

การโคลนและการแสดงออกของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต  
จาก *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *Escherichia coli*



นางสาวสิริรัตน์ วิเศษคุปต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLOWING AND EXPRESSION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS GENES  
FROM *Ralstonia eutropha* STRAIN A-04 IN *Escherichia coli*



Miss Sirirat Visetkoop

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

**521812**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การโคลนและการแสดงออกของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *Escherichia coli*

โดย

นางสาวสิริรัตน์ วิเศษคุปต์

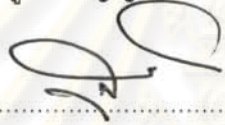
สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

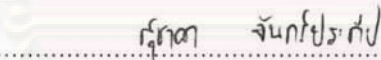
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



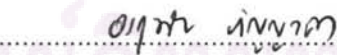
..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนีย์วัน)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญญาคง)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัญญะ ผลประไพ)

สิริรัตน์ วิเศษคุปต์ : การโคลนและการแสดงออกของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *Escherichia coli* (CLONING AND EXPRESSION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS GENES FROM *Ralstonia eutropha* STRAIN A-04 IN *Escherichia coli*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทรประทีป, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง, 162 หน้า.

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) เป็นพอลิเอสเทอร์ชีวภาพที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์หลายชนิด *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ซึ่งคัดแยกได้จากดินในประเทศไทย และมีรายงานว่าสามารถผลิตอนุพันธ์ของ PHA ได้หลายชนิด งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โคลนและแสดงออกยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกนี้ใน *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHA ให้สูงขึ้น ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ร่วมกับการใช้ชุดสำเร็จ GenomeWalker™ Universal Kit พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ ประกอบด้วย 3 กรอบการเปิดอ่าน (ORF) ซึ่งมีขนาด 1,770 1,182 และ 741 คู่เบส ตามลำดับ โดยมีผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมือนกับ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 สูงถึง 99% และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (*phaC*) เบต้าคีโตไทโอเอส ( *phaA*) และอะซิโตอะเซทิลโคเอริดักเทส (*phaB*) ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 ตามลำดับ จากนั้นโคลนยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตและแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *araBAD* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอะราบิโนส (pBAD/TOPO® ThioFusion™ เวกเตอร์) ศึกษาการผลิต PHB ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในระดับขวดเขย่าโดยการแปรผันชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ (L-อะราบิโนส) และขนาดของหัวเชื้อเริ่มต้น ผลวิจัยแสดงว่าการเลี้ยงโดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเริ่มต้นน้อยและอาหาร LB ที่มีคาร์บอนซิวลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเสริมด้วย 1% L-อะราบิโนสให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.11 กรัมต่อลิตรและปริมาณ PHB 5.7 กรัมต่อลิตร ใน 24 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนเหล่านี้ใน *E. coli* เป็นผลให้ได้ระดับ PHB ในสัดส่วนที่สูงเท่ากับ 93.3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ต้นแบบ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่สะสม PHB สัดส่วน เท่ากับ 78% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ 60 ชั่วโมง ดังนั้นความสามารถของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในการแสดงออกกรอบการอ่าน *phaCAB* นำไปสู่การผลิต PHB ที่มีคุณลักษณะที่เหนือกว่าทั้งในด้านการเจริญและการผลิต PHB ที่รวดเร็ว

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....สิริรัตน์.....วิเศษคุปต์.....  
ปีการศึกษา...2552.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....สุชาดา จันทรประทีป.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....อรุณทัย ภิญญาคง.....



# # 4972528923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : POLYHYDROXYALKANOATE / RECOMBINANT *E. coli* / PHA BIOSYNTHESIS

SIRIRAT VISETKOOP : CLONING AND EXPRESSION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS GENES FROM *Ralstonia eutropha* STRAIN A-04 IN *Escherichia coli*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 162 pp.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polyesters synthesized by a wide variety of microorganisms. Newly isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 screened from soil in Thailand could produce high content of PHAs. Thus, the PHA biosynthesis genes of this strain were cloned, characterized and expressed in *Escherichia coli* for achieving higher productivity. The PHA biosynthesis genes were analyzed by PCR and gene walking techniques to obtain the intact genes. Three major open reading frames (ORFs) were obtained and found to be 1,770, 1,182 and 741 bp, respectively. Sequence analysis showed that they were closely related to the PHA synthase (*phaC*), beta-ketothiolase (*phaA*) and acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) genes of *R. eutropha* H16. The recombinant *E. coli* strain harboring *phaCAB* operons of *R. eutropha* strain A-04 was constructed and expressed under the control of the arabinose-inducible *araBAD* promoter (pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> vector). In flask cultivation, the PHB production of recombinant *E. coli* was investigated by varying types of media, concentrations of inducer (L-arabinose) and initial inoculum sizes. The obtained results showed that the cultivation using a low inoculum size and LB medium containing 50 µg/ml carbinicillin supplemented with 1% L-arabinose gave 6.11 g/l of dry cell weight and 5.7 g/l of PHB amount at 24 h. It is indicated that the expression of these genes in *E. coli* results in a high level of 93.3% (w/w) of PHB content at 24 h of cultivation comparing with the wild type *R. eutropha* strain A-04 accumulated 78% (w/w) of PHB content at 60 h. Thus, the ability of the recombinant *E. coli* to express the *phaCAB* operons leading to the production of PHB with superior characteristic in rapid growth and PHB production.

Field of Study : .....Biotechnology.....Student's Signature.....Sirirat Visetkoop.....

Academic Year : ....2009.....Advisor's Signature.....Suchada Chanprateep.....

Co-Advisor's Signature.....Onruthai Pinyakong.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่ง จากหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาติดา จันทรประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ แนวทาง ข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้เสียสละแรงกาย แรงใจ และเวลาอันมีค่า ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญ ผลประไพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความสนใจ คำแนะนำต่างๆ และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อ งานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชา จุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีรวมทั้งเจ้าหน้าที่ที่ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการทุนวิจัย มหาคณบดีคณาจารย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับ เงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา รวมถึงสมาชิกห้องวิจัย 448 และ 449 ทุกคนที่คอยดูแล เอาใจใส่ แลกเปลี่ยนความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งคอยให้ กำลังใจ ห่วงใย และช่วยเหลือผู้วิจัยในทุกๆด้าน ตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่ได้มอบความรัก ความ ห่วงใย ความอบอุ่น และทุกสิ่งทุกอย่างแก่ผู้วิจัย รวมถึงกำลังใจที่ดีมาจากคนข้างกายที่ทำให้ วิทยานิพนธ์นี้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆและสำเร็จลุล่วงไปได้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
<b>บทที่ 2 ทัศนัวรรณกรรม</b>	
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก.....	5
2.2 ประเภทของพลาสติก.....	5
2.3 ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะพลาสติก.....	6
2.4 การสลายตัวของพลาสติก.....	8
2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....	9
2.6 การผลิต PHA เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์.....	28
2.7 หลักการในการค้นหาจีโนมที่ต้องการโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ร่วมกับการใช้ชุดสำเร็จ GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA).....	33
2.8 กลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO® ThioFusion™ vector system.....	36



### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
3.2	เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	40
3.3	จุลินทรีย์.....	42
3.4	พลาสติกและโพลิโนวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์.....	42
3.5	การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	44
3.6	การสกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอจาก <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04.....	45
3.7	การหาชิ้นส่วนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase, <i>phaC</i> ) จาก <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04.....	47
3.8	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสดีเอ็นเอสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ( <i>phaCAB</i> ) จาก <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 ด้วยวิธี gene walk โดยใช้ชุด GenomeWalker™ Universal Kit.....	54
3.9	การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2.....	63
3.10	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสดีเอ็นเอสังเคราะห์ PHA ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสติก.....	65
3.11	การเพิ่มจำนวนจีโนมดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสดีเอ็นเอสังเคราะห์ PHA ของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	67
3.12	การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสดีเอ็นเอสังเคราะห์ PHA ของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pBAD/TOPO® ThioFusion™ vector system.....	68
3.13	การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสดีเอ็นเอสังเคราะห์ PHA ของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 ในรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> .....	71



3.14 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*..... 73

**บทที่ 4 ผลการทดลอง**

4.1 การหาชิ้นส่วนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน  
พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสบางส่วน (PHA synthase, *phaC*)  
จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04..... 76

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีว  
สังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (*phaCAB*)  
จากโครโมโซมของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04..... 79

4.3 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์  
PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่  
พอลิเมอไรเซชัน..... 98

4.4 การโคลนผลิตภัณฑ์จีโนมิกดีเอ็นเอของ *R. eutropha*  
สายพันธุ์ A-04 เข้าในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pBAD/TOPO®  
ThioFusion™ vector system..... 100

4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนเบื้องต้นในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*..... 105

4.6 การแปรผันปัจจัยต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต  
PHA ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*..... 113

4.7 การสกัด PHB จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์..... 128

**บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**..... 130

รายการอ้างอิง..... 136

ภาคผนวก..... 144

ภาคผนวก ก ..... 145

ภาคผนวก ข ..... 148

ภาคผนวก ค ..... 159

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 162

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้.....	9
2.2	วิธีชีวสังเคราะห์ PHA.....	18
2.3	สมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB.....	27
2.4	ตัวอย่างของบริษัทระดับโลกที่มีชื่อเสียงในการพัฒนาและผลิต PHA.....	29
3.1	พลาสติกที่ใช้ในการทดลอง.....	42
3.2	โพลิโนวีคลีโอไทด์ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	43
4.1	แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC <sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง.....	107
4.2	แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง.....	110
4.3	แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> ในอาหาร LB 2YT SB และ TB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.02% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง.....	114
4.4	แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) จากการแปรผันน้ำตาลอะราบิโนสทั้งหมด 5 ความเข้มข้น เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> ในอาหาร LB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วยการเติมน้ำตาลอะราบิโนส ที่เวลา 0 ชั่วโมง.....	119

- 4.5 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) จากการแปรผัน ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิตร เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 1% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง..... 124
- 5.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ... 134



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพตัดขวางเซลล์ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) แสดง PHB ภายในแกรนูลของเซลล์.....	14
2.2 ภาพการเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ที่ย้อมด้วยสีคริสตัล ไวโอเล็ตของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก <i>R. eutropha</i> ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Leica DMLB microscope ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า โดยเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง.....	15
2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....	16
2.4 วิธีชีวสังเคราะห์ PHA.....	23
2.5 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA และพลาสติกชีวภาพในธรรมชาติ.....	24
2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ การย่อยสลาย PHB และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง.....	26
2.7 โครงสร้างของกรอบการอ่าน <i>phaCAB</i> ที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB.....	27
2.8 ภาพตัดขวางเซลล์รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีการสะสม PHB อยู่ในแกรนูล โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	32
2.9 โครงสร้างของอะแดปเตอร์ GenomeWalker และลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก (AP1) และไพรเมอร์ที่จำเพาะอะแดปเตอร์ด้านใน (AP2) และแสดงตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ.....	34
2.10 ขั้นตอนในการค้นหาชิ้นที่ต้องการศึกษาด้วยชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA).....	35
2.11 กลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO® ThioFusion™ โดยน้ำตาลอะราบิโนส (Invitrogen, USA).....	37
3.1 แผนที่แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และบริเวณปลาย 3' ของยีนพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนแล้ว.....	57



รูปที่	หน้า	
4.1	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ซินเทส จาก <i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Alcaligenes</i> sp. สายพันธุ์ SH-69, <i>A. eutrophus</i> , <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> และ <i>Chromatium vinosum</i> .....	77
4.2	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก ปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์โดยใช้ไพรเมอร์ F0 และ R4.....	78
4.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 466 คู่เบสของยีน <i>phaC</i> จาก <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04.....	79
4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>phaC</i> ที่ใช้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์.....	80
4.5	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>DraI</i> <i>EcoRV</i> และ <i>PvuII</i> .....	82
4.6	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์ครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 และ R2 กับ AP2 ตามลำดับ จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>SmaI</i> .....	83
4.7	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์ครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ F3 กับ AP1 และ F4 กับ AP2 ตามลำดับ จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>SmaI</i> .....	85
4.8	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์จากการใช้ GenomeWalker Human Positive Control Library เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ PCP1 กับ AP1 และไพรเมอร์ PCP2 กับ AP2.....	87
4.9	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรต์.....	88
4.10	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลการสกัดพลาสมิดและผลการตัดพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>EcoRI</i> .....	90

รูปที่	หน้า
4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM <sup>®</sup> -T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	91
4.12 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ F_phaCAB กับ R_phaCAB และ F_phaCAB กับ R_phaC ตามลำดับ.....	99
4.13 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	100
4.14 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนต่างๆ เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีน <i>phaC</i> สอดแทรกอยู่.....	101
4.15 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนต่างๆ เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีน <i>phaCAB</i> สอดแทรกอยู่.....	103
4.16 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้พลาสมิดเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	104
4.17 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD- <i>phaC</i> <sub>A04</sub> ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า หลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	106
4.18 ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี จากปฏิกิริยาเมทิลเอสเทอร์ของสารที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD- <i>phaC</i> <sub>A04</sub> .....	108
4.19 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD- <i>phaCAB</i> <sub>A04</sub> ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า หลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	109
4.20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD- <i>phaCAB</i> <sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	110

รูปที่	หน้า
4.21 ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ด้วยวิธี ก๊าซโครมาโตกราฟี จากปฏิกิริยามีทิลเอสเทอร์ของสารที่สกัดได้จาก รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> .....	112
4.22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> ในอาหาร LB 2YT SB และ TB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.02% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง.....	117
4.23 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นด้วย น้ำตาลอะราบิโนส 0.002 0.02 0.2 0.5 และ 2% ที่เวลา 0 ชั่วโมง.....	122
4.24 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) จากการแปรผันปริมาณ หัวเชื้อเริ่มต้น $4.5 \times 10^8$ $3.2 \times 10^9$ และ $1.5 \times 10^{10}$ CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงรีคอม บิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้น การแสดงออกด้วย 1% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง.....	127
4.25 การสกัด PHB ออกจากเซลล์รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB <sub>A04</sub> โดยการใช้คลอโรฟอร์มและลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการทำให้ บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน.....	128
5.1 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีชิ้นส่วน ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก <i>R. eutropha</i> ซึ่งตรวจสอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า.....	133



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ

ในปัจจุบันประชากรมนุษย์เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีรายงานแนวโน้มการใช้สอยผลิตภัณฑ์พลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นจากสมาคมอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกทั่วโลก (The Association of Plastic Manufacturers Europe, 2009) จึงนำไปสู่การสะสมของขยะพลาสติกซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีการนำพลาสติกมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย และถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน เช่น บรรจุภัณฑ์อาหาร ฉนวนกันความร้อน ภาชนะต่างๆ เส้นใยสิ่งทอ กระดุม เป็นต้น พลาสติกเป็นสารประเภทพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) พอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) พอลิสไตรีน (polystyrene, PS) พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride, PVC) และพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลท (polyethylene terephthalate, PET) (Zheng และคณะ, 2005) พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ราคาถูก มีความทนทาน น้ำหนักเบา และมีขอบข่ายการใช้งานได้อย่างกว้างขวาง ประกอบกับปัจจุบันจากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้สามารถผลิตพลาสติกให้มีคุณสมบัติต่างๆ ตามที่ต้องการได้ไม่ยาก โดยขึ้นกับการเลือกใช้วัตถุดิบ ปฏิกริยาเคมี กระบวนการผลิต และกระบวนการขึ้นรูปทรงต่างๆ ได้อย่างมากมาย นอกจากนี้ยังสามารถปรุงแต่งคุณสมบัติได้ง่าย โดยการเติมสารเติมแต่ง (Additives) เป็นต้น (Derraik, 2002) อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของพลาสติกสังเคราะห์ คือ กำจัดได้ยาก ใช้เวลาในการย่อยสลายนานนับร้อยปีหรือมากกว่า และมีการปลดปล่อยสารพิษในระหว่างกระบวนการกำจัดขยะพลาสติกอีกด้วย จึงก่อให้เกิดปัญหาในสิ่งแวดล้อม (Gross และ Kalra, 2002) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ดังกล่าว พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง คือ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA) และอนุพันธ์ของ PHA (Madison และ Huisman, 1999)

PHA เป็นพอลิเอสเตอร์ของกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิกที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยรวมถึงแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด (Jendrossek และ Handrick, 2002) จุลินทรีย์สร้างและสะสม PHA เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำรองภายในเซลล์ โดย



จะสร้างในภาวะที่จำกัดสารอาหารบางอย่าง เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน เป็นต้น และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป PHA จะถูกสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) โดยขนาดและจำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะแตกต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ (Steinbüchel และ Schlegel, 1991)

จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างและสะสม PHA มีรายงานการค้นพบมากกว่า 150 สายพันธุ์ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่น่าสนใจและมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง คือ *Ralstonia eutropha* (ชื่อเดิม *Alcaligenes eutrophus*) เนื่องจากสามารถสะสม PHA ภายในแกรนูลได้มากถึง 80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Lee, 1996) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ผลิต PHA ได้นั้นจะใช้เวลานานในกระบวนการผลิต และขั้นตอนการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ทำได้ยาก จึงเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้กระบวนการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพระดับอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์เหล่านี้ มีต้นทุนสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี นอกเหนือไปจากต้นทุนของแหล่งคาร์บอน (Lee และคณะ, 1999) จากเหตุผลดังกล่าว จึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA มากขึ้น และสามารถสกัด PHA ออกจากเซลล์ได้ง่าย เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่นิยม คือ การโคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์ต้นแบบ แล้วนำไปแสดงออกในจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่มีอัตราการเจริญสูงกว่าและกระบวนการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ทำได้ไม่ยาก ตลอดจนเป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษา ปรับปรุง และถูกนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมแล้ว โดยนักวิจัยต่างพยายามที่จะพัฒนาให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจนสามารถขยายส่วนการผลิตถึงระดับอุตสาหกรรมได้ เช่น

Liu และคณะ (1998) ศึกษาการใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เพื่อผลิต PHB โดยรีคอมบิแนนท์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ (HMS174/pTZ18u-PHB) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสามารถผลิต PHB เท่ากับ 80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และประสิทธิภาพการผลิต PHB เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Jung และคณะ (2005) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* พบว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในบริเวณที่มีโคโคไลน์ไม่หนาแน่นบนอาหารแข็ง สามารถสะสม PHB ภายในแกรนูลได้มากกว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในบริเวณที่มีโคโคไลน์หนาแน่นเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะของเซลล์และจำนวนแกรนูลจากการย้อมด้วยสีคริสตัล ไวโอเล็ต (crystal violet) และเมื่อ

เลี้ยงระดับขวดเขย่าในอาหารเหลว 2x LB ที่มีกลูโคส 21% จะมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB เท่ากับ 85.2 กรัมต่อลิตร และมีสัดส่วนของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงถึง 99%

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากดินในประเทศไทย (Chanprateep และ Kulpreecha, 2006) โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตอนุพันธ์ของ PHA ได้หลายชนิด แต่ยังไม่มียางงานการศึกษายีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ จากนั้นแสดงออกยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวใน *E. coli* เนื่องจาก *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว อาหารและขั้นตอนการเลี้ยงไม่ซับซ้อน ทำให้เซลล์แตกได้ง่าย มีข้อมูลทางพันธุศาสตร์และมีเทคโนโลยีในการผลิตระดับอุตสาหกรรมครบถ้วน สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งคือ *E. coli* ไม่ผลิตเอนไซม์ PHA depolymerase ซึ่งพบในจุลินทรีย์ต้นแบบทุกสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHA โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย PHA ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์เพื่อนำกลับมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จึงคาดว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* จะมีประสิทธิภาพในการผลิต PHA เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โคลนและแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *E. coli*

## 1.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. หาชิ้นส่วนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase, *phaC*) จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04
2. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ด้วย GenomeWalker™ Universal Kit
3. โคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA เข้าเวกเตอร์แสดงออก
4. คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีการแสดงออกของยีนและผลิต PHA ได้
5. วิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของ PHA ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี
6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* กับ PHA ที่ผลิตจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 และนำยีนดังกล่าวไปแสดงออกใน *E. coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHA



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พลาสติก หรือ พอลิเมอร์ เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีมวลโมเลกุลสูงสังเคราะห์จากกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ซึ่งเป็นการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีจากการนำสารประกอบหน่วยย่อย ที่มีโครงสร้างเหมือนกันเรียกว่าโมโนเมอร์ (monomer) มาเรียงต่อกันด้วยพันธะเคมีเป็นสายโซ่ยาวทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น และเปลี่ยนสถานะทางกายภาพจากเดิมที่อาจอยู่ในรูปของก๊าซหรือของเหลวกลายเป็นของแข็งซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ (รังสรรค์ ปิ่นทอง และสาวิตรี นิชานนท์, 2536)

#### 2.2 ประเภทของพลาสติก

พลาสติกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (สารานุกรมเสรี, 2548 ; รังสรรค์ ปิ่นทอง และสาวิตรี นิชานนท์, 2536) ได้แก่

2.2.1 เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) เป็นพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุด และมีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อได้รับความร้อนถึงจุดหนึ่งจะหลอมเหลว ซึ่งเทอร์โมพลาสติกแต่ละชนิดใช้ความร้อนในการหลอมเหลวไม่เท่ากัน แล้วแต่ชนิดของพลาสติกนั้นๆ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างพลาสติกแต่ละชนิดต่างกัน คุณสมบัติพิเศษดังกล่าวทำให้สามารถนำเทอร์โมพลาสติกกลับมาหลอมและขึ้นรูปใหม่เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกอีกครั้ง หรือ รีไซเคิล (Recycle) ซึ่งพลาสติกประเภทนี้มีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิด คือ พอลิเอธิลีน (Polyethylene, PE) พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) พอลิสไตลีน (Polystyrene, PS) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride, PVC) และอีทีเอส (Expandable polystyrene, EPS)

2.2.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Thermosetting plastic) เป็นพลาสติกที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและปฏิกิริยาทางเคมีได้ ผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากพลาสติกดังกล่าวส่วนใหญ่จะเป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร ที่เขี่ยบุหรี เป็นต้น เทอร์โมเซตติงพลาสติกที่



เป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ เมลามีน (Melamine) และโพลีเอสเตอร์ (Polyester) ที่ทอเป็นเสื้อผ้า ผ้าใบ โฟเบอร์กลาสที่ทำเป็นหลังคาถระบะ พอลิยูรีเทน (Polyurethane) ที่ใช้ทำเป็นพื้นรองเท้า ซึ่งจะคงรูปหลังการผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะแข็งมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัว และเปลี่ยนรูปร่างไม่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงจะปริแตกและไหม้เป็นซีดำสีดำ พลาสติกประเภทนี้โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำกลับมาหลอมเหลวเพื่อขึ้นรูปใหม่ได้

### 2.3 ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะพลาสติก

ผลิตภัณฑ์พลาสติกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทำให้เกิดปัญหาขยะพลาสติกล้นเกินเนื่องจากพลาสติกมีราคาถูก และในการใช้สอยบางอย่างพลาสติกถูกใช้งานเพียงครั้งเดียว เช่น ถุงอาหาร ขวดน้ำ เป็นต้น หรือใช้เพียงไม่นานก็ถูกนำมาทิ้งขยะ ถึงแม้ว่าพลาสติกส่วนหนึ่งถูกนำกลับมาใช้อีกในลักษณะต่างๆกัน แต่ส่วนใหญ่ถูกนำไปกำจัดทิ้งโดยวิธีการต่างๆ การนำขยะพลาสติกไปกำจัดทิ้งโดยการฝังกลบ อาจเป็นวิธีที่สะดวกแต่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว ทั้งนี้เพราะพลาสติกจะย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติ จึงทับถมอยู่ในดิน และนับวันยังมีปริมาณมากขึ้นตามปริมาณการใช้พลาสติก การเผาขยะพลาสติกก่อให้เกิดมลพิษและเป็นอันตรายอย่างมาก วิธีการแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่ก่อให้เกิดผลดีที่สุดคือ การนำพลาสติกกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ ซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้ (ไพศาล นาคพิพัฒน์, 2539)

2.3.1 การนำกลับมาใช้ซ้ำ (Reuse) ซึ่งผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาทำ ความสะอาดเพื่อใช้ซ้ำได้หลายครั้ง แต่ภาชนะเหล่านั้นจะเสื่อมคุณภาพลง และความสวยงามลดลงตามลำดับนอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความสะอาดและความปลอดภัยด้วย ซึ่งก่อให้เกิดข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์บางด้าน เช่น ถุงร้อนใส่อาหารไม่ควรนำกลับมาใช้ใส่อาหารร้อนจัดซ้ำแต่อาจนำไปทำความสะอาดเพื่อใช้ใส่ของใช้ต่างๆได้อีกหลายครั้ง หรือใช้ในการเกษตร เช่น ถุงเพาะชำต้นไม้ เป็นต้น

2.3.2 การหลอมขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ใหม่หรือการรีไซเคิล โดยวิธีนำไปหลอมและขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ และเป็นวิธีที่นิยมกันมาก แต่เมื่อเทียบกับปริมาณของขยะพลาสติกทั้งหมดก็ยัง

เป็นเพียงส่วนน้อย การนำพลาสติกใช้แล้วมาหลอมขึ้นรูปใหม่เช่นนี้ สามารถทำได้จำกัดเพียงไม่กี่ครั้ง รวมถึงต้องมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการคัดแยกชนิดพลาสติก นอกจากนี้การรีไซเคิลจะได้พลาสติกที่มีคุณภาพลดลงตามลำดับและต้องผสมกับพลาสติกใหม่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมทุกครั้ง อีกทั้งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่จะต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพลาสติกใหม่ทั้งหมด และบางครั้งไม่สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบเดิม เพราะเกรดพลาสติกต่ำลงไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคทำให้ต้นทุนการผลิตอาจสูงขึ้นแต่ราคาจำหน่ายกลับต้องถูกกว่าพลาสติกใหม่ การรีไซเคิลจึงยังเป็นเพียงส่วนน้อยในปัจจุบันจนกว่าต้นทุนการผลิตจะลดลงหรือได้รับการส่งเสริมมากขึ้น

2.3.3 การเปลี่ยนขยะพลาสติกเป็นผลิตภัณฑ์ของเหลวและก๊าซ เป็นวิธีการที่ทำให้ได้สารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นขยะเหลวและก๊าซ หรือเป็นสารผสมไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ซึ่งอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง หรือกลั่นแยกเป็นสารบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติกเรซินได้ เช่นเดียวกันกับวัตถุดิบที่ได้จากปิโตรเลียม กระบวนการนี้จะได้พลาสติกเรซินที่มีคุณภาพสูง เช่นเดียวกัน วิธีการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้แล้วให้เป็นของเหลวนี้เรียกว่า ลิควิแฟกชัน (Liquefaction) ซึ่งเป็นวิธีไพโรไลซิสโดยใช้ความร้อนสูงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนหรือก๊าซเฉื่อยชนิดอื่น นอกจากของเหลวแล้วยังมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเป็นกากคาร์บอนซึ่งเป็นของแข็ง สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ สำหรับก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไพโรไลซิส คือ ก๊าซไฮโดรคาร์บอน สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เช่นกัน นอกจากนี้ ยังมีก๊าซอื่นๆ เกิดขึ้นด้วย เช่น ก๊าซไฮโดรเจน คอลไรด์ ซึ่งใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภทได้

2.3.4 การใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง พลาสติกประเภทเทอร์โมพลาสติกส่วนมากมีสมบัติเป็นสารที่ติดไฟและลุกไหม้ได้ดี จึงใช้เป็นเชื้อเพลิงได้โดยตรง แต่การใช้เป็นเชื้อเพลิงนี้อาจก่อให้เกิดข้อเสียหลายอย่าง เช่น เกิดก๊าซที่เป็นพิษ หรือ มีกลิ่นฉุนในขณะที่เผาไหม้

2.3.5 การใช้เป็นวัสดุประกอบ อาจนำพลาสติกใช้แล้วผสมกับวัสดุอย่างอื่น เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์วัสดุประกอบที่ใช้เป็นประโยชน์ได้ เช่น ไม้เทียม หินอ่อนเทียม แต่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้อาจมีคุณภาพไม่สูงนัก



การแก้ไขปัญหามลพิษพลาสติกดังกล่าว เป็นการแก้ปัญหาได้ส่วนหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากปริมาณขยะพลาสติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว รวมถึงปัญหาจากการแยกชนิดของพลาสติกทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีการวิจัยและพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ แต่ยังคงรักษาคุณสมบัติของพลาสติกที่ต้องการไว้ ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ โดยกระบวนการทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ เป็นต้น

## 2.4 การสลายตัวของพลาสติก มี 4 วิธีทาง คือ

2.4.1 พลาสติกที่มีการย่อยสลายตัวโดยแสง (photodegradable plastics) พลาสติกชนิดนี้มีกลุ่มคาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบที่มีความไวต่อแสง เมื่อสัมผัสกับแสงจะเกิดการแตกตัวของกลุ่มคาร์บอนิล ซึ่งจะทำให้พลาสติกกรอบและแตกเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ย่อยสลายได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของพลาสติก ปัจจุบันพลาสติกที่สามารถทำลายโดยวิธีนี้ได้แก่ PE PP PS และ PVC เป็นต้น ซึ่งได้ผสมสารโฟโตแอคติเวเตอร์ (photoactivator) ที่ช่วยกระตุ้นการย่อยสลายตัวโดยแสงลงไป (Harper และ Kellar, 1972)

2.4.2 พลาสติกที่ย่อยสลายได้บางส่วน คือ พลาสติกที่เติมสารพอลิเมอร์ธรรมชาติซึ่งย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ได้แก่ เซลลูโลส ลิกนิน แล็กโตส แป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด และสารเติมแต่งอื่นๆ ลงในพลาสติก เช่น PE PP และ PS เป็นต้น ดังนั้นจุลินทรีย์ในดินซึ่งอยู่ในที่ที่มีความชื้น หรือ น้ำ ย่อยสลายอนุภาคสารดังกล่าว ทำให้พลาสติกสามารถย่อยสลายได้บางส่วน แต่ยังคงเหลือชิ้นส่วนของพลาสติกที่จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายได้ (ส่วนที่ไม่ใช่สารพอลิเมอร์ธรรมชาติ) (Gu, 2003)

2.4.3 พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยใช้ 2 ปฏิกิริยา คือ พลาสติกที่มีการย่อยสลาย 2 ขั้นตอนโดยผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสก่อน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ แล้วจึงเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ ตัวอย่างของพลาสติกที่ย่อยสลายด้วยวิธีนี้ได้แก่ PBS (Amer และคณะ, 2008)

2.4.4 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) เป็นพลาสติกที่เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ จากการทำงานของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่มีเอนไซม์ใน

การย่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดอินทรีย์สายสั้น ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Brandl และคณะ, 1990)

## 2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก สามารถถูกสร้างและสะสมภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อสะสมไว้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางอย่าง เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือออกซิเจน แต่ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บสะสมไว้ในรูปของแกรนูล ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Anderson และ Dawes, 1990) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้มีหลายชนิด เช่น *R. eutropha* *Rhodococcus ruber* และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น ในสภาพธรรมชาติพบว่าจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ได้ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Verlinden และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lauric acid, oleic acid	mcl- PHAs	(Lee และคณะ, 2000; Han และคณะ, 2004)
<i>Alcaligenes latus</i>	Malt, soy waste, milk waste, vinegar waste, sesame oil	PHB	(Wong และคณะ, 2004, 2005)
<i>Bacillus cereus</i>	Glucose, e-caprolactone, sugarbeet molasses	PHB, terpolymer	(Labuzek และ Radecka, 2001; Yilmaz และ Beyatli, 2005; Valappil และคณะ, 2007)



ตารางที่ 2.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้ (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus</i> spp.	Nutrient broth, glucose, alkanooates, e-caprolactone, soy molasses	PHB, PHBV, copolymers	(Katircioglu และคณะ, 2003; Shamala และคณะ, 2003; Tajima และคณะ, 2003; Yilmaz และคณะ, 2005; Full และคณะ, 2006)
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	Adonitol, arabinose, arabitol, cellobiose, fructose, fucose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose, xylitol	PHB, PHBV	(Bramer และคณะ, 2001)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Palm olein, palm stearin, crude palm oil, xylose, palm kernel oil, oleic acid, evulinic acid	PHB, PHBV	(Keenan และคณะ, 2004; Nakas และคณะ, 2004; Alias และ Tan, 2005; Celik และคณะ, 2005)
<i>Caulobacter crescentus</i>	Caulobacter medium, glucose	PHB	(Qi และ Rehm, 2001)
<i>E. coli</i> mutants	Glucose, glycerol, palm oil, ethanol, sucrose, molasses	(UHMW)PHB	(Mahishi และคณะ, 2003; Kahar และคณะ, 2005; Park และคณะ, 2005a; Nikel และคณะ, 2006; Sujatha และ Shenbagarathai, 2006)

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้ (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Halomonas boliviensis</i>	Starch hydrolysate, maltose, maltotetraose and maltohexaose	PHB	(Quillaguaman และคณะ, 2005, 2006)
<i>Legionella pneumophila</i>	Nutrient broth	PHB	(James และคณะ, 1999)
<i>Methylocystis</i> sp.	Methane	PHB	(Wendlandt และคณะ, 2005)
<i>Microlunatus phosphovor</i>	Glucose, acetate	PHB	(Akar และคณะ, 2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose, technical oleic acid, waste free fatty acids, waste free frying oil	mcl-PHAs	(Hoffmann และ Rehm, 2004; Fernandez และคณะ, 2005)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Octanoic acid	mcl-PHAs	(Durner และคณะ, 2000; Foster และคณะ, 2005)
<i>Pseudomonas putida</i>	Glucose, octanoic acid, undecenoic acid	mcl-PHAs	(Tobin และ O'Connor, 2005; Hartmann และคณะ, 2006)
<i>P. putida</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. jessenii</i>	Glucose, aromatic monomers	aromatic polymers	(Tobin และ O'Connor, 2005; Ward และ O'Connor, 2005; Ward และคณะ, 2005)
<i>P. stutzeri</i>	Glucose, soybean oil, alcohols, alkanoates	mcl-PHAs	(Xu และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้ (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhizobium melilot</i> , <i>R. viciae</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Glucose, sucrose, galactose, mannitol, trehalose, xylose, raffinose, maltose, dextrose, lactose, pyruvate, sugar beet molasses, whey	PHB	(Mercan และ Beyatli, 2005)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Acetate, malate, fumarate, succinate, propionate, malonate, gluconate, butyrate, glycerol, citrate	PHB, PHBV	(Mukhopadhyay และคณะ, 2005)
<i>Spirulina platensis</i> (cyanobacterium)	Carbon dioxide	PHB	(Jau และคณะ, 2005)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Malt, soy waste, milk waste, vinegar waste, sesame oil	PHB	(Wong และคณะ, 2004, 2005)



ตารางที่ 2.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติได้ (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์	เอกสารอ้างอิง
<i>R. eutropha</i> ( <i>Cupriavidus necator</i> )	Glucose, sucrose, fructose, valerate, octanoate, lactic acid, soybean oil	PHB, copolymers	(Kim และคณะ, 1995; Kichise และคณะ, 1999; Taguchi และคณะ, 2003; Kahar และคณะ, 2004; Khanna และ Srivastava, 2005; Volova และ Kalacheva, 2005; Volova และคณะ, 2005)
<i>R. eutropha</i> H16 ( <i>Cupriavidus necator</i> H16)	Hydrogen, carbon dioxide	PHB	(Pohlmann และคณะ, 2006)

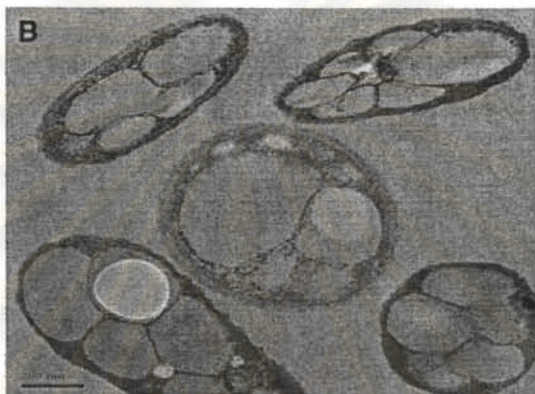
ที่มา: Verlinden และคณะ (2007)

### 2.5.1 การสะสม PHA ในจุลินทรีย์

Ballard และคณะ (1987) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสม PHA จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8-12 แกรนูล และทำให้เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมครอน รูปร่างของเซลล์เมื่อสะสม PHA จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้างกลม และพบว่าการสะสม PHA จะหยุดเมื่อมีปริมาณ PHA ประมาณ 80% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA แต่เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเก็บ PHA ได้มากกว่านี้ภายใต้ปริมาณผนังเซลล์ที่จำกัด ภายในแกรนูลจะประกอบด้วย PHA ประมาณ 98 % โดยน้ำหนัก โปรตีน 2 % โดยน้ำหนัก ที่เหลือเป็นไขมันจำพวกกรดฟอสฟาติก (phosphatidic) และสารประกอบที่ละลายในอะซิโตน ปริมาณเล็กน้อย



Chanprateep และคณะ (2008) ศึกษาลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 และรายงานว่าจุลินทรีย์นี้สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PHA ได้หลายชนิด และเก็บสะสมไว้ในรูปของแกรนูลที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.1



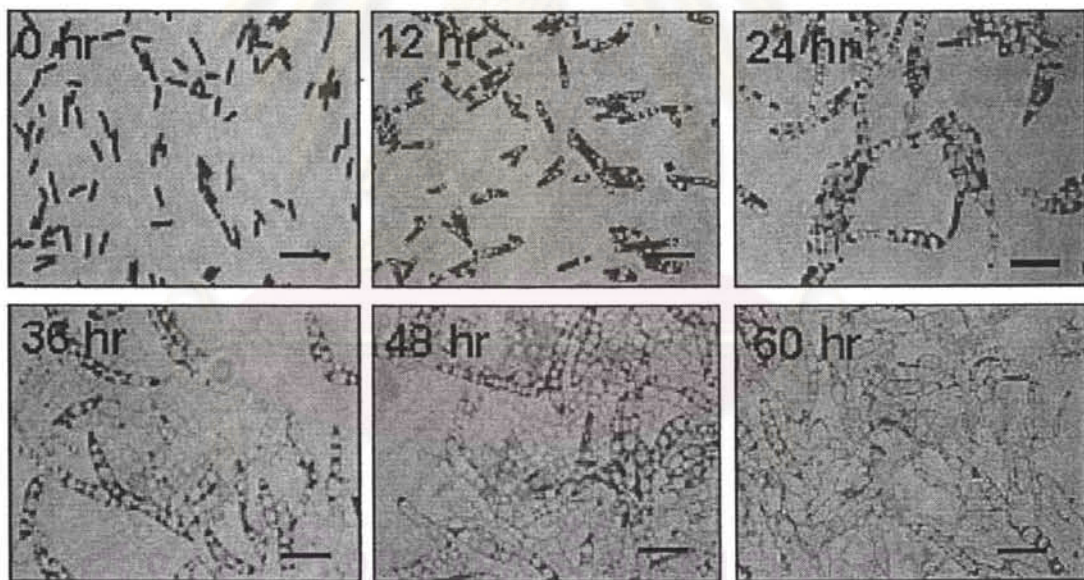
รูปที่ 2.1 ภาพตัดขวางของเซลล์ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดง PHB ภายในแกรนูลของเซลล์ หมายเหตุ เส้นที่ขีดแสดงขนาด 200 นาโนเมตร (Chanprateep และคณะ, 2008)

#### 2.5.2 การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA ในธรรมชาติ

จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ในแกรนูล ซึ่งแกรนูลเป็นสารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง ดังนั้นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นจะใช้เทคนิคการย้อมสีของสารประเภทไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น การย้อมเซลล์ด้วยสีซูดาน แบลค บี (Zudan black B) (Schlegel และคณะ, 1970) สีไนล์ บลู เอ (Nile blue A) (Ostle และ Holt, 1982) หรือ สีไนล์ เรด (Nile red) (Spiekermann และคณะ, 1999) ซึ่งแกรนูลจะติดสีและเรืองแสงเมื่อส่องภายใต้กล้องสเปกโตรสโคปีที่มีแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence spectroscopy) เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA โดยการย้อมด้วยสีเหล่านี้ ไม่จำเพาะกับแกรนูลของ PHA อย่างเดียวเท่านั้น แต่สามารถย้อมแกรนูลไขมันอื่นๆได้ ดังนั้นการรายงานการตรวจพบ PHA

ที่แม่นยำและถูกต้อง จึงต้องใช้วิธีทางเคมีหรือการตรวจสอบอื่นๆสนับสนุนด้วย (Sheu และคณะ, 2000)

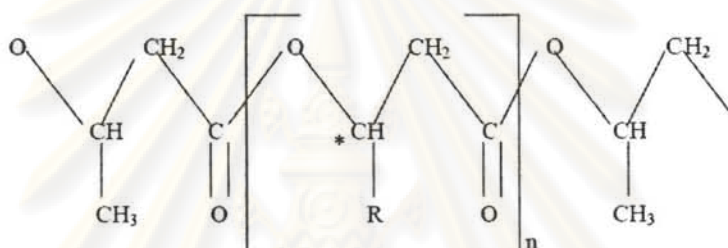
มีรายงานการศึกษาการย้อมเซลล์ด้วยสีคริสตัล ไวโอเลต (crystal violet) สามารถเห็นแกรนูล PHA ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จากงานวิจัยของ Jung และคณะ (2005) สามารถย้อมเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* ด้วยสีคริสตัล ไวโอเลต ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Leica DMLB microscope และถ่ายรูปโดยกล้อง Leica DC 300F ซึ่งมีการประมวลภาพโดยใช้โปรแกรม DC Twain เวอร์ชัน 5.1.9 พบว่า รูปร่างและลักษณะของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งบริเวณที่มีแกรนูล PHB ไม่สามารถติดสีคริสตัล ไวโอเลต จึงมีลักษณะเป็นช่องว่างอยู่ภายในเซลล์ และมีสีขาว โดยที่ขนาดของแกรนูลจะใหญ่ขึ้นเมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เป็นเวลานานขึ้น แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพการเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ที่ย้อมด้วยสีคริสตัล ไวโอเลตของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Leica DMLB microscope ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า โดยเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง หมายถึง เส้นที่ขีด แสดงขนาด 5 ไมโครเมตร

### 2.5.3 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyesters) ประกอบด้วยคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่ 2.3 โมโนเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไป ตรงตำแหน่งปีศาจคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration (Madison และ Huisman, 1999)



\*C แสดงตำแหน่งปีศาจคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	หรือ P(3HP)
	R = เมทิล (CH <sub>3</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(3HB)
	R = เอทิล (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	หรือ P(3HHx)
	R = บิวทิล (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	หรือ P(3HO)
	R = เฮกซิล (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	หรือ P(3HN)
	R = เฮปทิล (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต)	หรือ P(3HD)
	R = ออกทิล (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีอันเดคะโนเอต)	หรือ P(3HUD)
	R = โนทิล (C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(5HV)

รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

(Khanna และ Srivastava, 2005)



## 2.5.4 การจำแนกชนิดของ PHA

2.5.4.1 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (สุชาติ จันทรประทีป, 2539)

2.5.4.1.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และ พอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.5.4.1.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น สำหรับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกัน เรียกว่า เทอริพอลิเมอร์ (terpolymer) ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)] เป็นต้น

2.5.4.2 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยโมโนเมอร์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Li และคณะ, 2007)

2.5.4.2.1 PHAs สายสั้น (short chain length, SCL) หรือ scl-PHAs เป็น PHA ที่มีคาร์บอน 3-5 อะตอม

2.5.4.2.2 PHAs สายกลาง (medium chain length, MCL) หรือ mcl-PHAs เป็น PHA ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม

2.5.4.2.3 PHAs สายยาว (long chain length, LCL) หรือ lcl-PHAs เป็น PHA ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 14 อะตอมขึ้นไป

### 2.5.5 วิถีชีวสังเคราะห์ PHA

Chen (2010) ได้รวบรวมวิถีที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ และรายงานว่าอะเซทิลโคเอ (Acetyl-CoA) เป็นสารตั้งต้นหลักในหลายวิถีชีวสังเคราะห์ PHA และมีเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องโดยตรงและโดยอ้อมในกระบวนการผลิต PHA แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 วิถีชีวสังเคราะห์ PHA และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

ลำดับที่	วิถีชีวสังเคราะห์	อักษรย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์จุลินทรีย์	อ้างอิง
1	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 1	PhaA	$\beta$ -Ketothiolase	<i>R. eutropha</i>	(Sudesh และคณะ, 2000)
2		PhaB	NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase		
3	กลไกที่เกี่ยวข้อง	PhaC	PHA synthase		(Sudesh และคณะ, 2000)
4		PhaZ	PHA depolymerase	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	
5			Dimer hydrolase	<i>P. stutzeri</i> 1317	
6			( <i>R</i> )-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	<i>R. eutropha</i>	
7	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 2		Acetoacetyl-CoA synthetase	<i>P. oleovorans</i>	(Sudesh และคณะ, 2000; Mittendorf และคณะ, 1998)
8		FabG	3-Ketoacyl-CoA reductase	<i>P. putida</i> KT2442,	
9			Epimerase	<i>A. hydrophila</i> 4AK4,	

ตารางที่ 2.2 วิถีชีวสังเคราะห์ PHA และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (ต่อ)

ลำดับที่	วิถีชีวสังเคราะห์	อักษรย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์จุลินทรีย์	อ้างอิง
10	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 2	PhaJ	(R)-Enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I	<i>P. aeruginosa</i>	
11			Acyl-CoA oxidase, putative		
12			Enoyl-CoA hydratase I, putative		
13	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 3	PhaG	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferase	<i>P. mendocina</i> , recombinant <i>E. coli</i>	(Sudesh และคณะ, 2000; Zheng และคณะ, 2005; Taguchi และคณะ, 1999)
		FabD	transacylase		
14	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 4		NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	<i>Rhizobium (Cicer) sp. CC 1192</i>	(Chohan และ Copeland, 1998)
15		SucD	Succinic semialdehyde dehydrogenase		
16	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 5	4hbD	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase		(Valentin และ Dennis, 1997)
17		OrfZ	4-Hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase		
18	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 6		Lactonase, putative	Mutants and recombinant of <i>R. eutropha</i>	(Valentin และ Steinbüchel, 1995)
19			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		
20	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 7		Alcohol dehydrogenase, putative	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	(Xie และ Chen, 2008)



ตารางที่ 2.2 วิถีชีวสังเคราะห์ PHA และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (ต่อ)

ลำดับที่	วิถีชีวสังเคราะห์	อักษรย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์จุลินทรีย์	อ้างอิง
21	วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 8		Cyclohexanol dehydrogenase	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19, <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	(Brzostowicz และ คณะ, 2002)
22			Cyclohexanone monooxygenases		
23			Caprolactone hydrolase		
24		ChnA	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase		
25		ChnB	6-Oxohexanoate dehydrogenase		
26		ChnC	Semialdehyde dehydrogenase, putative		
27		ChnD	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase,		
		ChnE	putative		
28			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		

ที่มา: Chen (2010)

วิถีชีวสังเคราะห์ PHA มีทั้งหมด 8 วิถี ดังนี้ (แสดงดังรูปที่ 2.4 และตารางที่ 2.2)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 1 มีเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้ทั้งหมด 3 เอนไซม์ ได้แก่ เบต้าคีโตไทโอเลส ( $\beta$ -ketothiolase) เอ็นเอคิพีเอซ ดีเพนเดนท์ อะซิโตอะเซทิลโคเอ รีดักเทส (NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase) และพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase) ซึ่งประมวลรหัสจากยีน *phaA phaB* และ *phaC* ตามลำดับ สามารถพบวิถีชีวสังเคราะห์ PHA นี้ใน *R. eutropha* สำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องรวมถึงการย่อยสลาย PHA โดยเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ดีพอลิเมอร์เลส (PHA depolymerase) ไดเมอร์ ไฮโดรเลส (dimer hydrolase) 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) และอะซิโตอะเซทิลโคเอซินเทส (acetoacetyl-CoA synthase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะช่วยควบคุมการสังเคราะห์และย่อยสลายของ PHA และกลไกที่เกี่ยวข้องสามารถพบได้ใน *A. hydrophila P. stutzeri R. eutropha* และ *P. oleovorans* (Sudesh และคณะ, 2000)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 2 มีความสัมพันธ์กับกรดไขมันที่จุลินทรีย์นำมาใช้ หลังจากกรดไขมันเกิดปฏิกิริยาเบต้าออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) แล้ว จะได้เอซิลโคเอ (acyl-CoA) เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ PHA ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้ ได้แก่ 3-คีโตเอซิลโคเอ รีดักเทส (3-ketoacyl-CoA reductase) อีพิเมอร์เลส (epimerase) อีโนซิลโคเอไฮดราเทส/อีโนซิลโคเอไฮดราเทสวัน ((*R*)-enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I) เอซิลโคเอออกซิเดส (acyl-CoA oxidase) (putative) และอีโนซิลโคเอไฮดราเทสวัน (enoyl-CoA hydratase I) (putative) และพบว่ามีความสัมพันธ์ในการเตรียมสารตั้งต้น 3-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ (3-hydroxyacyl-CoA) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ PHA สามารถพบวิถีนี้ใน *P. putida P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้วิถีนี้ในการสังเคราะห์เป็น PHA สายสั้น หรือโคพอลิเมอร์ พอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โค 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนเอต (poly(*R*)-3-hydroxybutyrate-co-(*R*)-3-hydroxyhexanoate) (Sudesh และคณะ, 2000; Mittendorf และคณะ, 1998)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 3 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้ ได้แก่ 3-ไฮดรอกซีเอซิล เอซีที โคเอ ทรานเฟอร์ส (3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferase) และ มาโลนิลโคเอ เอซีที ทรานเอซิลเลส (malonyl-CoA-ACP transacylase) ซึ่งประมวลรหัสจากยีน *phaG* และ *fabD* ตามลำดับ โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้จะเปลี่ยน 3-ไฮดรอกซีเอซิล เอซีที (3-hydroxyacyl-ACP) ให้อยู่ในรูปของสารตั้งต้น 3-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยอาศัยเอนไซม์พอลิ

ไฮดรอกซีแอลคานอยล์ซินเทส (Sudesh และคณะ, 2000; Zheng และคณะ, 2005; Taguchi และคณะ, 1999)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 4 อาศัยเอนไซม์ เอ็นเอดีพีเอซ ดีเพนเดนท์ อะซิโตอะเซทิลโครีดักเทส ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เพื่อให้อยู่ในรูป 3-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอ (3-hydroxybutyryl-CoA) และเมื่อเกิดภาวะที่มีการเปลี่ยน NADPH เป็น NADP<sup>+</sup> ในอัตราส่วนเพิ่มขึ้น จะช่วยในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของอะซิโตอะเซทิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ในกระบวนการสังเคราะห์ PHB (Chohan และ Copeland, 1998)

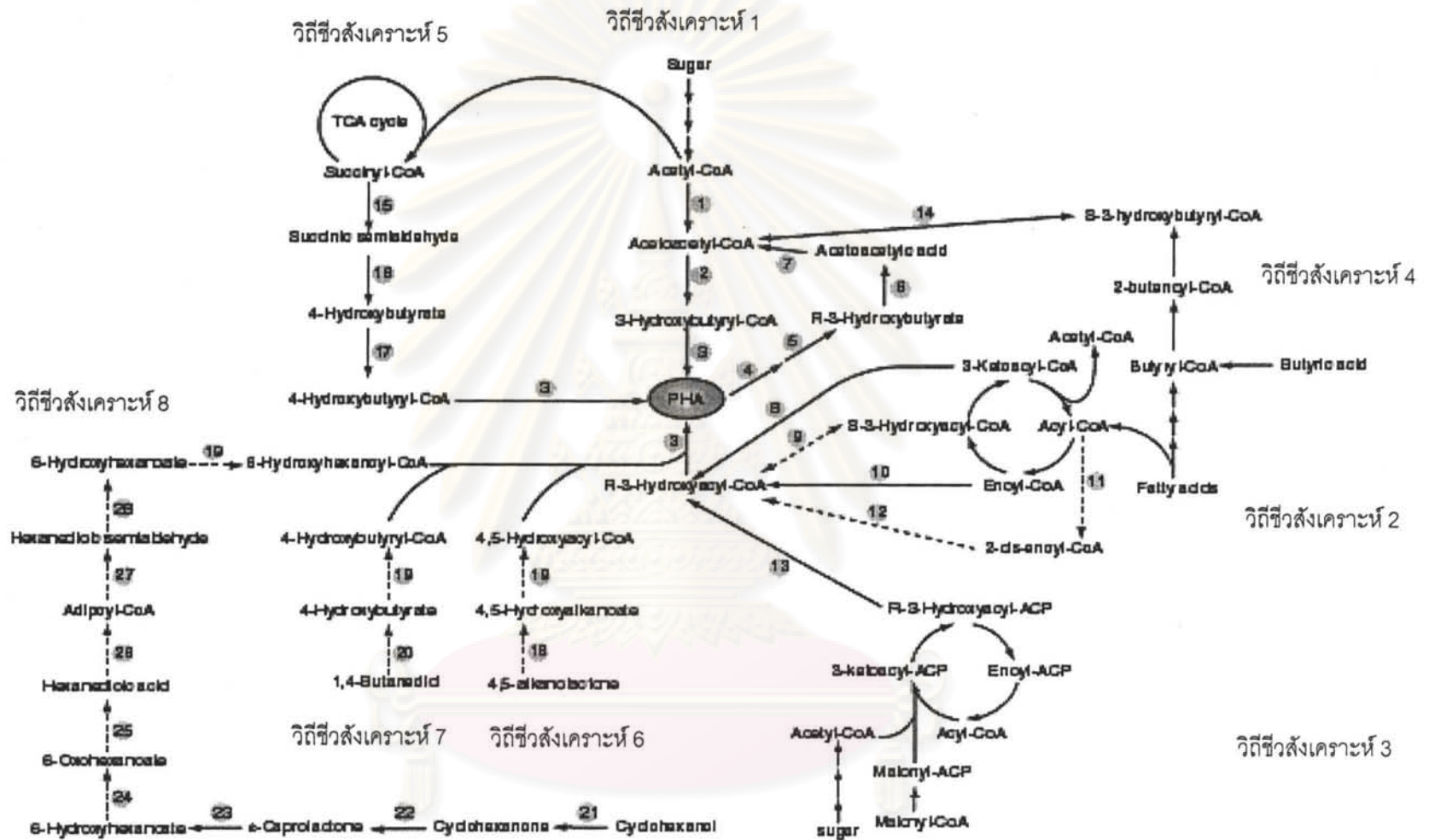
วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 5 อาศัยเอนไซม์ ซัคซินิคเซมิแอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (succinic semialdehyde dehydrogenase) 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ดีไฮโดรจีเนส (4-hydroxybutyrate dehydrogenase) และ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโคเอ:โคเอ ทรานเฟอร์เรส (4-hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase) ซึ่งประมวลผลจากยีน *SucD* *4hbD* และ *OrfZ* ตามลำดับเพื่อสังเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอ (4-hydroxybutyryl-CoA) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ในกระบวนการสังเคราะห์เป็น 4HB ต่อไป สามารถพบวิถีนี้ใน *C. kluyveri* (Valentin และ Dennis, 1997)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 6 อาศัยเอนไซม์แลคโตเนส (lactonase) และไฮดรอกซีเอซิลโคเอ ซินเทส (hydroxyacyl-CoA synthase) โดยเปลี่ยนโครงสร้างย้อนกลับ 4,5-แอลคานอยล์แลคโตน (4,5-alkanolactone) ให้อยู่ในรูปของ 4,5-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ (4,5-hydroxyacyl-CoA) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ PHA (Valentin และ Steinbüchel, 1995)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 7 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้ ได้แก่ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) (putative) เปลี่ยน 1,4-บิวเทนไดออล (1,4-butanediol) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ให้อยู่ในรูปของ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4-hydroxybutyrate) และ 4-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอ ตามลำดับ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ 4HB และสามารถพบวิถีนี้ใน *A. hydrophila* 4AK4 (Xie และ Chen, 2008)

วิถีชีวสังเคราะห์ที่ 8 เปลี่ยนโครงสร้างย้อนกลับ 6-ไฮดรอกซีเฮกซานอยล์ (6-hydroxyhexanoate) ให้อยู่ในรูป 6-ไฮดรอกซีเฮกซานอยล์โคเอ (6-hydroxyhexanoyl-CoA) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ 6HHx โดยอาศัยเอนไซม์ 8 ชนิด (Brzostowicz และคณะ, 2002) (แสดงในตารางที่ 2.2)



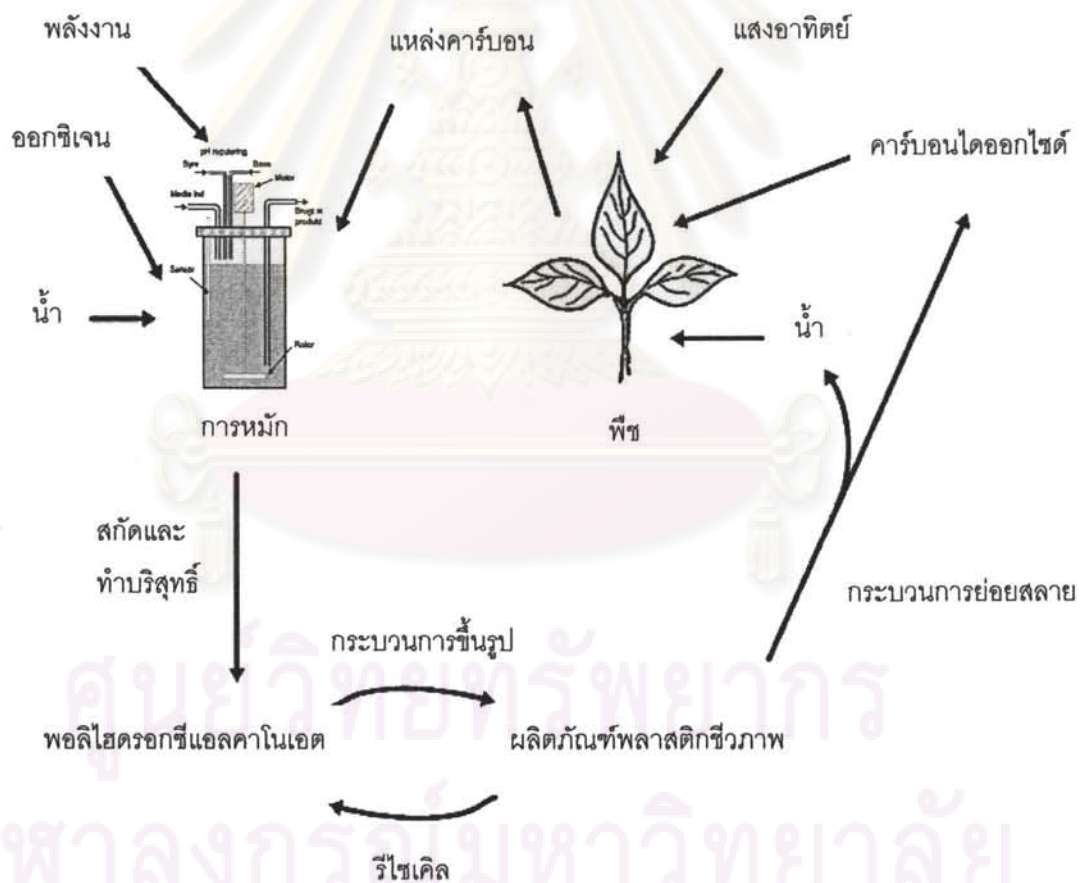


รูปที่ 2.4 วิถีชีวสังเคราะห์ PHA หมายถึง ตัวเลข แสดงรายละเอียดของเอนไซม์ หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 2.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.5.6 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA เริ่มจากการผลิต PHA จากวัตถุดิบทางการเกษตรโดยกระบวนการหมัก จุลินทรีย์จะสร้างและสะสมแกรนูลของ PHA จากนั้นสกัด PHA ออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆ หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHA ถูกกำจัดเช่นเดียวกับขยะประเภทของแข็งทั่วไป เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งอินทรีย์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อรักษาสารอาหารในดิน (Lee, 1996b) เมื่อย่อยสลายสมบูรณ์จะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และนำกลับมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต PHA ต่อไป (แสดงดังรูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA และพลาสติกชีวภาพในธรรมชาติ (ดัดแปลงจาก Verlinden และคณะ, 2007)

### 2.5.7 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ PHB

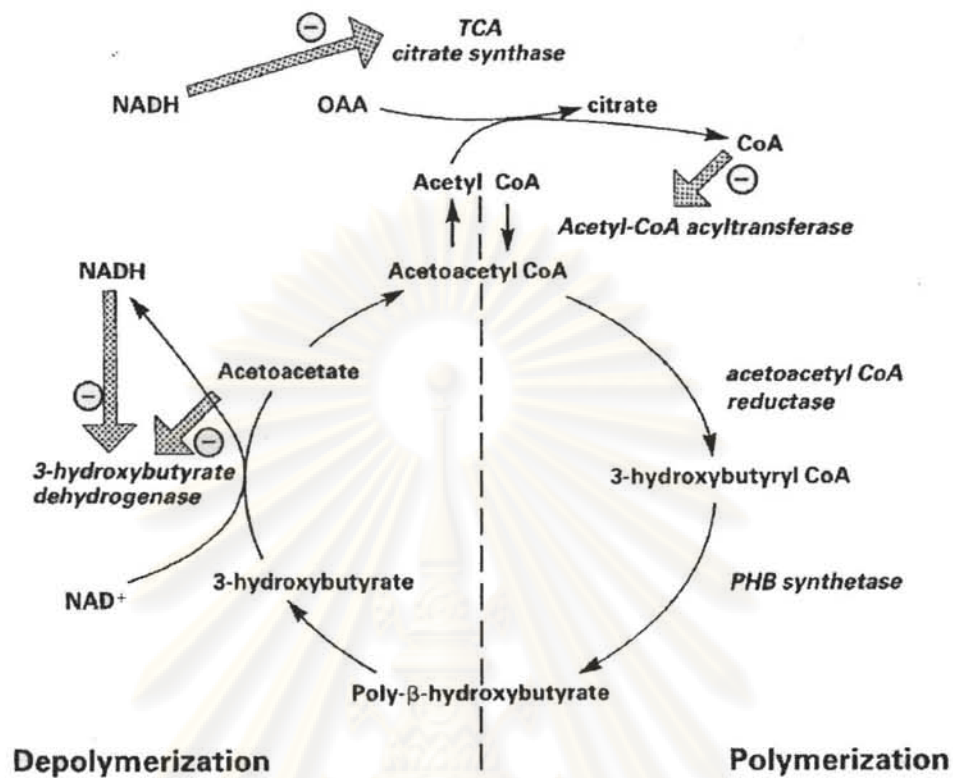
PHB เป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม PHA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารประเภทคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ PHB ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลสูง  $10^5 - 10^6$  และมีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline) มีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) และมีโครงสร้างภายในเป็น fibril ที่ยึดหยุ่นได้ PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกรด 3-ไฮดรอกซีบิวทิริก จำนวน 23,000 - 25,000 โมเลกุล มีจุดหลอมเหลวประมาณ  $180^{\circ}\text{C}$  น้ำหนักโมเลกุลของ PHB จะแตกต่างกัน ตามชนิดของจุลินทรีย์ วิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ปริมาณสารที่จำเป็น เป็นต้น (Anderson และคณะ, 1990)

### 2.5.8 วิธีชีวสังเคราะห์ PHB

วิธีชีวสังเคราะห์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ PHB นั้นมีเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในวิธีนี้ทั้งหมด 3 เอนไซม์ และปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกลไกการทำงานดังนี้ เริ่มจากอะเซทิลโคเอ 2 โมเลกุลควบแน่นไปเป็นอะซีโตอะเซทิลโคเอ โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส จากนั้นถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทิрилโคเอ โดยเอนไซม์ เอ็นเอดีพีเอซ ดีเพนเดนท์ อะซีโตอะเซทิลโคเอ รีดักเทส ซึ่ง 3-ไฮดรอกซีบิวทิрилโคเอเป็นโมโนเมอร์ในปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน และเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส จะพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerize) ให้อยู่ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ PHB (Verlinden และคณะ, 2007) แสดงดังรูปที่ 2.6

สำหรับวิธีการย่อยสลาย PHB (PHB depolymerization) จะอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ดีไฮโดรจีเนส ทำให้ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เปลี่ยนโครงสร้างย้อนกลับไปเป็นอะซีโตอะเซทิลโคเอเพื่อเข้าสู่วัฏจักรคาร์บอกซิลิกแอซิด Tricarboxylic acid (TCA) cycle ต่อไป (Byrom, 1987) แสดงดังรูปที่ 2.6





รูปที่ 2.6 วิถีชีวสังเคราะห์ การย่อยสลาย PHB และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Byrom, 1987)

### 2.5.9 ยีนและเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ PHB

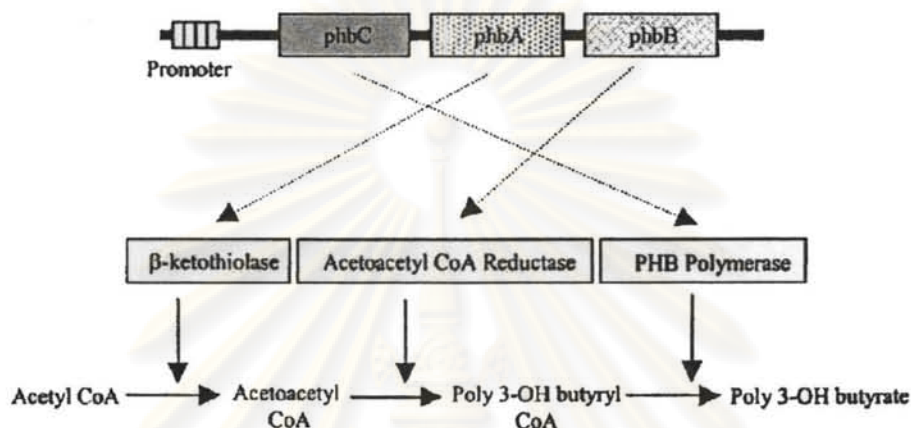
วิถีชีวสังเคราะห์ PHB ถูกควบคุมโดยยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ 3 ชนิด ได้แก่

2.5.9.1 ยีน *phaA* ทำหน้าที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกสำหรับปฏิกิริยาการควบแน่น

2.5.9.2 ยีน *phaB* ทำหน้าที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์เอ็นเอคิพีเอช ดีเพนเดนท์ อะซิโตอะเซทิลโคเอ รีดักเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำหรับปฏิกิริยารีดักชัน

2.5.9.3 ยีน *phaC* ทำหน้าที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

โครงสร้างของกรอบการอ่าน *phaCAB* ที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB ประกอบด้วย โพรโมเตอร์ (promoter) และยีนที่ควบคุมในวิถีชีวสังเคราะห์ ได้แก่ *phaC* *phaA* และ *phaB* ตามลำดับ (Reddy และคณะ, 2003) แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของกรอบการอ่าน *phaCAB* ที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB (Reddy และคณะ, 2003)

PHB เป็นพอลิเมอร์ที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง และสามารถนำไปใช้ในงานได้หลายประเภท เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น PP แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีบางประการที่ดีกว่า (แสดงดังตารางที่ 2.3) เช่นความทนทานต่อแสง UV ความหนาแน่น จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก เป็นต้น แต่มีความทนต่อตัวทำละลายน้อยกว่าและเปราะกว่า (Evans และ Sikdar, 1990)

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB

สมบัติ	PP	PHB
จุดหลอมเหลว (°ซ)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก (%)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm <sup>3</sup> )	0.95-0.94	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล (x10 <sup>5</sup> )	2.2-7	1-8

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB (ต่อ)

สมบัติ	PP	PHB
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12 1.7	2.2-3 3.5-4
ความแข็ง (flexural modulus) (GPa)	39	40
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (MPa)	400	6-8
ความสามารถในการขยายตัว (extension to break) (%)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (Oxygen permeability) ( $\text{cm}^{-1}\text{m}^{-2}\text{atm}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	1700	45

ที่มา : Evans และ Sikdar (1990)

## 2.6 การผลิต PHA เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

ในปี ค.ศ. 1982 บริษัทอิมพีเรียล เคมีเคิล อินดัสตรี (Imperial Chemical Industries, ICI) ได้พัฒนาการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งผลิต PHB จาก *R. eutropha* H16 โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Biopol® (Reddy และคณะ, 2003) ต่อมาได้มีการพัฒนาการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยบริษัทระดับโลกที่มีชื่อเสียงในการพัฒนาและผลิต PHA แสดงดังตารางที่ 2.4 (Chen, 2009)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างของบริษัทระดับโลกที่มีชื่อเสียงในการพัฒนาและผลิต PHA

บริษัท	ชนิดของ PHA	ระดับการผลิต (ตันต่อปี)	ช่วงระยะเวลา	ลักษณะผลิตภัณฑ์
Chemie Linz, Austria	PHB	20-100	1980s	บรรจุภัณฑ์ และ แคมปูสสำหรับบรรจุยา
BTF, Austria	PHB	20-100	1990s	บรรจุภัณฑ์ และ แคมปูสสำหรับบรรจุยา
Biomers, Germany	PHB	-	1990s ถึงปัจจุบัน	บรรจุภัณฑ์ และ แคมปูสสำหรับบรรจุยา
Metabolix, USA	PHA หลายชนิด	-	1980 ถึงปัจจุบัน	บรรจุภัณฑ์
Tepha, USA	PHA หลายชนิด	-	1990 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัสดุสิ้นเปลืองใน งานศัลยกรรม
ADM, USA (ร่วมกับ บริษัท Metabolix)	PHA หลายชนิด	50,000	2005 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัตถุดิบ
Meredian, USA	PHA หลายชนิด	10,000	2007 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัตถุดิบ
Mitsubishi, Japan	PHB	10	1990s	บรรจุภัณฑ์
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัตถุดิบ
Zhejiang Tian An, China	PHBV	2,000	1990 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัตถุดิบ
Bio-On, Italy	PHA (ไมแนซ์)	10,000	2008 ถึงปัจจุบัน	ใช้เป็นวัตถุดิบ

ที่มา: Chen (2009)

ในปี 2006 ราคา PHB อยู่ในช่วง 10-12 ยูโรต่อกิโลกรัม ซึ่งมีราคาสูงกว่าพอลิเมอร์ที่ทำจากแป้ง และพอลิเมอร์ที่ทำจากวัสดุธรรมชาติอื่นๆ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูง เช่น ราคาวัตถุดิบที่สูงขึ้น (Kosior และคณะ, 2006) การที่จะนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางหรือไม่ขึ้นอยู่กับต้นทุนการผลิต โดยต้นทุนของการผลิต PHB ในปัจจุบัน (2010) มีราคาถูกลงเนื่องจากมีเทคโนโลยีที่มีการพัฒนามากขึ้น และมีหลายบริษัทที่สามารถผลิต PHA ชนิดต่างๆ ได้ เช่น บริษัท Telles เป็นบริษัทร่วมทุนระหว่าง Metabolix และ Archer Daniels Midland Company (ADM) สามารถผลิต PHB โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Mirel™ โดยมีอัตราการผลิต 50,000 ตันต่อปี และมีราคาขายในปัจจุบัน 1.50 ยูโรต่อกิโลกรัม บริษัท P&G สามารถผลิต PHBH โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nodax™ โดยมีอัตราการผลิต 20,000-50,000 ตันต่อปี และมีราคาขายในปัจจุบัน 2.50 ยูโรต่อกิโลกรัม เป็นต้น และมีแนวโน้มที่จะขยายระดับการผลิตในอนาคตต่อไป (Kosior และคณะ, 2006; Plastics news, 2010)

#### 2.6.1 การประยุกต์ใช้ทางการเกษตรและปศุสัตว์

ผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุน้ำยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง หรือผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุน้ำยาโรคของสัตว์ และบรรจุน้ำยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน (Reddy และคณะ, 2003)

#### 2.6.2 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

ใช้เป็นวัสดุเส้นเปลี่ยนในงานศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็มเย็บผ้า ผ้าซับเลือด เป็นต้น (Chen และ Wu, 2005) ใช้ผลิตเป็นแคปซูลบรรจุน้ำยาเพื่อให้ตัวยาถูกปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ทีละน้อย (Gould และคณะ, 1987)

#### 2.6.3 การประยุกต์ใช้ในด้านบรรจุภัณฑ์หรือวัสดุใช้สอย

ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร และวัสดุอื่นๆ เช่น วัสดุเส้นใย สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม เป็นต้น (Clarival และ Halleux, 2005)



ปัญหาของการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ต่างๆ ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง และเมื่อนำไปเลี้ยงในถังหมักจะใช้เวลานานในกระบวนการผลิต ขั้นตอนการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ทำได้ยาก (Lee และคณะ, 1999) ซึ่งมีงานวิจัยต่างๆ พยายามที่จะพัฒนาให้จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมโดยมีต้นทุนที่ลดลง เช่น

Lee และ Choi (1998) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes latus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้วิธีการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ ด้วยสารลดแรงตึงผิวไฮโปคลอไรท์ (surfactant-hypochlorite) โดยการย่อยผนังเซลล์ และสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ PHA พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในระดับถังหมัก ปริมาณของ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 98.7 กรัมต่อลิตร และ 88.3% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB 4.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ถึงแม้ว่าจะผลิตได้ในปริมาณมากแต่เมื่อพิจารณาต้นทุนในการผลิตยังคงสูงอยู่ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA มากขึ้น และสามารถสกัด PHA ออกจากเซลล์ได้ง่าย โดยโคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ลงในจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่มีอัตราการเจริญสูงกว่า และสามารถสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ได้ง่าย ตัวอย่างเช่น

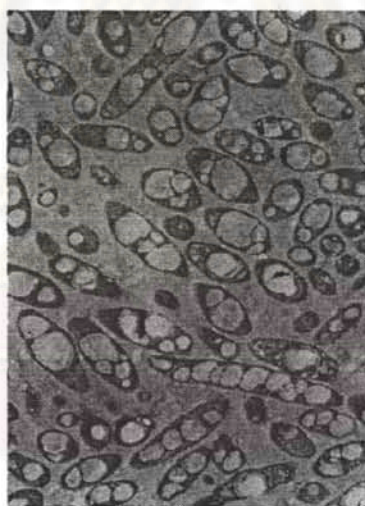
Choi และคณะ (1998) ศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้สามารถผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมได้ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต โดยโคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *Alcaligenes latus* ลงใน *E. coli* เลี้ยงในถังหมักที่มีระบบการเลี้ยงแบบเฟดแบช pH สแตต (pH-stat fed-batch) พบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* นี้ สามารถผลิต PHB โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 194.1 และ 141.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB 4.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแนวทางในการพัฒนาเพื่อผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณมากขึ้น และยังสามารถลดต้นทุนในส่วนของ การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ตัวอย่างเช่น

Ahn และคณะ (2000) ได้โคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *A. latus* ลงใน *E. coli* สายพันธุ์ CGSC 4401 เมื่อเลี้ยงในถังหมักโดยใช้หางนม (whey) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นของเสียหลักที่ได้จากอุตสาหกรรมการทำชีส หรือเคซีนจากนม ซึ่งหางนมมีน้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนประกอบ 280 กรัมต่อลิตร พบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* นี้ สามารถผลิต PHB ได้ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ 119.5 และ 96.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 37.5 ชั่วโมง และมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB 2.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การใช้ของ



เสียจากอุตสาหกรรมนมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เป็นการลดต้นทุนการผลิตอย่างหนึ่งในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีการพัฒนาต่อไปเรื่อยๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีศักยภาพเพียงพอในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Lee (1996b) ได้โคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* ลงใน *E. coli* พบว่าเมื่อมีการแสดงออกของยีนดังกล่าว สามารถสังเคราะห์และผลิต PHB ได้ ประมาณ 80-90% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (แสดงดังรูปที่ 2.8) ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ 80 กรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในถังหมักที่มีระบบการเลี้ยงแบบเฟดแบช pH สเตต นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนเพื่อผลิต PHB ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น ความเสถียรของพลาสมิดที่ใช้ การเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม และสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ที่ได้จากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด



รูปที่ 2.8 ภาพตัดขวางของเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีการสะสม PHB อยู่ภายในแกรนูลโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Lee, 1996b)

ดังนั้นจึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการทำวิจัยนี้ โดยโคลนและแสดงออกยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย (Chanprateep และ Kulpreecha, 2006; Chanprateep และคณะ, 2008) ใน

*E. coli* จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการผลิต PHB โดยการแปรผันสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB

ปัจจุบันมีการพัฒนาขั้นตอนและวิธีที่มีความรวดเร็วและสะดวกมากขึ้น ในการค้นหาชิ้นที่ต้องการเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว โดยพัฒนาเป็นชุดสำเร็จ เช่น บริษัท Clontech laboratories พัฒนาชุด GenomeWalker™ Universal Kit เพื่อค้นหาชิ้นที่ต้องการโดยใช้วิธี DNA walking เป็นต้น ดังตัวอย่างงานวิจัย เช่น

Natsch และคณะ (2002) โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *agaA* ประมวลรหัสเอนไซม์อะมิโนเอซิลเลส (aminoacylase) จาก *Corynebacterium striatum* สายพันธุ์ Ax20 โดยใช้ชุด GenomeWalker™ Universal kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)

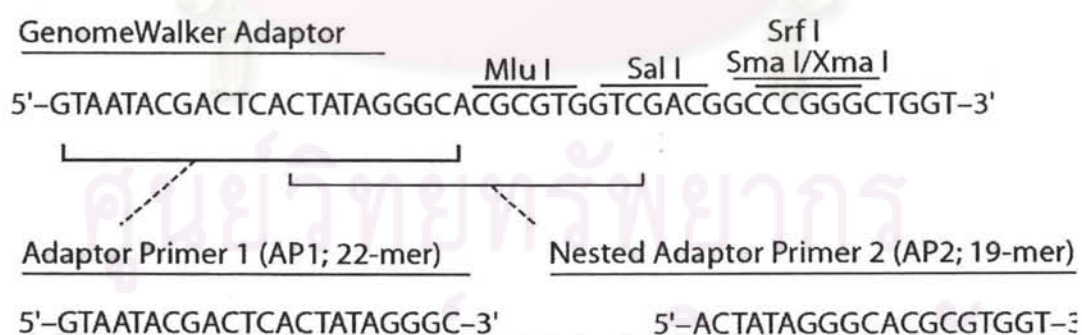
Yang และคณะ (2002) โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไซโตโคไนิน ออกซิเดส ดีเอสซีเคเอกซ์วัน (cytokinin oxidase *DSCKX1*) จาก *Dendrobium Sonia* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง *Dendrobium Caesar* กับ *Dendrobium Tomie Drake* โดยใช้ชุด GenomeWalker™ Universal kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)

Dombrink-Kurtzman (2008) ใช้ชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ออกซิเดส (isoamyl alcohol oxidase) ในบริเวณด้าน 3' ของยีน *idh*

**2.7 หลักการในการค้นหาชิ้นที่ต้องการโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับการใช้ชุดสำเร็จ GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) มีดังต่อไปนี้**

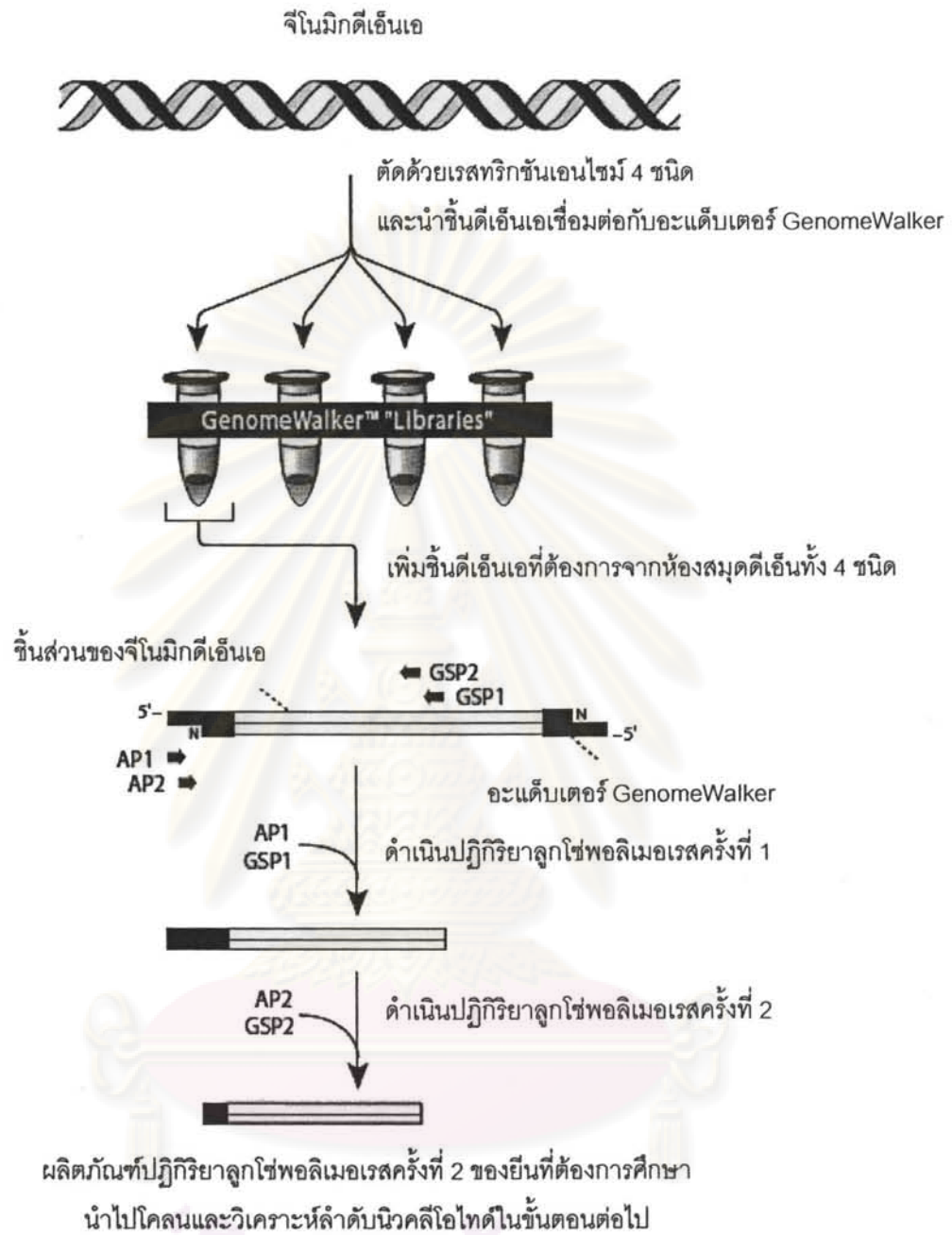
เป้าหมายของการใช้ชุด GenomeWalker™ Universal Kit คือ เพื่อค้นหาชิ้นที่ต้องการและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วของยีนที่ต้องการศึกษาโดยวิธี DNA walking (Siebert และคณะ, 1995) และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีนที่ต้องการศึกษาบริเวณที่ทราบแล้วนี้ ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา โดยออกแบบไพรเมอร์ที่อยู่ด้านนอก (outer gene-specific primer1 (GSP1)) และ ไพรเมอร์ที่อยู่ด้านใน (nested gene-specific primer2 (GSP2)) ซึ่งจะนำมาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก (outer adaptor primer1 (AP1)) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านใน (nested adaptor primer2 (AP2)) จากชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีขั้นตอนในการทำแสดงในรูปที่ 2.10 เริ่มจากการทำห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA libraries) โดยนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI* *EcoRV* *PvuII* และ *StuI* ซึ่งจะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเรียบ (blunt end) นำชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์ GenomeWalker โดยโครงสร้างของอะแดปเตอร์แสดงในรูปที่ 2.9 จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้านนอก (GSP1) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก (AP1) หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 แล้ว นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้านใน (GSP2) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านใน (AP2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AP1 และ AP2 แสดงในรูปที่ 2.9 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 แล้ว สามารถนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ของยีนที่ต้องการศึกษานี้ ไปใช้เพื่อการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของอะแดปเตอร์ GenomeWalker และลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก (AP1) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านใน (AP2) และแสดงตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ (Clontech laboratories Inc., USA)





รูปที่ 2.10 ขั้นตอนในการค้นหายีนที่ต้องการศึกษาด้วยชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) หมายถึง AP1 และ AP2 คือ ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก และไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านใน ตามลำดับ GSP1 และ GSP2 คือ ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้านนอก และไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้านใน ตามลำดับ (Clontech laboratories Inc., USA)

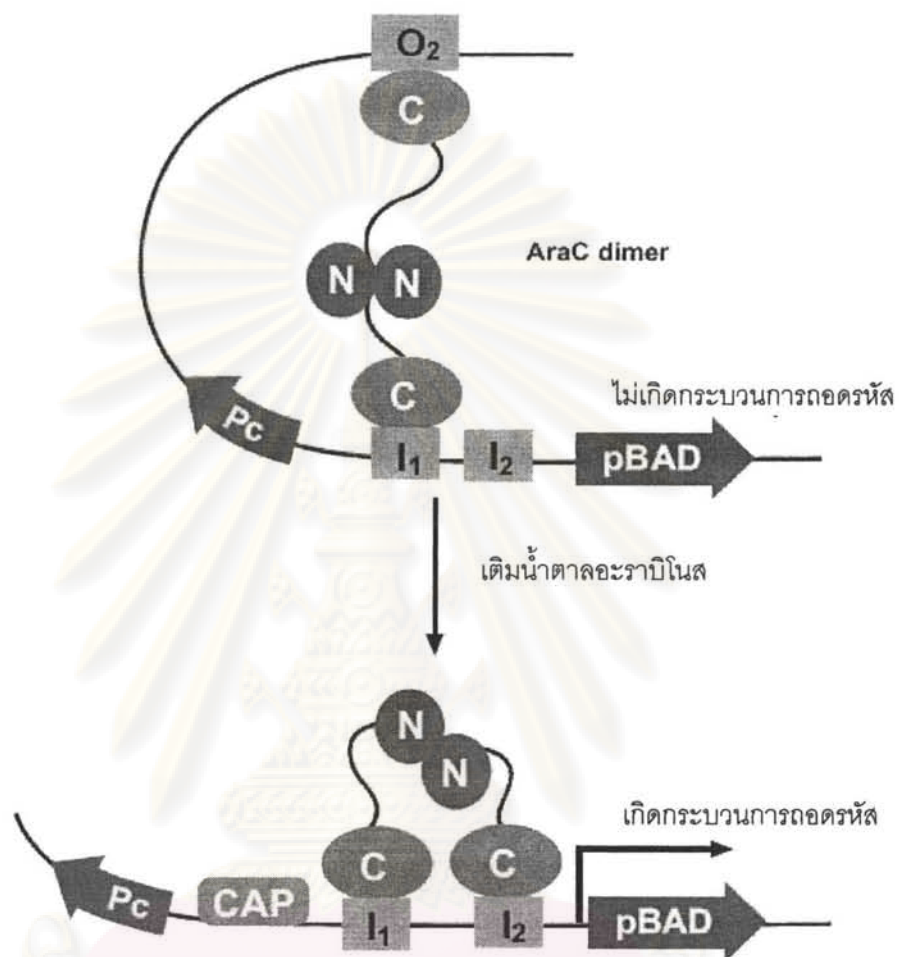
## 2.8 กลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> vector system

เวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> เป็นเวกเตอร์ชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจเพื่อการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ เนื่องจากเวกเตอร์ชนิดนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น มีระดับการแสดงออกของยีนในปริมาณสูง มีการตอบสนองที่รวดเร็ว สามารถควบคุมขั้นตอนการ แสดงออกได้อย่างมั่นคง และใช้กับเซลล์เจ้าบ้านได้หลายสายพันธุ์ (Guzman และคณะ, 1995; Newman และ Fuqua, 1999) ดังตัวอย่างงานวิจัย เช่น

Leow และคณะ (2004) โคลนและแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อ อุณหภูมิสูง (thermostable lipase) จาก *Geobacillus* sp. สายพันธุ์ T1 ลงใน *E. coli* Top10 โดยใช้เวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> TA (Invitrogen, Gronin-gen, Netherlands) พบว่า สามารถแสดงออกยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจาก *Geobacillus* sp. สาย พันธุ์ T1 ในปริมาณสูงได้สำเร็จ

Narayanan และคณะ (2006) โคลนและแสดงออกของยีน *pac* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ เพนนิซิลลิน อะซิลเลส (penicillin acylase (PAC)) ใน *E. coli* โดยการแสดงออกเกินของยีน *pac* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *araBAD* พบว่า เมื่อมีการเติมน้ำตาลอะราบิโนสจะมี การแสดงออกของยีนที่รวดเร็วและมีปริมาณสูง ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับปริมาณ ของน้ำตาลอะราบิโนส

เนื่องจากน้ำตาลอะราบิโนสเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดง ออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลจึงมีอิทธิพลต่อการแสดง ออกของยีน ซึ่งมีกลไกในการทำงานดังนี้ บริเวณโปรโมเตอร์ *araBAD* ถูกควบคุมโดยผลิตภัณฑ์ ของยีน *araC* (Ogden และคณะ, 1980; Schleif, 1992) AraC เป็นตัวควบคุมกระบวนการ ถอดรหัส โดยจับกับน้ำตาลอะราบิโนสดังนั้นในกรณีที่ไม่มีน้ำตาลอะราบิโนส AraC dimer จะจับบริเวณ O<sub>2</sub> และ I<sub>1</sub> ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอบริเวณกรอบการอ่าน *araBAD* เกิดลูป (loop) จึงไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส เมื่อมีการเติมน้ำตาลอะราบิโนสในอาหาร น้ำตาลจะไปจับบริเวณ AraC dimer จึงเกิดการคลายลูป โดย AraC dimer จะเปลี่ยนไปจับบริเวณ I<sub>2</sub> แทน ทำให้ กระบวนการถอดรหัสเกิดขึ้น แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion™ โดยน้ำตาลอะราบิโนส (Invitrogen, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
4. ตู้เชื้อเชื้อ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
5. เครื่องชั่ง รุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
9. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
10. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920, รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, Germany

12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
13. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab<sup>th</sup> Thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
14. เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS ของบริษัท DMS, Japan
15. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA
16. เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200 ของบริษัท Packard, USA
17. เครื่องผลิตก๊าซออกซิเจน (air compressor) รุ่น WL 505000AJ ของบริษัท Campbell Hausfeld, USA
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14, รุ่น W760 ของบริษัท Memmert, Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 ของบริษัท Eyela, Japan ซึ่งต่อเข้ากับ (เครื่อง ligation 16°C)
  - เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 ของบริษัท Eyela, Japan
  - เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S ของบริษัท Eyela, Japan
20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C ของบริษัท Forma Scientific, USA
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
23. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad, USA
  - Electrophoresis complete system ของบริษัท Bio-Rad, USA
24. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
  - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
25. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
26. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P2, P20, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
27. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan

28. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman International Ltd., England
29. กระดาษกรองขังน้ำหนักเซลล์ (filter paper) ของบริษัท Gibthai, Thailand
30. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Bioadvance, Thailand

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดเบนโซอิก ( $C_7H_6O_2$ ) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
3. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial  $CH_3COOH$ ) ของบริษัท Merck, Germany
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
5. ก्लीเซอรอล ของบริษัท Merck, Germany
6. คาบินนิซิลลิน (carbinicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
7. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France
8. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France
9. คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) ของบริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
10. ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> Expression Kit ของบริษัท Invitrogen, USA
11. ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ pCR4-TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing ของบริษัท Invitrogen, USA
12. ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems ของบริษัท Promega, USA
13. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล ชุดสกัด Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit ของบริษัท Promega, USA
14. ชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit ของบริษัท Roche Applied Science, Germany
15. ชุด GenomeWalker<sup>™</sup> Universal Kit ของบริษัท Clontech laboratories Inc., USA
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
18. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
19. ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
20. เพปโตเน (peptone) ของบริษัท Merck, Germany



21. 2-โพรพานอล (2-propanol) ของบริษัท Merck, Germany
22. โฟสเฟอรัสไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
23. โฟสเฟอรัสอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
24. พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ของบริษัท Sigma, USA
25. มังกะนีคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France
26. เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
27. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
28. รูบิเดียมคลอไรด์ ( $\text{RbCl}$ ) ของบริษัท Sigma, USA
29. สารละลายฟีนอลอิมิตัว (equilibrated phenol, ultrapure) ของบริษัท USB, USA
30. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
31. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
32. สีย้อมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Germany
33. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท ABgene, UK
34. อะราบินโนส (arabinose) ของบริษัท Sigma, USA
35. อะซีโตน (Acetone) บริษัท Merck, Germany
36. เอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
37. เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ของบริษัท Fermentas, USA
38. เอนไซม์ T4-ดีเอ็นเอไลเกส (T4- DNA ligase) ของบริษัท BioLabs, USA
39. lysozyme ของบริษัท Sigma, USA
40. proteinase K ของบริษัท Fermentas, USA
41. แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
42. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
43. เฮกเซน (Hexane) ของบริษัท Merck, Germany
44. CTAB ของบริษัท Sigma, USA
45. dNTP ของบริษัท Fermentas, USA
46. DreamTaq™ DNA Polymerase ของบริษัท Fermentas, USA
47. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Sigma, USA
48. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ของบริษัท Fermentas, USA

49. IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA
50. Long PCR enzyme mix ของบริษัท Fermentas, USA
51. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
52. TaKaRa Ex Taq™ ของบริษัท Takara Biotechnology (Dalian) CO.,LTD.
53. Taq DNA polymerase ของบริษัท BioLabs, USA
54. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ( $C_4H_{11}NO_3$ ) ของบริษัท Sigma USA
55. X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Fermentas, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย คือ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกโดย อรุณ ชาญชัยเชาววิวัฒน์ (2536) มีความสามารถในการสร้างและสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) (ชัญญ ผลประไพ, 2537; อัญชญา ศุภติขจร, 2537; สุชาติ จันทร์ประทีป, 2539) จุลินทรีย์ *E. coli* สายพันธุ์ Top10 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออกของยีนชีวสังเคราะห์ PHA และจุลินทรีย์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109

### 3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
pBAD/TOPO® ThioFusion™	$Ap^r$ , $P_{BAD}$	บริษัท Invitrogen, USA
pCR4-TOPO TA Cloning®	$Ap^r$ , $Km^r$ , $P_{lac}$	บริษัท Invitrogen, USA
pGEM®-T Easy Vector	$Ap^r$ , $lacZ$ , $P_{T7}$	บริษัท Promega, USA

ตารางที่ 3.1 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

พลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
pBAD-phaC <sub>A04</sub>	Ap <sup>r</sup> , P <sub>BAD</sub> , พลาสมิด pBAD/TOPO <sup>®</sup> ThioFusion™ ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสสอดแทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pBAD-phaCAB <sub>A04</sub>	Ap <sup>r</sup> , P <sub>BAD</sub> , พลาสมิด pBAD/TOPO <sup>®</sup> ThioFusion™ ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T <sub>m</sub> )	เอกสารอ้างอิง
T7 promoter	5'-ATTATGCTGAGTG ATATCCC-3' (56.3 <sup>o</sup> ซ)	Promega, USA
SP6 Promoter	5'-TAAGATATCACAGTGGATTTA-3' (55.1 <sup>o</sup> ซ)	Promega, USA
F0	5'-TACATCCTGGACCTGCAGCC-3' (58.0 <sup>o</sup> ซ)	Chanprateep, 2009
R4	5'-CGTAGTTCCACACCAGGTCG-3' (57.2 <sup>o</sup> ซ)	Chanprateep, 2009
Outer adaptor primer 1 (AP1)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (57.9 <sup>o</sup> ซ)	Clontech laboratories Inc., USA
Nested adaptor primer 2 (AP2)	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' (58.8 <sup>o</sup> ซ)	Clontech laboratories Inc., USA



ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( $T_m$ )	เอกสารอ้างอิง
F3	5'-TCACGCTGCTGACCACGCTGCTGGAC TTTG-3' (60.7°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
F4	5'-TTGAGCTGGCCAATACCTTCTCGTTCT TGC-3' (59.2°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
R1	5'-CACGTTGATCTTGTCCCTGGCCGCTGAT GTC-3' (61.3°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
R2	5'-AAACACCGTATGTCCCTGCTCCACCAC ATG-3' (60.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
F_phaCAB	5'-CACGTTGATCTTGTCCCTGGCCGCTGAT GTC-3' (61.3°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
R_phaCAB	5'-AAACACCGTATGTCCCTGCTCCACCAC ATG-3' (60.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Trx Forward	5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3' (50.3°ซ)	Invitrogen, USA
pBAD Reverse	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3' (52.7°ซ)	Invitrogen, USA

### 3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

#### 3.5.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เก็บจุลินทรีย์โดยใช้ลูปป้ายเชื้อลาก (streak) บนอาหารแข็งเลี้ยง LB (ภาคผนวก ก 4) ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ภาคผนวก ข1) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ ทุก 1 เดือน

### 3.5.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก3) ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1) นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ในกลีเซอรอล 10% นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 8-10 บรรจุลงในหลอดเก็บเยือกแข็ง (cyotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 1 ปี

### 3.6 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

#### 3.6.1 การเลี้ยง *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เพื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารแข็งเลี้ยงสูตรอุดม (rich medium agar slant) (ภาคผนวก ก6) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือก 1 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

#### 3.6.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

สกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้วิธีของ Sambrook และ Russell (2001) ดังนี้ ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมน้ำฟอสเฟต TE (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 517 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่า จากนั้นเติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข7) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% SDS (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม proteinase K ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°C

เป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนนี้จะเห็นว่ามีลักษณะใส และหนืด จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB ในโซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิวล์หลอดใหม่ และสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข17) ซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นนำส่วนใสที่อยู่ในหลอดไมโครพิวล์หลอดใหม่มาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และไอโซโพรพานอลที่เย็นปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสของโซเดียมอะซีเตทและไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยการปั่นล้างที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) โดยปริมาตรที่เพิ่มขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 0.01 เท่าของส่วนใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มใสในหลอดไมโครพิวล์หลอดใหม่ และสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์มซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนใสที่อยู่ในหลอดไมโครพิวล์หลอดใหม่มาตกตะกอนดีเอ็นเอ ซึ่งทำตามขั้นตอนที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.6.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) โดยดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ซึ่งค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

## 3.7 การหาชิ้นส่วนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase, *phaC*) จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

### 3.7.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โดยการออกแบบ degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโนที่อ้างอิงจากรฐานข้อมูล GenBank และใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสจากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้ 6 สายพันธุ์ในการออกแบบ คือ *Comamonas acidovorans* (หมายเลขเข้าถึง AB009273) *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ SH-69 (หมายเลขเข้าถึง U78047) *A. eutrophus* (หมายเลขเข้าถึง J05003) *Aeromonas caviae* (หมายเลขเข้าถึง D88825) *Rhodococcus ruber* (หมายเลขเข้าถึง X66407) และ *Chromatium vinosum* (หมายเลขเข้าถึง O1112) (Sudesh และคณะ, 1998) โดยออกแบบไพรเมอร์จากส่วนอนุรักษ์ (แสดงดังรูปที่ 3.1) และแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* จาก *R. eutropha* H16 (Peoples และ Sinskey, 1989) เป็นยีนต้นแบบ เนื่องจาก Chanprateep และคณะ (2008) รายงานว่า จากการจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ไฟโลจีนี พบว่า *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *R. eutropha* H16 มากที่สุด คือ 99.84% ดังนั้นจึง

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *phaC* จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ได้ทั้งหมด 2 เส้น คือ forward primer และ reverse primer ตั้งชื่อว่า F0 และ R4 ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.2

### 3.7.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำโครโมโซมดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่สกัดได้ในข้อ 3.6.2 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 3.7.1 ในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในการทำปฏิกริยามีดังต่อไปนี้

10X Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Taq DNA polymerase buffer)	5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ F0 (ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R4 (ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Taq DNA polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 หน่วย)	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.2 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 3 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

### 3.7.3 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เดิมบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไป ละลายเจลด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งผงเจลละลายหมด เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ของเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส เทบัฟเฟอร์ 1X TAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย จากนั้นโหลดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันลงไป โดยผสมกับ 10X loading buffer (ภาคผนวก ข20) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และใช้ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส (Bio-Rad, USA) ใช้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข21) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่น เพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก เป็นเวลา 5 นาที และนำไปถ่ายรูปด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad, USA)



### 3.7.4 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, USA) (ภาคผนวก ข22)

นำชิ้นอะกาโรสที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ เติม Membrane Binding Solution ลงไป ให้มีอัตราส่วนเป็น 10 ไมโครลิตร ต่อ 10 มิลลิกรัมของน้ำนักเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50-65°C เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 1-2 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมด เติม Membrane Binding Solution ลงไปอีก 1 เท่าตัว ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดใส่ใน SV Minicolumn ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Membrane Wash Solution ลงไป 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม Membrane Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ด้านบนใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติม Nuclease-Free Water 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย นำไปเก็บไว้ที่ -20°C

### 3.7.5 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pCR4 โดยใช้ชุดสำเร็จ pCR4-TOPO TA Cloning® (Invitrogen, USA) (ภาคผนวก ข23)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการสกัดออกจากอะกาโรสเจลจากข้อ 3.7.4 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR4 ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	2	ไมโครลิตร
Salt Solution	1	ไมโครลิตร
TOPO <sup>®</sup> vector	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	5	ไมโครลิตร

ผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22-23°C) เป็นเวลา 30 นาที

3.7.6 การทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ Top10 โดยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001)

3.7.6.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* Top10 (Sambrook และ Russell, 2001)

ใช้รูปเชื้อเชื้อลาก *E. coli* Top10 ลงบนอาหารแข็ง  $\Psi$ b (ภาคผนวก ก2) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว  $\Psi$ b (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ( $A_{550}$ ) เท่ากับ 0.3 ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว  $\Psi$ b ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ( $A_{550}$ ) เท่ากับ 0.48 นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ถ่ายใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centifuge tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย TfbI ที่เย็น (ภาคผนวก ข25) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กระจายเซลล์โดยใช้เครื่องผสมสาร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย TfbII ที่เย็น (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครพิพิจ์หลอดละ 50 ไมโครลิตร นำไปทำให้เยือกแข็งอย่างรวดเร็วโดยนำหลอดไปแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งนำออกมาใช้ทรานส์ฟอร์ม

### 3.7.6.2 การทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

นำสารละลายผสมจากข้อ 3.7.5 ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* Top10 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.6.1 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* Top10 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  มาทำให้ละลายอย่างช้าๆ ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่สารละลายผสมที่ได้จากข้อ 3.7.5 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* Top10 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเบาๆแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก4) ที่มีแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข1) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแบ่งปริมาตรที่จะนำไปเกลี่ยบนอาหารเป็น 3 ปริมาตรด้วยกัน คือ 100 200 และปริมาตรทั้งหมด ตามลำดับ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป กระจายเซลล์ให้ทั่วอาหารเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก4) ที่มีแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข1) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มียีน *phaC* สอดแทรกอยู่ต่อไป

3.7.7 การคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *phaC*

คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มียีน *phaC* โดยการคัดเลือกโคโลนีต่างๆ จากนั้นนำมาทำโคโลนีพีซีอาร์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเชื้อโคโลนีบนอาหารแข็งที่ได้จากข้อ 3.7.6.2 มาครึ่งโคโลนีใส่ในหลอดไมโครพิพจที่มีสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอร์ส และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 3.7.1 โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร ดังนี้



10X Ex Taq DNA polymerase buffer	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ F0 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์	0.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R4 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Ex Taq DNA polymerase (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ (โคลนีนี)		
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	25	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 98°C	เป็นเวลา 10 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 50°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

3.7.8 การสกัดพลาสมิดของโคลนีนีที่มียีน *phaC* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) (ภาคผนวก ข27)

นำโคลนีนีที่เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในข้อ 3.7.7 ซึ่งมีส่วนของยีน *phaC* แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* Top10 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB ซึ่งมีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว

200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ กระจายเซลล์ด้วย Suspension Buffer ที่มีส่วนผสมของ RNase ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเติม Lysis Buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 3-6 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Binding Buffer ที่เย็นลงไป 350 มิลลิลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา ประมาณ 3-6 ครั้ง แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จะสังเกตเห็นว่าสารแขวนลอยเริ่มหนืดและเกิด เป็นตะกอนขาว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ลงใน High Pure column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Buffer I ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Wash Buffer II ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง ก่อนที่จะปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโคร พิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุที่ปลอดเชื้อหรือ Elution Buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และสารละลายพลาสติกจะอยู่ในส่วนน้ำใส จากนั้นเก็บสารละลายพลาสติก ที่อุณหภูมิ -20°C นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* ด้วยเครื่อง ABI 3100 เวอร์ชัน 3.1

3.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวิตสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (*phaCAB*) จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ด้วยวิธี gene walk โดยใช้ชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) (ภาคผนวก ข31)

นำยีน *phaC* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จากข้อ 3.7.8 มาทำ gene walk ด้วย ชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) เพื่อวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวิตสังเคราะห์ PHA ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

### 3.8.1 การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์

นำดีเอ็นเอในข้อ 3.6.2 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* (Clontech laboratories Inc., USA) และ *SmaI* (Fermentas, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยแต่ละปฏิกิริยาใช้ส่วนผสมดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	12.5	ไมโครลิตร
10X เรสทริกชันเอนไซม์บัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
เรสทริกชันเอนไซม์ (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	4	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	28.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผสมเบาๆ ด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5-10 วินาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

### 3.8.2 การทำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดในข้อ 3.8.1 มาเติมสารละลาย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปผสมเบาๆ ด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิพซ์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปผสมเบาๆ ด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นคลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิพซ์หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส (9.5 ไมโครลิตร) เติมเอธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส (190 ไมโครลิตร) และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1



ไมโครลิตร นำไปผสมเบาๆ ด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 80% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.8.3 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับอะแดปเตอร์ (adaptor)

เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.2 เข้ากับอะแดปเตอร์ ด้วย T4 ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) (Clontech laboratories Inc., USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

นิวคลีโอไทด์ที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.2	2	ไมโครลิตร
อะแดปเตอร์ (25 ไมโครโมลาร์)	0.95	ไมโครลิตร
10X ไลเกสบัฟเฟอร์	0.8	ไมโครลิตร
T4 ดีเอ็นเอไลเกส (6 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	4	ไมโครลิตร

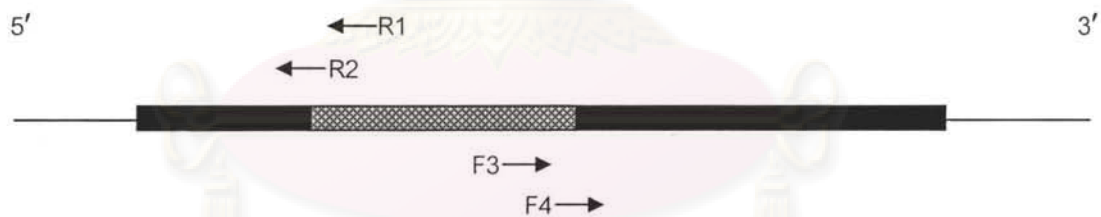
ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที เติมนิวคลีโอไทด์ TE (ภาคผนวก ข15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครลิตร

3.8.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จากจีโนมิกของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน


#### 3.8.4.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

นำยีน *phaC* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากข้อ 3.7.8 มาออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนดังกล่าวที่บริเวณปลาย 5' เพื่อใช้หา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ที่อยู่ถัดลงมา ซึ่งได้แก่ ยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส (*phaA*) และยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์อะซีโตอะเซทิลโคเออร์ดิคเทส (*phaB*) ตามลำดับ โดยออกแบบ forward primer 2 เส้น คือ forward primer ที่อยู่ด้านนอก (outer forward primer) และ forward primer ที่อยู่ด้านใน (nested forward primer) โดยตั้งชื่อว่า F3 และ F4 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนดังกล่าวที่บริเวณปลาย 3' เพื่อให้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* ที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยออกแบบ reverse primer 2 เส้น คือ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก (outer reverse primer) และ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (nested reverse primer) โดยตั้งชื่อว่า R1 และ R2 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านนอก (outer adaptor primer 1, AP1) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอะแดปเตอร์ด้านใน (nested adaptor primer 2, AP2) จากชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.2 ซึ่งทั้ง AP1 และ AP2 เป็นลำดับที่อยู่บนอะแดปเตอร์ที่ต่อเข้ากับซินดีเอ็นเอในข้อ 3.8.3



รูปที่ 3.1 แผนผังที่แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และบริเวณปลาย 3' ของยีน *phaC* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนแล้ว

หมายเหตุ บริเวณ  คือ ยีน *phaC* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนแล้ว สำหรับบริเวณ  คือ ยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA และสัญลักษณ์  $\rightarrow$  แสดงทิศทาง 5'  $\rightarrow$  3' ของไพรเมอร์

### 3.8.4.2 ปฏิกริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1

#### 3.8.4.2.1 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *phaC* ส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ R1 ขึ้นไป โดยใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก R1 ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในปฏิกริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยามีดังต่อไปนี้

10X Long PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Long PCR buffer)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R1 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ AP1 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide)	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Long PCR Enzyme Mix (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์แล้วจากข้อ 3.8.3	0.5	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร



โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 2.5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 20 วินาที	} 10 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 62°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 68°C	เป็นเวลา 7 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 20 วินาที	} 20 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 62°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 68°C	เป็นเวลา 10 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 68°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข19) และทำตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในข้อ 3.7.3

#### 3.8.4.2.2 โดยใช้ไพรเมอร์ F3 และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *phaC* ในส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ F3 ลงมา โดยจะมีส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA อื่นๆ ซึ่งได้แก่ ยีน *phaA* และยีน *phaB* ตามลำดับ โดยใช้ forward primer ที่อยู่ด้านนอก F3 ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยามีดังต่อไปนี้

10X Long PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Long PCR buffer)	5	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร

สารละลายไพรมอร์ F3 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรมอร์ AP1 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide)	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Long PCR Enzyme Mix (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์แล้วจากข้อ 3.8.3	0.5	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมและวิธีการดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.2.1 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

#### 3.8.4.2.3 ชุดควบคุมผลบวก (positive control)

โดยใช้ Human Positive Control Library จากชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) เป็นแม่แบบ และใช้ไพรมอร์ Positive Control tPA primer (PCP1) ที่จำเพาะกับยีน tPA บนโครโมโซมของมนุษย์ ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) จากชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8.4.2.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.8.4.2.4 ชุดควบคุมผลลบ (negative control)

โดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.8.4.2.1 และ 3.8.4.2.2 โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8.4.2.1 และ 3.8.4.2.2

#### 3.8.4.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2

##### 3.8.4.3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ R2 และ AP2

เจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในครั้งที่ 1 จากข้อ 3.8.4.2.1 ประมาณ 50 เท่า โดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 โดยใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (R2) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังต่อไปนี้

10X Long PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Long PCR buffer)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R2 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ AP2 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide)	0.5	ไมโครลิตร



เอนไซม์ Long PCR Enzyme Mix (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.8.4.2.1 ที่เจือจางแล้ว	0.5	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร

#### โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	2 นาที	} 10 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°ซ	เป็นเวลา	20 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 61°ซ	เป็นเวลา	30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 68°ซ	เป็นเวลา	4 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°ซ	เป็นเวลา	20 วินาที	} 20 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 61°ซ	เป็นเวลา	30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 68°ซ	เป็นเวลา	7 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 68°ซ	เป็นเวลา	10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข19) และทำตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในข้อ 3.7.3

#### 3.8.4.3.2 โดยใช้ไพรเมอร์ F4 และ AP2

เจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ครั้งที่ 1 ในข้อ 3.8.4.2.2 ประมาณ 50 เท่า โดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 2 ซึ่งใช้ forward primer ที่อยู่ด้านใน (F4) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสมีดังต่อไปนี้

10X Long PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Long PCR buffer)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ F4 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ AP2 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide)	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Long PCR Enzyme Mix (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.8.4.2.2 ที่เจือจางแล้ว	0.5	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมและวิธีการดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส มีขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.3.1 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

### 3.9 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 2

#### 3.9.1 การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสออกจากอะกาโรสเจล

สกัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 2 ออกจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, USA) (ภาคผนวก ข22) ตามวิธีที่ระบุข้อ 3.7.4

3.9.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega, USA) (ภาคผนวก ข24)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการสกัดออกจากอะกาโรสเจลจากข้อ 3.9.1 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

2X Rapid Ligation Buffer	2.5	ไมโครลิตร
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50 นาโนกรัม)	0.5	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	0.4	ไมโครลิตร
T4 ดีเอ็นเอไลเกส (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	0.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	5	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน

3.9.3 การทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109

ทรานส์ฟอร์มสารละลายผสมจากข้อ 3.9.2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* JM109 ที่เตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.7.6.1 และทรานส์ฟอร์มด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ซึ่งมีขั้นตอนในการทำดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.7.6.2

3.9.4 การคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

นำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* JM109 ที่ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วในข้อ 3.9.3 ปริมาตร 100 200 ไมโครลิตรและปริมาตรทั้งหมด ตามลำดับ มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข1) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ



ผ่านการกลีบบนผิวหน้าอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข29) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร (โดยเกลี่ยสารละลายทั้งสองนี้ก่อนใช้ ตั้งทิ้งไว้จนแห้งและหลีกเลี่ยงสภาวะที่มีแสง) หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนี *E. coli* JM109 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ซึ่งเป็นวิธีคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่ โดยมีหลักการดังนี้ เมื่อมีการสอดแทรกของชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (*lacZ*) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี X-gal เป็นส่วนประกอบ โคโลนีที่ไม่มีการสอดแทรกของชิ้นดีเอ็นเอสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อย X-gal ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของโคโลนีเป็นสีฟ้า และโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อย X-gal ได้ โคโลนีจึงมีสีขาว

### 3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.10.1 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) (ภาคผนวก ข27)

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวจากข้อ 3.9.4 มาสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต และมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.7.8

3.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3

### 3.10.3 การยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI

ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.10.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI (Fermentas, USA) อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

10X บัฟเฟอร์ EcoRI	2	ไมโครลิตร
พลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.10.1 (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ EcoRI (ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	16	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	20	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆโดยใช้เครื่องผสมสาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที และตรวจสอบรูปแบบพลาสมิดที่ตัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

### 3.10.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสซีวสังเคราะห์ PHA ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสซีวสังเคราะห์ PHA ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.10.1 ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท First Base Holdings (ประเทศสิงคโปร์) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสซีวสังเคราะห์ PHA ที่ได้นี้ โดยนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีการรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีวสังเคราะห์มาเชื่อมต่อกันด้วยโปรแกรม Bioedit

### 3.11 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

#### 3.11.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอ บริเวณโคดอนเริ่มต้น และสิ้นสุดของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA เพื่อให้ได้ยีนที่ครบสมบูรณ์ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่หาได้ในข้อ 3.10.4 ออกแบบ forward และ reverse primer ตั้งชื่อว่า F\_phaCAB และ R\_phaCAB ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.2

#### 3.11.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำโครโมโซมดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่สกัดได้ในข้อ 3.6.2 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 3.11.1 มาใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

10X Ex Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Ex Taq DNA polymerase buffer)	5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ F_phaCAB (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R_phaCAB (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Ex Taq DNA polymerase (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร



ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.2	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)		
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 98°C	เป็นเวลา 10 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 50°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

3.12 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> vector system

### 3.12.1 การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันออกจากอะกาโรสเจล

สกัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากข้อ 3.11.2 ออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัด Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, USA) (ภาคผนวก ข22) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต และมีขั้นตอนในการทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion™ โดยใช้ชุดสำเร็จ pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion™ Expression Kit (Invitrogen, USA) (ภาคผนวก ข32)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการสกัดออกจากอะกาโรส เจลจากข้อ 3.12.1 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion™ ตามวิธีที่ระบุ โดยบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	2	ไมโครลิตร
Salt Solution	1	ไมโครลิตร
TOPO <sup>®</sup> vector	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	6	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน

3.12.3 การทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ Top10

ทรานส์ฟอร์มสารละลายผสมจากข้อ 3.12.2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* Top10 ที่เตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.7.6.1 และทรานส์ฟอร์มด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ซึ่งมีขั้นตอนในการทำดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.7.6.2

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.4 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) (ภาคผนวก ข27)

คัดเลือกโคโลนีจากข้อ 3.12.3 มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต และมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.7.8

3.12.5 การคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.12.4 มาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเวกเตอร์แสดงออก ซึ่งมีสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสดังนี้

10X Dream™ Tag buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Dream Taq buffer)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์)	2.5	ไมโครลิตร
สารละลาย MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
สารละลาย forward primer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
สารละลาย reverse primer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ DreamTaq™ DNA Polymerase (ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.12.4 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	25	ไมโครลิตร



โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 3 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 50°C	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 4 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3

3.13 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

3.13.1 การกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA โดยการเติมสารที่กระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ LB ที่มีคาร์บอนิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกครั้ง กระจายเซลล์ในกลีเซอรอล 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และถ่ายลงในอาหาร LB ที่เตรียมใหม่ โดยมีคาร์บอนิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 จึงเติมสารที่กระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ ได้แก่ น้ำตาลอะราบินอสที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง นำมาหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB และนำเซลล์ส่วนที่

เหลือไปปั่นแยกเซลล์ เทสวุ้นใส่ทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2

3.13.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ที่ผลิตได้จากรีคอมบิแนนท์ *E.coli* โดยใช้วิธี ก๊าซโครมาโตกราฟี

ใช้วิธีของ Comeau และคณะ (1988) ซึ่งแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสวุ้นใส่ทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 3% กรดซัลฟูริกในเมทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นลง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ชั้นล่างใส่หลอดฝาเกลียว ขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโมโนเมอร์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m. x 25 mm. ID x 25 $\mu$ m. df
อุณหภูมิของ injector	: 250°C (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130°C นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180°C ด้วย อัตรา 5°C ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180°C
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250°C (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐานพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) (ภาคผนวก ค4)

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (กรัมต่อลิตรต่อเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม) โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : เวอร์ชัน 4.02 ซึ่งจะคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

### 3.13.3 การสกัด PHA จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นบรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิทและสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่ภาชนะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบ โดยละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80°C จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำมาตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยเฮกเซนออกให้หมดจะได้ผลิตภัณฑ์ของพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว

## 3.14 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

### 3.14.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ปั่นแยกเซลล์ จากนั้นกระจายเซลล์ในกลีเซอรอล 10% (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน



### 3.14.2 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 4 ชนิด คือ อาหาร LB (ภาคผนวก ก3) อาหาร SB (ภาคผนวก ก7) อาหาร 2YT (ภาคผนวก ก8) และอาหาร TB (ภาคผนวก ก9) นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารแต่ละชนิดที่มีคาร์บอนิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 หรือมีการเจริญเติบโตในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential growth phase) จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ด้วยน้ำตาลอะราบิโนส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02% เท่ากันทุกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำเซลล์ส่วนที่เหลือไปปั่นแยกเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดพอลิเมอร์ด้วยวิธีเมทิลเอสเทอร์ และวิเคราะห์ผลโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB เพื่อคัดเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

### 3.14.3 การแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนส

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารเหลว LB ที่มีคาร์บอนิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 หรือมีการเจริญเติบโตในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ด้วยน้ำตาลอะราบิโนส ซึ่งแปรผันทั้งหมด 5 ความเข้มข้น โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.002% 0.02% 0.2% 0.5% และ 2% ตามลำดับ ซึ่งมีชุดควบคุมผลลบบเป็นชุดที่ไม่มีการเติมน้ำตาลอะราบิโนส นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและนำเซลล์ส่วนที่เหลือไปปั่นแยกเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดพอลิเมอร์ด้วยวิธีเมทิลเอสเทอร์ และวิเคราะห์ผลโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนสที่เหมาะสม

#### 3.14.4 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่แปรผัน มีทั้งหมด 3 ขนาดด้วยกัน คือ  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร (Colony Forming Unit, CFU) โดยมีวิธีเตรียมหัวเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 3.14.1 จากนั้นใส่ลงในอาหารเหลว LB ที่มีคาร์บอนิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 หรือมีการเจริญเติบโตในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ด้วยน้ำตาลอะราบิโนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำเซลล์ส่วนที่เหลือไปปั่นแยกเซลล์ เติมน้ำล้าง นำเซลล์ที่ได้ไปบ่มแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดพอลิเมอร์ด้วยวิธีเมทิลเอสเทอร์ และวิเคราะห์ผลโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB เพื่อคัดเลือกปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

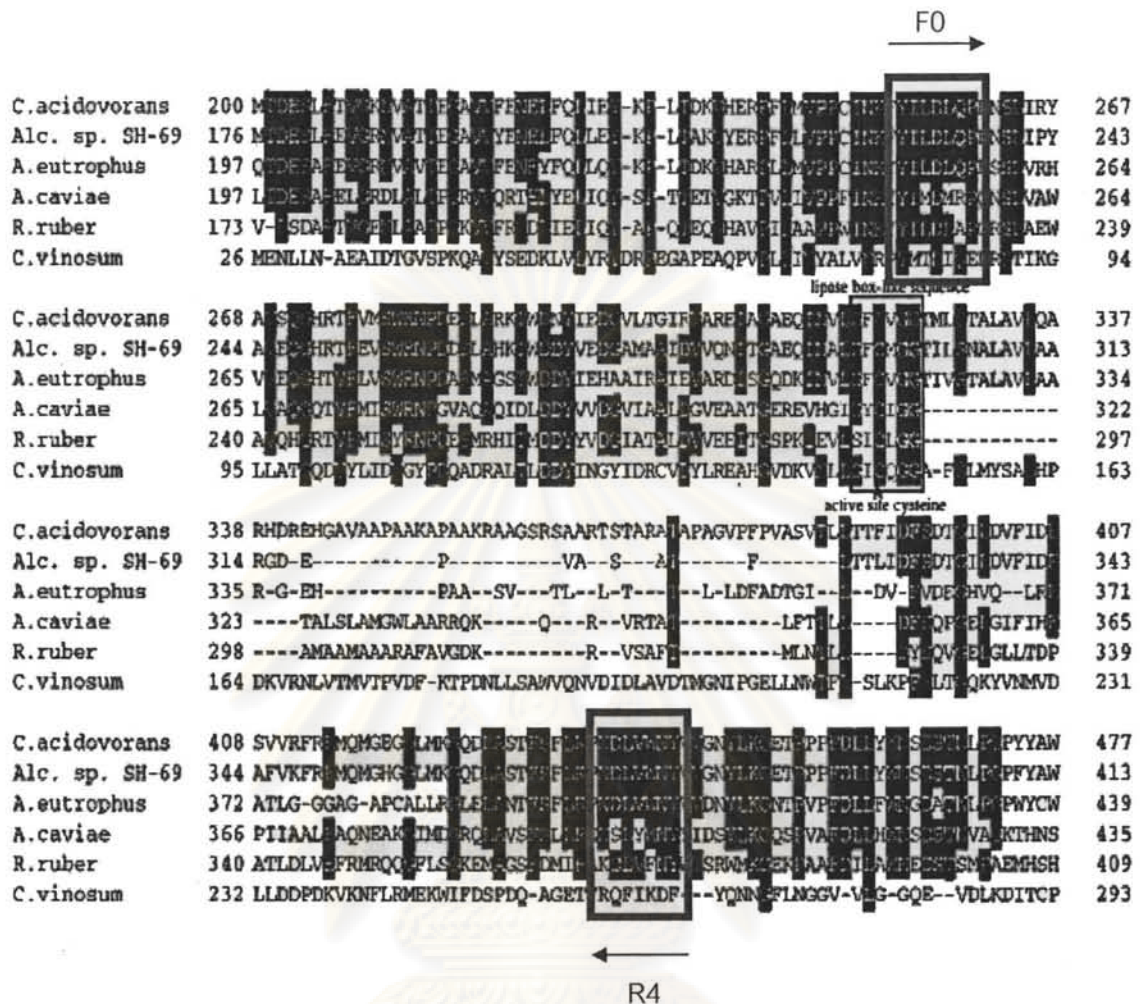
#### 4.1 การหาชิ้นส่วนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสบางส่วน (PHA synthase, *phaC*) จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

##### 4.1.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ออกแบบ degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโนที่อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสจากจุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ คือ *Comamonas acidovorans* (หมายเลขเข้าถึง AB009273) *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ SH-69 (หมายเลขเข้าถึง U78047) *A. eutrophus* (หมายเลขเข้าถึง J05003) *Aeromonas caviae* (หมายเลขเข้าถึง D88825) *Rhodococcus ruber* (หมายเลขเข้าถึง X66407) และ *Chromatium vinosum* (หมายเลขเข้าถึง O1112) (Sudesh และคณะ, 1998) ผลการเปรียบเทียบแสดงในรูปที่ 4.1 โดยลำดับกรดอะมิโนในกรอบที่ระบุไว้ คือ ส่วนของไพรเมอร์คู่แรกของการทดลอง โดยตั้งชื่อว่า F0 และ R4 ตามลำดับ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 3.2

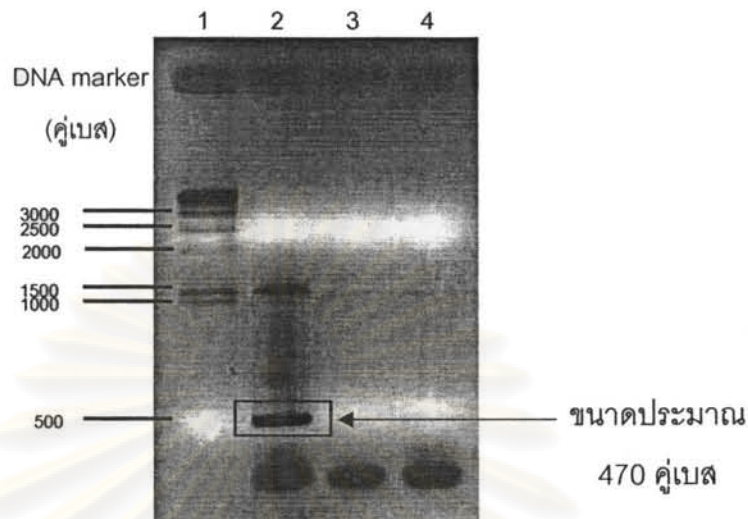
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ซินเทส จาก *Comamonas acidovorans*, *Alcaligenes sp.* สายพันธุ์ SH-69, *A. eutrophus*, *Aeromonas caviae*, *Rhodococcus ruber* และ *Chromatium vinosum* (Sudesh และคณะ, 1998)

เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นี้มาทำนายขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้โปรแกรม FastPCR พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์คู่นี้จะมีขนาดประมาณ 470 คู่เบส ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อค้นหายีน *phaC* จากโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ F0 และ R4

- ช่องวิ่งที่ 1 500 bp DNA Ladder (Takara Bio Inc., Japan)
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ (ชุดควบคุมผลลบ)
- ช่องวิ่งที่ 4 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ H16

ผลการตรวจสอบได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 470 คู่เบสตามที่คาดหวัง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.7.4 (Promega, USA) และเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนี้เข้ากับเวกเตอร์ pCR4 โดยใช้ชุดสำเร็จ pCR4 TA-cloning vector (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.7.5 สำหรับขั้นตอนอื่นๆ ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3100 ver 3.1 จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ จากฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *R. eutropha* H16 100% (Pohlmann และคณะ, 2006) ผลแสดงดังรูปที่ 4.3



```

1 CCGGA GAGCT CGCTG GTGCG CCATG TGGTG GAGCA GGGAC ATACG GTGTT
51 TCTGG TGTCG TGGCG CAATC CGGAC GCCAG CATGG CCGGC AGCAC CTGGG
101 ACGAC TACAT CGAGC ACGCG GCCAT CCGCG CCATC GAAGT CGCGC GCGAC
151 ATCAG CGGCC AGGAC AAGAT CAACG TGCTC GGCTT CTGCG TGGGC GGCAC
201 CATTG TCTCG ACCGC GCTGG CGGTG CTGGC CGCGC GCGGC GAGCA CCCGG
251 CCGCC AGCGT CACGC TGCTG ACCAC GCTGC TGGAC TTTGC GCACA CCGGC
301 ATCCT CGACG TCTTT GTCGA CGAGG GCCAT GTGCA GTTGC GCGAG GCCAC
351 GCTGG GCGGC GCGCG CGGCG CGCCG TGCGC GCTGC TGCGC GGCTT TGAGC
401 TGGCC AATAC CTTCT CGTTC TTGCG CCCGA ACGAC CTGGT GTGGA ACTAC
451 GAAGG GCGAA TTCGC G

```

รูปที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ 466 คู่เบสของยีน *phaC* จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

#### 4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (*phaCAB*) จากโครโมโซมของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04

##### 4.2.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 4.1.1 เพื่อใช้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *phaC* ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนทั้งหมดที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จากโครโมโซมของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* ที่ทราบแล้วนี้ที่บริเวณปลาย 5' เพื่อให้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมา โดยออกแบบ forward primer 2 เส้น คือ forward primer ที่อยู่ด้านนอก (outer forward primer) และ forward primer ที่อยู่ด้านใน (nested forward primer) โดยตั้งชื่อว่า F3 และ F4 ตามลำดับ (ตาราง 3.2) และออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* ที่ทราบแล้วนี้บริเวณปลาย 3' เพื่อให้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยออกแบบ reverse primer 2 เส้น คือ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก (outer reverse primer) และ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (nested reverse primer) โดยตั้งชื่อว่า R1 และ R2 ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.1 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ แสดงในรูปที่ 4.4



← R2 primer

1 CCGGA GAGCT CGCTG GTGCG CCATG TGGTG GAGCA GGGAC ATACG GTGTT

51 TCTGG TGTCG TGGCG CAATC CGGAC GCCAG CATGG CCGGC AGCAC CTGGG

101 ACGAC TACAT CGAGC ACGCG GCCAT CCGCG CCATC GAAGT CGCGC GCGAC

← R1 primer

151 ATCAG CGGCC AGGAC AAGAT CAACG TGCTC GGCTT CTGCG TGGGC GGCAC

201 CATTG TCTCG ACCGC GCTGG CGGTG CTGGC CGCGC GCGGC GAGCA CCCGG

251 CCGCC AGCGT CACGC TGCTG ACCAC GCTGC TGGAC TTTGC CGACA CGGGC

F3 primer→

301 ATCCT CGACG TCTTT GTCGA CGAGG GCCAT GTGCA GTTGC GCGAG GCCAC

351 GCTGG GCGGC GGC GC GCGCG CGCCG TCGCG GCTGC TGCGC GGCTT TGAGC

F4 primer→

401 TGGCC AATAC CTTCT CGTTC TTGCG CCCGA ACGAC CTGGT GTGGA ACTAC

451 GAAGG GCGAA TTCGC G

รูปที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *phaC* อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่ออกแบบเป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ และลูกศรแสดงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

#### 4.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2

หลังจากตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI* *EcoRV* *PvuII* และ *SmaI* ตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8.1 นำชิ้น ดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วมาเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์ ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3 จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จากโครโมโซมของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ ต่างๆ ดังนี้

##### 4.2.2.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 และ R2 กับ AP2

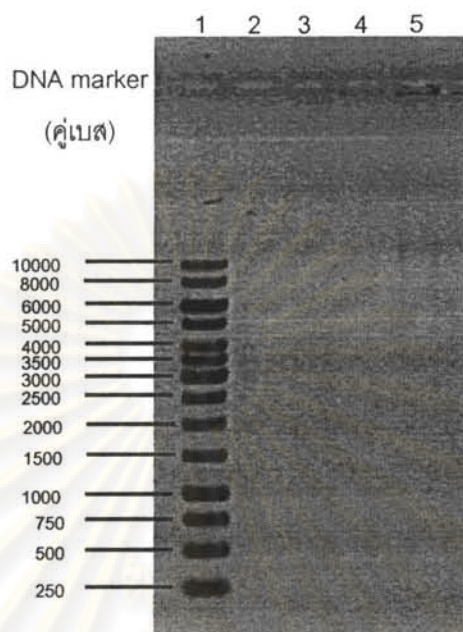
เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *phaC* ในบริเวณที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จะใช้ reverse primer (R1) ร่วมกับ outer adaptor primer 1

(AP1) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.2.1 จากนั้นเจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในครั้งที่ 1 ประมาณ 50 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ และนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (R2) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.3.1 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลดังแสดงรูปที่ 4.5 และ 4.6

จากรูปที่ 4.5 พบว่า ไม่มีผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* *EcoRV* และ *PvuII* เกิดขึ้น ในช่องวิ่งที่ 2 ช่องวิ่งที่ 3 และช่องวิ่งที่ 4 ตามลำดับ และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับชุดควบคุมผลลบ (ช่องวิ่งที่ 5)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

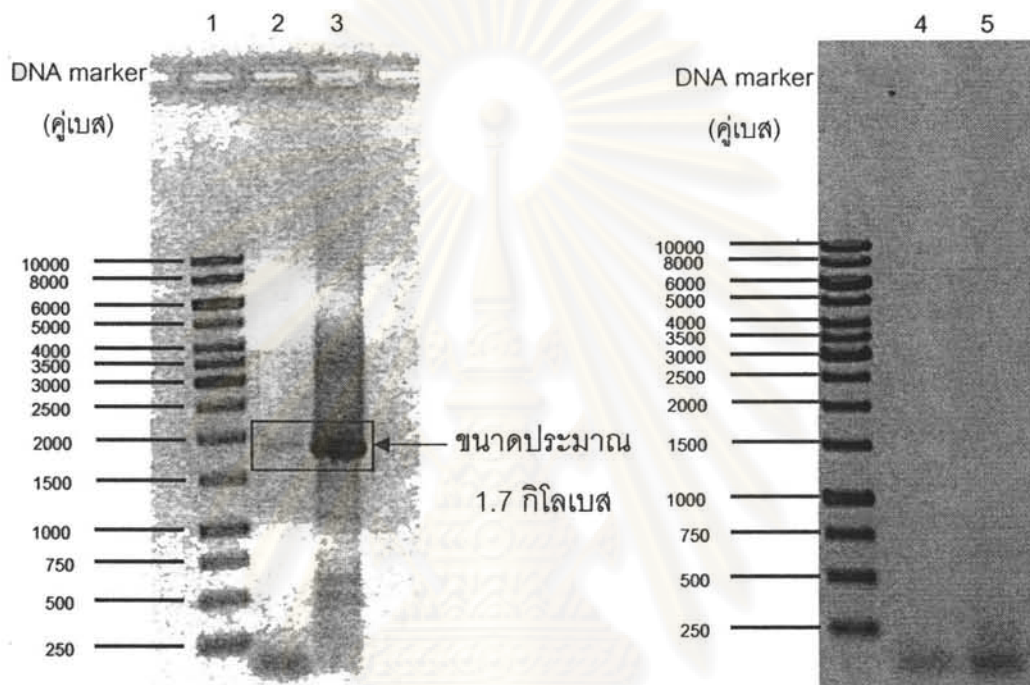


รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ DnaI, EcoRV และ PvuII

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ DnaI โดยใช้ไพรเมอร์ R1 และ AP1
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRV โดยใช้ไพรเมอร์ R1 และ AP1
- ช่องวิ่งที่ 4 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ PvuII โดยใช้ไพรเมอร์ R1 และ AP1
- ช่องวิ่งที่ 5 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 (ชุดควบคุมผลลบ)



จากรูปที่ 4.6 พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 ที่จำเพาะจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 1.7 กิโลเบส ในช่องวิ่งที่ 2 และช่องวิ่งที่ 3 ตามลำดับ และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับชุดควบคุมผลลบ (ช่องวิ่งที่ 4 และ ช่องวิ่งที่ 5)



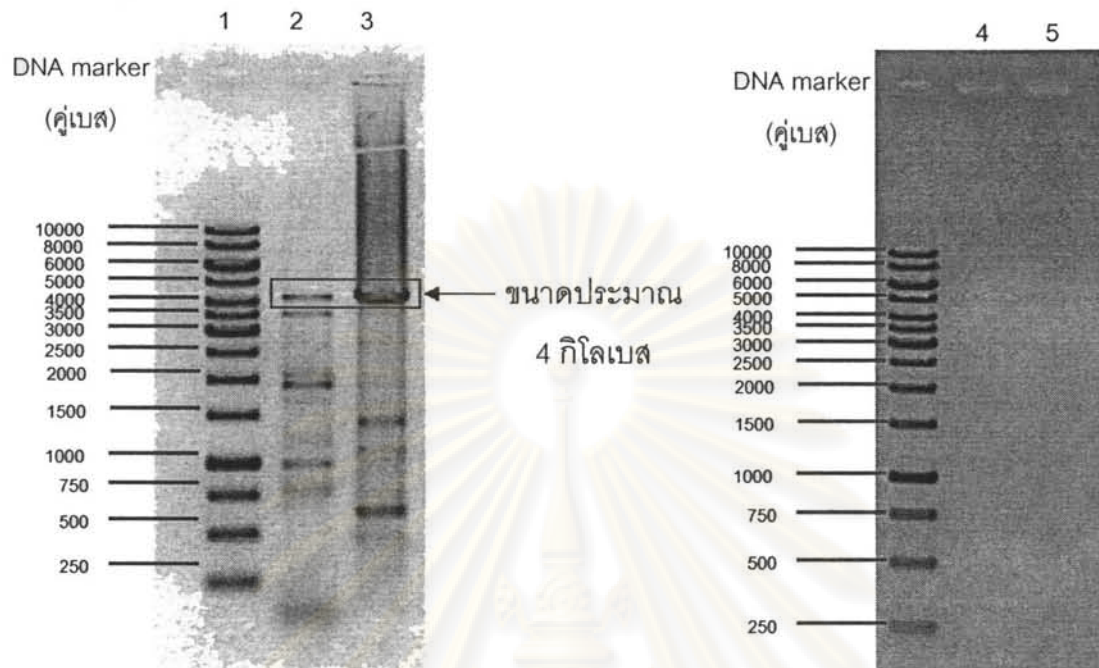
รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 และ R2 กับ AP2 ตามลำดับ จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ R1 และ AP1
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์ที่เจือจางแล้วจากครั้งที่ 1 เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ R2 และ AP2
- ช่องวิ่งที่ 4 และ 5 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ R1 กับ AP1 และไพรเมอร์ R2 กับ AP2 ตามลำดับ (ชุดควบคุมผลลบ)

4.2.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ F3 กับ AP1 และ F4 กับ AP2

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *phaC* ในบริเวณที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ F3 และ F4 ลงมา โดยการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 จะใช้ forward primer (F3) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.2.2 จากนั้นจึงเจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 ประมาณ 50 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 โดยใช้ forward primer ที่อยู่ด้านใน (F4) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) ในการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.3.2 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลดังแสดงรูปที่ 4.7

จากรูปที่ 4.7 พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I เท่านั้น และมีขนาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันประมาณ 4 กิโลเบสในช่องวิ่งที่ 2 และช่องวิ่งที่ 3 ตามลำดับ และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับชุดควบคุมผลลบ (ช่องวิ่งที่ 4 และ ช่องวิ่งที่ 5) สำหรับโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2.1



รูปที่ 4.7 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ F3 กับ AP1 และ F4 กับ AP2 ตามลำดับ จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I

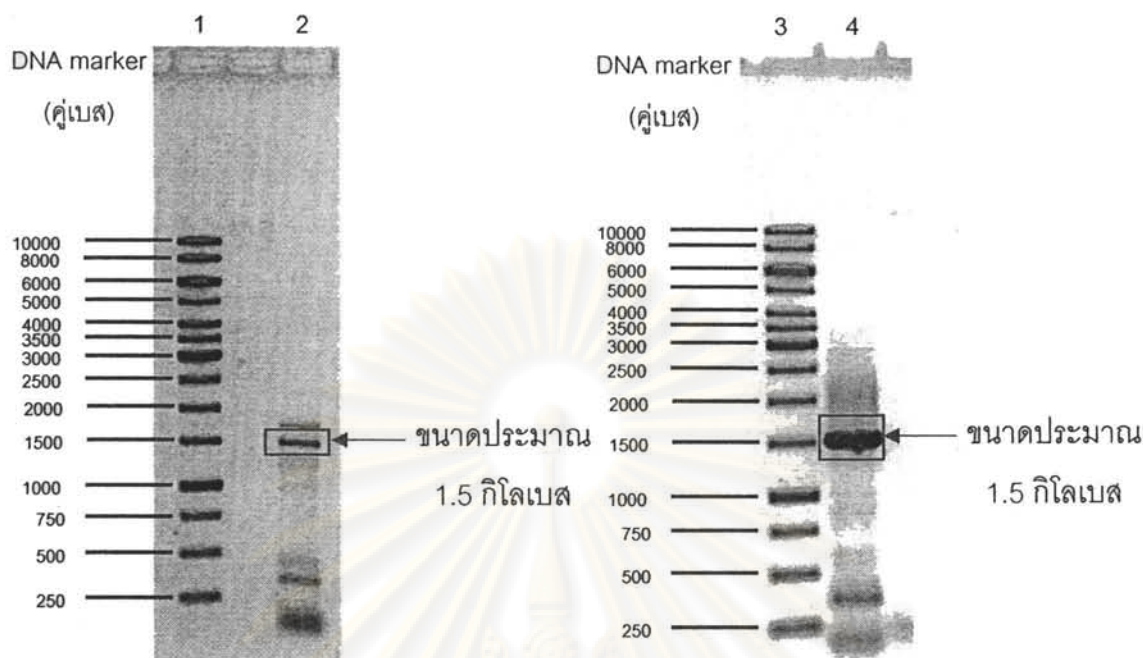
- ช่องวิ่งที่ 1      GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2      ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ F3 และ AP1
- ช่องวิ่งที่ 3      ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์ที่เจือจางแล้วจากครั้งที่ 1 เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F4 และ AP2
- ช่องวิ่งที่ 4 และ 5      ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบโดยใช้ไพรเมอร์ F3 กับ AP1 และไพรเมอร์ F4 กับ AP2 ตามลำดับ (ชุดควบคุมผลลบ)



#### 4.2.2.3 ชุดควบคุมผลบวก

ชุดควบคุมผลบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ใช้ Human Positive Control Library เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Positive Control tPA primer (PCP1) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) จากชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.2.1 จากนั้นเจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในครั้งที่ 1 ประมาณ 50 เท่า เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 โดยใช้ Positive Control tPA Nested Primer ที่อยู่ด้านใน (PCP2) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.4.3.1 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้ว จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.8

จากรูปที่ 4.8 พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 และ 2 จาก GenomeWalker Human Positive Control Library โดยใช้ไพรเมอร์ PCP1 กับ AP1 (ซ้าย) และไพรเมอร์ PCP2 กับ AP2 (ขวา) มีขนาดของผลิตภัณฑ์เท่ากัน ประมาณ 1.5 กิโลเบส (ช่องวิ่งที่ 2 และ ช่องวิ่งที่ 4 ตามลำดับ)



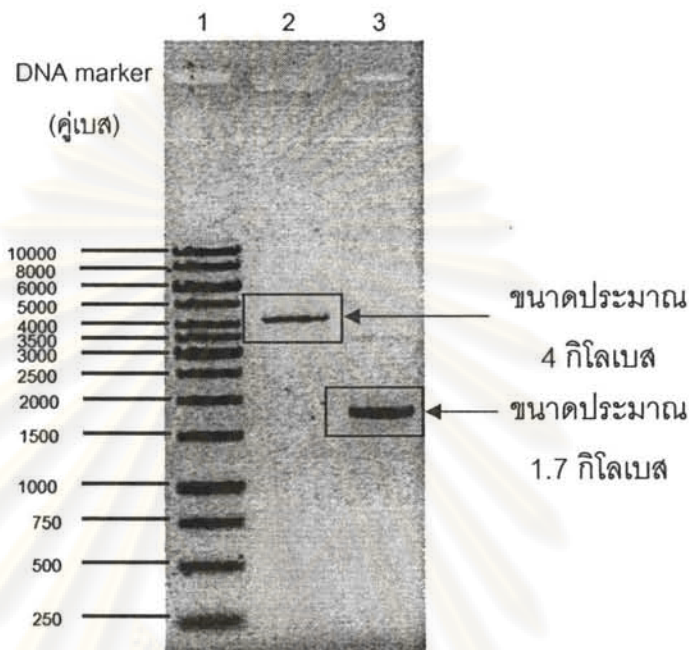
รูปที่ 4.8 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้ GenomeWalker Human Positive Control Library เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ PCP1 กับ AP1 (ซ้าย) และไพรเมอร์ PCP2 กับ AP2 (ขวา) (เป็นชุดควบคุมผลบวก)

- ช่องวิ่งที่ 1      GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder  
 ช่องวิ่งที่ 2      ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 จาก GenomeWalker Human Positive Control Library โดยใช้ไพรเมอร์ PCP1 กับ AP1  
 ช่องวิ่งที่ 3      GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder  
 ช่องวิ่งที่ 4      ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์ที่เจือจางแล้ว จากครั้งที่ 1 เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ PCP2 กับ AP2

#### 4.2.3 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากอะกาโรสเจล

จากรูปที่ 4.6 (ช่องวิ่งที่ 3) และ 4.7 (ช่องวิ่งที่ 3) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 นี้ เกิดผลิตภัณฑ์อื่นๆปนเปื้อนมาด้วย ดังนั้นก่อนนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์จึงต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นอะกาโรสบริเวณขนาด 1.7 และ 4 กิโลเบส เพื่อสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และใช้ชุดสำเร็จ Wizard SV Gel and PCR Clean-Up

System Kit ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.1 จากนั้นตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา  
 ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา  
 ลูกโซ่พอลิเมอเรส

ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องวิ่งที่ 2 ผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา  
 ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากช่องวิ่งที่ 3 รูปที่ 4.7  
 ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 4 กิโลเบส

ช่องวิ่งที่ 3 ผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา  
 ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากช่องวิ่งที่ 3 รูปที่ 4.6  
 ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 1.7 กิโลเบส

คู่มือวิธีทำพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



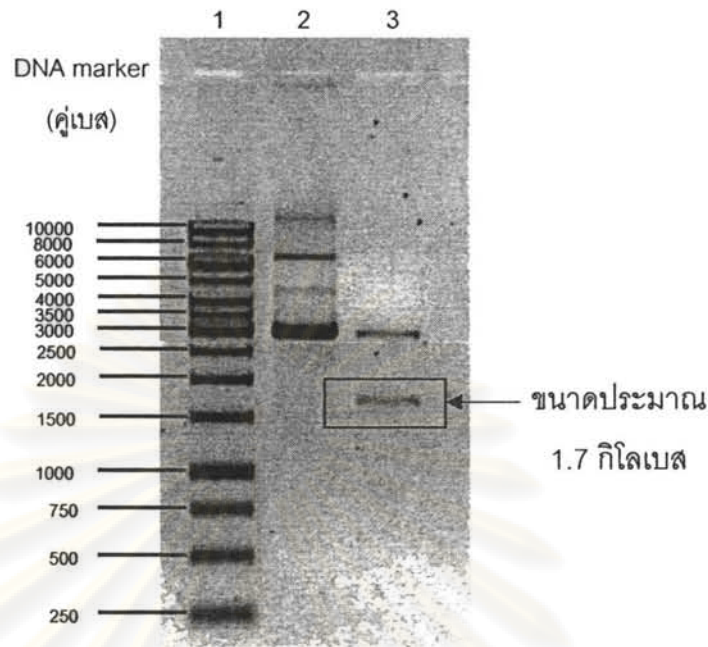
#### 4.2.4 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 เข้าในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>

-T Easy

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.2.1 เลือกผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากแม่แบบที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I และใช้ไพรเมอร์ R2 กับ AP2 (รูปที่ 4.6 ช่องวงที่ 3) และจากผลการทดลองในข้อ 4.2.2.2 เลือกผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากแม่แบบที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I และใช้ไพรเมอร์ F4 กับ AP2 (รูปที่ 4.7 ช่องวงที่ 3) โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน *phaC* ที่อยู่เหนือจากไพรเมอร์ R2 ขึ้นไป และอยู่ถัดจากไพรเมอร์ F4 ลงมา ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 และ 4 กิโลเบสตามลำดับ เพื่อการโคลน โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 4.2.3 ดังกล่าวเข้าเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.2 จากนั้นทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.3

คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีน *phaC* สอดแทรกอยู่ ด้วยวิธี Blue/White Selection ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.4 โดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอ สอดแทรกอยู่ในเวกเตอร์ ซึ่งให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาตรวจสอบ โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ High Pure Plasmid Isolation Kit ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.10.1 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI สำหรับเวกเตอร์นี้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะสามารถแยกชิ้นส่วนที่แทรกอยู่ ออกจากเวกเตอร์ได้อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.10.3 ตรวจสอบตามวิธีดังกล่าวด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.10

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลการสกัดพลาสมิดและผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ EcoRI

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder  
 ช่องวิ่งที่ 2 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก  
 ช่องวิ่งที่ 3 ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ในช่องวิ่งที่ 2 ด้วยเอนไซม์ EcoRI

จากรูปที่ 4.10 พบว่า การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่คัดเลือกนี้ มีขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส เท่ากับผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอร์เรสจากข้อ 4.2.3 (รูปที่ 4.9 ช่องวิ่งที่ 3) แสดงว่า โคลนนี้มีชิ้นส่วนของยีน *phaC* ที่อยู่เหนือจากไพรมอร์ R2 ขึ้นไปสอดแทรกอยู่ในเวกเตอร์ จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* ดังกล่าว โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท First Base Holdings (ประเทศสิงคโปร์) สำหรับการโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอร์เรสครั้งที่ 2 ของยีน *phaC* ที่อยู่ถัดจากไพรมอร์ F4 ลงมาซึ่งมีขนาดประมาณ 4 กิโลเบส ไม่สามารถโคลนได้ เนื่องจากไม่มีโคลนเกิดขึ้น ดังนั้นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว ทำโดยนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอร์เรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 4.2.3 (รูปที่ 4.9 ช่องวิ่งที่ 2) ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 4 กิโลเบส ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ

โหนดที่บริษัท First Base Holdings (ประเทศสิงคโปร์) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.10.4 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้ แสดงในรูปที่ 4.11

```

1 TAGGGCACGCGTGTGCGACGGCCCCGGGCTGGTGGGCAAGTACCTTGCCGACATCTATGCGC 60
61 TGGCGCGCGCGCCCTGGCGCGCGCCGGCTGTACCGAGGTCTACGGCGGCGACGCGCTGCA 120
121 CCGTGGCCGACGCGGCTCGCTTCTACTCCTATCGGGCGGATGGCGTGACCGGCCGCGATGG 180
181 CCAGCCTGGTCTGGCTGGCGGACTGAGCCCCCGCTGCCTCACTCGTCTTGGCCCTGGC 240
241 CGCCTGCGCGCGCTCGGCTTACGCTTGCCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGTGGCCATGATGTA 300
301 GAGCACCAGCGCCACCGGCGCCATGCCATACATCAGGAAGGTGGCAACGCCTGCCACCAC 360
361 GTTGTGCTCGGTGATCGCCATCATCAGCGCCACGTAGAGCCAGCCAATGGCCACGATGTA 420
421 CATCAAAAATTTCATCCTTCTCGCCTATGCTCTGGGGCCTCGGCAGATGCGAGCGCTGCAT 480
481 ACCGTCCGGTAGGTGCGGAAGCGTGCAGTGCCGAGGCGGATTCCCCTGAGACAATCGCGCT 540
541 GCGTCGCAAGGTAACAATGACTCAAATGTCTCGGAATCGCTGACGATTCCCAGGTTTCT 600
601 CCGGCAAGCATAGCGCATGGCGTCTCCATGCGAGAATGTCGCGCTTGGCCGATAAAAAGG 660
661 GAGCCGCTATCGGAATGGACGCAAGCCACGGCCGAGCAGGTGCGGTCGAGGGCTTCCAG 720
721 CCAGTTCAGGGCAGATGTGCCGGCAGACCCTCCCGCTTGGGGGAGGCGCAAGCCGGT 780
781 CCATTCGGATAGCATCTCCCATGCAAAGTGCCGGCCAGGGCAATGCCCGGAGCCGGTTC 840
841 GAATAGTGACGGCAGAGAGACAATCAAATCATGGCGACCGGCAAAGGCGCGGAGCTTCC 900
1
111 L P Y R F A A A F Y L P N A R A L T E L 130
1201 CTCCCATATCGCTTCGCTGCCGCTTCTACCTGCCCAATGCGCGCGCCTTGACCGAGCTG 1260
1261 L P Y R F A A A F Y L P N A R A L T E L 130
901 ACGCAGGAAGGCAAGTCCCAACCATTCAAGGTCACGCCGGGGCCATTTCGATCCAGCCACA 960
961 T Q E G K S Q P F K V T P G P F D P A T 30
961 TGGCTGGAATGGTCCC GCCAGTGGCAGGGCACTGAAGGCAACGGCCACGCGGCCGCGTCC 1020
1021 W L E W S R Q W Q G T E G N G H A A A S 50
1021 GGCATTCCGGGCCTGGATGCGCTGGCAGGCGTCAAGATCGCGCCGGCGCAGCTGGGTGAT 1080
1081 G I P G L D A L A G V K I A P A Q L G D 70
1081 ATCCAGCAGCGCTACATGAAGGACTTCTCAGCGCTGTGGCAGGCCATGGCCGAGGGCAAG 1140
1141 I Q Q R Y M K D F S A L W Q A M A E G K 90
1141 GCCGAGGCCACCGGTCCGCTGCACGACCGGCGCTTCGCCGGCGACGCATGGCGCACCAAC 1200
1201 A E A T G P L H D R R F A G D A W R T N 110
1201 CTCCCATATCGCTTCGCTGCCGCTTCTACCTGCCCAATGCGCGCGCCTTGACCGAGCTG 1260
1261 L P Y R F A A A F Y L P N A R A L T E L 130

```

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกลิโพลีเมอเรส หมายถึง ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมทไธโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น การถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโพรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณ จุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนา และเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site)



1261 GCCGATGCCGTCGAGGCCGATGCCAAGACCCGCCAGCGCATCCGCTTCGCGATCTCGCAA 1320  
 131 A D A V E A D A K T R Q R I R F A I S Q 150  
 1321 TGGGTCGATGCGATGTGCGCCGCCAACTTCCTTGCCACCAATCCCGAGGCGCAGCGCCTG 1380  
 151 W V D A M S P A N F L A T N P E A Q R L 170  
 1381 CTGATCGAGTCGGGCGGCGAATCGCTGCGTGCCGGCGTGCGCAACATGATGGAAGACCTG 1440  
 171 L I E S G G E S L R A G V R N M M E D L 190  
 1441 ACACGCGCAAGATCTCGCAGACCGACGAGAGCGCGTTTGAGGTCGCGCCAATGTCGCG 1500  
 191 T R G K I S Q T D E S A F E V G R N V A 210  
 1501 GTGACCGAAGGCGCCGTTGCTTCGAGAACGAGTACTTCCAGCTGTTGCAGTACAAGCCG 1560  
 211 V T E G A V V F E N E Y F Q L L Q Y K P 230  
 1561 CTGACCGACAAGGTGCACGCGCGCCCGCTGCTGATGGTGCCGCCGTCATCAACAAGTAC 1620  
 231 L T D K V H A R P L L M V P P C I N K Y 250  
 1621 TACATCCTGGACCTGCAGCCGGAGAGCTCGCTGGTGCCCATGTGGTGGAGCAGGGACAT 1680  
 251 Y I L D L Q P E S S L V R H V V E Q G H 270  
 1681 ACGGTGTTTCTGGTGTGCTGGCGCAATCCGGACGCCAGCATGGCCGGCAGCACCTGGGAC 1740  
 271 T V F L V S W R N P D A S M A G S T W D 290  
 1741 GACTACATCGAGCACGCGGCCATCCGCGCCATCGAAGTCGCGCGCGACATCAGCGGCCAG 1800  
 291 D Y I E H A A I R A I E V A R D I S G Q 310  
 1801 GACAAGATCAACGTGCTCGGCTTCTGCGTGGGCGGCACCATTGTCTCGACCGCGCTGGCG 1860  
 311 D K I N V L G F C V G G T I V S T A L A 330  
 1861 GTGCTGGCCGCGCGCGGCGAGCACCCGCGCCAGCGTCACGCTGCTGACCACGCTGCTG 1920  
 331 V L A A R G E H P A A S V T L L T T L L 350  
 1921 GACTTTGCCGACACGGGCATCCTCGACGCTTTTGTGACGAGGGCCATGTGCAGTTGCGC 1980  
 351 D F A D T G I L D V F V D E G H V Q L R 370  
 1981 GAGGCCACGCTGGGCGGCGCGCCGGCGCGCCGTCGCGCTGCTGCGCGCCTTGAGCTG 2040  
 371 E A T L G G G A G A P C A L L R G L E L 390  
 2041 GCCAATACCTTCTCGTTCCTGCGCCCGAACGACCTGGTGTGGAACCTACGTGGTCGACAAC 2100  
 391 A N T F S F L R P N D L V W N Y V V D N 410  
 2101 TACCTGAAGGGCAACACGCCGGTGCCGTTTCGACCTGCTGTTCTGGAACGGCGACGCCACC 2160  
 411 Y L K G N T P V P F D L L F W N G D A T 430

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรสึ่ม หมายถึง: ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมทไธโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น การถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโพรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณ จุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนา และเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site) (ต่อ)

```

2161 AACCTGCCGGGGCCGTGGTACTGCTGGTACCTGCGCCACACCTACCTGCAGAACGAGCTC 2220
431 N L P G P W Y C W Y L R H T Y L Q N E L 450

2221 AAGGTACCGGGCAAGCTGACCGTGTGCGGCGTGCCGGTGGACCTGGCCAGCATCGACGTG 2280
451 K V P G K L T V C G V P V D L A S I D V 470

2281 CCGACCTATATCTACGGCTCGCGCGAAGACCATATCGTGCCGTGGACCGCGGCCATATGCC 2340
471 P T Y I Y G S R E D H I V P W T A A Y A 490

2341 TCGACCGCGCTGCTGGCGAACAAGCTGCGCTTCGTGCTGGGTGCGTCCGGGCCATATCGCC 2400
491 S T A L L A N K L R F V L G A S G H I A 510

2401 GGTGTGATCAACCCGCGGCCAAGAACAAGCGCAGCCACTGGACTAACGATGCGCTGCCG 2460
511 G V I N P P A K N K R S H W T N D A L P 530

2461 GAGTCGCCGAGCAATGGCTGGCCGGCGCCATCGAGCATCACGGCAGCTGGTGGCCGGAC 2520
531 E S P Q Q W L A G A I E H H G S W W P D 550

2521 TGGACCGCATGGCTGGCCGGCAGGCCGGCGCGAAACGCGCCGCGCCCGCCAACCTATGGC 2580
551 W T A W L A G Q A G A K R A A P A N Y G 270

2581 AATGCGCGCTATCGCGCAATCGAACCCGCGCCTGGGCGATACGTCAAAGCCAAGGCATGA 2640
271 N A R Y R A I E P A P G R Y V K A K A *

2641 CGCTTGCATGAGTGCCGGCGTGCATGCACGGCGCCGGCAGGCCTGCAGGTTCCCTCC 2700
2701 CGTTTCCATTGAAAGGACTACACAATGACTGACGTTGTCATCGTATCCGCCGCCCGCACC 2760
1
phaA M T D V V I V S A A R T 12
13
2761 GCGGTCGGCAAGTTTGGCGGCTCGCTGGCCAAGATCCCGGCACCGGAACTGGGTGCCGTG 2820
13 A V G K F G G S L A K I P A P E L G A V 32

2821 GTCATCAAGGCCGCGCTGGAGCGCGCCGGCTCAAGCCGGAGCAGGTGAGCGAAGTCATC 2880
33 V I K A A L E R A G V K P E Q V S E V I 52

2881 ATGGGCCAGGTGCTGACCGCGGTTCCGGCCAGAACCCCGCACGCCAGGCCGCGATCAAG 2940
53 M G Q V L T A G S G Q N P A R Q A A I K 72

2941 GCCGGCCTGCCGGCGATGGTGGCCGATGACCATCAACAAGGTGTGCGGCTCGGGCCTG 3000
73 A G L P A M V P A M T I N K V C G S G L 92

3001 AAGCCGTGATGCTGGCCGCAACGCGATCATGGCGGGCGACGCCGAGATCGTGGTGGCC 3060
93 K A V M L A A N A I M A G D A E I V V A 112

```

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส หมายถึง ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมทไธโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น การถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโปรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณ จุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนา และเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site) (ต่อ)



3061 GGCGGCCAGGAAAACATGAGCGCCGCCCGCACGTGCTGCCGGGCTCGCGCGATGGTTTC 3120  
 113 G G Q E N M S A A P H V L P G S R D G F 132  
 3121 CGCATGGGCGATGCCAAGCTGGTCGACACCATGATCGTCGACGGCCTGTGGGACGTGTAC 3180  
 133 R M G D A K L V D T M I V D G L W D V Y 152  
 3181 AACCAGTACCACATGGGCATCACCGCCGAGAACGTGGCCAAGGAATACGGCATCACACGC 3240  
 153 N Q Y H M G I T A E N V A K E Y G I T R 172  
 3241 GAGGCGCAGGATGAGTTCGCCGTCGGCTCGCAGAACAAGGCCGAAGCCGCGCAGAAGGCC 3300  
 173 E A Q D E F A V G S Q N K A E A A Q K A 192  
 3301 GGCAAGTTTGACGAAGAGATCGTCCCGGTGCTGATCCCGCAGCGCAAGGGCGACCCGGTG 3360  
 193 G K F D E E I V P V L I P Q R K G D P V 212  
 3361 GCCTTCAAGACCGACGAGTTCGTGCGCCAGGGCGCCACGCTGGACAGCATGTCCGGCCTC 3420  
 213 A F K T D E F V R Q G A T L D S M S G L 232  
 3421 AAGCCCCTTCGACAAGGCCGGCAGGTGACCGCGCCAACGCCTCGGGCCTGAACGAC 3480  
 233 K P A F D K A G T V T A A N A S G L N D 252  
 3481 GGCGCCGCCGCGGTGGTGGTGTGTCGGCGGCCAAGGCCAAGGAAGTGGGCTGACCCCG 3540  
 253 G A A A V V V M S A A K A K E L G L T P 272  
 3541 CTGGCCACGATCAAGAGCTATGCCAACGCCGGTGTGATCCCAAGGTGATGGGCATGGGC 3600  
 273 L A T I K S Y A N A G V D P K V M G M G 292  
 3601 CCGGTGCCGGCCTCCAAGCGCGCCTGTGCGCGCGCCAGTGGACCCCGCAAGACCTGGAC 3660  
 293 P V P A S K R A L S R A E W T P Q D L D 312  
 3661 CTGATGGAGATCAACGAGGCCCTTGCCGCGCAGGGCGCTGGCGGTGCACCAGCAGATGGGC 3720  
 313 L M E I N E A F A A Q A L A V H Q Q M G 332  
 3721 TGGGACACCTCCAAGGTCAATGTGAACGGCGGGCGCCATCGCCATCGGCCACCCGATCGGC 3780  
 333 W D T S K V N V N G G A I A I G H P I G 352  
 3781 GCGTCGGGCTGCCGTATCCTGGTGACGCTGCTGCACGAGATGAAGCGCCGTGACGCGAAG 3840  
 353 A S G C R I L V T L L H E M K R R D A K 372  
 3841 AAGGGCCTGGCCTCGCTGTGCATCGGCGGGCGCATGGGCGTGGCGCTGGCAGTCGAGCGC 3900  
 373 K G L A S L C I G G G M G V A L A V E R 392  
 3901 AAATAAGGAAGGGGTTTTCCGGGGCCGCGCGGGTGGCGGGACCCGGCGACGATAACG 3960  
 393 K \* 394

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกลูโซฟิลิเมอร์ส หมายถึง: ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมไทโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น การถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโพรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณ จุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนา และเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site) (ต่อ)



```

3961 AAGCCAATCAAGGAGTGGACATGACTCAGCGCATTGCGTATGTGACCGGCGGCATGGGTG 4020
  1
      M T Q R I A Y V T G G M G 13
      phaB →
4021 GTATCGGAACCGCCATTTGCCAGCGGCTGGCCAAGGATGGCTTTCGTGTGGTGGCCGGTT 4080
  14 G I G T A I C Q R L A K D G F R V V A G 33
4081 GCGGCCCAACTCGCCGCGCCGCGAAAAGTGGCTGGAGCAGCAGAAGGCCCTGGGCTTCG 4140
  34 C G P N S P R R E K W L E Q Q K A L G F 53
4141 ATTTTCATTGCCTCGGAAGGCAATGTGGCTGACTGGGACTCGACCAAGACCGCATTTCGACA 4200
  54 D F I A S E G N V A D W D S T K T A F D 73
4201 AGGTCAAGTCCGAGGTCCGCGAGGTTGATGTGCTGATCAACAACGCCGGTATCACCCGCG 4260
  74 K V K S E V G E V D V L I N N A G I T R 93
4261 ACGTGGTGTTCGCAAGATGACCCGCGCCGACTGGGATGCGGTGATCGACCAACCTGA 4320
  94 D V V F R K M T R A D W D A V I D T N L 113
4321 CCTCGCTGTCAACGTCACCAAGCAGGTGATCGACGGCATGGCCGACCGTGGCTGGGGCC 4380
  114 T S L F N V T K Q V I D G M A D R G W G 133
4381 GCATCGTCAACATCTCGTCCGTGAACGGGCAGAAGGGCCAGTTCGGCCAGACCAACTACT 4440
  134 R I V N I S S V N G Q K G Q F G Q T N Y 153
4441 CCACCGCAAGGCCGGCCTGCATGGCTTACCATGGCACTGGCGCAGGAAGTGGCGACCA 4500
  154 S T A K A G L H G F T M A L A Q E V A T 173
4501 AGGGCGTGACCGTCAACACGGTCTCTCCGGGCTATATCGCCACCGACATGGTCAAGGCGA 4560
  174 K G V T V N T V S P G Y I A T D M V K A 193
4561 TCCGCCAGGACGTGCTCGACAAGATCGTCCGACGATCCCGGTCAAGCGCTGGGCCTGC 4620
  194 I R Q D V L D K I V A T I P V K R L G L 213
4621 CGGAAGAGATCGCCTCGATCTGCGCCTGGTTGTCGTGGAGGAGTCCGGTTTCTCGACCG 4680
  214 P E E I A S I C A W L S S E E S G F S T 233
4681 GCGCCGACTTCTCGTCAACGGCGGCCTGCATATGGGCTGACCTGCCGGCCTGGTTCAAC 4740
  234 G A D F S L N G G L H M G *
4741 CAGTCGGCAGCCGGCGCTGGCGCCCGGTATTGCGGTGCAGCCAGCGCGGCGCACAAAGGC 4800
4801 GCGGGCGTTTCGTTTCGCGCCCGTTCGCGGGCCGTCAAGGCCCGCAATCGTTTCTG 4860
4861 CCCGCGCGCATTCTCGTTCGCGCCAATTCACGGGTTTTCTTAAGCCCCGTCGC 4920
4921 TTTTCTTAGTGCCTTGTGGGCATAGAATCAGGGCAGCGGCGCAGCCAGCCATGTTTCG 4980
4981 TGCAGCGCGGCCCTCGCGGGGGCAGGCTGCAGGCCGCCACGCGCAGCCATGCGCGAACG 5040
5041 GGCCACCAGATGGGCCGACGACAACAAGCAGATGGCGGGGCGATACCGATTTGCGCA 5100

```

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรสึ่ม หมายถึง: ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมไทโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโพรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site) (ต่อ)

5101 CTGCACCCCATGCGGTGCAGCAGCGCGCAAACAGCGATGACACAAGGACAGAGCACCGAT 5160  
 5161 GGCCACGACCAAAAAAGGCGCAGAGCGACTGATCAAAAAGTATCCGAACCGTAGGCTCTA 5220  
 5221 CGACACCCAGACCAGCACCTACATCACCCCTGGCCGACGTCAAGCAGCTGGTCATGGATTC 5280  
 5281 AGAAGAATTC AAGGTCGTCGACGCCAAGTCTGGTGACGAAGTACCCCGCAGCATCTTGCT 5340  
 5341 GCAGATCATCCTGGAAGAAGAAACGGGCGGCGTGCCGATGTTCTCCAGCGCGATGCTGTC 5400  
 5401 GCAGATCATCCGCTTCTACGGCCATGCCATGCAGGGCATGATGGGCACCTACCTGGAAAA 5460  
 5461 GAACATCCAGGCCTTCATCGACATCCAGAACAAGCTGGCCGAGAACTCCAAGGGCCTGTA 5520  
 5521 TTCCGGCGAAAACCTTCAGCCCCGACATGTGGTTCGACAGTTCATGAACATGCAGGGCCCGAT 5580  
 5581 GATGCAGGGCATGATGAGCAACTACATCGAGCAGAGCAAGAACCTGTTCTGTCAGATGCA 5640  
 5641 GGAGCAGATGCAAAGCCAGGCCAAAAATATGTTCCGGGACGTTCCCGTTCAACCAGCCGGA 5700  
 5701 CAAGAAGTAAGACACTGGCAGCGGCGGCTACACCCGCCGCATATCCCGCACGCTGGC 5760  
 5761 TGGCACTCAGCCAGCGCTCGCATGCAGG 5788

รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG codon) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส หมายถึง ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมทไธโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น การถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง -35 และ -10 ของโพรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ แสดงบริเวณ จุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนา และเอียง แสดงบริเวณที่สิ้นสุดการถอดรหัส (transcription termination site) (ต่อ)

จากรูปที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวกเตอร์ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *phaC* ที่อยู่เหนือจากโพรโมเตอร์ R2 ขึ้นไป และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส ของยีน *phaC* ที่อยู่ถัดจากโพรโมเตอร์ F4 ลงมา เมื่อนำมาวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมดด้วยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A04 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 ถึง 99% (Pohlmann และคณะ, 2006) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณก่อนถึงโพรโมเตอร์และหลังกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA โดยแบ่งออกเป็น 3 ยีน และเรียงลำดับดังต่อไปนี้ ยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส (polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*)) ยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส ( $\beta$ -ketothiolase (*phaA*)) และยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์อะซิโตอะเซทิลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*)) โดยแต่ละยีนจะมีจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของการถอดรหัส

เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีนทั้ง 3 ยีน โดยใช้โปรแกรม BLASTx พบว่ามีความเหมือน 99% กับเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทสของ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 (Pohlmann และคณะ, 2006) โดยมีกรดอะมิโนที่ต่างกัน ดังนี้ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เป็นโพรลีน (P) ในขณะที่ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 เป็นลูซีน (L) สำหรับเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส และเอนไซม์อะซิโตอะเซทิลโคเอไรด์กเทสของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 100% (Pohlmann และคณะ, 2006)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ยีนนี้ ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีหมายเลข เข้าถึง FJ897463 FJ897461 และ FJ897462 ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

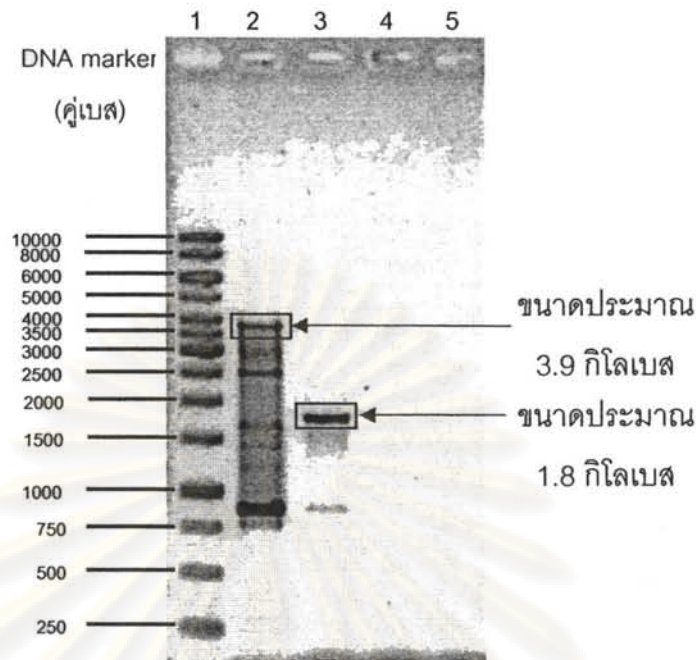


#### 4.3 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบในข้อ 4.2 แสดงให้เห็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณก่อนถึงโปรโมเตอร์ และหลังกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อให้ได้ยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ที่สมบูรณ์อยู่ภายในชิ้นเดียวกัน จึงออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์คู่ใหม่ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* เพื่อออกแบบ forward primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (start codon) และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaB* ออกแบบ reverse primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณจุดสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) โดยออกแบบ forward primer ตั้งชื่อว่า F\_phaCAB และ reverse primer ตั้งชื่อว่า R\_phaCAB และออกแบบ reverse primer ใหม่อีก 1 เส้น สำหรับยีน *phaC* เพียงยีนเดียว โดยใช้ forward primer (F\_phaCAB) เส้นเดียวกับที่ออกแบบไว้แล้ว และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบในข้อ 4.2 เพื่อออกแบบ reverse primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณจุดสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของยีน *phaC* โดยตั้งชื่อว่า R\_phaC ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เหล่านี้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

นำคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้นมาใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA และจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตซินเทส โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เป็นแม่แบบ และใช้เอนไซม์ *Ex Taq* DNA polymerase ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.2 พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ F\_phaCAB และ R\_phaCAB และได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบสจากคู่ไพรเมอร์ F\_phaCAB และ R\_phaC ผลแสดงดังรูปที่ 4.12

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

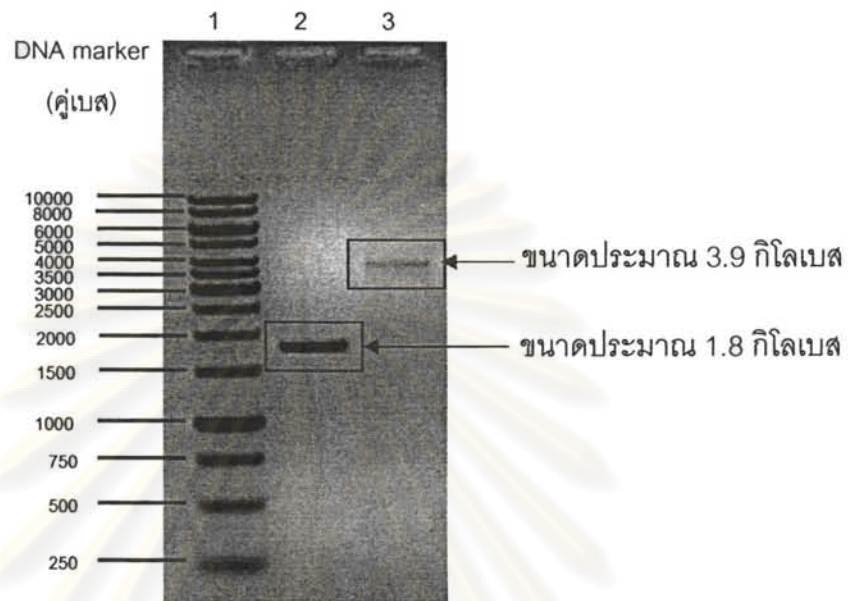


รูปที่ 4.12 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB และ F\_phaCAB กับ R\_phaC ตามลำดับ

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaC
- ช่องวิ่งที่ 4 และ 5 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB และไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaC ตามลำดับ (ชุดควบคุมผลลบ)

จากรูปที่ 4.12 ช่องวิ่งที่ 2 และช่องวิ่งที่ 3 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่นี้ เกิดผลิตภัณฑ์อื่นๆปนเปื้อนมาด้วย ดังนั้นก่อนนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์แสดงออกจึงต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นอะกาโรสบริเวณขนาด 3.9 กิโลเบส และ 1.8 กิโลเบส เพื่อสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ชุดสำเร็จ Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.1 ตรวจสอบผลการ

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากช่องวิ่งที่ 3 รูปที่ 4.12 ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 1.8 กิโลเบส
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากช่องวิ่งที่ 2 รูปที่ 4.12 ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 3.9 กิโลเบส

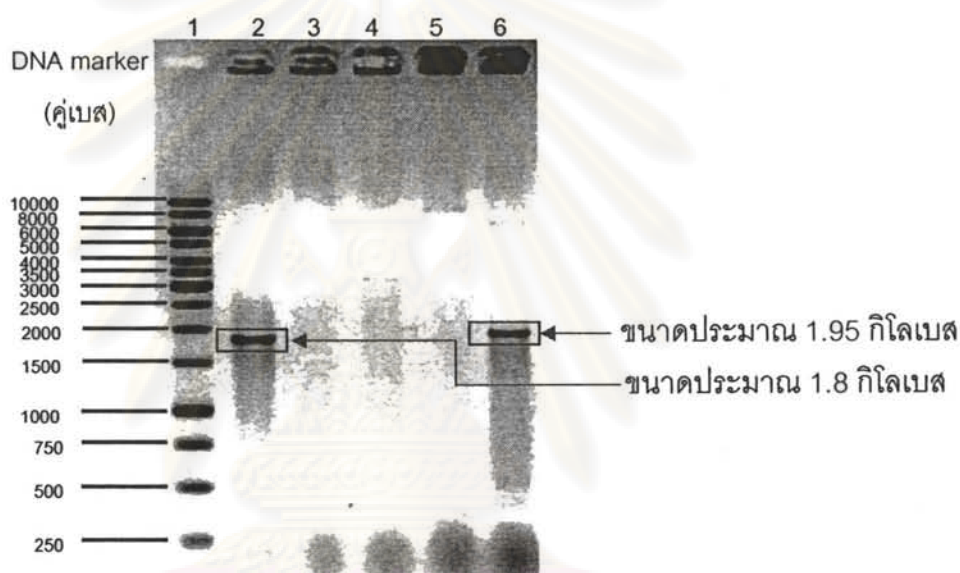
#### 4.4 การโคลนผลิตภัณฑ์จีโนมิกดีเอ็นเอของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เข้าในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pBAD/TOPO® ThioFusion™ vector system

4.4.1 โคลนผลิตภัณฑ์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ซินเทส

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากข้อ 4.3 (รูปที่ 4.13 ช่องวิ่งที่ 2) ซึ่งเป็นยีน *phaC* ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBAD/TOPO® ThioFusion™ (แผนที่แสดงลักษณะของ เวกเตอร์ pBAD/TOPO® ThioFusion™



แสดงในภาคผนวก ค3) ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.12.2 จากนั้นทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* Top10 แล้วคัดเลือกโคลนที่มียีน *phaC* สอดแทรกอยู่ ตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โคโลนีเป็นแม่แบบ เพื่อเป็นการตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของยีนดังกล่าว จึงใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ pBAD Reverse ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนและจำเพาะต่อเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกตามลำดับ ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันดังกล่าวไว้ในข้อ 3.12.5 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนต่างๆ

- ช่องวิ่งที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์จากข้อ 4.3 (รูปที่ 4.13 ช่องวิ่งที่ 2) เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaC (ชุดควบคุมผลบวก)
- ช่องวิ่งที่ 3 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ pBAD Reverse (ชุดควบคุมผลลบ)
- ช่องวิ่งที่ 4-6 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนที่ 1-3 ตามลำดับ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ pBAD Reverse

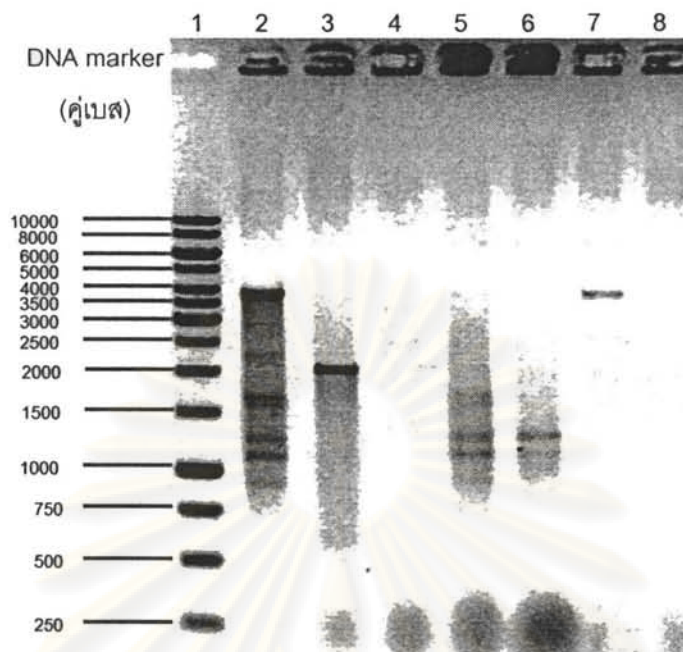
จากรูปที่ 4.14 พบว่า โคลนที่ 3 (ช่องวงที่ 6) ให้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันตามที่ต้องการโดยมีขนาดประมาณ 1.95 กิโลเบส เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์เพิ่มขึ้นประมาณ 150 คู่เบส ดังนั้นขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ไม่นับรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ 150 คู่เบสของเวกเตอร์ จึงมีขนาด 1.8 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันของชุดควบคุมผลบวก (ช่องวงที่ 2) แสดงว่า โคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *phaC* สอดแทรกอยู่และมีทิศทางที่ถูกต้อง

สำหรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *phaC* สอดแทรกอยู่บริเวณหลังโปรโมเตอร์ pBAD ตั้งชื่อว่า pBAD-*phaC*<sub>A04</sub>

#### 4.4.2 โคลนผลิตภัณฑ์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากข้อ 4.3 (รูปที่ 4.13 ช่องวงที่ 3) ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> (แผนที่แสดงลักษณะของเวกเตอร์ pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> แสดงในภาคผนวก ค3) ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.12.2 จากนั้นทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top10 แล้วคัดเลือกโคลนที่มียีนประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่ ตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โคโลนีเป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ F-*phaCAB* กับ R-*phaCAB* ที่ออกแบบในข้อ 4.3 ซึ่งจำเพาะกับยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA สำหรับขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันได้กล่าวไว้ในข้อ 3.12.5 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



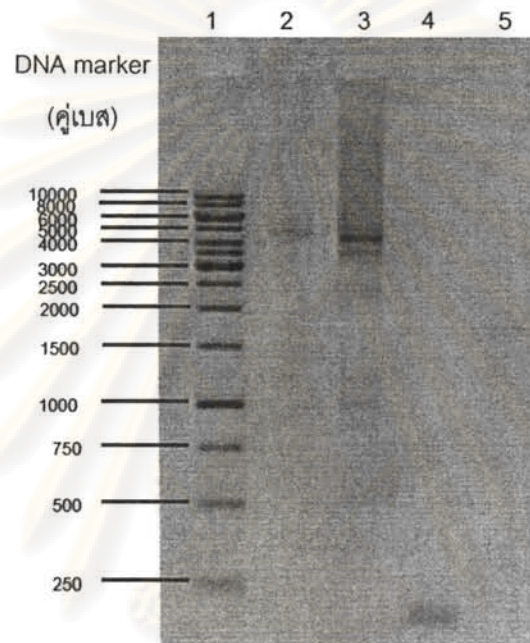
รูปที่ 4.15 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนต่างๆ

- ช่องวิ่งที่ 1      GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- ช่องวิ่งที่ 2-6    ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากโคลนที่ 1-5 ตามลำดับ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB
- ช่องวิ่งที่ 7      ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์จากข้อ 4.3 (รูปที่ 4.13 ช่องวิ่งที่ 3) เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB (ชุดควบคุมผลบวก)
- ช่องวิ่งที่ 8      ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F\_phaCAB กับ R\_phaCAB (ชุดควบคุมผลลบ)

จากรูปที่ 4.15 พบว่า โคลนที่ 1 (ช่องวิ่งที่ 2) ให้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่มีขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เท่ากับผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในชุดควบคุมผลบวก (ช่องวิ่งที่ 7) แสดงว่า โคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่ ดังนั้นจึงคัดเลือกโคลนที่ 1 มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.12.4 เพื่อยืนยันผลและตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จึงนำพลาสมิดที่สกัดได้นี้เป็นแม่แบบใน



ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.12.5 และตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของชิ้นดีเอ็นเอในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกดังกล่าว โดยใช้ไพรเมอร์ Trx Forward กับ R\_phaCAB และ F\_phaCAB กับ pBAD Reverse ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนและจำเพาะต่อเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลแสดงดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้พลาสมิดเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

- |               |   |
|---------------|---|
| ช่องวิ่งที่ 1 | GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder  |
| ช่องวิ่งที่ 2 | ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้พลาสมิดที่สกัดได้เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ Trx Forward กับ R_phaCAB                      |
| ช่องวิ่งที่ 3 | ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้พลาสมิดที่สกัดได้เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ F_phaCAB กับ pBAD Reverse                     |
| ช่องวิ่งที่ 4 | ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ (ชุดควบคุมผลลบ) โดยใช้ไพรเมอร์ Trx Forward กับ R_phaCAB  |
| ช่องวิ่งที่ 5 | ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ (ชุดควบคุมผลลบ) โดยใช้ไพรเมอร์ F_phaCAB กับ pBAD Reverse |

จากรูปที่ 4.16 พบว่าได้ขนาดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามที่ต้องการ โดยมีขนาดประมาณ 4.4 และ 4 กิโลเบส (ช่องวิ่งที่ 2 และ 3) ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นส่วนของยีนโดยใช้ forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อเวกเตอร์แสดงออกนี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์เพิ่มขึ้นประมาณ 500 และ 150 คู่เบส ตามลำดับ ทำให้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มีขนาดเพิ่มขึ้นจากเดิม ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าโคลนที่คัดเลือกนี้มีชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่ในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกและมีทิศทางที่ถูกต้อง

สำหรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA สอดแทรกอยู่บริเวณหลังโปรโมเตอร์ pBAD ตั้งชื่อว่า pBAD-phaC<sub>A04</sub>

#### 4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนเบื้องต้นในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

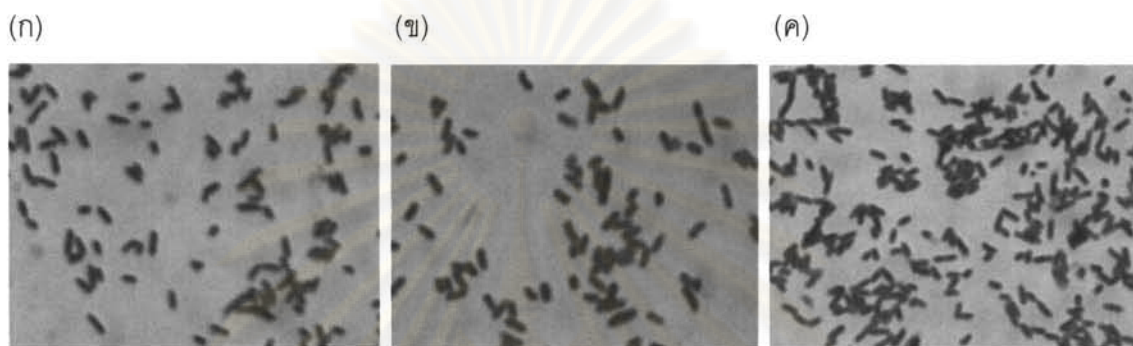
##### 4.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub> จากข้อ 4.4.1 และรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> จากข้อ 4.4.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และเตรียมเป็นหัวเชื้อ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.5.1.2

##### 4.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกเบื้องต้นของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub>

ตรวจสอบการแสดงออกเบื้องต้นโดยนำหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.5.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% ต่อปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 จึงเติมน้ำตาลอะราบิโนส 0.2% ซึ่งกระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ araBAD ดังอธิบายทฤษฎีในข้อ 2.8 จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่ 0

24 และ 48 มาตรวตรวจสอบผลการผลิต PHA ในเบื้องต้น โดยการย้อมแกรม (Jung และคณะ, 2005) ผลแสดงดังรูปที่ 4.17 วัดการเจริญเติบโตโดยคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของ PHA ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี โดยทำปฏิกิริยาเมทิลเอสเตอร์ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 (ผลแสดงในตารางที่ 4.1) และมีสภาวะของก๊าซโครมาโตกราฟี ตามข้อ 3.13.2



รูปที่ 4.17 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub> ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า โดยเลี้ยงเป็นเวลา 24 (ก) และ 48 (ข) ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ค)

จากผลการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลที่นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ที่ผลิตได้ โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub> ไม่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ เนื่องจากลักษณะของเซลล์ที่เห็นภายหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูป 4.17 ก) และ 48 ชั่วโมง (รูป 4.17 ข) ซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับชุดควบคุมผลลบ (รูป 4.17 ค) ผลการวิเคราะห์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (แสดงดังตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3HB พบว่าไม่มีพีคของ PHA เกิดขึ้น (แสดงดังรูปที่ 4.18)

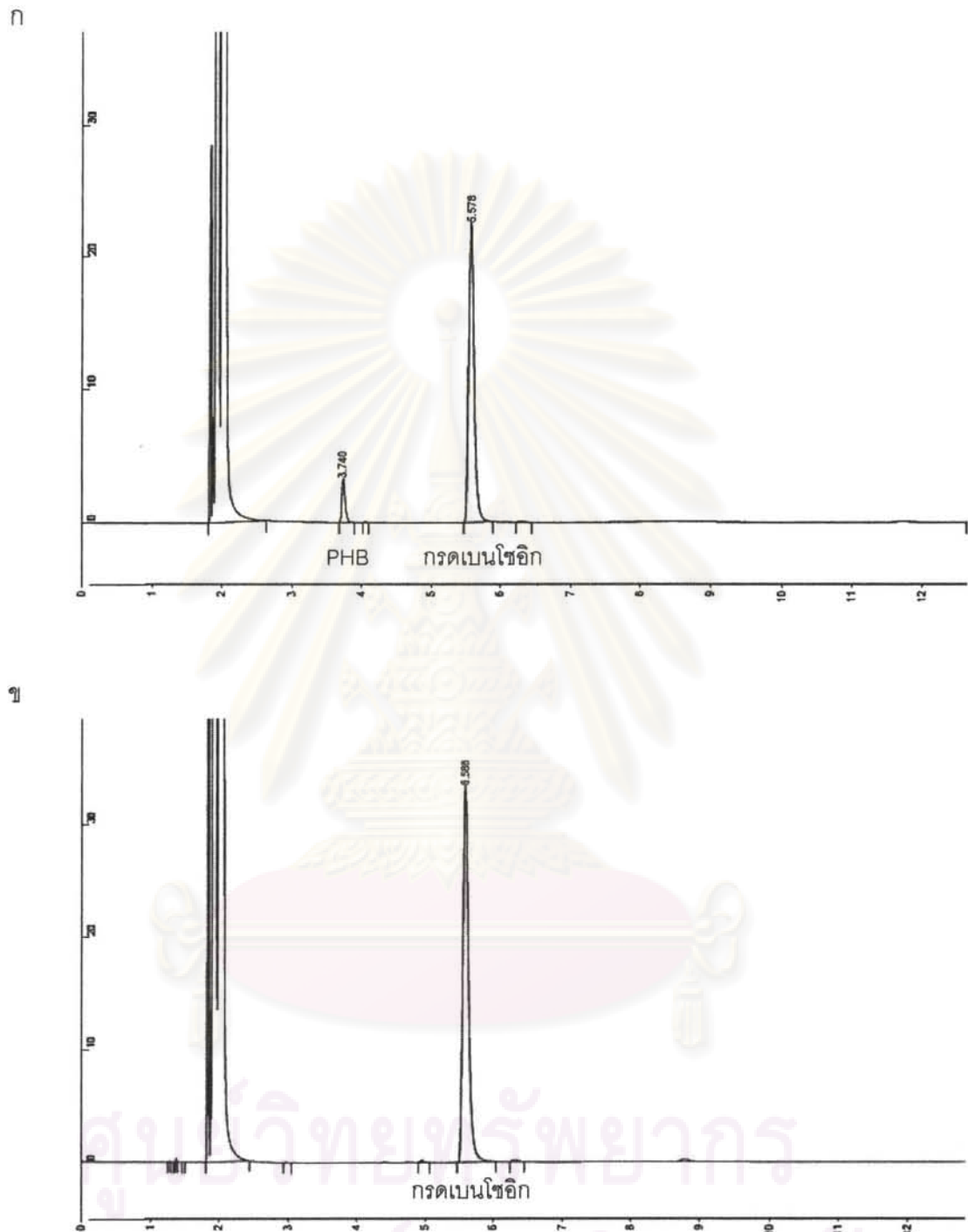
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
0	0.52	0	0
24	1.41	0	0
48	1.65	0	0

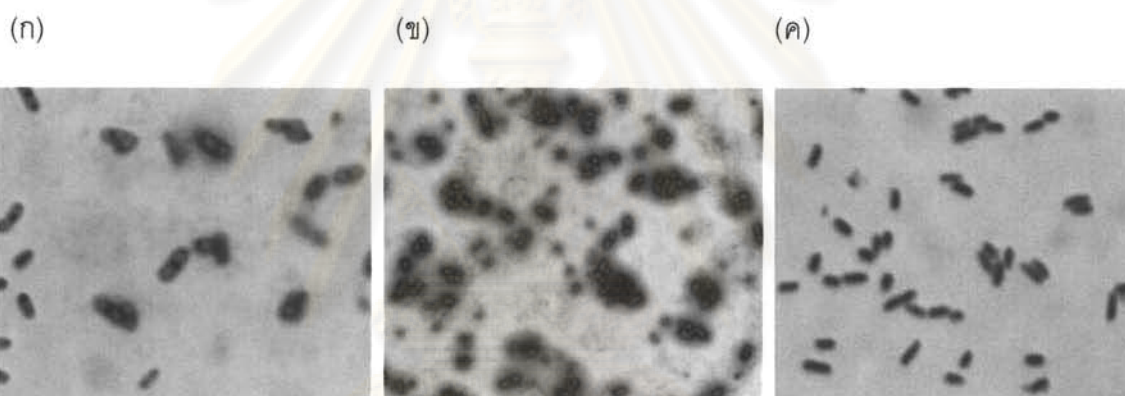
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี จากปฏิกิริยาเมทิลเอสเตอร์ โดยรูป ก แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB ปริมาณ 1 กรัม ต่อลิตร และรูป ข แสดงโครมาโตแกรมของสารที่สกัดได้จากกรีกอมมิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaC<sub>A04</sub> โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

#### 4.5.3 การตรวจสอบการแสดงออกเบื้องต้นของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub>

สำหรับขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ การเลี้ยงเชื้อ และการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเบื้องต้น ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.5.2 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 24 และ 48 มาตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนในเบื้องต้น โดยนำไปย้อมแกรม (Jung และคณะ, 2005) ผลแสดงดังรูปที่ 4.19 วัดการเจริญเติบโตโดยคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี โดยทำปฏิกิริยามีทิลเอสเตอร์ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 (ผลแสดงในตารางที่ 4.2) และมีสภาวะของก๊าซโครมาโตกราฟี ตามข้อ 3.13.2



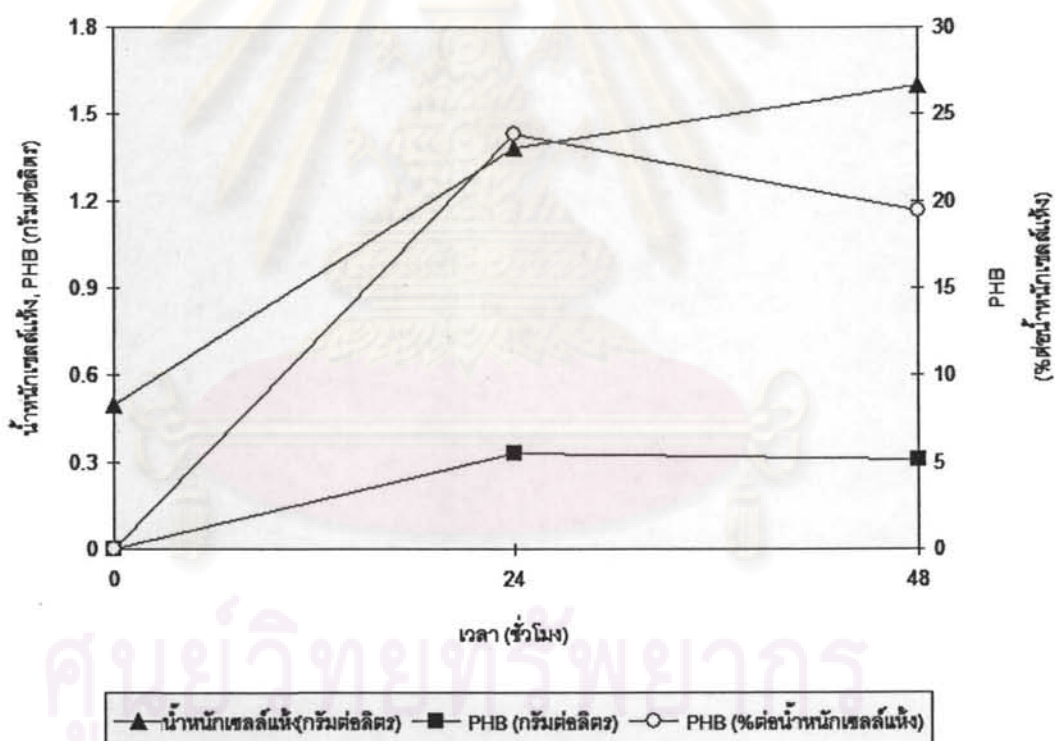
รูปที่ 4.19 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า โดยเลี้ยงเป็นเวลา 24 (ก) และ 48 (ข) ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรโมเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ค)

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
0	0.5	0	0
24	1.38	0.33	23.88
48	1.6	0.31	19.44

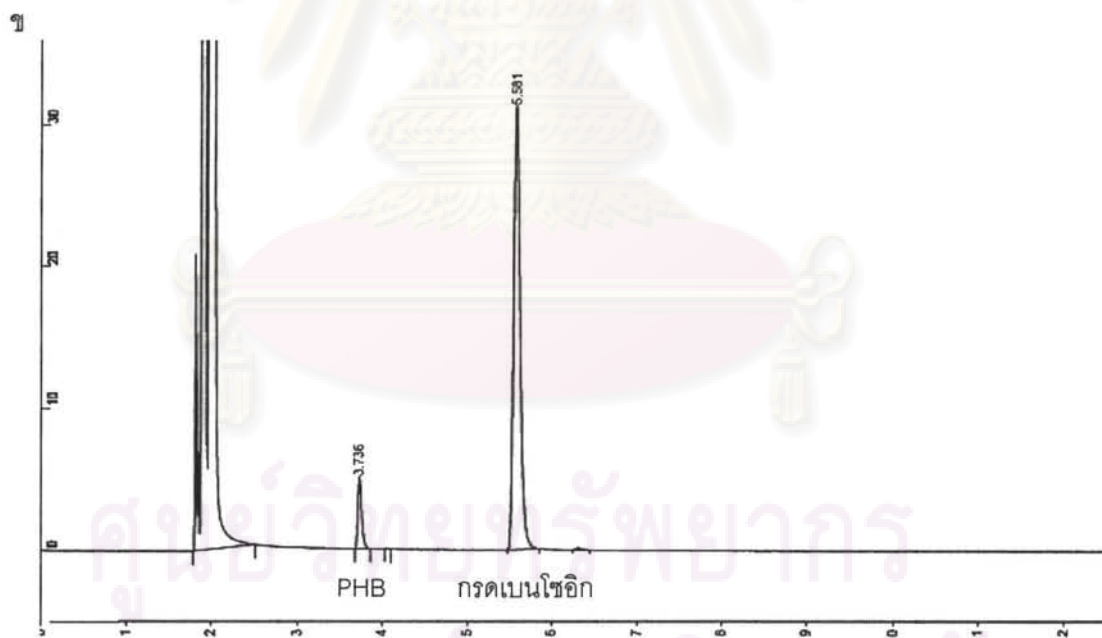
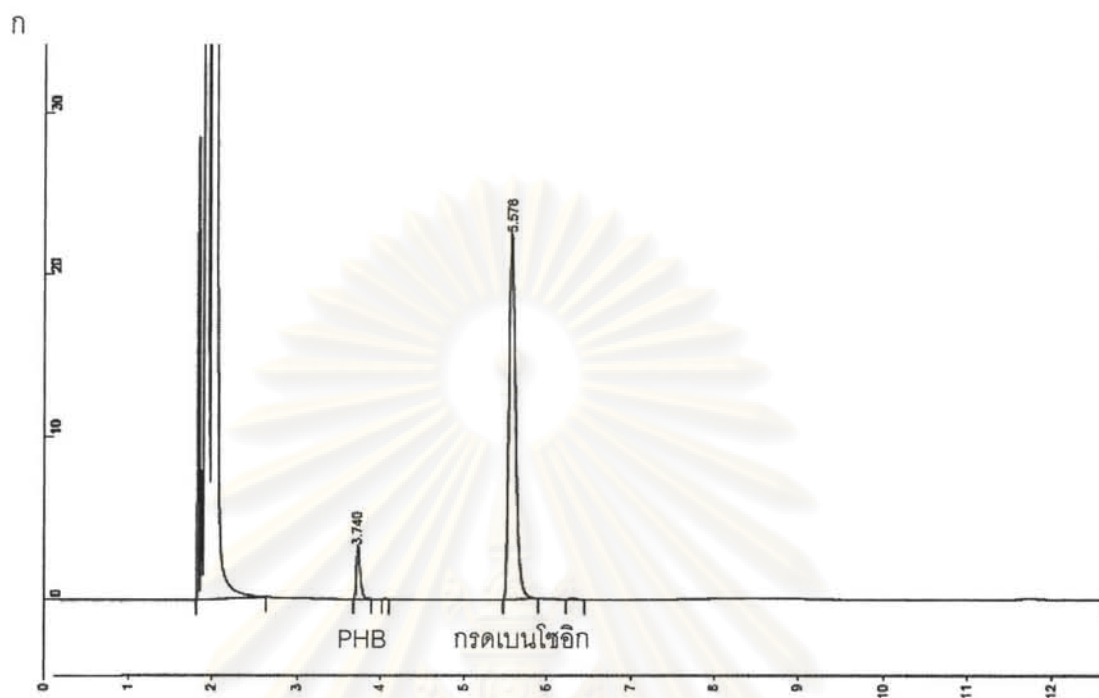


รูปที่ 4.20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

จากผลการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ เนื่องจากลักษณะของเซลล์ที่สังเกตเห็น พบแกรนูลซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ติดสีอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูป 4.19 ก) และ 48 ชั่วโมง (รูป 4.19 ข) ภายหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างกับชุดควบคุมผลลบ (รูป 4.19 ค) ผลการวิเคราะห์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB (แสดงดังรูปที่ 4.21) พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 23.88% และ 19.44% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.20)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี จากปฏิกิริยาเมทิลเอสเตอร์ โดยรูป ก แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB ปริมาณ 1 กรัม ต่อลิตร และรูป ข แสดงโครมาโตแกรมของสารที่สกัดได้จากกรีกอมมิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.2% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง



#### 4.6 การแปรผันปัจจัยต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

นำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ จากข้อ 4.5.3 มาเลี้ยงเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต PHB ดังนี้

##### 4.6.1 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การคัดเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของโปรตีน (Ren และคณะ, 2009) ในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 4 ชนิด คือ อาหาร LB อาหาร SB อาหาร 2YT และอาหาร TB เนื่องจากมีรายงานการศึกษาในการเปรียบเทียบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ (Ren และคณะ, 2009) ขั้นตอนการเลี้ยงและการกระตุ้นการแสดงออกได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.14.2 การเลือกชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> วิเคราะห์จากการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) และคำนวณเป็น %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการเปรียบเทียบแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.22

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.3 ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.3 ข) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ตารางที่ 4.3 ค) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร LB 2YT SB และ TB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.02% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

ก

อาหาร เวลา(ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	LB	2YT	SB	TB
0	1.42	1.47	1.63	1.51
6	2.37	2.30	3.14	3.24
12	2.41	2.86	3.24	4.3
18	2.48	3.72	3.08	4.64
24	2.70	3.80	4.20	5.72
30	2.74	3.64	4.66	5.70
36	2.68	4.11	4.14	6.40
42	2.56	4.08	4.78	6.88
48	2.48	4.34	5.76	7.60

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

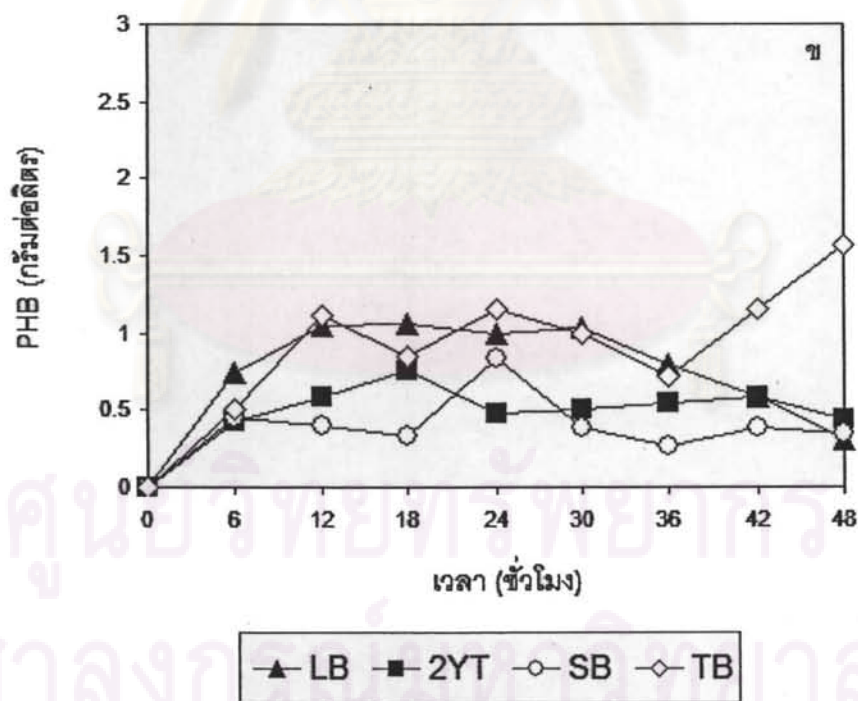
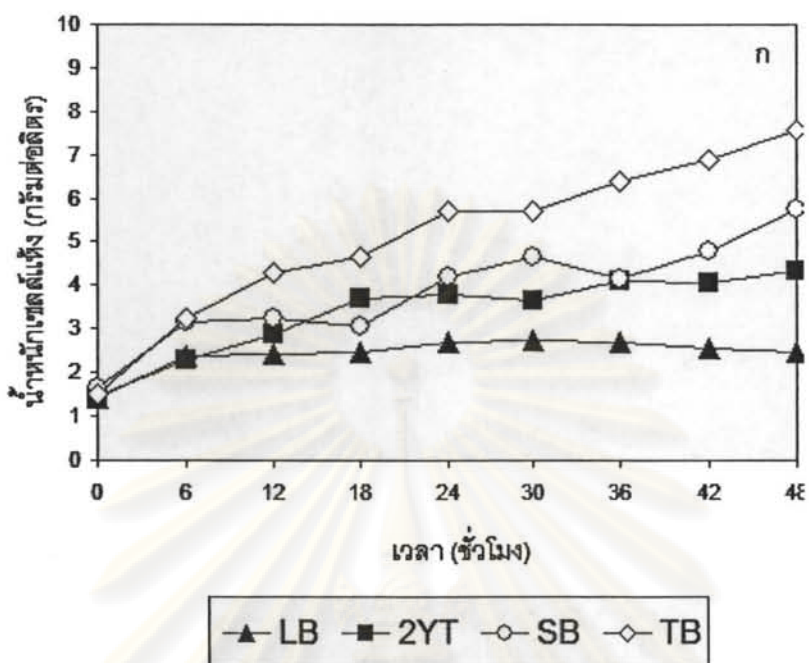
ข

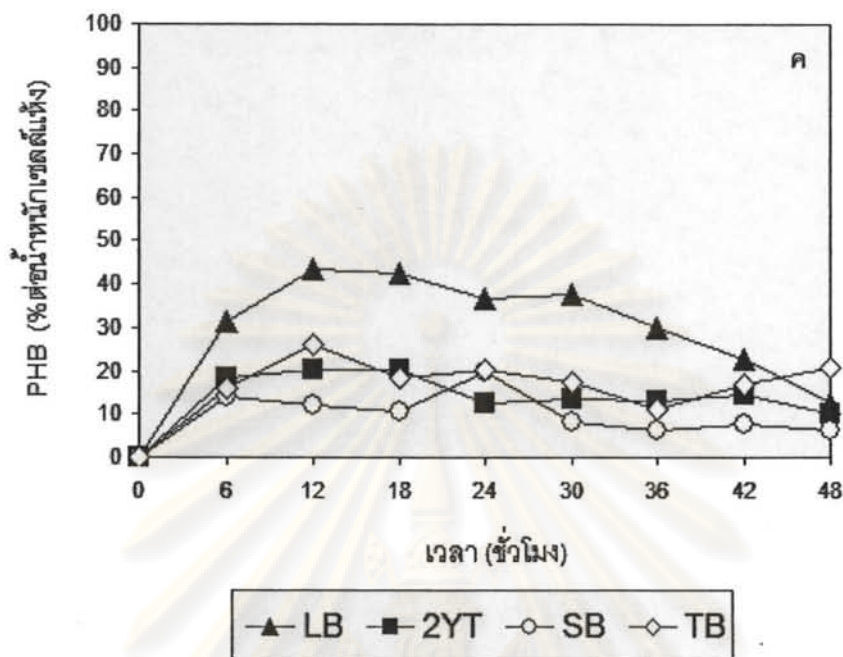
		PHB (กรัมต่อลิตร)			
อาหาร เวลา(ชั่วโมง)	LB	2YT	SB	TB	
0	0	0	0	0	
6	0.74	0.42	0.45	0.51	
12	1.05	0.59	0.40	1.12	
18	1.06	0.76	0.33	0.85	
24	0.99	0.48	0.83	1.16	
30	1.04	0.50	0.39	1.00	
36	0.80	0.54	0.26	0.72	
42	0.59	0.59	0.38	1.16	
48	0.31	0.44	0.35	1.57	

ค

		PHB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)			
อาหาร เวลา(ชั่วโมง)	LB	2YT	SB	TB	
0	0	0	0	0	
6	31.25	18.26	14.22	15.85	
12	43.54	20.47	12.26	25.96	
18	42.65	20.41	10.66	18.36	
24	36.50	12.76	19.83	20.24	
30	37.81	13.71	8.37	17.46	
36	30.02	13.14	6.26	11.19	
42	22.92	14.53	7.94	16.87	
48	12.65	10.25	6.06	20.66	







รูปที่ 4.22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ข) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ค) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร LB 2YT SB และ TB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.02% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

ผลการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร LB 2YT SB และ TB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อาหาร TB ให้การเจริญเติบโตและปริมาณ PHB สูงที่สุด คือ 7.6 และ 1.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.22 ก และ ข และตารางที่ 4.3 ก และ ข) แต่เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิต PHB โดยคิดเป็นสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.22 ค และตารางที่ 4.3 ค) พบว่า เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 43.54% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าอาหารชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกอาหาร LB มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.6.2 การแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนส

เนื่องจาก Ogden และคณะ (1980) รายงานว่าระดับการแสดงออกของยีนที่สอดแทรกอยู่ในเวกเตอร์แสดงออก pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลอะราบิโนส ดังนั้นในการทดลองนี้แปรผันระดับความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนสเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยแปรผันน้ำตาลอะราบิโนส 5 ระดับความเข้มข้น ทั้งนี้กำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.002% 0.02% 0.2% 0.5% และ 2% ตามลำดับ ซึ่งขั้นตอนการเลี้ยงและการกระตุ้นการแสดงออก ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.14.3 การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> วิเคราะห์จากการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) ผลการเปรียบเทียบแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.23

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.4 ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.4 ข) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ตารางที่ 4.4 ค) จากการแปรรูปน้ำตาลอะราบิโนสทั้งหมด 5 ความเข้มข้น เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มี พลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร LB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วยการ เติมน้ำตาลอะราบิโนสที่เวลา 0 ชั่วโมง

ก

		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
		0.002	0.02	0.2	0.5	2
เวลา(ชั่วโมง)	ความเข้มข้น(%)					
0		1.30	1.42	1.90	1.71	1.84
6		2.97	3.02	3.90	3.98	3.88
12		3.45	3.37	4.04	4.16	4.32
18		3.60	3.84	4.46	4.26	4.20
24		3.94	4.17	4.77	4.60	4.28
30		3.81	3.96	4.34	4.34	4.40
36		3.73	3.74	4.41	4.30	4.32
42		4.01	4.04	4.54	4.14	4.21
48		3.59	3.91	4.32	4.30	4.36

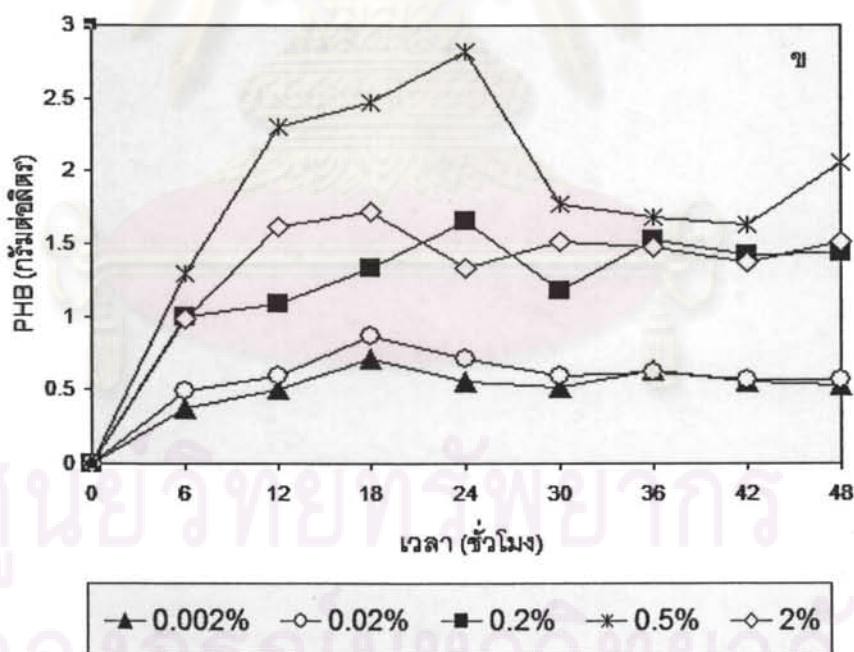
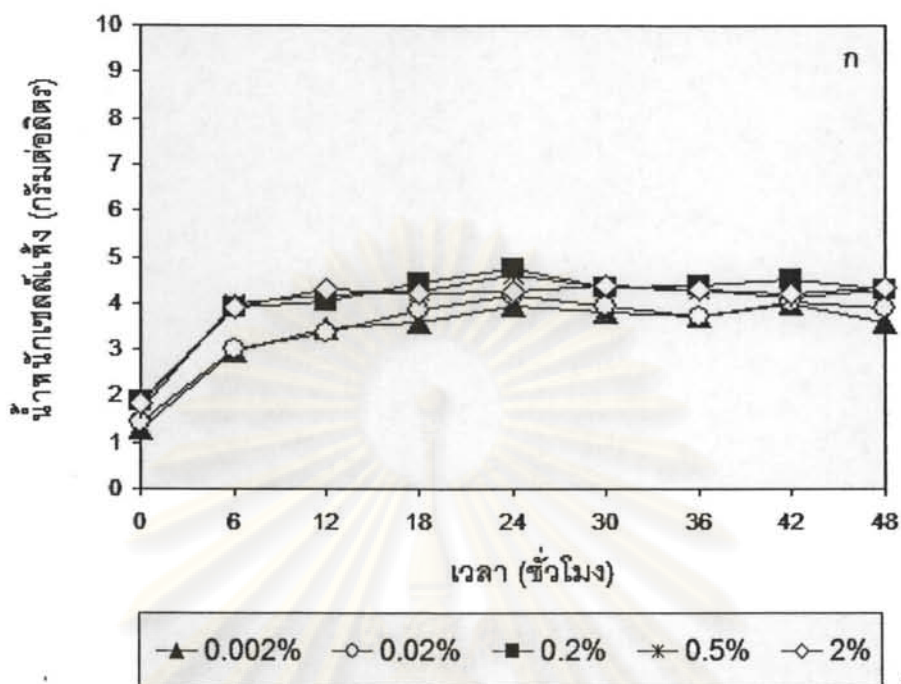
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข

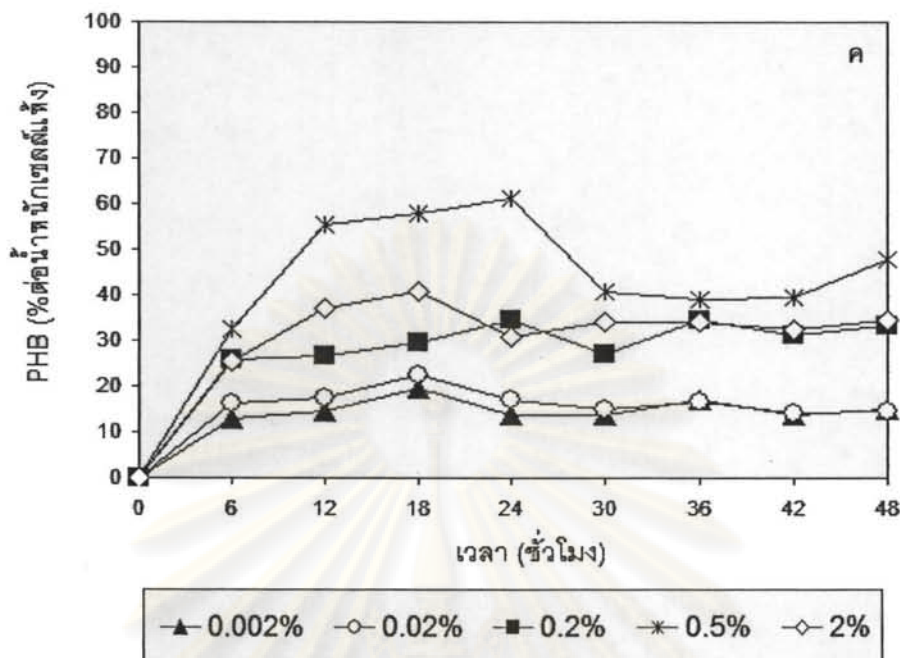
		PHB (กรัมต่อลิตร)				
เวลา(ชั่วโมง)	ความเข้มข้น(%)	0.002	0.02	0.2	0.5	2
	0		0	0	0	0
6		0.38	0.49	1.00	1.29	0.98
12		0.50	0.59	1.08	2.30	1.61
18		0.71	0.87	1.33	2.47	1.72
24		0.55	0.71	1.66	2.82	1.33
30		0.52	0.59	1.18	1.77	1.51
36		0.63	0.62	1.53	1.68	1.47
42		0.56	0.57	1.42	1.63	1.37
48		0.53	0.57	1.44	2.06	1.51

ค

		PHB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)				
เวลา(ชั่วโมง)	ความเข้มข้น(%)	0.002	0.02	0.2	0.5	2
	0		0	0	0	0
6		12.75	16.21	25.72	32.45	25.25
12		14.49	17.51	26.61	55.31	37.27
18		19.61	22.67	29.74	58.07	41.00
24		13.85	17.09	34.73	61.21	31.02
30		13.76	15.01	27.19	40.79	34.30
36		17.00	16.52	34.65	39.14	34.09
42		13.84	14.17	31.28	39.45	32.49
48		14.88	14.61	33.44	47.98	34.54







รูปที่ 4.23 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ข) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ค) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นด้วยน้ำตาลอะราบิโนส 0.002 0.02 0.2 0.5 และ 2% ที่เวลา 0 ชั่วโมง

ผลการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการแปรผันน้ำตาลอะราบิโนสทั้งหมด 5 ความเข้มข้น พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (รูปที่ 4.23 ก และตารางที่ 4.4 ก) เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิต PHB (รูปที่ 4.23 ข และ ค และตารางที่ 4.4 ข และ ค) พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลอะราบิโนส 0.5% ให้ปริมาณ PHB และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุด 2.82 กรัมต่อลิตร และ 61.21% ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ PHB และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ 0.002% จนถึง 0.5% มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆตามความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนสที่เพิ่มขึ้น

#### 4.6.3 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

การทดลองนี้แปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 3 ระดับ คือ  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFU ต่อ มิลลิลิตร (Colony Forming Unit, CFU) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารผลิตภัณฑ์เมื่อมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของโปรตีนและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ (Jung และคณะ, 2005) ซึ่งขั้นตอนการเลี้ยงและการกระตุ้นการแสดงออก ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.14.4 การคัดเลือกปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> วิเคราะห์จากการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%) เมื่อแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ผลการเปรียบเทียบแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.24



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.5 ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.5 ข) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ตารางที่ 4.5 ค) จากการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 1% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง หมายเหตุ (A) หมายถึง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร (B) หมายถึง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $3.2 \times 10^9$  CFUต่อมิลลิลิตร และ (C) หมายถึง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร

ก

		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
		A	B	C
เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ (CFUต่อมิลลิลิตร)			
	0	2.40	3.30	4.18
	6	4.98	6.77	7.74
	12	5.46	7.04	8.12
	18	5.90	7.28	8.66
	24	6.11	7.79	9.18
	30	6.02	7.83	8.79
	36	5.94	7.51	8.84
	42	5.82	7.44	8.82
	48	5.90	7.48	8.22

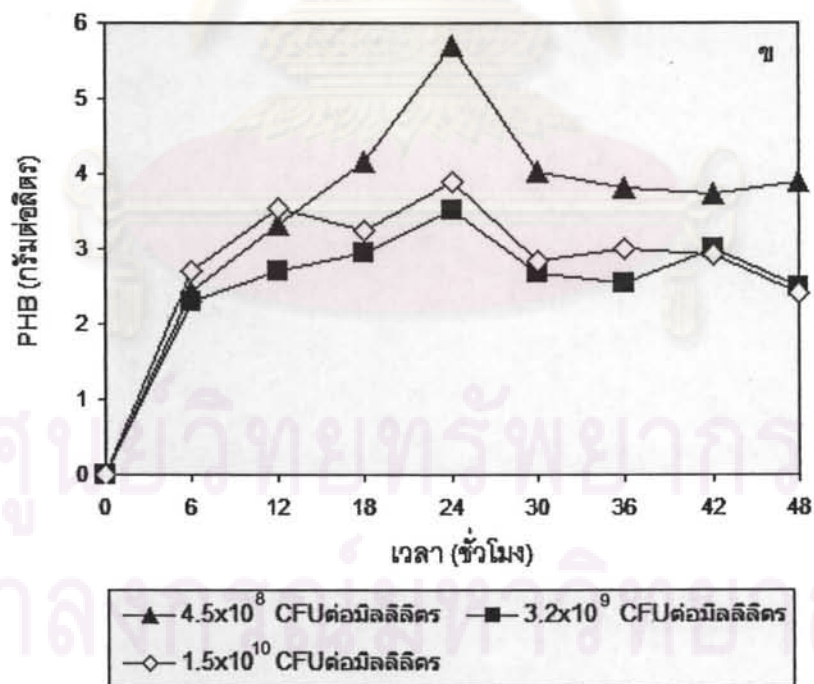
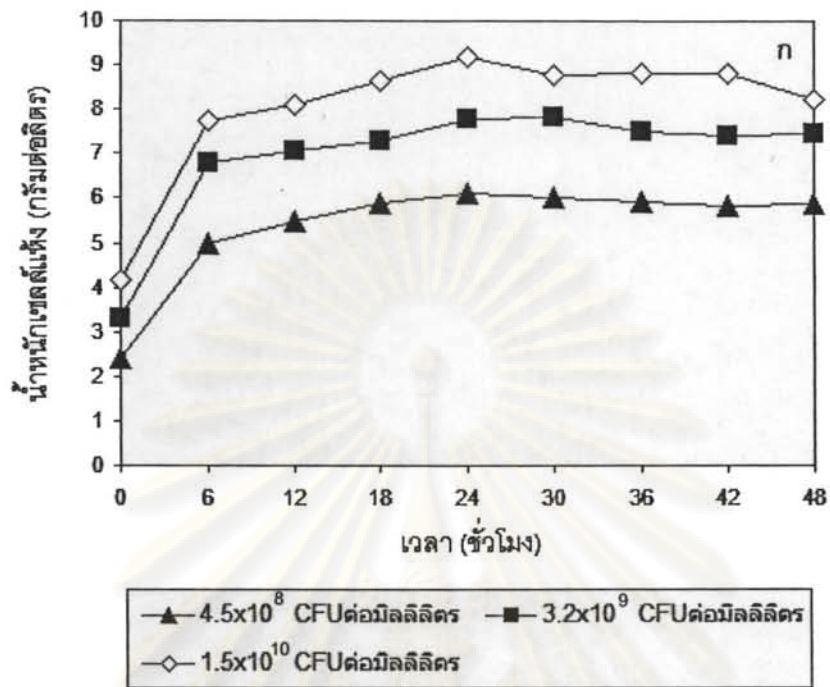


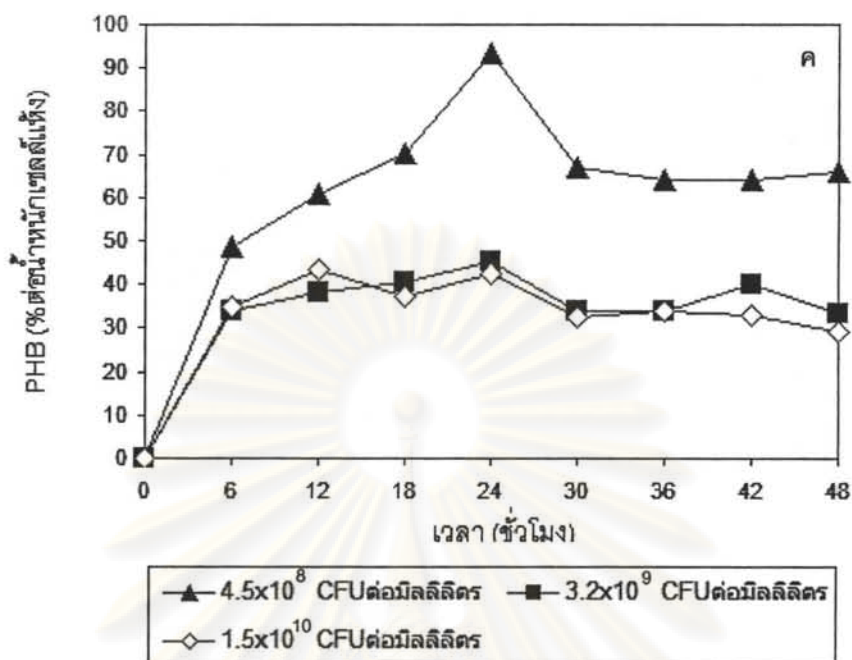
ข

		PHB (กรัมต่อลิตร)		
เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ (CFUต่อมิลลิลิตร)	A	B	C
		0	0	0
6		2.43	2.31	2.71
12		3.33	2.69	3.53
18		4.15	2.95	3.24
24		5.70	3.52	3.88
30		4.02	2.67	2.85
36		3.82	2.54	2.99
42		3.72	2.99	2.93
48		3.89	2.50	2.40

ค

		PHB (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)		
เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ (CFUต่อมิลลิลิตร)	A	B	C
		0	0	0
6		48.72	34.14	35.05
12		60.96	38.20	43.43
18		70.33	40.57	37.41
24		93.30	45.18	42.24
30		66.78	34.12	32.37
36		64.37	33.76	33.82
42		63.96	40.18	33.24
48		65.88	33.48	29.25





รูปที่ 4.24 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ก) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) (ข) และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%) (ค) จากการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกระตุ้นการแสดงออกด้วย 1% อะราบิโนส ที่ 0 ชั่วโมง

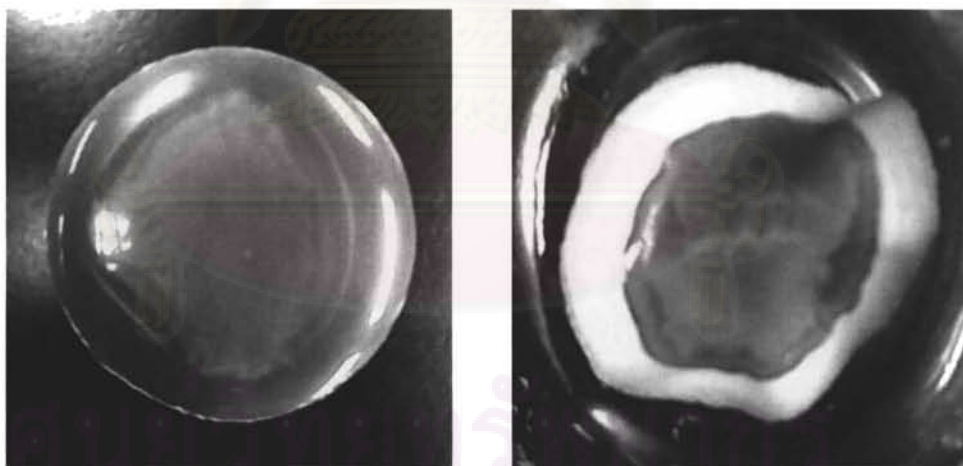
ผลการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$   $3.2 \times 10^9$  และ  $1.5 \times 10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการทดลองภายหลังจากเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็นต้นไป (รูปที่ 4.24 ก และ ตารางที่ 4.5 ก) มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อพิจารณาปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (รูปที่ 4.24 ข และ ค และตารางที่ 4.5 ข และ ค) พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร เหมาะสมในการผลิต PHB เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.11 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB 5.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 93.3% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสัดส่วนของการผลิต PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุดในการศึกษาครั้งนี้



#### 4.7 การสกัด PHB จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

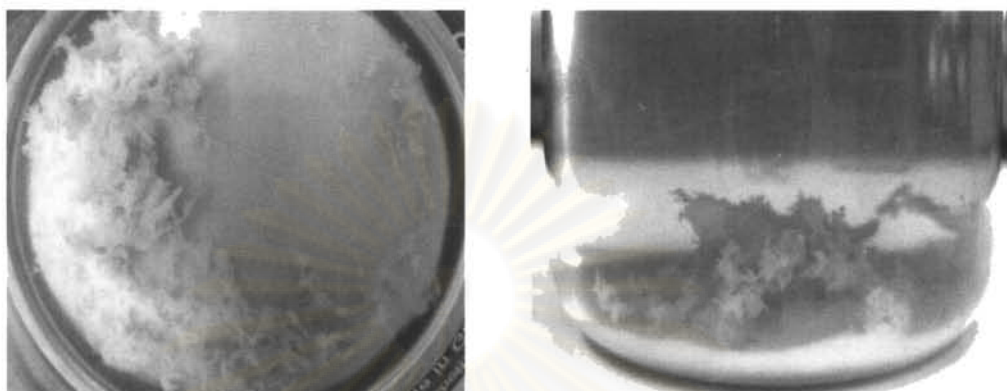
เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด PHA จากเซลล์จุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี และมีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารผลิตภัณฑ์อีกครั้งโดยการตกตะกอนในเฮกเซน (สุชาติา จันทรประทีป, 2539 อ้างถึงใน Brandl และคณะ, 1990; Doi, 1996) จากการทดลองที่ 4.6.3 เมื่อได้สัดส่วน PHB สูงสุด 93.3% จึงได้สกัด PHB ออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.13.3 เมื่อสกัด PHB จากเซลล์แห้งของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> โดยวิธีนี้จะมีลักษณะของแผ่นฟิล์ม PHB ดังแสดงในรูป 4.25 ก พบว่า แผ่นฟิล์มที่ได้มีส่วนอื่นของเซลล์ติดมาด้วย ดังนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบโดยละลายแผ่นฟิล์มในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80°ซ นำมาตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะพบว่ามี การตกตะกอนในเฮกเซนและ PHB ที่ได้มีลักษณะขาวขึ้น (แสดงดังรูปที่ 4.25 ข) ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายด้านบนใส เทและระเหยเฮกเซนออกให้หมด โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ของ PHB ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว (แสดงดังรูปที่ 4.25 ค)

ก



รูปที่ 4.25 การสกัด PHB ออกจากเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> โดยการใช้คลอโรฟอร์ม (ก) และลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน (ข และ ค ตามลำดับ)

ข



ค



รูปที่ 4.25 การสกัด PHB ออกจากเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> โดยการใช้คลอโรฟอร์ม (ก) และลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน (ข และ ค ตามลำดับ) (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์ของ PHB จากงานวิจัยนี้ จะถูกนำไปศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกลต่อไปในอนาคต ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* มีความสามารถในการผลิต PHB ในปริมาณที่มากพอต่อการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มและมีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการนำไปพัฒนาและปรับปรุงภาวะการผลิตให้มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีขึ้น

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHA โดยการใช้เทคนิคการโคลนยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้ ลงในจุลินทรีย์ *E. coli* เป็นเหตุให้มีการพัฒนาการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น (Lee, 1996; Lee และ Choi, 1998; Choi และคณะ, 1998; Ahn และคณะ, 2000; Jung และคณะ, 2005; Agus และคณะ, 2006; Kang และคณะ, 2008) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษา โคลนและแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *E. coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHA

จากการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าว มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 มากที่สุด 99% (Pohlmann และคณะ, 2006) ซึ่งประกอบด้วย 3 กรอบการเปิดอ่าน คือ ยีน *phaC* ยีน *phaA* และยีน *phaB* ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 กับ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 ที่รายงานโดย Schubert และคณะ (1991) พบว่าบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิด ซึ่งประกอบด้วย CAAT Box มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TTGACA และ TATA Box มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AACAAAT และบริเวณที่คาดว่าเป็นบริเวณเชื่อมต่อกับไรโบโซม (ribosome binding site) มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AGAGAGA ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีนทั้ง 3 ชนิด โดยใช้โปรแกรม BLASTx พบว่ามีกรดอะมิโนต่างกัน 1 ตำแหน่ง จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่า *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการรายงานการศึกษาอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความสามารถในการผลิต PHA ในปริมาณที่สูงถึง 70-80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Peoples และ Sinskey, 1989 ; Pohlmann และคณะ, 2006)

ผลการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* และทดสอบการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์ PHB เบื้องต้น พบว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-*phaC*<sub>A04</sub> ซึ่งมีชิ้นส่วนของยีน *phaC* เพียงยีนเดียว ไม่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ เนื่องจากลักษณะของเซลล์ที่เห็นหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกับชุดควบคุมผลลบ และยีนย่นผลที่ได้จากการวิเคราะห์



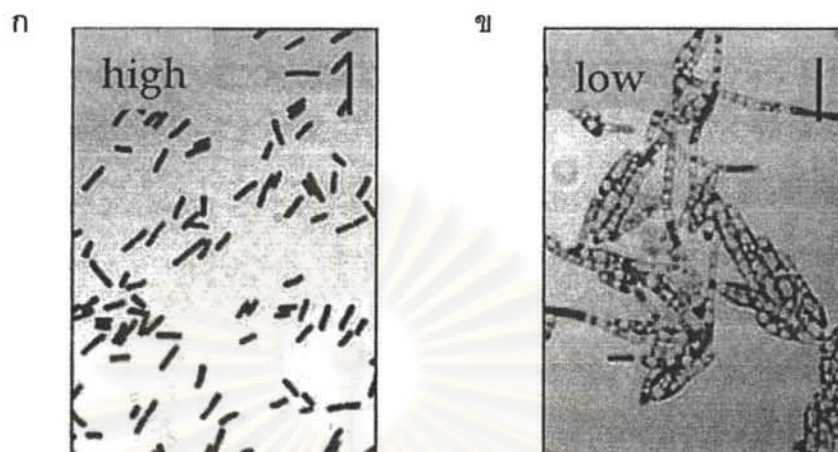
โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีซึ่งไม่มีพีคของ PHB เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน โดยให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Peoples และคณะ (1989) พบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pAeT42 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *phaC* เพียงยีนเดียว ไม่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้เนื่องจากค่าแอกติวิตีของโปรตีนในการสังเคราะห์ PHA มีค่าน้อยมากประมาณ 0.011 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ไม่สามารถสังเคราะห์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิล โคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ PHA ได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์เบต้าคีโตไทโอเลส และเอนไซม์อะซีโตอะเซทิลโคเอริคเทสที่ประมวลผลจากยีน *phaA* และ ยีน *phaB* ตามลำดับ ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์ PHB จึงคาดว่าเอนไซม์ที่ประมวลผลจากยีนทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์ร่วมกันในการสังเคราะห์ PHB (Peoples และคณะ, 1989)

จากงานวิจัยของ Ren และคณะ (2009) รายงานว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้านและการผลิตโปรตีนจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* พบว่าอาหาร 3 ชนิด (LB 2YT และ TB) มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน และเมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหาร TB จะให้ค่าการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารชนิดอื่น และเหมาะสมต่อการแสดงออกของพิวชั่นโปรตีน pEXP-hCRs ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ C41 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็น 4 ชนิดด้วยกัน คือ อาหาร LB SB 2YT และ TB พบว่า เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-*phaCAB*<sub>A04</sub> ในอาหาร TB ให้ค่าการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารชนิดอื่น และมีปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 25.96% ซึ่งน้อยกว่าอาหาร LB ที่สามารถผลิต PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด 43.54% ดังนั้นอาหาร TB จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป อาจมีสาเหตุเนื่องจากอาหาร TB มีส่วนประกอบของสารสกัดจากยีสต์ และทริปโตเนน ในปริมาณที่มากกว่าอาหารชนิดอื่น และมีการเติมกลีเซอรอลลงไป 0.4% ปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการแตกของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการเติมฟอสเฟตฟิฟเฟอริจทำให้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว เนื่องจากการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้นอาจเป็นสาเหตุให้มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้นในปริมาณมากจนเกิดเป็นอินคลูชัน บอดี้ (inclusion bodies) ทำให้โปรตีนเกิดการพับตัวผิดโครงสร้างและสูญเสียแอกติวิตี ซึ่งมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ PHB (Agus และคณะ, 2006; Ren และคณะ, 2009) ดังนั้น PHB ที่ผลิตได้อาจมีค่าน้อยลง

งานวิจัยของ Agus และคณะ (2006) รายงานว่าระดับการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ซึ่งมียีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* สายพันธุ์ H16 สามารถควบคุมการแสดงออกได้จากปริมาณสารเหนี่ยวนำ ไอโซโพรพิล-β-D-ไทโอไกลาแลคโตไพราโนไซด์ (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยแปรผันปริมาณที่ใส่ให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTrcphaCAB<sub>Re</sub> (พลาสมิดแบบ high copy number) มีระดับการผลิต PHB สูงขึ้นตามความเข้มข้นของ IPTG ที่เติมลงไปจนถึง 0.1 มิลลิโมลาร์ และไม่สามารถผลิตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเป็น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองนี้น้ำตาลอะราบิโนสเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์แสดงออก ดังนั้นระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจึงมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน จากผลการทดลองพบว่า ค่า PHB ที่ผลิตได้ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ 0.002% จนถึง 0.5% มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลอะราบิโนสที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มจนถึง 2% ค่าการผลิต PHB มีค่าลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> สามารถแสดงออกเกิน (over expression) ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในรูปของอินคลูชัน บอดี้ เหมือนกับการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเจริญเติบโตในปริมาณสูง ซึ่งมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ PHB (Agus และคณะ, 2006) ดังนั้นการเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมจะทำให้ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้มีค่าสูงสุด

Jung และคณะ (2005) รายงานว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* มีความสามารถในการผลิต PHB สูงถึง 99% เมื่อเลี้ยงในอาหาร 2xLB และมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นน้อย (โดยที่ปริมาณหัวเชื้อมากหรือน้อยนั้น อาจเปรียบเทียบได้กับการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งในบริเวณที่มีโคโลนีหนาแน่นและไม่หนาแน่นตามลำดับ) ซึ่งเห็นได้ชัดจากผลการย้อมแกรมด้วยสีคริสตัล ไวโอเลต และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 x 10 เท่า (แสดงดังรูปที่ 5.1) เพื่อดูลักษณะของเซลล์บริเวณที่มีจุลินทรีย์หนาแน่นกับบริเวณที่มีจุลินทรีย์ไม่หนาแน่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่าภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่อยู่แบบไม่หนาแน่น มีการสร้างแกรนูลอยู่ภายในเซลล์หลายอัน (รูปที่ 5.1 ก) แต่ไม่พบแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่แบบหนาแน่น (รูปที่ 5.1 ข)





รูปที่ 5.1 ภาพย้อมแกรมแสดงลักษณะเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ PHA จาก *R. eutropha* ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 100 x 10 เท่า โดยภาพ ก แสดงบริเวณของรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มีการเจริญเติบโตแบบหนาแน่น และ ภาพ ข แสดงบริเวณของรีคอมบิแนนท์ *E.coli* ที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่หนาแน่น หมายถึงขีดแสดงขนาด 5 ไมโครเมตร

ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลอย่างหนึ่งในการสนับสนุนว่าการใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่างกัน จะมีผลต่อการสะสม PHB ภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต PHB จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อนำมาสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปทดสอบลักษณะทางกายภาพอื่นๆต่อไป โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 3 ระดับ และให้ปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสมากเกินพอ พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น  $4.5 \times 10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร เหมาะสมในการผลิต PHB เนื่องจากได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.11 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB 5.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 93.3% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมากขึ้นทำให้ค่าการผลิต PHB น้อยลงอาจมีสาเหตุเช่นเดียวกับการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> ในอาหาร TB เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตในปริมาณสูงอาจเป็นสาเหตุให้มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้นในปริมาณมากทำให้โปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในรูปของอินคลูชัน บอดี้ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการผลิต PHB (Agus และคณะ, 2006; Ren และคณะ, 2009)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBAD-phaCAB<sub>A04</sub> จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่า



การทดสอบประสิทธิภาพการผลิต PHB ในระดับขวดเย้าของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่โคลนได้ มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ใกล้เคียงหรือสูงกว่างานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาในระดับถังหมัก (แสดงในตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ

จุลินทรีย์	เวกเตอร์	ยีนที่ประมวล รหัสชื่อ สังเคราะห์ PHA	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ PHB (%)	อ้างอิง
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ GCSC 6576	pSYL107	<i>R. eutropha</i>	6.4	5.2	81%	Lee และคณะ (1997)
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ XL1-Blue	pJC4	<i>A. latus</i>	194.1	141.6	73%	Choi และ คณะ (1998)
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ GCSC 6576	pSYL107	<i>R. eutropha</i>	31	25	80%	Kim (2000)
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ K24K	pJP24K	<i>Azotobacter</i> sp. สายพันธุ์ FA8	70.1	51.1	72.9%	Nikel และ คณะ (2006)
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ TOP10	pBAD- phaCAB <sub>A04</sub>	<i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04	6.11	5.7	93.3%	ในการศึกษานี้
<i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04			6.8	5.3	78%	Chanprateep และคณะ (2008)

งานวิจัยนี้ สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 โคลนและแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตใน *E. coli* เพื่อให้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ต้นแบบ และสามารถนำโคลนที่ได้จากการทดลองนี้ เพิ่มระดับการผลิตในระดับที่สูงขึ้นต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

รังสรรค์ ปิ่นทอง และสาวิตรี นิชานนท์. 2536. ประโยชน์และโทษของพลาสติก. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพมหานคร : กรมควบคุมมลพิษ.

ไพศาล นาคพิพัฒน์. 2539. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 28. ขยะพลาสติก [ออนไลน์].

แหล่งที่มา : <http://guru.sanook.com/encyclopedia/ขยะพลาสติก> [27 มกราคม 2553]

ชนัญ ผลประไพ. 2537. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิ บิต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต จาก *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในระดับถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุชาดา จันทร์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซี วาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สารานุกรมเสรี. 2548. พลาสติก [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://th.wikipedia.org/wiki/พลาสติก> [2 กุมภาพันธ์ 2553]

อัญชญา ศุทธิขจร. 2537. การสร้างโพลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดย *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Aamer, A.S., Fariha, H., Abdul, H., and Safia, A., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. Biotechnol Adv 26 : 246–265.

Ahn, W.S., PARK, S.J., and Lee, S.Y., 2000. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution. Appl Environ Microbiol 66 : 3624–3627.

Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev 54 : 450-472.

Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y., and Tsuge, T., 2006. Altered expression of polyhydroxyalkanoate synthase gene and its effect on poly[(R)-3-



- hydroxybutyrate] synthesis in recombinant *Escherichia coli*. Polym Degrad Stab 91 : 1645-1650.
- Ballard, D.G.H., Holmes, P.A., and Snior, P.J., 1987. Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cell and a comparison of the morphology of growth the formation of polyethylene in the solid state. In M. Fontanille and A. Guyot (ed.), Recent advances in mechanistic and synthetic aspects of polymerization, pp. 239-314.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C., 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. Adv Biochem Eng 41 : 77-93.
- Brzostowicz, P.C., Blasko, M.S., and Rouvière, P.E., 2002. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. Appl Microbiol Biotechnol 58 : 781-789.
- Byrom, D., 1987. Polymer synthesis by microorganism; technology and economic. Tibtech 5 : 246-250.
- Chanprateep, S. and Kulpreecha, S., 2006. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. J Biosci Bioeng 101 : 51-56.
- Chanprateep, S., Yoshio, K., Hiroshi, S., Songsri, K., Sirirat, V., and Suteaki, S., 2008. Production of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by newly isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04. J Ind Microbiol Biotechnol 35 : 1205-1215.
- Chanprateep, S., Buasri, K., Visetkoop, S., Pinyakong, O., and Veeranondha, S., 2009. BioMicroWorld 2009 : International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Lisbon, Portugal.
- Chen, G.Q. and Wu, Q., 2005. Polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials 26 : 6565-6578.
- Chen, G.Q., 2009. A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. Chem Soc Rev 38 : 2434-2446.

- Chen, G.Q., 2010. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. In G.Q. Chen (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 17-37. New York : Springer Heidelberg Dordrecht London.
- Chohan, S.N. and Copeland, L., 1998. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium* (Cicer) sp. strain CC 1192. Appl Environ Microbiol 64 : 2859–2863.
- Choi, J., Lee, S.Y., and Han, K., 1998. Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 64 : 4897-4903.
- Clarival, A.M. and Halleux, J., 2005. Classification of biodegradable polymers. In: Smith R (ed.), Biodegradable polymers for industrial applications, pp. 3–56. CRC, Boca Raton.
- Comeau, Y., Hall, K., and Oldham, W., 1988. Determination of poly-hydroxybutyrate and poly-hydroxyvalerate in activated sludge by gasliquid chromatography. Appl Environ Microbiol 54 : 2325-2327.
- Derraik, J.G., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar Pollut Bull 44 : 842-852.
- Doi, Y., Kitamanea, S., and Kideki, A., 1995. Microbial Synthesis and Characterization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules 28 : 4822-4828.
- Dombrink-Kurtzman, M. A., 2008. A Gene Having Sequence Homology to Isoamyl Alcohol Oxidase Is Transcribed During Patulin Production in *Penicillium griseofulvum*. Curr Microbiol 56 : 224–228.
- Evan, D.J. and Sikdar, K.S., 1990. Biodegradable plastic. Chemtech 5 : 38-42.
- Gould, P.L., Holland, S.J., and Tighe, B.J. 1987. Polymers for biodegradable medical devices. 4-Hydroxybutyrate valerate copolymers as nondisintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms. Int J Pharm 38 : 231–237.

- Gross, R.A. and Kalra, B., 2002. Biodegradable polymers for the environment. Science 297 : 803-807.
- Gu, J.D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. Int Biodeterior Biodegrad 52 : 69–91.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. J Bacteriol 177 : 4121-4130.
- Harper, D.J. and Mc Kellar, J.F., 1972. Sensitised photodegradation of polypropylene. Chem Ind 25 : 843-848.
- Haywood, A.C., 1958. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusion in the classification of aerobic gram-negative bacteria. Proc Soc Gen Microbioa 56 : ii-iii.
- Jendrossek, D. and Handrick, R., 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annu Rev Microbiol 56 : 403-432.
- Jung, I.L., Phyo, K.H., Kim, K.C., Park, H.K., and Kim, I.G., 2005. Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli*. Res Microbiol 156 : 865-873.
- Kang, Z., Wang, Q., Zhang, H., and Qi, Q., 2008. Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. Appl Microbiol Biotechnol 79 : 203–208.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem 40 : 607–619.
- Kim, B.S., 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. Enzyme and Microbial Tech 27 : 774-777.
- Kosior, E., 2006. Lightweight Compostable Packaging : Literature Review. The Waste & Resources Action Programme [Online]. Available from : <http://www.warp.org.uk> [2010, January 29].



- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N., and Chang, Y.K., 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. J Biotechnol 32 : 203-211.
- Lee, S.Y., 1996a. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Tibtech 14 : 431-438.
- Lee, S.Y., 1996b. Review: Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol Bioeng 49 : 1-14.
- Lee, S.Y., Middelberg, A.P.J. and Lee, Y.K., 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Lett 19 : 1033-1035.
- Lee, S.Y. and Choi, J.I., 1998. Effect of fermentation performance on the economic of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. Polym Degrad Stabil 59 : 387-393.
- Lee, S.Y., Choi, J. and Wong, H.H., 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. Int J Biol Macromol 25 : 31-36.
- Li, R., Zhang, H., and Qi, Q., 2007. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. Bioresour Technol 98 : 2313-2320.
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D., and Gu, T., 1998. Production of poly-beta-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Lett 20 : 345-348.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev 63 : 21-53.
- Mittendorf, V., Robertson, E.J., Leech R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A., and Poirier, Y., 1998. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid b-oxidation. Proc Natl Acad Sci 95 : 13397-13402.
- Narayanan, N., Xu, Y., and Chou, C.P., 2006. High-Level Gene Expression for Recombinant Penicillin Acylase Production Using the *araB* Promoter System in *Escherichia coli*. Biotechnol Prog 22 : 1518-1523.

- Natsch, A., Gfeller, H., Gygax, P., Schmid, J., and Acuna, G., 2002. A Specific Bacterial Aminoacylase Cleaves Odorant Precursors Secreted in the Human Axilla. J Bio Chem 278 : 5718–5727.
- Newman, J. R. and Fuqua, C., 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. Gene 227 : 197-203.
- Nikel, P., Almeida, A., Melillo, E.C., Galvagno, M.A., and Pettinari, M.J., 2006. New Recombinant *Escherichia coli* Strain Tailored for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Agroindustrial By-Products. Appl Environ Microbiol 72 : 3949–3954.
- Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C. M., Kolodrubetz, D., and Schleif, R., 1980. The *Escherichia coli* L-Arabinose Operon: Binding Sites of the Regulatory Proteins and a Mechanism of Positive and Negative Regulation. Proc Natl Acad Sci 77 : 3346-3350.
- Ostle, A. G. and Holt, J. G., 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol 44 : 238-241.
- Peoples, O.P. and Sinskey, A.J., 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). J Biol Chem 264 : 15298-15303.
- Pohlmann, A. et al., 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. Nat Biotechnol 24 : 1257-1262.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., and Kalia, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource technol 87 : 137–146.
- Ren, H. et al., 2009. High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1. PLoS One 4 : 1-15.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.

- Schlegel, H. G., Lafferty, R., and Krauss, I., 1970. The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. Arch Microbiol 70 : 283-294.
- Schleif, R. S., 1992. DNA Looping. Ann Rev Biochem 61 : 199-223.
- Schubert, P., Kruger, N., and Steinbuchel, A., 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. J Bacteriol 173 : 168-175.
- Sheu, D.S., Wang, Y.T., and Lee, C.Y., 2000. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. Microbiology 146 : 2019–2025.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A., 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Res 23 : 1087–1088.
- Spiekermann, P., Rehm, B.H.A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., and Sheinbüchel, A., 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Arch Microbiol 171 : 73– 80.
- Steinbuchel, A. and Schlegel, H.G., 1991. Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. Mol Microbiol 5 : 535-542.
- Sudesh, K., Fukui, T., and Doi, Y., 1998. Genetic analysis of *Comamonas acidovorans* polyhydroxyalkanoate synthase and factors affecting the incorporation of 4-hydroxybutyrate monomer. Appl Environ Microbiol 64 : 3437-3443.
- Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci 25 : 1503–1555.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., and Doi, Y., 1999. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. Biotechnol Lett 21 : 579–584.



- Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., Taguchi, K., and Doi, Y., 2005. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. Macromol Biosci 5 : 112–117.
- Valentin, H.E. and Steinbüchel, A., 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. J Environ Polym Degrad 3 : 169–175.
- Valentin, H.E. and Dennis, D., 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. J Biotechnol 58 : 33–38.
- Verlinden, R.A., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., and Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. J Appl Microbiol 102 : 1437-1449.
- Xie, W.P. and Chen, G.Q., 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes phaPCJ. Biochem Eng J 38 : 384–389.
- Zheng, L.Z., Li, Z., Tian, H.L., Li, M., and Chen, G.Q., 2005. Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein: coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. FEMS Microbiol Lett 252 : 299–307.
- Zheng, Y., Yanful, E.K., and Bassi, A.S., 2005. A review of plastic waste biodegradation. Crit Rev Biotechnol 25 : 243-250.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว  $\psi$ b

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตเนน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	5	กรัม

ละลายสาร 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง  $\psi$ b

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว  $\psi$ b และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 15 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายสาร 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 15 นาที



#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุดม (rich medium)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	กรัม
ทริปโตส (tryptose)	10	กรัม

ละลายสาร 4 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรอุดม (rich medium agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุดม และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Super broth (SB)

ทริปโตน (tryptone)	32	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสาร 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT

ทริปโตเนน (tryptone)	16	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสาร 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 9. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Terrific Broth (TB)

ทริปโตเนน (tryptone)	12	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	24	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	4	มิลลิลิตร

ละลายสาร 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำอาหารไปใช้ให้เติมสารละลายผสมระหว่าง 0.17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ 0.72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

## สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

## 1. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลิน (ampicillin) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

คาร์บินิซิลลิน (carbinicillin) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายคาร์บินิซิลลิน 50 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

## 2. กลีเซอรอล 10%

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที

## 3. สารละลายน้ำตาลอะราบิโนส 20%

ละลายน้ำตาลอะราบิโนส 20 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 110°C เป็นเวลา 15 นาที

## 4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร



### 5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.2	กรัม
-----------------------	------	------

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 6. สารละลาย CTAB ในโซเดียมคลอไรด์ (Hexadecyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 7. สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิลิตร

ละลายไลโซไซม์ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดจึงเติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 8. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเค น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากันให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 9. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากัน ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 10. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดจึงเติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

#### 11. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่าง 8.0

EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

#### 12. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่าง 8.0

Trisma base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	121.1	กรัม
--	-------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 13. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.8

Trisma base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	181.71	กรัม
---------------------------------	--------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมให้เข้ากันและวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเป็น 8.8 เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 14. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8

Trisma base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	60.57	กรัม
---------------------------------	-------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมให้เข้ากันและวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเป็น 6.8 เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 15. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 2



มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 16. สารละลายโซเดียมอะซีเทต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเทต 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตร 57 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 17. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68°C จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลายๆ ครั้งด้วย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรดเบสของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม  $\beta$ -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25:25 (ปริมาตร/ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

#### 18. สารละลายฟีนอลอิมิตัว (Equilibrated phenol, ultrapure)

ประกอบด้วย

ฟีนอลอิมิตัวด้วย Tris-HCl

Equilibrate Buffer

ก่อนใช้สารละลายฟีนอลอิมิตัว (บริษัท USB, USA) ครั้งแรก ให้เติม Equilibrate Buffer ลงในสารละลายฟีนอลอิมิตัว เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

## 19. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปลอดดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

## 20. 10X Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

## 21. สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอทธิเดียมโบรไมด์	0.1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ให้เข้ากัน เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอทธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, USA)

ประกอบด้วย

- 20 ml Membrane Binding Solution
- 15 ml Membrane Wash Solution (concentrated)
- 3.75 ml Nuclease-Free Water
- 50 Wizard® SV Minicolumns
- 50 Collection Tubes (2ml)

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม 95% Ethanol ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงใน Membrane Wash Solution จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

23. ชุด pCR4-TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, USA)

ประกอบด้วย

- pCR®4-TOPO® (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
- 10X PCR Buffer
- dNTP Mix
- Salt Solution (NaCl 1.2 โมลาร์ และ MgCl<sub>2</sub> 0.06 โมลาร์)
- M13 Forward Primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- M13 Reverse Primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- T3 primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- T7 primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- Control PCR Template (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- Control PCR Primers (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
- Nuclease free water



## 24. ชุด pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA)

## ประกอบด้วย

pGEM®-T Easy Vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

Control Insert DNA (4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

T4 DNA Ligase

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

## 25. สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ ( $\text{RbCl}$ )	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ )	0.148	กรัม
มันกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกชนิดเข้าด้วยกันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็น 5.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรและทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4°C

## 26. สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid]	0.290	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.103	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.121	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกชนิดเข้าด้วยกันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็น 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรและทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4°C

## 27. ชุดสกัดพลาสมิด High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany)

### ประกอบด้วย

Suspension Buffer  
RNase A  
Lysis Buffer  
Binding Buffer  
Wash Buffer I  
Wash Buffer II  
Elution Buffer  
High Pure Filter Tubes  
Collection Tubes

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม Suspension Buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน lyophilized RNase ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และนำปริมาตรทั้งหมดมาใส่ใน Suspension Buffer ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และเติม absolute ethanol ปริมาตร 20 และ 40 มิลลิลิตร ลงใน Wash Buffer I และ Wash Buffer II ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 28. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ -20°C

### 29. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มิลลิกรัม ในสารละลาย dimethylformamide ให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ในหลอดปิดสนิทและพันหลอดด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายสัมผัสกับแสง

### 30. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ น้ำหนัก 55.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

### 31. ชุด GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech laboratories Inc., USA)

ประกอบด้วย

เรสทริกชันเอนไซม์

*DraI* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*EcoRI* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*PvuII* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*StuI* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

เรสทริกชันเอนไซม์ บัฟเฟอร์

10X *DraI* Restriction Buffer

10X *EcoRI* Restriction Buffer

10X *PvuII* Restriction Buffer

10X *StuI* Restriction Buffer

Control Human Genomic DNA (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

T4 DNA Ligase (6 หน่วยต่อไมโครลิตร)

10X Ligation Buffer

GenomeWalker Adaptor (25 ไมโครโมลาร์)



Outer Adaptor Primer 1 (AP1 : 10 ไมโครโมลาร์)  
 Nested Adaptor Primer 2 (AP2 : 10 ไมโครโมลาร์)  
 GenomeWalker Human Positive Control Library  
 Positive Control tPA Primer (PCP1 : 10 ไมโครโมลาร์)  
 Positive Control tPA Nested Primer (PCP2 : 10 ไมโครโมลาร์)

### 32. ชุด pBAD/TOPO® ThioFusion™ Expression Kit (Invitrogen, USA)

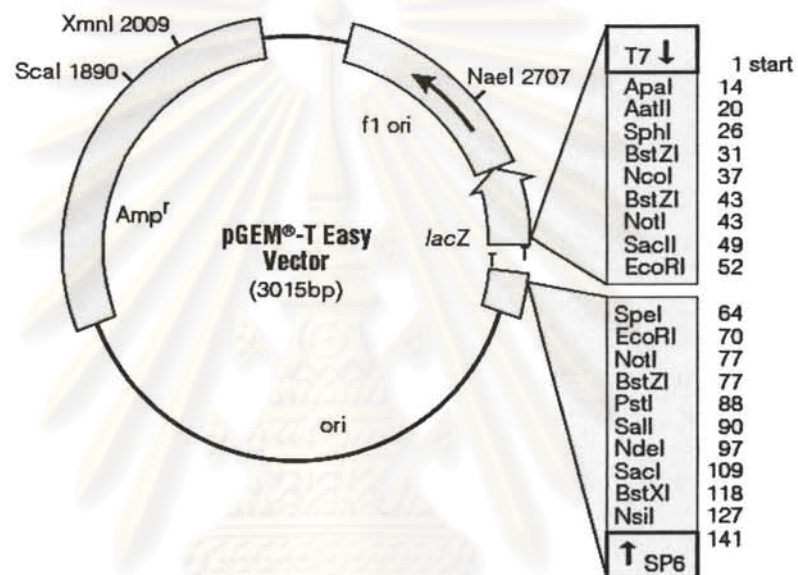
#### ประกอบด้วย

pBAD/Thio-TOPO® vector, linearized (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)  
 10X PCR Buffer  
 dNTP Mix  
 Salt Solution (NaCl 1.2 โมลาร์ และ MgCl<sub>2</sub> 0.06 โมลาร์)  
 20% L-Arabinose  
 Trx Forward Sequencing Primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)  
 pBAD Reverse Sequencing Primer (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)  
 Control PCR Template (0.05 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)  
 Control PCR Primers (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)  
 Nuclease free water  
 Expression Control Plasmid (pBAD/Thio, supercoiled) (500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

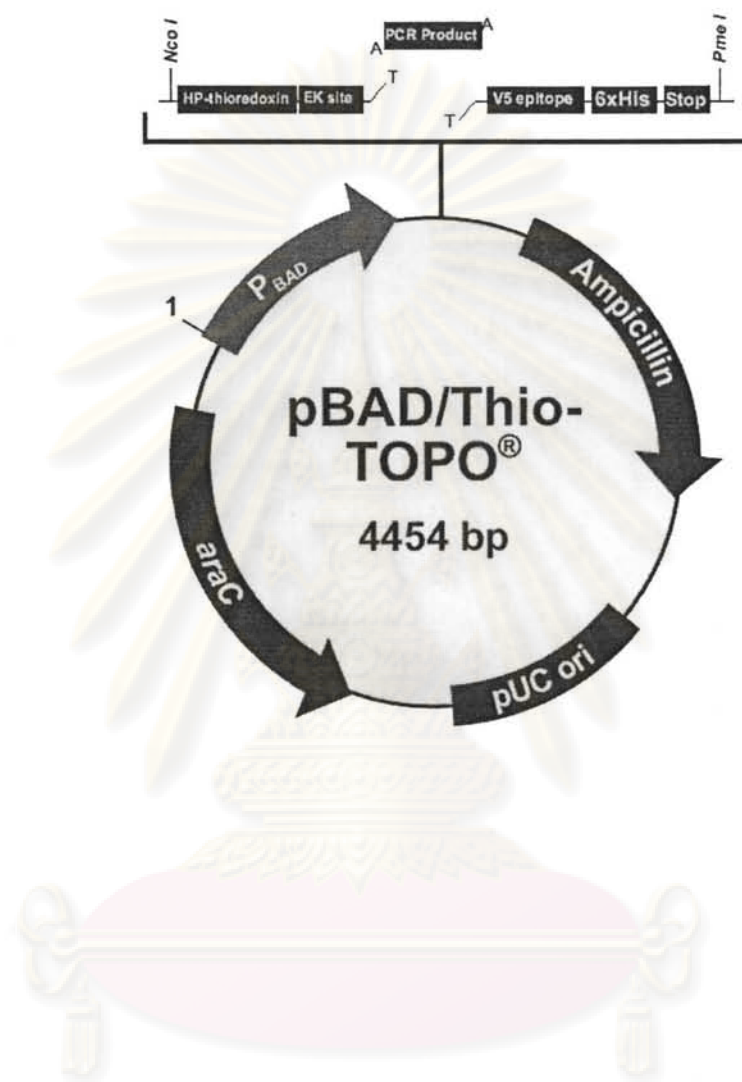
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## เวกเตอร์และโครมาโตแกรม

1. เวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, USA)2. เวกเตอร์ pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, USA)

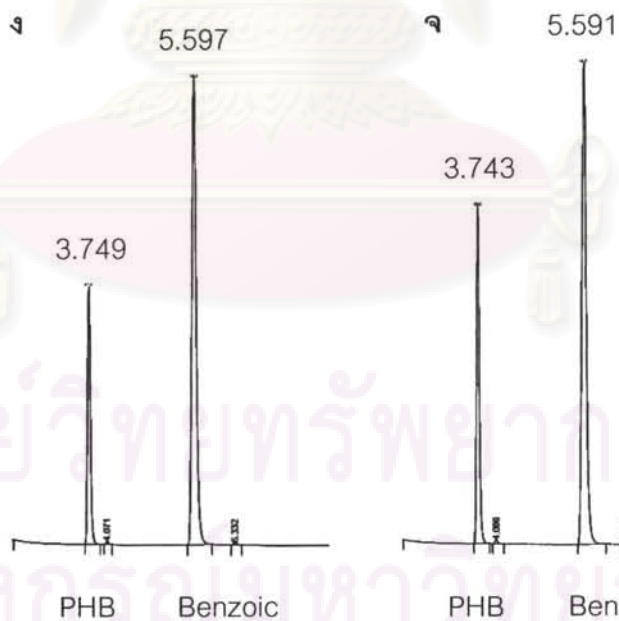
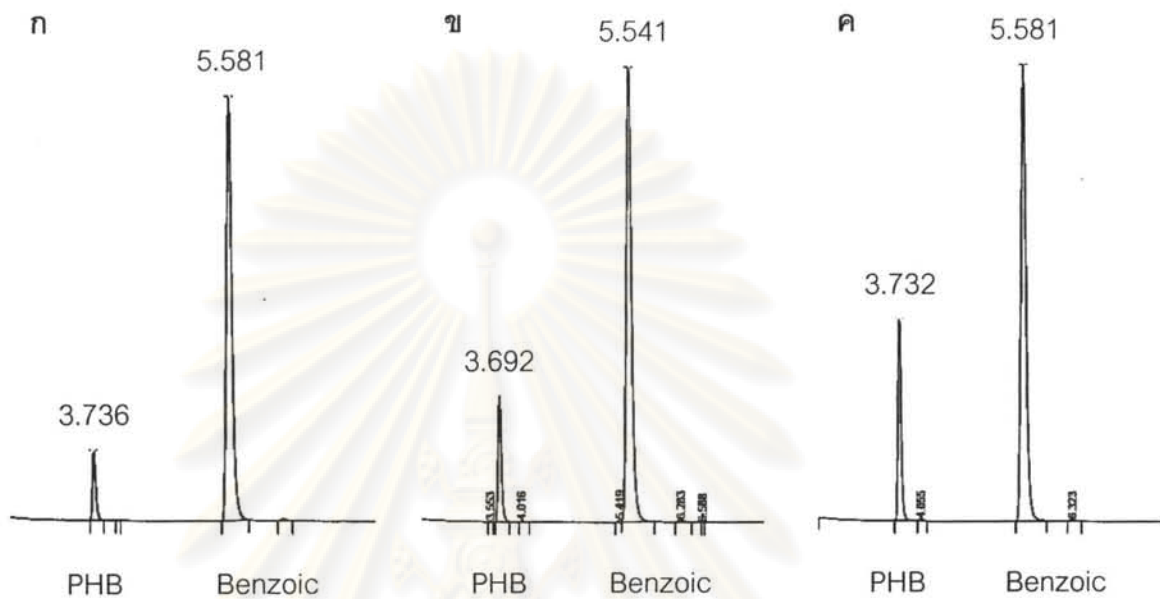
3. เวกเตอร์ pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> (Invitrogen, USA)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 4. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB



รูปโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB ปริมาณ 1 2 3 4 5 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป ก ข ค ง จ ตามลำดับ

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริรัตน์ วิเศษคุปต์ เกิดวันที่ 8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดสมุทรสาคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษาหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 ได้นำเสนอบทความเรื่อง "CLONING AND EXPRESSION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS GENES FROM *Ralstonia eutropha* STRAIN A-04 IN *Escherichia coli*" ในการประชุมสัมมนาเชิงวิชาการระดับชาติ "International Conference on Green and Sustainable Innovation : Sufficiency and Sustainability through Life Cycle Thinking" ซึ่งจัดโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงาน (Energy Research and Development Institute, ERDI) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 2 - 4 ธันวาคม 2552 ณ โรงแรมเลอเมอร์เดียน จังหวัดเชียงราย และได้นำเสนอบทความเรื่อง "CLONING AND EXPRESSION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS GENES FROM *Ralstonia eutropha* STRAIN A-04 IN *Escherichia coli*" ในการประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 30 มีนาคม - 1 เมษายน 2553 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย