโนพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับอะมิโนของยีน *alb β* ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนเป็นลำดับอะมิโนได้เพียง 15 กรดอะมิโน ได้แก่ K N R R S S Q K W R N P T G L แล้วเกิด stop codon ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนที่ได้นั้น ไม่ใช่ลำดับกรดอะมิโนที่พบในแบคทีเรียโอซิน *alb β* ดังภาพ 78 ในขณะที่โคโลนีที่ไม่มีชิ้นยีนกลายพันธุ์ *active/albβ* พบการแสดงออกของโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดโปรตีน intein ในพลาสมิด pTYB1 expression vector



ภาพที่ 74 โคโลนีพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมิวแทนท์ pTYB1*active /albβ* D25 ที่ได้จากการทำ error prone PCR โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 144 bp



ภาพที่ 75 12% SDS-PAGE แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลาย D25 active alb β fused intein โดยมีพลาสมิด pTYB1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ผลการศึกษา ไม่พบการแสดงออกของยีนกลายของโปรตีน active alb β fused intein

K4beta	AAAAATGG----CTATGGTGGGAAGTGG---AATTTCGTTGGGTTCACTGTGG-AGCAGGTA
Mutbeta	AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
	***** * * * ***** * * * * * * * *
K4beta	TTG-----TAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGC
Mutbeta	TTTCCCCCTGGGAAGCTCCCTCGTGGGCTCTCCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGAAT
	** * * * * * * * * * * * * *
K4beta	AGGTG---GCATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTA-----
Mutbeta	ACCTGTCCGCCCTTTCTCCCTTCGGGAANC GTGGCGCTTTCTCATAACTCAGCTGTAGGT
	* * * * * * * * * * * * *

ภาพที่ 76 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง active/alb β จาก *Lb. salivarius* K4 กับยีนกลายพันธุ์ D25 ของ active/alb β

AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
 K N R R S S Q K W R N P T G L * R Y Q A
 TTTCCCCCTGGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGAAT
 F P P G K L P R A L S C S D P A A Y R N
 ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAANCGTGGCGCTTTCTCATAA
 T C P P F S L R E X W R F L I

ภาพที่ 77 แสดงผลการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีนกลาย D25 ของพลาสมิด

pTYB1*active/alb* β

ตารางที่ 13 สรุปรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมด

Vector	Gene	Sequencing results	Expression results	Antimicrobial activity
pGEMT-easy	<i>Inactive sal K</i>	correct	NA	NA
	<i>Inactive alb β</i>	incorrect/3 mutation	NA	NA
pGEX4T-1	<i>Active sal K</i>	correct	NE	ND
	<i>Active alb β</i>	Incorrect/1 deletion	E/incorrect protein	ND
pTYB12	<i>Inactive sal K</i>	correct	E	ND
	<i>Active sal K</i>	correct	E/IBs	ND
	<i>Inactive β</i>	correct	E	ND
	<i>Active β</i>	correct	E/ IBs	ND
pTYB1	<i>Active sal K</i>	Incorrect	NE	ND
	<i>Active β</i>	correct	E	<i>Leuconostoc</i> sp.

หมายเหตุ NE = No Expression, NA = Not available, ND = Not detectable, E= Expression,
IBs= Inclusion bodies

วิจารณ์

1. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4

จากผลการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 พบว่ามีขนาดประมาณ 24 กิโลเบสเมื่อเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานของ λ HindIII ซึ่งตรงกับขนาดของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่รายงานโดย Pilasombut (2006) ในขณะที่ขนาดของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอใน *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 พบมีขนาดประมาณ 10.7 กิโลเบส ซึ่งรายงานโดย Flynn *et al.* (2002)

2. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *inactive/sal K* และยีน *inactive/alb β* โดยใช้พลาสมิด pGEMT[®]-easy vector

จากการศึกษาการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *inactive/sal K* และยีน *inactive/alb β* ที่ได้จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งควบคุมการผลิตแบคทีเรียโอซิน sal K และแบคทีเรียโอซิน alb β โดยใช้พลาสมิด pGEMT[®]-easy vector พบว่าสามารถสร้างพลาสมิด pGEMsal K และ pGEMalb β ซึ่งมียีน *inactive/sal K* และยีน *inactive/alb β* ได้ เมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า pGEMsal K มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน FK15 หรือ Salvicin K ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และมีความเหมือน 100% (Pilasombut, 2006) และเมื่อทำการแปลรหัสของกรดอะมิโนที่ได้จากพลาสมิด pGEMsal K พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน abp118 alpha peptide ซึ่งผลิตจาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 เท่ากับ 64 %

ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในพลาสมิด pGEMalb β พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *alb β* ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง และส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสมีความเหมือนกับเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน alb β ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เพียง 95.8% และมีความเหมือนกับแบคทีเรียโอซิน Abp118 beta peptide จากเชื้อ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius*

