

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2561

ชื่อแผนงานวิจัย อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

ชื่อโครงการวิจัย การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์

(ภาษาอังกฤษ) Cloning of 5-aminolevulinate synthase (ALAS) gene from microorganisms.

### คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวภรณ์ สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสุภาวดี จ้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวศุภลักษณ์ สัตยสมิตสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

### บทคัดย่อ

กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรเพื่อเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ งานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA พบว่าเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี จึงนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase ตรวจพบยีนที่สนใจ มีขนาดประมาณ 1,224 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem A* ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hemA* (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีน *hem A* เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และทำการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

**คำสำคัญ** แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เอนไซม์ 5-Aminolevulinate synthase กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก

รหัสการทดลอง 03-11-59-02-00-00-03-59

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Patumthani, 12110, Thailand

## คำนำ

กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลิน ฮีม และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สหรัย และแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสร้าง ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอร์ไฟริน เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลิน ฮีม และวิตามินบี12 (Sasikala *et al.*, 1994) แบคทีเรียที่สังเคราะห์ ALA ได้มีหลายชนิด เช่น สหรัย *Chlorella regularis*, *C. vulgaris* เชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas sp.*, *Clostridium thermoaceticum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas riboflavin* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ แต่มีข้อจำกัดในด้านการเพาะเลี้ยงที่ยู่งยากซับซ้อน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตช้า อาศัยแสงในการเจริญเติบโต แต่ไม่อาศัยออกซิเจน

สาร ALA สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย เช่น เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth stimulator) เพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนพืช โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและการสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังสามารถใช้ทดแทนสารกำจัดวัชพืช (Photodynamic herbicides) และสารกำจัดแมลง (Porphyrin insecticides) ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สาร ALA จึงเป็นสารชีวภาพทางเลือกเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกรในระบบการผลิตเกษตรอินทรีย์ (Organic Agriculture) หรือเกษตรปลอดสารพิษ เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบยั่งยืน เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร ลดปัญหาการใช้สารเคมีเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัยให้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคและช่วยฟื้นฟู บำรุง รักษาสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่ในสภาพที่สมดุลตลอดไป

เอนไซม์ 5-Aminolevulinic acid synthase (ALAS) มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมของไกลซีนและซัคซินิลโคเอ ได้เป็น CoA, คาร์บอนไดออกไซด์ และ ALA (Jordan, 1991) โดย ALA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ เตตราไพโรลในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอนไซม์ ALAS ที่ได้มาจาก *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 57,000 ดาลตัน (Warnick and Burnham, 1971) ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* มี 2 ยีน คือ *hemA* และ *hemT* โดยมีรายงานการศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *hemA* และ *hemT* เพื่อการผลิต ALA (Neidle and Kaplan, 1993) เทคโนโลยีชีวภาพสามารถเข้ามาช่วยในการพัฒนาวิธีการผลิตสาร ALA ให้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยวิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อแบคทีเรีย และให้มีการ over expression แล้วนำไปผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ซึ่งจะช่วยเร่งระยะเวลาให้กระบวนการสังเคราะห์ ALA จาก succinyl CoA และ glycine ใน Shemin pathway ( $C_4$  pathway) เกิดได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งผลผลิตที่ได้ คือ ALA

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ aminolevulinic acid (ALA) synthase จากเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ ALA synthase และรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
10. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit<sup>®</sup> (RBC Bioscience)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เซลล์แบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ , BL21(DE)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific)
19. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
20. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
  - ไพรเมอร์ 16S rDNA : 27F (forward), 1492R (reverse)
  - ไพรเมอร์ยีน *hem A* (synthase) : HemA-F, HemA-R
  - ไพรเมอร์ T&A Cloninng vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
  - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse

21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
  - โปรแกรม BLAST จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/>
  - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
  - โปรแกรม DNASTar software analysis ( DNASTAR, Inc, USA )
  - โปรแกรม ChromasPro version 1.33 จาก <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>
  - โปรแกรม NEBcutter2 จาก <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้แก่ YA medium, Nutrient agar (NA), Luria-Bertani (LB), LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

## วิธีการ

### 1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA)

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำในนาข้าว และแหล่งน้ำตามธรรมชาติต่างๆ ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร NA แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร YA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่ที่มีแสงสว่าง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Sodium acetate buffer (ประกอบด้วย Sodium acetate trihydrate 27.2 กรัม ละลายใน Glacial acetic acid และปรับปริมาตรด้วย Glacial acetic acid ให้ได้ 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ Acetone 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที วางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสารละลาย Modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย ALA มาตรฐาน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

### 2. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

#### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในข้อ 1 โดยการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH<sub>2</sub>O) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE Buffer 2 ครั้ง เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก 15 นาที เติม 2

เท่า CTAB (บ่ม 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ผสมทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ตู่น้ำใส่ใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 700 ไมโครลิตร) เติม 0.6 เท่า ของ isopropanol และ 0.1 volume ของ 3 M NaOAc ผสมเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ระบายแอลกอฮอล์ที่ตกค้างในหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เติม TE + RNase 15 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD<sub>260/280</sub> และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ แอโรเจล Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แฉแผ่นเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

## 2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16s rDNA โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

โดยใช้ universal primer (Lane, 1991; Alm *et al.*, 1996)

Forward 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

Reverse 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 1492R (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700)

โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	} จำนวน 30 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity ( $\alpha$ )		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

### 2.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 2.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH<sub>2</sub>O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

### 2.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ 16s rDNA

#### 2.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	}	จำนวน 1 รอบ	
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที		}	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที			
60 องศาเซลเซียส	4 นาที			
4 องศาเซลเซียส	infinity ( $\alpha$ )			

#### 2.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 2.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH<sub>2</sub>O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ปล่อยให้แห้งในที่มืด

#### 2.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

#### 2.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI ต่อไป

### 3. การโคลนยีน *hem A* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อ *Rhodobacter* sp.

#### 3.1 การสกัดดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

#### 3.2 การสังเคราะห์ยีน *hem A* โดยวิธี PCR Amplification และการตรวจวิเคราะห์ผล

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *hem A* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HemA-F, HemA-R

HemA-F 5'-ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTG-3'

HemA-R 5'-TCAGGCAACGACCTCGGCGGATTTCAGCGCACAGTG-3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ HemA-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ HemA-R Bamy401R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร

Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	} จำนวน 40 รอบ	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		
4 องศาเซลเซียส infinity ( $\alpha$ )			

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยการแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis

### 3.3 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลนยีน

ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือจาก 3.2 มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมน้ำละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAc 10 ไมโครลิตร) เติมน้ำ Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติมน้ำ PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem A* เข้ากับ Cloning vector

นำชิ้นยีน *hem A* ซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 3.3 มาทำการเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector โดยใช้ชุด T&A Cloning Kit (RBC Bioscience)



Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product	2	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ทันที นำ ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.5 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

เตรียมอาหารแข็ง LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal โดยเตรียมอาหาร LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH<sub>2</sub>O) ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB- Ampicillin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มี insert ของยีนอะไมเลส ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

### 3.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เก็บตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงไว้ จากข้อ 2.5 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 - 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 - 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25

ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.7 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem A* ใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'

M13-R 5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	} จำนวน 25 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity ( $\alpha$ )		

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

### 3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *hem A* โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการตรวจพบการปรากฏของยีน *hem A* (ขนาด ~ 1,224 bp) ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วจึงนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ไพรเมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1.6	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	} จำนวน 25 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity ( $\alpha$ )	

- การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้างต้นมาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำ

ปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (dH<sub>2</sub>O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใส่ทิ้งปล่อยให้แห้งในที่มืด

- การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

### 3.9 การเชื่อมต่อชิ้นยีนที่ได้เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

นำผลผลิต PCR ของยีน *hem A* และเวกเตอร์ (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific) (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการสร้าง recombinant protein โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Expression vector เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>hem A</i> (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) ที่ได้สู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

### 3.10 การตรวจสอบการปรากฏของยีนใน aLICator LIC Cloning and Expression system

ตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

LIC Reverse 5' GAGCGGATAACAATTCACACAGG 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	} จำนวน 25 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity ( $\alpha$ )		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *hem A*

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem A* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB-Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

## 5. การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase โดยการผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA)

นำสารละลายจากข้อ 4 ที่เลี้ยงต่อจนครบเวลา 12 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อทำการแยกตะกอนเซลล์ออก ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100  $\mu\text{M}$

### เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561 รวม 3 ปี

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA)

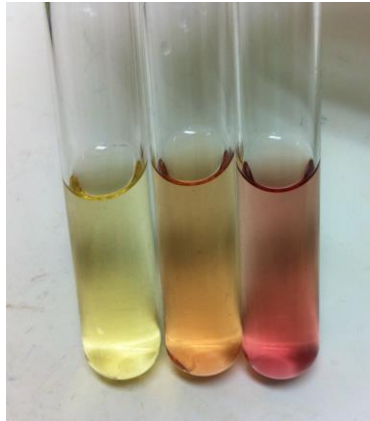
จากการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ โดยคัดแยกและเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงให้บริสุทธิ์ในอาหารสูตร NA พบว่า ได้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง จำนวน 36 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่รวบรวมได้ ไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร YA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืด และเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใส มาทดสอบศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA) โดยการเติมสารละลาย Modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู พบว่า ไอโซเลท D34 มีการผลิตสาร ALA สูงที่สุด 64.10  $\mu\text{M}$  ดังภาพที่ 1 ตารางที่ 1

#### 2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

จากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ 16S ribosomal RNA gene ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1,492R ได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ดังภาพที่ 2) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม GenBank พบว่าสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodospseudomonas palustris* ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการสังเคราะห์ ALA และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้เทคนิคซีวโมเลกุล

ไอโซเลท	ชนิด	ปริมาณ ALA (uM)	% identity	Accession no.
D1	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30.73	99	KJ955374.1
D2	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	29.25	100	KJ955374.1
D3	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	6.78	100	KJ955374.1
D4	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2.96	99	KJ955374.1
D5	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	6.14	99	KJ955374.1
D6	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3.17	100	KP979543.1
D7	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5.29	100	KJ955374.1
D8	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4.87	100	KJ955374.1
D9	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	25.5	99	KJ955374.1
D10	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	21.5	99	KJ955374.1
D11	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5.27	100	KJ955374.1
D12	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3.16	100	KJ955374.1
D13	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5.89	100	KJ955374.1
D14	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4.83	99	KJ955374.1
D15	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3.80	100	KJ955374.1
D16	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4.43	100	KJ955374.1
D17	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3.81	100	KJ955374.1
D18	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	11.22	100	KJ955374.1
D19	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	8.89	100	KJ955374.1
D20	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2.95	100	KJ955374.1
D21	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	21.10	99	FN543496.1
D22	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	11.86	100	KJ955374.1
D23	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14.60	100	KJ955374.1
D24	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	46.42	100	KJ955374.1
D25	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	8.69	100	KJ955374.1
D26	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	11.02	100	KJ955374.1
D27	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	13.14	99	KJ955374.1
D28	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	11.45	100	KJ955374.1
D29	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	31.58	100	KJ955374.1
D30	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	47.69	100	KJ955374.1
D31	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	20.90	100	KJ955374.1
D32	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	34.55	100	KJ955374.1
D33	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23.8	99	KJ955374.1
D34	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	64.1	99	KJ955374.1
D35	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	25.7	100	KP979543.1
D36	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30.6	100	KJ955374.1

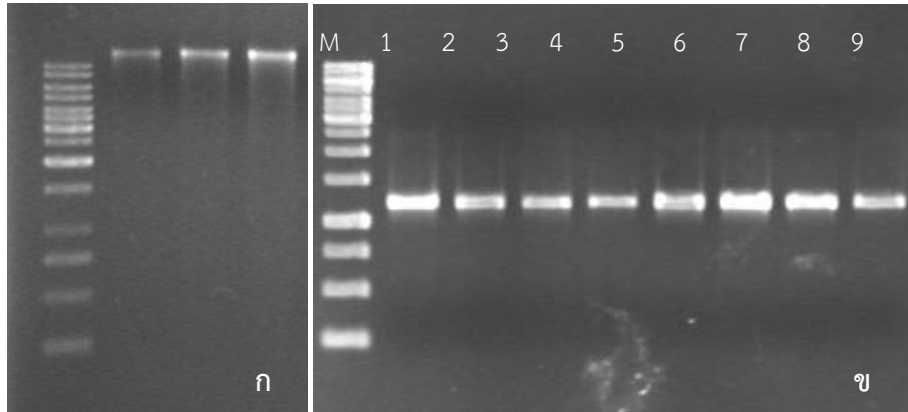


ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบการสร้างสาร ALA โดยเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง สังเกตปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีชมพู

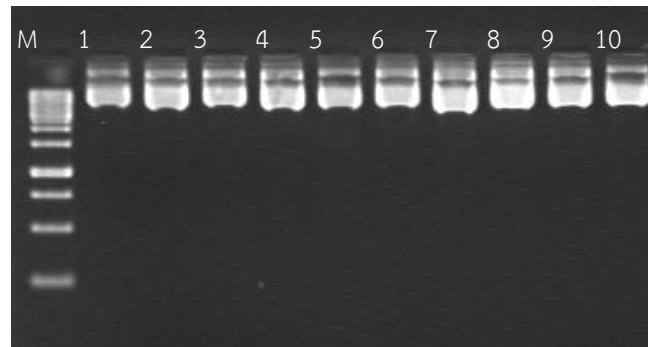
### 3. การโคลนยีน *hem A* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เฮโมไซม์ ALA synthase จากเชื้อ *Rhodobacter* sp.

การสังเคราะห์ยีน *hem A* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเฮโมไซม์ ALA synthase จาก genomic DNA ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *hem A* มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของยีน ALA synthase ที่มีขนาดประมาณ 1,224 bp ดังภาพที่ 2 จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีน *hem A* เข้าสู่เวกเตอร์พาหะ (T&A cloning vector) และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีน และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 ug/ml เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 3 ตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,224 bp ดังภาพที่ 4 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hem A* ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem A* (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 5 และเมื่อแปลรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hemA* (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 6

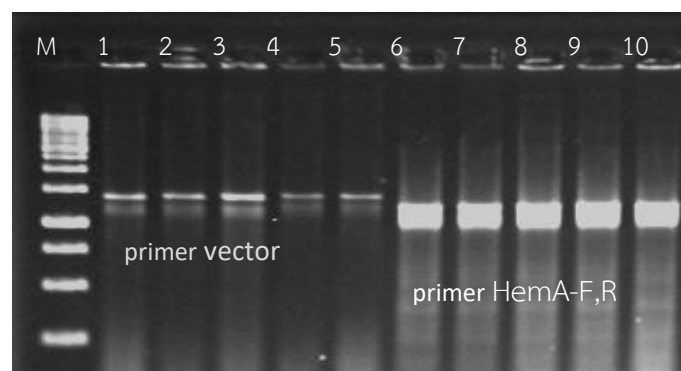




ภาพที่ 2 แสดง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp. (ก) และ ผลผลิต PCR ของยีน *hem A* ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,224 bp (ข)



ภาพที่ 3 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ cloning vector (T&A Cloning vector) และยีน *hem A* ซึ่งถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem A* ในพลาสมิดลูกผสมของ T&A Cloning vector โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (M13-F, M13-R) Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน *hem A* (HemA-F, HemA-R)

Rhodobacter sphaeroides strain MBTLJ-13 chromosome 1, complete sequence

Sequence ID: [CP015210.1](#) Length: 3188543 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1674685 to 1675908 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
2261 bits(1224)	0.0()	1224/1224 (100%)	0/1224 (0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query	1	ATGGACTACAATCTGGCACTCGATAACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC			60
Sbjct	1675908	ATGGACTACAATCTGGCACTCGATAACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC			1675849
Query	61	CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCCAAAGCCATGTGGCGCAAG			120
Sbjct	1675848	CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCCAAAGCCATGTGGCGCAAG			1675789
Query	121	CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCAGCAACGACTATCTCGGCATGGGC			180
Sbjct	1675788	CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCAGCAACGACTATCTCGGCATGGGC			1675729
Query	181	CAGCATCCGGTGGTGCCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTTCGACCGGCGCCGGGTTCG			240
Sbjct	1675728	CAGCATCCGGTGGTGCCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTTCGACCGGCGCCGGGTTCG			1675669
Query	241	GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC			300
Sbjct	1675668	GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC			1675609
Query	301	GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC			360
Sbjct	1675608	GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC			1675549
Query	361	GCGACCTCTCGACGCTGCCGACGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG			420
Sbjct	1675548	GCGACCTCTCGACGCTGCCGACGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG			1675489
Query	421	AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCAGAGAAGCACATCTTCAAG			480
Sbjct	1675488	AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCAGAGAAGCACATCTTCAAG			1675429
Query	481	CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGCAAGGACCGTCCGATC			540
Sbjct	1675428	CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGCAAGGACCGTCCGATC			1675369
Query	541	CTCGTGGCCTTCGAATCCGCTCTATTTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC			600
Sbjct	1675368	CTCGTGGCCTTCGAATCCGCTCTATTTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC			1675309
Query	601	TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCGCTCGGC			660
Sbjct	1675308	TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCGCTCGGC			1675249
Query	661	ATGTACGGCCCCCGGGCGGCGGCTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC			720
Sbjct	1675248	ATGTACGGCCCCCGGGCGGCGGCTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC			1675189
Query	721	ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG			780
Sbjct	1675188	ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG			1675129
Query	781	TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG			840
Sbjct	1675128	TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG			1675069

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน *hem A* (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

```

Query 841      CCGCCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG 900
              |||
Sbjct 1675068  CCGCCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG 1675009

Query 901      CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC 960
              |||
Sbjct 1675008  CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC 1674949

Query 961      CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGGACCCCGTGAC 1020
              |||
Sbjct 1674948  CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGGACCCCGTGAC 1674889

Query 1021     TGCAAGATGATCTCGGACATGTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC 1080
              |||
Sbjct 1674888  TGCAAGATGATCTCGGACATGTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC 1674829

Query 1081     TTCCCGACCGTGCCGCGGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGATGAT 1140
              |||
Sbjct 1674828  TTCCCGACCGTGCCGCGGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGATGAT 1674769

Query 1141     TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG 1200
              |||
Sbjct 1674768  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG 1674709

Query 1201     AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA 1224
              |||
Sbjct 1674708  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA 1674685

```

**ภาพที่ 5 (ต่อ)** ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน *hem A* (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

5-aminolevulinate synthase 1 [Rhodobacter sphaeroides KD131]

Sequence ID: [ACM01167.1](#) Length: 435 Number of Matches: 2

Related Information

Range 1: 29 to 394 [GenPeptGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	724 bits(1868)	0.0()	Compositional matrix adjust.	363/366(99%)	364/366(99%)	0/366(0%)	+3
Features:							
Query	42		MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFFKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG			221	
Sbjct	29		MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFFKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG			88	
Query	222		QHPAVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND			401	
Sbjct	89		QHPAVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND			148	
Query	402		ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSgteKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI			581	
Sbjct	149		ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSgteKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI			208	
Query	582		LVAFESVYSMDGDFGRIKEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID			761	
Sbjct	209		LVAFESVYSMDGDFGRIKEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID			268	
Query	762		IIDGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPvvaagaaasvrHLKGDVE			941	
Sbjct	269		IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE			328	
Query	942		LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDVPRCKMISDMLLEHFGIYVQPIN			1121	
Sbjct	329		LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDVPRCKMISDMLLEHFGIYVQPIN			388	
Query	1122	FPTVAR 1139					
		FPTV R					
Sbjct	389	FPTVPR 394					

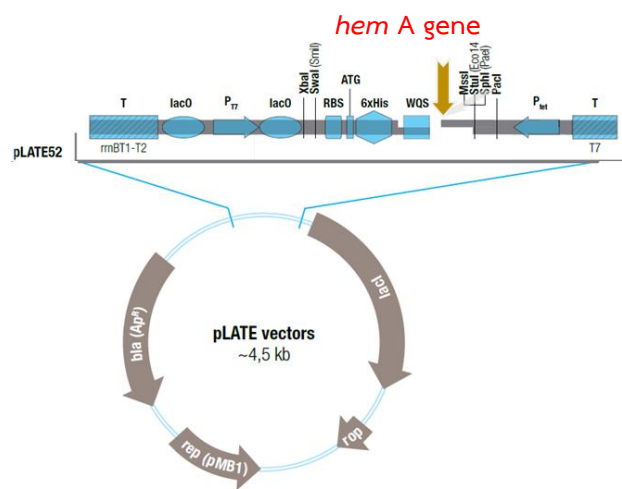
**ภาพที่ 6** การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน *hemA* (synthase) ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนไซลาเนส ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

การเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem A* เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน  
ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem A* เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน *hem A* ดังภาพที่ 7 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของปลาย 5' ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ ดังนี้

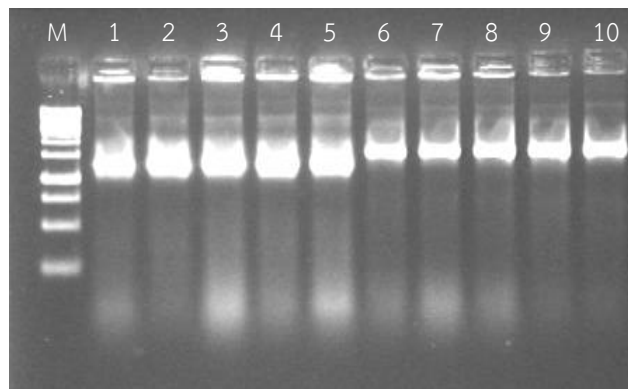
Ex\_HemA-Fatg 5'GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3'

Ex\_HemA-Rtaa 5' GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3'

แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem A* เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส และสามารถตรวจพบการปรากฏของยีน *hem A* ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค PCR ดังภาพที่ 8



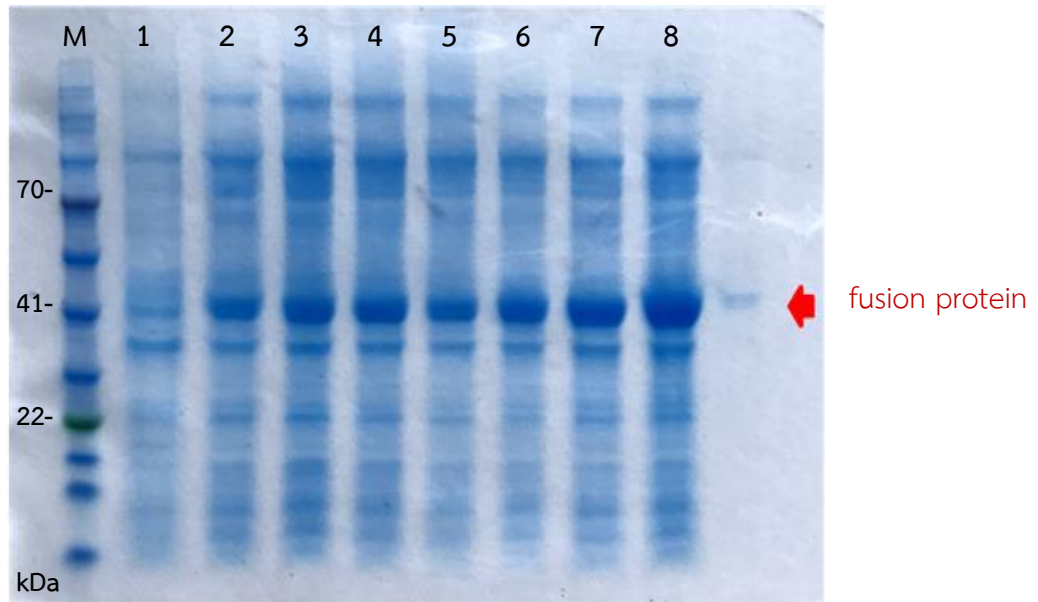
ภาพที่ 7 แผนที่ตำแหน่งของยีน *hem A* ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem A* ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน *hem A* (Ex\_HemA-Fatg, Ex\_HemA-Rtaa), Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)

#### 4. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *hem A*

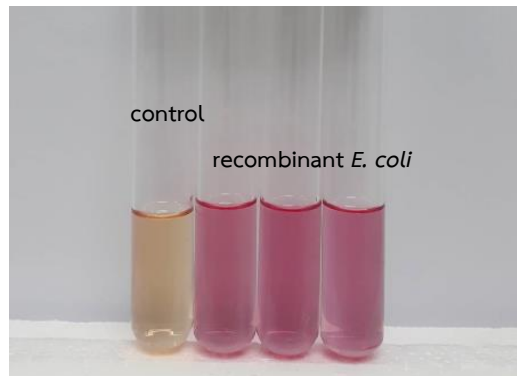
การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem A* เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีน *hem A* โดย 3mM IPTG Lane M; protein marker Lane 1; *E. coli* BL21 (DE3) Lane 2-8; *E. coli* BL21 (DE3) ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem A* ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ

## 5. การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase โดยการผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA)

จากการชักนำการทำงานของยีน *hem A* ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ เมื่อเวลาผ่านไปนาน 6 ชั่วโมง โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ehrlich's reagent ดังภาพที่ 10 เมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100  $\mu\text{M}$  พบว่ามีความสามารถผลิตสาร ALA ได้เท่ากับ 56.011  $\mu\text{M}$



ภาพที่ 10 การผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) จาก recombinant *E. coli* ที่ได้รับการชักนำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase นาน 12 ชั่วโมง

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำแหล่งต่างๆ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 ที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี เมื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *hemA* (synthase) ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 พบว่าขึ้นยีน *hemA* (synthase) ที่ได้ มีขนาด ~ 1,224 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem A* ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hemA* (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

การโคลนยีนจากการเชื่อมต่อยีน *hem A* เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) สามารถถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem A* เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์

เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 สามารถนำไปเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ALA ได้ ข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อจุลินทรีย์
2. ได้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ ALA synthase ได้ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งสามารถใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมี ฮอร์โมน และสารเสริมที่สังเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

### เอกสารอ้างอิง

- Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III in animals and bacteria. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.
- Neidle, E. L., and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J. Bacteriol.* 175:2292–2303.
- Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnol. Prog.* 10: 451-459.
- Warnick GR, Burnham BF. Regulation of porphyrin biosynthesis. Purification and characterization of 5-aminolevulinic acid synthase. *J Biol Chem.* 1971 Nov 25; 246(22):6880–6885.