UCC118 และเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน FK22 ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เพียง 69% ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เนื่องจากอาจมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดการกลายพันธุ์ตั้งแต่ขั้นตอนการเลี้ยงเมื่อทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจึงมีเฉพาะจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้เกิดการกลายพันธุ์ ผลจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน ดังนี้ K2N, N3H, I41V ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวพบว่า ตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็นกรดอะมิโนอยู่ในบริเวณ leader peptide ของสายเปปไทด์ ทำให้อาจไม่มีผลต่อแอกติวิตี้ของแบคทีเรียโอซินเพราะในขั้นตอนการทำให้แบคทีเรียโอซินพร้อมทำงานจะมีการตัดส่วนของ leader peptide ออกไป ทำให้ถึงจะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในบริเวณของ leader peptide ก็อาจจะไม่มีผลต่อแอกติวิตี้ของแบคทีเรียโอซิน ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ 41 ซึ่งเป็นตำแหน่งในสายเปปไทด์แบคทีเรียโอซินพร้อมทำงาน และเกิดการเปลี่ยนจากกรดอะมิโน I เป็น V ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม nonpolar และมีขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจไม่มีผลต่อแอกติวิตี้ของเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน

3. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียโอซินในพลาสมิด pGEX4T-1

จากผลการทดลองพบว่าสามารถโคลนยีนแบคทีเรียโอซิน *active/sal K* และ *active/alb β* เข้าสู่พลาสมิด pGEX4T-1 ได้ ผลจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pGEX*active/sal K* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sal K* ที่ได้จากพลาสมิด pGEM*sal K* ในขณะที่พลาสมิด pGEX*active/alb β* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับพลาสมิด pGEM*alb β* แต่ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน FK22 ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 (Pilasombut, 2006) ผลจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pGEX*active/sal K* และพลาสมิด pGEX*active/alb β* โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าเซลล์ *E. coli* ไม่สามารถผลิตโปรตีนจากพลาสมิด pGEX*active/sal K* ได้ เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GST fused *active sal K* ซึ่งมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน อีกทั้งสายเปปไทด์ของแบคทีเรียโอซิน *sal K* มีความเป็นประจุบวกค่อนข้างสูงและประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 ตำแหน่ง ซึ่งอาจจะเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้โปรตีนแบคทีเรียโอซิน GST fused *active salK* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *E. coli* เนื่องจากเมื่อทำการเลี้ยง *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pGEX*active/sal K* ซึ่งมียีนที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน *sal K* ที่พร้อมทำงานได้ พบว่าเซลล์ *E.*

coli มีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ และเมื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนแล้วทำการศึกษานาฬิกาของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GST fused active sal K ที่มีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pGEXactive/sal K โครโมโซมทำลายด้วยฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน sal K ที่ผลิตได้จากภายในเซลล์ โดยแบคทีเรียโอซินจะไปทำลายเซลล์ *E. coli* ด้วยการจับกับ DNA หรือ RNA ของเซลล์ *E. coli* ทำให้เซลล์ *E. coli* มีการตายอย่างรวดเร็ว (Park *et. al.*, 1998 and Sharma and Khuller, 2001) แต่หลังจากเลี้ยงเซลล์ไปได้ช่วงเวลาหนึ่งพบว่าเซลล์ *E. coli* กลับมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *active/sal K* ภายในพลาสมิด ทำให้เซลล์ที่มีพลาสมิดที่มียีนที่เกิดการกลายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจส่งผลให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่มีแอกติวิตี แต่เซลล์ยังคงเจริญได้ภายในอาหารที่มีแอมพิซิลิน ผลจากการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et. al.* (2007) ที่ศึกษาการผลิตเปปไทด์ต้านแบคทีเรียชนิด ABP-CM 4 และ ABP-CMt ที่ได้จากหนอนไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* โดยการใช้ GST เป็นโปรตีนตัวเชื่อม เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* พบว่า ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย ABP-CM 4 และ ABP-CMt มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *E. coli* ส่งผลให้เซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน ABP-CM 4 และ ABP-CMt ตายในขณะที่มีการผลิตโปรตีน โดยเปปไทด์ดังกล่าวเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีความเป็นประจุบวกเป็นองค์ประกอบสูง สายเปปไทด์จึงมีความเป็นประจุบวกสูงและสามารถจับกับสารชีวโมเลกุลที่เป็นลบภายในเซลล์ เช่น DNA หรือ RNA ได้ดี ทำให้เซลล์มีการตายอย่างรวดเร็ว จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถต่อต้านแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด อีกทั้งการใช้ GST เป็นตัวเชื่อมไม่ได้สามารถป้องกันการเกิด proteolysis ภายในเซลล์ทำให้ GST ถูกทำลายในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนจึงไม่พบการแสดงออกของโปรตีนใดๆ เมื่อทำ SDS-PAGE ในขณะทำการทดลองของ Pilasombut (2006) กลับพบแบคทีเรียโอซิน Sal K ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยตรงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดสอบแอกติวิตีของแบคทีเรียโอซิน Sal K ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ต่อ *E. coli* เป็นการทดสอบโดยการหยดแบคทีเรียโอซินลงไปบนจานอาหารที่มีเชื้อ *E. coli* อยู่ ซึ่ง Sal K อาจจะไม่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* ได้จึงทำให้เซลล์ *E. coli* ไม่ตาย แต่เมื่อทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน *active/sal K* เข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* พบว่า เซลล์ *E. coli* มีการเจริญเติบโตช้ามาก ทั้งนี้เนื่องจากภายในเซลล์ของ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *active/sal K* มีการผลิตแบคทีเรียโอซิน sal K ที่พร้อมทำงานอยู่ภายในเซลล์ ทำให้แบคทีเรียโอซิน sal K สามารถไปจับกับสารชีวโมเลกุลของ *E. coli* ได้โดยตรง ส่งผลให้ *E. coli* ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือผลิตโปรตีนที่จำเป็นสำหรับ *E. coli* ได้ จึงส่งผลให้เซลล์ *E. coli* ตาย

ในขณะที่การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pGEX α ctive/alb β พบการแสดงออกของโปรตีน GST fused active alb β แต่ขนาดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับขนาดที่แท้จริงของโปรตีนนี้เนื่องจากเมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์อะดีนีน (A) โดยตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่อยู่หลังจากตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งอาจเกิดจาก star activity ของเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้สภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการ ทำงานที่ผิดพลาดโดยทำการตัดขึ้นดีเอ็นเอผิดไปจากตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ ทำให้เกิด frame shift ของลำดับกรดอะมิโน และไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน active alb β ได้ และหลังจากทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนโดยใช้ Translate tool (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) พบว่าสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 18 กรดอะมิโน ก่อนพบ stop codon ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นไม่ตรงกับลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน active alb β และเปปไทด์มีขนาดเท่ากับ 2056.46 กิโลดาลตัน (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) เมื่อรวมขนาดของเปปไทด์ที่ได้อีกกับขนาดของ GST ทำให้ขนาดของโปรตีน GST fused active alb β มีขนาดรวมประมาณ 28.51 กิโลดาลตัน ส่งผลให้ขนาดของโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE ไม่แตกต่างกับขนาดของ GST ที่ใช้เป็นตัวควบคุมและไม่พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc* sp. ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Pilasombut (2006) ซึ่งทำการศึกษาเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน FK22 ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lb. sarivarius* K7 ซึ่งมีขนาดของเปปไทด์เท่ากับ 4331.70 กิโลดาลตัน จากการทดลองพบว่า FK22 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ เช่น *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *Bacillus coagulans* JCM 2257T และขนาดเปปไทด์แบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* K7 ใกล้เคียงกับการทดลองของ Flynn *et al* (2002) ซึ่งทำการศึกษาแบคทีเรียโอซิน abp118 β ที่มีขนาดของเปปไทด์เท่ากับ 4333.80 กิโลดาลตัน ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118

4. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการแสดงออกของโปรตีนแบคทีริโอซินในพลาสมิด pTYB1 expression vector และ pTYB12 expression vector

การใช้ pTYB12 เป็น expression vector ซึ่งมี intein อยู่บริเวณปลายหมู่กรดอะมิโนของโปรตีนและพบว่าสามารถผลิตโปรตีน intein fused bacteriocins ได้ ซึ่งแบคทีริโอซินที่อยู่ในรูป inactive form ทั้ง *inactive/sal K* และ *inactive/alb β* สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เมื่อเชื่อมต่อกับ intein (55 กิโลดาลตัน) จะทำให้โปรตีนมีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน ซึ่งผลที่ได้จากการทำให้แบคทีริโอซิน *inactive/sal K* และ *inactive/alb β* บริสุทธิ์ เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่ 2 ตำแหน่ง คือโปรตีนขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และโปรตีนขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน เนื่องจากในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์อาจมีผลทำให้เกิดการตัดเปปไทด์แบคทีริโอซินออกจาก intein ได้ แต่เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ใช้ระยะเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง หรือ fusion protein ที่ได้มีความเข้มข้นสูงมากจึงทำให้การตัดเปปไทด์แบคทีริโอซินออกจาก intein ได้ไม่สมบูรณ์ จึงทำให้เห็นขนาดของโปรตีน 2 ขนาด คือขนาดของ intein (55 กิโลดาลตัน) และขนาดของ intein fused bacteriocin (62 กิโลดาลตัน) โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้ intein fused bacteriocin บริสุทธิ์มีค่าประมาณ 7.5-8.0 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Diao *et. al.*, (2007) ที่พบว่า pH ของโปรตีนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดโปรตีนออกจาก intein ได้ โดยพบว่า pH ของโปรตีนในช่วง 7.5-8.0 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดโปรตีนออกจาก intein ได้บางส่วน ในขณะที่ pH ในช่วง 5.0-7.0 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดโปรตีนออกจาก intein ได้สมบูรณ์

ในขณะที่แบคทีริโอซินที่อยู่ในรูป active form พบมีการแสดงออกของโปรตีนแต่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากมีการตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้น ซึ่งการตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้นเนื่องจากโปรตีนมีการม้วนพับของโปรตีนที่ไม่ถูกต้อง จึงทำให้โปรตีนสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ และเมื่อทำการคืนสภาพโปรตีนเพื่อให้โปรตีนสามารถอยู่ในสภาพที่ละลาย พบว่าโปรตีนยังคงตกตะกอนและไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ จึงได้แก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการเปลี่ยน expression vector โดยเปลี่ยนจาก pTYB12 เป็น pTYB1

การใช้ pTYB1 เป็น expression vector ซึ่งมี intein เชื่อมต่ออยู่บริเวณปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีน active sal K fused intein ได้ เนื่องจากเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิด pTYB1active/sal K มาทำการตรวจสอบ และทำการแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าเกิด stop codon บนสายเปปไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมื่อทำการแปลรหัสทำให้เกิดการสังเคราะห์สายเปปไทด์สายสั้นๆ ประมาณ 10 กรดอะมิโน ในขณะที่สามารถผลิตโปรตีน active alb β fused intein และสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ หลังจากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า active alb β fused intein สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบแอกติวิตีของแบคทีเรียโอซิน FK22 กับ intein fused active/alb β พบว่าแบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T ได้เหมือนกัน แต่พบว่า FK22 (200 AU/ml) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบมากกว่า intein fused active/alb β (800 AU/ml) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน active/alb β ซึ่งอาจส่งผลต่อแอกติวิตีของแบคทีเรียโอซิน หรืออาจเนื่องมาจากแบคทีเรียโอซิน intein fused active/alb β เป็นแบคทีเรียโอซินที่ยังมี intein เชื่อมต่ออยู่กับยีนแบคทีเรียโอซิน alb β ที่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลของสายโปรตีน การที่มี intein อยู่ก็บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลอาจมีผลต่อฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินได้ โดยอาจไปรบกวนการทำงานของแบคทีเรียโอซินทำให้มีฤทธิ์น้อยลง ซึ่งหากมีการกำจัด intein ออกไปได้ อาจทำให้ alb β มีฤทธิ์มากขึ้นได้

ซึ่งผลข้างต้นสอดคล้องกับงานของ Chen *et al.*, (2008) ซึ่งได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ ABP-CM4 และเปปไทด์ ABP-CMt ที่ได้จากหนอนไหม (*Bombyx mori*) โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้งสองโดย intein fusion protein ใน *E. coli* expression system พบว่า เปปไทด์ดังกล่าวสามารถแสดงออกได้เมื่อใช้ intein เป็น fusion protein โดยอธิบายว่าเนื่องจาก intein มีขนาดของโปรตีนที่ค่อนข้างใหญ่ (55 กิโลดาลตัน) intein จึงไปขัดขวางการทำงานของเปปไทด์ ABP-CM4 และเปปไทด์ ABP-CMt ทำให้ เปปไทด์ทั้งสองไม่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ได้ จึงทำให้เซลล์ *E. coli* ไม่ถูกทำลาย อีกทั้ง intein ยังป้องกันการเกิด proteolysis ภายในเซลล์ได้ด้วย จึงทำให้สามารถผลิตเปปไทด์ที่มีความเป็นประจุบวกสูงได้ ขณะที่ก่อนหน้านี้ Ingham *et al* (2004) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมในการทำการศึกษาการแสดงออกของแบคทีเรียโอซิน โดยทำการสร้างดัดแปลงดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 เพื่อ

สร้างดีเอ็นเอพาหะที่มี intein fusion protein อยู่บริเวณปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน ทำให้สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เช่นกัน

5. การผลิตสายพันธุ์กลายของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี error prone PCR

จากการผลิตสายพันธุ์กลายของยีนแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* พบว่าวิธี error prone PCR สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายอย่างสุ่มได้ทั่วทั้งยีนเช่นเดียวกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายโดยวิธีเดียวกันในแบคทีเรียโอซินชนิด lacticin 3147 แต่ตรงกันข้ามกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียโอซิน subtilin และ Pep5 (Pag และ Sahl, 2002) ซึ่งไม่ประสบความสำเร็จในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี error prone PCR

ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถแทรกยีนกลายพันธุ์เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ได้จำนวน 25 โคโลนี และทำการคัดเลือกพลาสมิดที่เกิด error prone PCR โดยการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pTYB1*active/alb β* ผลการแสดงผลการแสดงออกของพลาสมิดยีนกลายพันธุ์ของยีน *active/alb β* พบว่าพลาสมิดของยีนกลายพันธุ์ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นจึงนำพลาสมิดยีนกลายพันธุ์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่อทำการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของยีนกลายพันธุ์และแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนสามารถแปลรหัสได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เนื่องจากการทำ error prone PCR เป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ ส่งผลให้ยีนกลายพันธุ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมาก ผลการแปลรหัสทำให้เกิดพบตำแหน่งหยุดการสังเคราะห์สายเปปไทด์ เนื่องจากมีตำแหน่งหยุดการแปลรหัสตั้งแต่ส่วนต้นของสายเปปไทด์ ส่งผลให้ไม่เห็นการแสดงผลการแสดงออกของเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน ดังนั้นในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *active/alb β* โดยใช้วิธี error prone PCR อาจยังไม่เหมาะสมในการสร้างแบบแบคทีเรียโอซินสายพันธุ์กลาย เนื่องจากส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มบนยีน และมักจะเกิด stop codon ทำให้ไม่สามารถศึกษาดำเนินการกรดอะมิโนที่สำคัญต่อฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการทดลองสามารถสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนแบคทีเรียโอซิน inactive/sal K, active/sal K, inactive/alb β และ active/alb β ได้สำเร็จ
2. จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนนิ่งยีนแบคทีเรียโอซินเข้าสู่ pGEX4T1, pTYB1 และ pTYB12 ได้สำเร็จ
3. จากการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ expression vector ที่แตกต่างกันพบว่าได้ผลดังนี้

3.1 กรณีใช้ pGEX4T1 เป็น expression vector พบว่า ไม่สามารถผลิตโปรตีน GST fused active sal K เนื่องจากโปรตีน sal K มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *E. coli* ในขณะที่พบการแสดงออกของโปรตีน GST fused active alb β จากพลาสมิด pGEXactive/alb β แต่ขนาดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับขนาดที่แท้จริงของโปรตีน เนื่องจากการเกิด stop codon ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนได้เพียงบางส่วน และไม่พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

3.2 กรณีใช้ pTYB12 เป็น expression vector พบว่าสามารถผลิตโปรตีน intein fused bacteriocins ได้ ซึ่งแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป inactive form ทั้ง inactive sal K และ inactive alb β สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ ในขณะที่แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป active form พบมีการแสดงออกของโปรตีนแต่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากมีการตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้น เมื่อทำการคืนสภาพโปรตีน พบว่าโปรตีนที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

3.3 กรณีใช้ pTYB1 เป็น expression vector พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีน intein fused active sal K ได้เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของโปรตีน ในขณะที่สามารถผลิตโปรตีน intein fused active alb β และสามารถทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ หลังจากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้ง

เชื้อทดสอบ พบว่า intein fused active alb β สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc* sp. ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. pTYB1 เป็น expression vector ที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน active alb β

5. การใช้วิธี error prone PCR พบว่าไม่สามารถศึกษาผลของการกลายพันธุ์ได้เนื่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี error prone PCR บังคับได้ยาก และมักเกิด stop codon ทำให้ไม่สามารถผลิตเปปไทด์แบคทีเรียโอซินได้

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเปปไทด์แบคทีเรียโอซินมีความเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* ส่งผลให้ไม่มีการผลิตโปรตีนดังในกรณีของ active salK ใน pGEX4T-1 และ pTYB1 expression vector หรือทำให้เกิดการตกตะกอนดังกรณีของ active salK และ active alb β ใน pTYB12 เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว จึงควรมีการผลิตเปปไทด์แบคทีเรียโอซินระบบอื่นๆ เช่น cell free expression system, insect cell expression systems หรือ yeast expression system หรืออาจบังคับให้โปรตีนมีการแสดงออกโดยการทำให้โปรตีนเป็น inclusion bodies
2. เนื่องจากยังไม่มีเกณฑ์ใดในการเลือกใช้ fusion protein ที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินใน *E. coli* expression system ดังนั้นจึงควรทดลองใช้โปรตีนตัวเชื่อมระบบอื่น เช่น maltose binding protein และ His-tag หรือสร้าง expression vector ที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินโดย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน
3. เนื่องจากเปปไทด์แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป active form เป็นเปปไทด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* ทำให้ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้ *E. coli* มีการผลิตโปรตีนในปริมาณที่มากได้ แต่ในขณะเดียวกันจากผลการทดลองจะพบว่า สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป inactive form ได้ อีกทั้งยังสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ จึงมีความคิดในการแก้ไขปัญหาการเป็นพิษของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์ของ *E. coli* นั่นคือ อาจทำการผลิตแบคทีเรียโอซินที่ต้องการให้อยู่ในรูป inactive form แล้วนำแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูป inactive form มากำจัด leader peptide ออก จะทำให้เกิดการเปลี่ยนจาก inactive form เป็น active form ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการเป็นพิษต่อเซลล์ของ *E. coli* ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ศศิวิมล ชื่นอ้อม อาเหม็ด และอดิสร เสวตวิวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลกติกในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1): 88-101.
- Anonymous. 2006. **IMPACT™-CN Protein purification System Now Featuring Fusion to C- or N- Terminus of the Target Protein Version 2.1.** Available Source: <http://www.neb.com/nebecomm/manualFiles/manualE6900.pdf>, April 6, 2009.
- Anonymous. 2008. **Nisaplin® , the only nisin A product effective against bacterial spoilage.** Nisaplin. Available Source: <http://www.daniscocare4u.com/nisaplin.html>, March 31, 2009.
- Anonymous. 2008. **Spinclean™ Glutathione Excellose® Kit.** GST fusion protein. Available Source: http://www.gentaur.com/gst_fusion_protein.htm, April 6, 2009.
- Anonymous. 2009. **GST Gene Fusion System Handbook.** Handbook. Available Source: [http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/87478CFA7E09E0C7C1256EB400417E59/\\$file/18115758.pdf](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/87478CFA7E09E0C7C1256EB400417E59/$file/18115758.pdf), April 6, 2009.
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. **Molec. Immunol.** 40: 845–859.
- Brogden, KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nat. Reviews Microbiol.** 3: 238–250.

- Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds and H.-G Sahl. 1998. The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. **Antimicrob. Agents and Chemotherapy**. 42: 154-160.
- Cadwell, R. and G. Joyce. 1991. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **PCR Meth. Appl.** 2, 28–33.
- Cao, Y., G. Zhang, G. Zhang, Y. Xu and L. Wang . 2008. Construction of prokaryotic expression vector and expression of human beta defensin 4 gene. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**. 25:1166-9.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendes and J. W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **Int. J. Food Microbiol.** 34: 1-16.
- Cataloluk, O. 2001. Molecular characterization of the gene encoding for the salivacin B activity and its flanking sequences. **Turk. J. Biol.** 25: 379-386.
- Cherry, J. R., M. H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones and AH. Pedersen .1999. Directed evolution of a fungal peroxidase. **Nat. Biotechnol.** 17:379–384.
- Choi, M. H. and Y. H. Park. 2000. Selective Control of Lactobacilli in Kimichi with Nisin. **Letters in Applied Microbiol.** 30: 173-177.
- Colgrave, M. L., A. C. Kotze, Y. H. Huang, J. O’Grady, S. M. Simonsen and D. J. Craik. 2008. Cyclotides: natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Biochem.** 47: 5581–5589.
- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross. 2005. Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Therapeutic Potential. **Current Protein and Peptide Science** 6: 61-75.

- Cutter, C. N. and G. R. Siragusa. 1995. Population Reductions of Gram-Negative Pathogens Following Treatments with Nisin and Chelators under Various Conditions. **J. Food Prot.** 58: 977-988.
- Deegan, L. H., P. D Cotter, C. Hill and P. Ross. 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. **Int. Dairy J.** 16: 1058-1071.
- Diao, H., C. Guo, D. Lin and Y. Zhang. 2007. Intein-mediated expression is an effective approach in the study of β -defensins. **Biochem. Biophys. Research Communicat.** 357: 840–846.
- Drider, D., G. Fimland, Y. H. Chard, L. M. McMullen and H. Prevos. 2006. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 70: 564-582.
- Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi and S. Rebuffat. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. **Nat. Prod. Reports.** 24: 708–734.
- Eijsink, V.G.H., M. Skeie, P.H. Middelhoven, M.B. Brurberg and I.F. Nes. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 3275-3281.
- Eijsink, V.G.H., L. Axelsson, D.B. Diep, L.S. Havarstein, H. Holo and I.F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by LAB; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek** 81: 639-654.
- Ennahar, S., K. Sonomoto and A. Ishizaki. 1999. Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. **J. Biosci. Bioengin.** 87: 705-716.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class II bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.

- Field, D., P. M. Connor, P. D. Cotter, C. Hill and R. P. Ross. 2008. The generation of Nisin variants with enhanced activity against specific Gram positive pathogens. **Molec. Microbiol.** 69: 218–230.
- Flynn, S., D.V. Sinderen, G.M. Thornton, H. Holo, I.F. Nes and J.K. Collins. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. **Microbiol.** 148: 973-984.
- 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 Microbiol. Lett.** 221: 143-149.
- Garneau, S., N.I. Martin and J.C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochemie.** 84: 577-592
- Gert, M., W. N. Konings and A. J. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek.** 76: 185-198.
- Hammarstrom, M., N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund and T. Hard. 2002. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. **Protein Sci.** 11: 313–321.
- Hancock, R. E. and H. G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** 24: 1551–1557.
- Héchar, Y. and H. G. Sahl. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie.** 84: 545–557.

- Holzapfel, W. H., R. Geisen and U. Schillinger. 1995. Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food-Grade Enzymes. **Int. J. Food Microbiol.** 24: 343-362.
- Imke, W., T. Bottiger, R. R. Bonelli, A. Wiese, S. O. Hagge, T. Gutschmann, U. Seydel, L. Deegan, C. Hill, P. Ross and H. G. Sahl. 2006. The mode of action the lantibiotic lactacin 3147-a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. **Molec. Microbiol.** 61: 285-296.
- Ireland, D. C., C. K. Wang, J. A. Wilson, K. R. Gustafson and D. J. Craik. 2008. Cyclotides as natural anti-HIV agents. **Biopolymers.** 90: 51–60.
- Jack, R. W., J. R. Tag and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiol. Reviews.** 59: 171-200.
- Kim, YW., JH. Choi, JW. Kim, C. Park, JW. Kim, H. Cha, SB. Lee, BH. Oh, TW. Moon and Park KH. 2003. Directed evolution of *Thermus maltogenic* amylase toward enhanced thermal resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:4866–4874.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. **Biochemie.** 70: 337-349.
- Lehrer, R. I. 2007. Multispecific myeloid defensins. **Curr. Opinion in Hematol.** 14: 16–21.
- Leung, D., E. Chen and D. Goeddel. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. **Technique.** 1: 11–15.
- Linda G. O. and W. J. Quax. 2005. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. **Biomolec. Engineer.** 22: 1–9.

- Linde, A., C. R. Ross, E. G. Davis, L. Dib, F. Blecha and T. Melgarejo. 2008. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **J. Vet. Int. Med.** 22: 247–265.
- Marcos, J. F., A. Muñoz, E. Pe´rez-Paya´, S. Misra and B. Lo´pez-Garci´a. 2008. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. **Annual Review of Phytopathol.** 46: 273–301.
- McAuliffe, O., R.P. Ross and C. Hill. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiol. Rev.** 25: 285–308.
- Moon, G. S., Y. R. Pyun and W. J. Kim. 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.
- Mygind, P. H., R. L. Fischer, K. M. Schnorr, M. T. Hansen, C. P. So´nksen, S. Ludvigsen, D. Ravento´s, S. Buskov, B. Christensen, L. De Maria, O. Taboureau, D. Yaver, S. G. Elvig-Jørgensen, M. V. Sørensen, B. E. Christensen, S. Kjaerulff, N. Frimodt-Møller, R. I. Lehrer, M. Zasloff and H. H. Kristensen. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature.** 437: 975–980.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 70: 113–128.
- Nes, I. F., D. B. Diep and H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **J. Bacteriol.** 189: 1189–1198.
- Neylon C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. **Nucl Acids Res.** 32:1448–59.

- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Håvarstein, 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.
- Oppegård, C., J. Schmidt, P. E. Kristiansen, and J. Nissen Meyer. 2008. Mutational Analysis of Putative Helix-Helix Interacting GxxxG-Motifs and Tryptophan Residues in the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. **J. Biochem.** 47: 5242–5249.
- Oscáriz J.C. and A.G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **Int. Microbiol.** 4: 13-19.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross and C. Hill. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. **Biochimie.** 84: 593-604.
- 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.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Pag, U and H. G. Sahl. 2002. Multiple activities in lantibiotics—models for the design of novel antibiotics. **Curr Pharm Des.** 8: 815–833.
- Park, C. B., H.S. Kim and S.C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 244: 253–257.
- Pilasombut, K. 2006. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine. Ph. D. Thesis, Kasetsart, University, Bangkok. Thailand.

- Pilasombut, K., T. Sakpuaram, W. Wajjwalku, S. Nitisinprasert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, K. Fujita, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2006. Purification and amino acid sequence of a bactreiocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. **J. sci. Technol.** 28 (Supl. 1): 121-132.
- Sambrook, J.L., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed.** Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor. New York.
- Sang, Y. and F. Blecha . 2008. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008 June 9 [Epub ahead of print] **doi:10.1016/j.dci.2008.05.006.**
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nat. Immunol.** 6: 551–557.
- Senes, A., D. E. Engel and W. F. DeGrado. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 14: 465–479.
- Sharma, S. and G.K. Khuller. 2001. DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, **Curr. Microbiol.** 243: 74–76.
- Soomro, A.H., T. Masud and K. Anwaar. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health - a review. **Pakistan J. Nutrition**, 1: 20-24.
- Stemmer W. P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. **Nature.** 370: 389–91.
- Stiles, M. E. and J. W. Hastings. 1991. Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation. **Trends in Food Sci. Technol.** 2: 247-251.

- Van Belkum, M.J. and M.E. Stiles. 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. **Nat. Pro. Rep.** 17: 323-335.
- Wiedemann I., E. Breukink, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, G. Bierbaum and B. de Kruijff. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, **J. Biol. Chem.** 276: 1772–1779.
- Willey, J. M. and W. A. van der Donk . 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. **Annual Review Microbiol.** 61: 477–501.
- Wintrode, P. L., K. Miyazaki and F. H. Arnold .2001. Patterns of adaptation in a laboratory evolved thermophilic enzyme. **Biochim BiophysActa.** 1549: 1–8.
- Worobo, R. W., M. J. Van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. **J. Bacteriol.** 177: 3143-3149.
- Xu, X., F. Jin, X. Yu, S. Ji, J. Wang, H. Chen, C. Wang and W. Zhang. 2007. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 53: 293–301.
- Yeaman, M. R. and Yount, N. Y. 2007. Unifying themes in host defence effector polypeptides. **Nat. Reviews Microbiol.** 5: 727–740.
- Zhou, Q. F., X.G. Luo, L. Ye and T. Xi. 2007. High-Level Production of a Novel Antimicrobial Peptide Perinerin in *Escherichia coli* by Fusion Expression. **Curr. Microbiol.** 54: 366–370.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารสูตร MRS / 1000 ml

MRS	52.5 g
-----	--------

อาหารสูตร LB broth / 1000 ml

Tryptone	10 g
----------	------

Yeast extracts	5 g
----------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

2. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

Alkaline lysis Solution I (Resuspension buffer) /100 ml

50 mM Glucose	2.5 ml
---------------	--------

25 mM Tris-HCl, pH 8	5 ml
----------------------	------

10 mM EDTA	2 ml
------------	------

Alkaline lysis Solution II (Lysis buffer) / 100 ml

0.2 N NaOH	2 ml
------------	------

1% (w/v SDS)	5 ml
--------------	------

Alkaline lysis Solution III / 100 ml

5 M Potassium acetate	50 ml
-----------------------	-------

0.2 M Glacial acetic acid	11.5 ml
---------------------------	---------

3. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

10X TBE stock solution 1000 ml

Tris base	108 g
-----------	-------

Boric acid	55 g
------------	------

EDTA	5.84 g
------	--------

4. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

30 % Acrylamide (30.8 % T, 2.6% C)/ 100 ml

30% Acrylamide acrylamide	30 g
---------------------------	------

<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide (BIS)	0.8 g
---	-------

10% Amonium persulfate / 1 ml

Amonium persulfate	100 mg
--------------------	--------

Separating solution 1.5 M Tris pH 8.8 / 200 ml

Tris base	36.3 g
-----------	--------

Stacking solution 0.5 M Tris pH 6.8 / 100 ml

Tris base	6 g
-----------	-----

6x Protein loading dye

0.5M tris pH 6.8	7 ml
------------------	------

Glycerol	3 ml
----------	------

SDS	1 g
-----	-----

Bromophenol blue	1.2 mg
------------------	--------

5x Protein running buffer / 1000 ml

0.125 M Tris base	15.1 g
-------------------	--------

0.96 M Glycine	72.0 g
----------------	--------

0.5%w/v SDS	5 g
-------------	-----

5x Staining solution / 500 ml

0.5%w/v coomasie blueR250	2.5 g
40% methanol	200 ml
10% Acetic acid	50 ml

Destain /1000 ml

40 % Ethanol	400 ml
10 % Acetic acid	100 ml

5. สารเคมีสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

Lysis buffer / 50 ml

20 mM Tris-HCl pH 7.5	1 ml
500 mM NaCl	8.33 ml
1 mM EDTA	0.1 ml
0.1% TritonX	0.05 ml

Column buffer / 500 ml

20 mM Tris-HCl pH 7.5	10 ml
500 mM NaCl	83.33 ml
1 mM EDTA	1 ml

Stripping buffer

0.3 M NaOH

Clave buffer / 10 ml

20 mM Tris-HCl pH 7.5	0.2 ml
500 mM NaCl	1.17 ml
1 mM EDTA	0.02 ml
50 mM DTT	0.077 g

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	น.ส.กรรณิกา ทองขาว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	1 มีนาคม 2526
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตศึกษา สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร