การโคลนและการแสดงออกของแฟลกเจลลินจาก *Bacillus subtilis* N3 ใน *Escherichia coli* เพื่อการยับยั้งราก่อโรคในพืช *Curvularia lunata*

น.ส.จุฑากาญจน์ นามสง่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND EXPRESSION OF FLAGELLIN FROM *Bacillus subtilis* N3 IN *Escherichia coli* FOR INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN *Curvularia lunata*

Miss Juthakarn Namsanga

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกของแฟลกเจลลินจาก *Bacillus subtilis* N3 ใน *Escherichia coli* เพื่อการยับยั้งราก่อโรคในพืช *Curvularia lunata*
โดย	น.ส.จุฑากาญจน์ นามสง่า
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฑากาญจน์ นามสง่า : การโคลนและการแสดงออกของแฟลกเจลลินจาก *Bacillus subtilis* N3 ใน *Escherichia coli* เพื่อการยับยั้งราก่อโรคในพืช *Curvularia lunata* . (CLONING AND EXPRESSION OF FLAGELLIN FROM *Bacillus subtilis* N3 IN *Escherichia coli* FOR INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN *Curvularia lunata*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

Curvularia lunata เป็นราสายใยที่พบทั่วไปในดินซึ่งก่อให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด และส่งผลให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เกษตรกรจึงจำเป็นต้องควบคุมและกำจัดรานี้ ซึ่งแนวทางที่น่าสนใจในการยับยั้งและกำจัดรา คือ การใช้วิธีการทางชีวภาพซึ่งไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยก่อนหน้าพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว พบว่าเป็นโปรตีนที่มีความคล้ายกับแฟลกเจลลิน เอ ซึ่งเป็นยูนิตโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาในแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษายีนที่ประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 โดยให้แสดงออกใน *Escherichia coli* BL21 ผลการวิจัยพบว่ายีนแฟกเจลลินที่สมบูรณ์จาก *B. subtilis* N3 มีขนาด 990 คู่เบส ที่แปลรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 330 เรซิดิว โดยมีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอ ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สูงถึง 100% เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* BL21 แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG พบว่าส่วนของเซลล์และส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มีการแสดงออกโปรตีนขนาด 37 kDa และ 37-40 kDa ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน คือ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงในส่วนของเซลล์ และ 16 ชั่วโมงในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ 21.3 % เมื่อทำบริสุทธิ์โปรตีนพบว่าโปรตีนบริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 41 kDa และมีความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* ได้ โดยทำให้เกิดความผิดปกติของสายใยและยับยั้งการงอกของสปอร์ เมื่อโคลนและแสดงออกโดเมน N และโดเมน C ของแฟลกเจลลินพบว่าไม่เกิดการแสดงออกโปรตีนใน *E. coli* BL 21 เมื่อใช้วิธีการกลายแบบสุ่มบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด พบว่าโคลนที่แสดงออกโปรตีนที่เกิดการกลายบริเวณโดเมน C โดยเกิดการเปลี่ยนแปลง A330T และ D293N นั้น สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* เนื่องจากกรดอะมิโนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปมีสมบัติเฉพาะและโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ทำให้สูญเสียความสามารถในการยับยั้งราดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนบริเวณโดเมน C ของโปรตีนแฟลกเจลลินที่อะดีนีนตำแหน่งที่ 330 และกรดแอสพาร์ติกที่ตำแหน่ง 293 รับผิดชอบต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

5971924823 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORD: Flagellin protein, Bacillus subtilis, Curvularia lunata, Anitifungal activity
Juthakarn Namsanga : CLONING AND EXPRESSION OF FLAGELLIN FROM *Bacillus subtilis* N3 IN *Escherichia coli* FOR INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN *Curvularia lunata* . Advisor: Asst. Prof. Dr. PANAN RERNGSAMRAN

Curvularia lunata is a filamentous fungus that generally found in soil which causes plant diseases in several economic crops and leads to substantial economic loss. Therefor, farmers need to control and eliminate this fungus where an interesting approach to inhibit and eliminate the fungus is the use of biological control method which dose not harm to organisms and does not adversely affect the enviromment. It was found from previous study that bioactive compound from *Bacillus subtilis* N3 was able to effectly inhibit the growth of *C. lunata*. Analysis of the compound revealed that the protein was high similarity to flagellin-like A protein which is the unit protein that is a component of bacterial flagella. This study aims to study the flagellin coding gene of *B. subtilis* N3 by expressing in *Escherichia coli* BL21. The result found that the complete sequence of flagellin gene from *B. subtilis* N3 was 990 bp in length which translated to 330 amino acid residues that showed high homology to the flagellin A protein of bacteria in *Bacillus* group up to 100%. After transformed the recombinant plasmid containing flagellin gene to *E. coli* BL21 and induced for protein expression by IPTG, it was found that the proteins with molecular weights of 37 kDa and 37-40 kDA were expressed from cell fraction and cell-free culture medium fraction, respectively. The optimal condition for proteiin induction was 0.1 mM IPTG for 8 hours in cell fraction and 16 hours in cell-free culture medium fraction. Cell-free culture medium fraction was able to inhibit *C. lunata* at 21.3% inhibition. After purification, the purified flagellin protein was 41 kDa and showed ability to inhibit *C. lunata* by causing abnormal mycelial and inhibiting conidial germination. When the domain N and domain C of flagellin gene was cloned and expressed in *E. coli* BL 21, it was revealed that both proteins could not express. The random mutation by error-prone PCR showed the point mutation on domain C of flagellin gene, A330T and D293N, which caused the loss of antifungal inhibition activity. Each changed amino acid has different properties and structures affecting to the three dimension of the protein and the loss of the antifungal inhibition activity. This is the first research that demonstrates that amino acids on domain C at alanine at position 330 and aspartic acid at position 293 were responsible for the inhibition of *C. lunata*.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Student's Signature .....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ตลอดการทำวิจัย อีกทั้งให้การช่วยเหลือในทุกอุปสรรคปัญหาในระหว่างการทำวิจัย และยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงเพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภัคดี ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนวิทยบัณฑิต จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนค่าเล่าเรียนในระหว่างการศึกษา ขอบคุณโครงการแลกเปลี่ยนนักศึกษาระยะสั้น SSSV Program ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายต่าง ๆ และเปิดโอกาสให้ไปแลกเปลี่ยนประสบการณ์การทำวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกให้การวิจัยราบรื่นและเป็นไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี ศิริศรัทธา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ภายในห้องวิจัยของอาจารย์ ตลอดจนให้คำปรึกษาต่าง ๆ ขอขอบคุณนางสาวธนาภา อธิกิจ และผู้วิจัยในห้องวิจัย 1904/13 ทุกคน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สถานที่ และการให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องวิจัย 1904/15 ทุกคน ที่คอยเป็นคำกำลังใจและเป็นที่ปรึกษา รวมไปถึงทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้ความช่วยเหลือ ติดตาม ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาตลอดการศึกษา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

จุฑากาญจน์ นามสง่า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม 4

2.1 *Curvularia lunata* 4

2.1.1 โรคพืชที่มีสาเหตุจาก *C. lunata* 5

2.1.2 วิธีการป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรา 7

2.1.3 การควบคุม *C. lunata* โดยวิธีทางชีวภาพ 11

2.2 *Bacillus subtilis* 12

2.2.1 บทบาทของ *B. subtilis* ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ 13

2.2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* 14

2.3 แฟลกเจลลิน (flagellin) 18

2.3.1 ประโยชน์ของแฟลกเจลลินในการเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) 19

2.3.2 การยับยั้งราก่อโรคพืชโดยแฟลกเจลลิน 20

2.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR) 21

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 24
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป 25
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ 27
3.3.1 แบคทีเรีย 27
3.3.2 ราก่อโรคพืช 28
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 28
3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย 28
3.4.2 สำหรับรา 28
3.5 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน 28
3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *B. subtilis* N3 28
3.5.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์และการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแฟลกเจลลิน 29
3.5.3 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 30
3.5.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส 31
3.5.5 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31
3.6 การโคลนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector) 32
3.6.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 32
3.6.2 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α 32
3.6.3 การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 33
3.7 การโคลนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector) 35
3.7.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 35
3.7.2. การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 36
3.8 การแสดงออกแฟลกเจลลิน 36

3.8.1 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3)... 36
3.8.2. การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 37
3.8.3 การชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนแฟลกเจลลินใน *E. coli* BL21(DE3) 37
3.9 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 38
3.9.1 การเตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับทำ SDS-PAGE 38
3.9.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับ SDS-PAGE 39
3.9.3 การตรวจสอบโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE 40
3.10 การหาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุด 40
3.10.1 การแปรผันความเข้มข้น IPTG 40
3.10.2 การแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน 41
3.11 การทำบริสุทธิ์โปรตีนแฟลกเจลลินโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC . 42
3.12 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 44
3.13 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนบริสุทธิ์ 45
3.14 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ *C. lunata* 46
3.14.1 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อสายใย *C. lunata* 46
3.14.2 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการงอกของสปอร์ *C. lunata* 46
3.15 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* 46
3.15.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* .. 46
3.15.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 47
3.15.3 การโคลนชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector) 48
3.15.4 การโคลนชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector) 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.15.5 การแสดงออกของโปรตีนจากชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลิน 48
3.15.6 การตรวจสอบโปรตีนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE 48
3.16 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR) 49
3.16.1 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด 49
3.16.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector) 50
3.16.3 การโคลนยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector) 50
3.16.4 การแสดงออกของโปรตีนจากชิ้นส่วนของยีนแฟลกเจลลิน 50
3.16.5 การตรวจสอบโปรตีนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE 51
3.16.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 51
3.16.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* 51
3.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 51
บทที่ 4 ผลการทดลอง 52
4.1 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน 52
4.1.1การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์และการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแฟลกเจลลิน 52
4.1.2 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 53
4.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลิน 53
4.3 การแสดงออกแฟลกเจลลิน 54
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุด 56
4.4.1 การแปรผันความเข้มข้น IPTG 56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.2 การแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน 57
4.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีนแฟลกเจลลิน 59
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 60
4.7 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนบริสุทธิ์ 61
4.8 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ *C. lunata* 62
4.9 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* 63
4.9.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* 63
4.9.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 63
4.9.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลิน 64
4.9.3 การแสดงออกโปรตีนจากโดเมนบนแฟลกเจลลิน 65
4.10 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR) 66
4.10.1 การเพิ่มปริมาณ, การโคลนและการแสดงออกของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม 66
4.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการกลายแบบสุ่ม 68
4.10.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาการกลายบนยีนแฟลกเจลลินที่มีผลต่อการยับยั้ง *C. lunata* 74
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 77
บรรณานุกรม 81
ภาคผนวก 92
ภาคผนวก ก 93
ภาคผนวก ข 95
ภาคผนวก ค 102

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง 104

ประวัติผู้เขียน 117

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การยับยั้งราก่อโรคพืชโดยไลโปเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราจาก B. subtilis สายพันธุ์ต่าง ๆ 17

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง C. lunata ของน้ำเลี้ยงเชื้อ E. coli BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของ C. lunata บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 5

รูปที่ 2 ลักษณะสปอร์หรือคอนิเดียของ C. lunata 5

รูปที่ 3 ลักษณะของโรคใบไหม้ที่มีสาเหตุจาก C. lunata ในหญ้าปล้อง (ซ้าย) ลักษณะของโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว (กลาง) และลักษณะของโรคเมล็ดด่างในข้าว (ขวา) 6

รูปที่ 4 ลักษณะของโรคผลเน่าในมะเขือเทศ 6

รูปที่ 5 ลักษณะโคโลนีของ B. subtilis บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSY 13

รูปที่ 6 โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของไลโปเพปไทด์ในกลุ่มเซอแฟกติน อิทูริน และเฟนจิซิน .. 16

รูปที่ 7 แบบจำลองโครงสร้างแบบริบบิ้นของแฟลกเจลลิน แสดงโดเมนปลายด้าน C (CD), โดเมนกลาง และโดเมนปลายด้าน N (ND) 19

รูปที่ 8 แบบจำลองโครงสร้างแบบริบบิ้นของสายใยแฟลกเจลลินที่ประกอบด้วยยูนิตของแฟลกเจลลินจากมุมมองด้านบน (ซ้าย) จากมุมมองด้านข้าง (ขวา) 19

รูปที่ 9 การกลายแบบสุ่มโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด ภายใต้ภาวะที่ลดความแม่นยำของเอนไซม์ Taq DNA polymerase 22

รูปที่ 10 วิธีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง C. lunata ของโปรตีนบริสุทธิ์ 45

รูปที่ 11 ตำแหน่งของโดเมน N และโดเมน C บนโปรตีนแฟลกเจลลิน 52

รูปที่ 12 ผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 53

รูปที่ 13 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง 55

รูปที่ 14 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของสารละลายโปรตีนจากเซลล์ E. coli BL21(DE3) เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน . 56

รูปที่ 15 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน 57

รูปที่ 16 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของเซลล์ E. coli BL21(DE3) เมื่อมีการแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน 58

รูปที่ 17 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน 58

รูปที่ 18 โปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์ 59

รูปที่ 19 ประสิทธิภาพการยับยั้ง C. lunata ของน้ำเลี้ยงเชื้อ E. coli BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 60

รูปที่ 20 ประสิทธิภาพการยับยั้ง C. lunata ของสารละลายโปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ E. coli BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 61

รูปที่ 21 ผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ C. lunata 62

รูปที่ 22 ผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดเมน N และโดเมน C 64

รูปที่ 23 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโดเมน N และโดเมน C 65

รูปที่ 24 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG 67

รูปที่ 25 โครงสร้างสามมิติแบบริบบิ้นของโปรตีนแฟลกเจลลิน 75

รูปที่ 26 โครงสร้างสามมิติแบบแท่งของกรดอะมิโนจากโปรตีนแฟลกเจลลินในตำแหน่งที่ 59, 330 และ 293 76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

Curvularia spp. เป็นราสายใยในไฟลัมแอสโคไมโคตา (ascomycota) ที่มักพบทั่วไปในดิน และเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชเศรษฐกิจที่มีใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวโพดและอ้อย โดยโรคที่พบมาก ได้แก่ โรคใบไหม้ (leaf blight) (Kamaluddeen และ Abhilasha, 2013; Macri และ Di Lenna, 1974; Nishi และคณะ, 2008) และโรคกาบใบเน่า (black sheath spot) (Gao และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังพบรานี้ก่อโรคในพืชชนิดอื่นอีก เช่น โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot) ในหน่อไม้ฝรั่ง (Salleh และคณะ, 1996) และปวยเล้ง (Pandey และคณะ, 2011) ซึ่งการก่อโรคอย่างกว้างขวางนี้ทำให้เกิดการสูญเสียผลิตผลทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

เกษตรกรจึงจำเป็นจะต้องควบคุมและกำจัดการเจริญของราเหล่านี้ ซึ่งวิธีที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การเผาทำลายพืชที่มีการติดเชื้อ และการปลูกพืชหมุนเวียน (Singh และ Pandey, 2012) แต่อย่างไรก็ตามสปอร์ของราก็ยังคงอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานานและสามารถติดเชื้อในพืชที่ปลูกครั้งถัดไปได้ (McGrath, 2009) นอกจากนี้เกษตรกรยังนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันการติดเชื้อและทำลายการเจริญของรา แต่การใช้สารเคมีนั้นเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมได้ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (Han และคณะ, 2015) ด้วยเหตุนี้การใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพจึงนับว่าเป็นวิธีทางเลือกที่ดีซึ่งเป็นมิตรต่อทั้งสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างงานวิจัยของการใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อการควบคุม *Curvularia* spp. เช่น Huyly และคณะ (2017) พบว่า *Chaetomium cupreum* สามารถยับยั้ง *C. lunata* ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf) ในข้าวได้ Srivastava และคณะ (2008) พบว่า *Pseudomonas fluorescence* สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ Basha และคณะ (2002) พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตโปรตีนในกลุ่มของไคติเนส ซึ่งสามารถยับยั้งการสร้างสายใยของ *C. lunata* ได้ และ Orberac และคณะ (2012) พบว่า *B. sublilis* สามารถผลิตสารต้านราประเภทไลโปเพปไทด์ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia gudauskasii* ในต้นกล้าอ้อยได้ เป็นต้น

Bacillus spp. เป็นสกุลของแบคทีเรียที่มักถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียในสกุลอื่นและราได้อย่างหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นการศึกษาการยับยั้ง *C. lunata* โดยใช้ *B. subtilis* และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียนี้ผลิตขึ้น จึงเป็นที่น่าสนใจ

จากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการทดสอบการยับยั้ง *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และโรคสนิมจุด (flower rusty spot) ในกล้วยไม้ด้วย *B. subtilis* N3 และพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสมบัติยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ด้วยแมสสเปกโทรสโกปีพบว่าเป็นโปรตีนในกลุ่มที่คล้ายแฟลกเจลลิน เอ (flagellin A) ซึ่งมีขนาดประมาณ 39.88 kDa และยีนแฟลกเจลลินที่แสดงออกให้โปรตีนนี้มีขนาดประมาณ 904 คู่เบส โดยโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นี้มีผลต่อการงอกของสปอร์รา ทำให้สายใยนั้นมีการบวมและโป่งพองออก (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2559)

แฟลกเจลลินเป็นยูนิตโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาในแบคทีเรียทั่วไป (Asano และคณะ, 2001) และมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา เช่น *Bacillus* sp. BH072 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งราได้หลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Pythium* sp., และ *Botrytis cinerea* นั้น มีการแสดงออกของยีนแฟลกเจลลิน (*hag*) และเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์พบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 35 kDa และมีความคล้ายกับโปรตีนแฟลกเจลลิน ซึ่งโปรตีนบริสุทธิ์นี้มีความสามารถในการยับยั้ง *A. niger* ได้ดี (Zhao และคณะ, 2013b) จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Stachybotrys chartarum* และ *Penicillium expansum* ซึ่งเป็นราก่อโรคในเกาลัด พบว่าหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 29.5 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรีแล้ว พบว่าโปรตีนนี้มีความคล้ายกับโปรตีนแฟลกเจลลิน (Fang และคณะ, 2017) การคัดแยก *B. subtilis* RN-061 ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cinerea* พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่คล้ายแฟลกเจลลินซึ่งมีขนาดประมาณ 32 kDa เมื่อเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน แล้วโคลนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* ที่มียีนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ได้ถึง 47 เปอร์เซ็นต์ (Ren และคณะ, 2013) และการคัดแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ต้าน *Monilinia fructicola* จาก *B. subtilis* F3 พบว่าโปรตีนนี้มีความใกล้เคียงกับแฟลกเจลลิน ซึ่งมีผลต่อการสร้างสปอร์และทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายใยราเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังสามารถยับยั้ง *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia capsicum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้อีกด้วย (Liu และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าส่วนใดของโปรตีนแฟลกเจลลินที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยนี้จึงศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 แล้วโคลนเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนจากยีนดังกล่าว แล้วนำโปรตีนที่ได้มาทำบริสุทธิ์และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* จากนั้นตรวจสอบส่วนของยีนและโปรตีนแฟลกเจลลินโดยการตัดลำดับบนยีนออก แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* เพื่อระบุว่าส่วนใดของโปรตีนแฟลกเจลลินที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata*

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

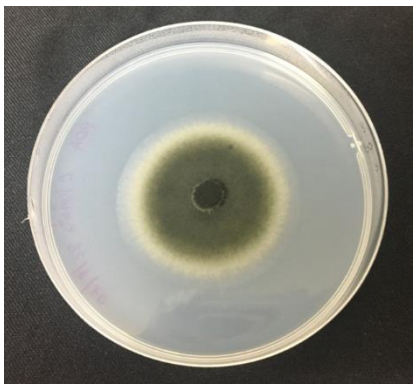
1. ศึกษายีนที่ประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3
2. โคลนยีนที่ประมวลรหัสได้โปรตีนแฟลกเจลลินเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนแฟลกเจลลิน
3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนแฟลกเจลลิน
4. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* โดย *E. coli* BL21(DE3) ที่มีการแสดงออกของโปรตีนแฟลกเจลลิน
5. ทำบริสุทธิ์โปรตีนแฟลกเจลลินและทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ในการยับยั้ง *C. lunata*
6. หาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 *Curvularia lunata*

C. lunata เป็นราดำสายใย (dematiaceous hyphomycete mold) ซึ่งจัดอยู่ในโดเมน Eukaryota อาณาจักร Fungi ภายใต้ Subkingdom Dikarya ซึ่งแต่เดิมนั้นไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes หรือ mitosporic fungi แต่ในปัจจุบันด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, คลาส Dothideomycetes, อันดับ Pleosporales และแฟมิลี Pleosporaceae ราชนิดนี้ยังมีชื่อพ้องอื่น ได้แก่ *Acrothecium lunatum* ซึ่งเป็นชื่อในระยะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic stage) อีกชื่อหนึ่ง และมีชื่อในระยะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic stage) คือ *Cochliobolus lunatus* หรือ *Pseudocochliobolus lunatus* (Manamgoda และคณะ, 2012) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราชนิดนี้ โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ (รูปที่ 1) ลักษณะสายใยตรง มีสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ มีผนังกั้น มีการสร้างสปอร์หรือคอนิเดีย (conidia) บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) โดยก้านชูนี้จะมีความยาวประมาณ 650 ไมโครเมตร มีความหนา 5-9 ไมโครเมตร มีการเจริญเป็นเส้นตรงไม่แตกกิ่ง (unbranched) สายใยมีผนังกั้น มีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีดำ โดยที่บริเวณปลายจะมีสีอ่อนลง ปลายสุดของก้านชูจะมีการสร้างคอนิเดียหรือบางครั้งจะพบเห็นเป็นปม (nodulose) เมื่อไม่มีการสร้างคอนิเดีย คอนิเดียมีรูปร่างคล้ายวงรีโค้งหรือพระจันทร์เสี้ยวความยาวประมาณ 21-31 ไมโครเมตร และกว้างประมาณ 9-12 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีดำ มีผิวเรียบ ประกอบด้วยเซลล์ตั้งแต่ 2-4 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางจะมีขนาดใหญ่และโป่งพองกว่าเซลล์บริเวณหัวท้าย (รูปที่ 2) *C. lunata* สามารถพบได้ทั่วไปในดินแทบทุกภูมิภาคของโลก แต่จะพบมากบริเวณเขตร้อน สามารถดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติและเป็นเชื้อก่อโรคในพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (McKenzie, 2013; Mycology online, 2016) ซึ่งก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่ายและรวดเร็ว เนื่องจากสปอร์สามารถแพร่กระจายไปในอากาศได้ (Ram และคณะ, 2017)



<u>รูปที่ 1</u> ลักษณะโคโลนีของ *C. lunata* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

<u>รูปที่ 2</u> ลักษณะสปอร์หรือคอนิเดียของ *C. lunata*
ที่มา : (Revankar และ Sutton, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.1 โรคพืชที่มีสาเหตุจาก *C. lunata*

C. lunata สามารถก่อโรคได้หลากหลายในพืชหลายชนิด อาการโดยทั่วไปของโรคจะเริ่มที่ใบซึ่งจะสังเกตพบจุดรีสีน้ำตาลและสีจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ ขนาดประมาณ 0.2 ถึง 1 เซนติเมตรขึ้นอยู่กับขนาดของใบ จากนั้นรอยโรคจะลามไปยังกาบใบ พบเห็นเป็นรอยสีน้ำตาลเข้มและมีขอบสีเหลือง และลุกลามไปทั่วทั้งกาบใบ หากเกิดอาการที่กลีบดอกจะทำให้กลีบดอกมีสีซีดจางลง และหากเกิดอาการกับเมล็ดจะทำให้เมล็ดกลายเป็นสีดำ โดยโรคต่าง ๆ จะแสดงถึงบริเวณที่แสดงอาการของโรค เช่น โรคใบไหม้ จะแสดงอาการของโรคที่ใบและกาบใบ โดยจะเห็นใบเป็นจุดสีน้ำตาลและมีขอบสีเหลือง ลุกลามไปทั่วทั้งใบ (รูปที่ 3 (ซ้าย)) ลักษณะเช่นนี้มีรายงานว่าพบในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว (Kamaluddeen และ Abhilasha, 2013) ข้าวโพด (Macri และ Di Lenna, 1974) อ้อย (Nishi และคณะ, 2008) มะเขือเทศ (Iftikhar และคณะ, 2016a) และหม่อน (Bussaban และคณะ, 2017)

โรคใบจุดสีน้ำตาลจะแสดงอาการของโรคที่ใบ โดยจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กคล้ายไข่ปลาบริเวณใบและใบที่เกิดใหม่และจุดจะขยายรวมกันเป็นวงขนาดใหญ่ (รูปที่ 3 (กลาง)) พบใน ข้าว (Majeed และคณะ, 2015) หน่อไม้ฝรั่ง (Salleh และคณะ, 1996) และปวยเล้ง (Pandey และคณะ, 2011) โรคเมล็ดด่าง (black kernel) ในข้าวจะแสดงอาการของโรคบริเวณเมล็ดในระยะออกรวง เมล็ดข้าวมีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำและบางส่วนไม่มีสี (Jin, 1989) (รูปที่ 3 (ขวา)) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถก่อให้เกิดอาการของโรคบริเวณผลได้ เช่น โรคผลเน่า (fruit rot) ในมะเขือเทศ โดยจะสังเกตพบรอยช้ำบริเวณผิวของผลที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. lunata* จากนั้นจะพัฒนาเป็นรอยแผลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลเข้มขึ้น จนกระทั่งผลนั้นเน่าเสียไป (Iftikhar และคณะ, 2016b) (รูปที่ 4)

<u>รูปที่ 3</u> ลักษณะของโรคใบไหม้ที่มีสาเหตุจาก *C. lunata* ในหญ้าปล้อง (ซ้าย) ลักษณะของโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว (กลาง) และลักษณะของโรคเมล็ดด่างในข้าว (ขวา)
ที่มา : (Groth, 2009, 2010; Monteiro และคณะ, 2003)

<u>รูปที่ 4</u> ลักษณะของโรคผลเน่าในมะเขือเทศ
ที่มา : (Iftikhar และคณะ, 2016b)

2.1.2 วิธีการป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรา

วิธีการทางกายภาพ การป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราด้วยวิธีทางกายภาพมีหลายวิธี เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมราก่อโรคพืชและมีค่าใช้จ่ายน้อย หลักการคือการปลูกพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่สายพันธุ์เจ้าบ้านของราก่อโรคสลับกับพืชที่เกิดโรคได้ โดยราก่อโรคจะไม่สามารถอยู่รอดต่อไปได้หากไม่มีพืชเจ้าบ้าน ทั้งนี้ต้องมีการควบคุมและจัดการกับเศษซากของพืชที่ติดเชื้อและเศษวัชพืชต่าง ๆ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนได้ในภายหลัง แต่อย่างไรก็ดี วิธีนี้เหมาะสำหรับราก่อโรคที่ต้องอาศัยพืชเจ้าบ้านเท่านั้นในการมีชีวิตรอด ไม่เหมาะกับราก่อโรคที่สามารถติดเชื้อในพืชเจ้าบ้านได้หลายชนิด สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน หรือมีการสร้างโครงสร้างพิเศษสำหรับทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถอยู่รอดโดยใช้สารอินทรีย์อื่นจากดิน และมีการสร้างสปอร์ที่สามารถแพร่กระจายไปในระยะไกลได้ นอกจากนี้ การปนเปื้อนของสปอร์ราก่อโรคที่มาจากอุปกรณ์ทางการเกษตร เมล็ดพันธุ์ หรือเกษตรกร อาจทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ถึงแม้ว่าจะมีการจัดการแปลงปลูกให้ปลอดการปนเปื้อนของราก่อโรคแล้วก็ตาม (McGrath, 2009)

วิธีการทางเคมี เป็นวิธีการควบคุมโรคพืชที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถดำเนินการได้สะดวก มีประสิทธิภาพสูงและเห็นผลได้ชัดเจน ตัวอย่างของสารเคมีที่นิยมใช้ในการกำจัดราก่อโรคพืช เช่น แมนโคเซป (mancozeb) คลอโรทาโลนิล (chlorothalonil) ไธแรม (thiram) และคอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ (copper oxychloride) ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มที่ไม่ดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช เหมาะสำหรับใช้ป้องกันก่อนที่จะเกิดโรค เนื่องจากสารเหล่านี้จะปกคลุมและออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของราก่อโรคบริเวณผิวภายนอกเท่านั้น สามารถออกฤทธิ์ในการป้องกันได้อย่างกว้างขวาง สารเคมีอีกกลุ่มหนึ่ง เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim) โพรพิโคนาโซล (propiconazole) ไธโอฟาเนต (thiophanate) และเมตาแลคซิล (metalaxyl) เหมาะสำหรับพืชที่มีการติดเชื้อและเริ่มมีการแสดงอาการของโรค เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มนี้สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชและเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีการเข้าทำลายของราได้ เพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคและการลุกลามของโรคจากบริเวณที่มีการติดเชื้อ (Tekade และคณะ, 2017) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีเหล่านี้ส่งผลให้เกิดอันตรายทั้งต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยสารเคมีสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งต่อผู้ได้รับสัมผัสโดยตรงหรือจากการปนเปื้อนของสารเคมีในผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลให้เกิดอาการป่วยแบบฉับพลันหรือสะสมเป็นโรคเรื้อรังต่าง ๆ มีการสะสมในเนื้อเยื่อของ

สิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปในห่วงโซ่อาหาร ก่อให้เกิดความเสียหายในระบบนิเวศ อีกทั้งยังสะสมในสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดมลพิษทั้งในดิน น้ำ และอากาศ (สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558)

วิธีการทางชีวภาพ เป็นวิธีการทางเลือกที่ดีวิธีการหนึ่งเพื่อป้องกันและควบคุมการเกิดโรคจากราก่อโรคพืช เนื่องจากเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถแก้ไขปัญหาได้อย่างยั่งยืน โดยอาศัยหลักการการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของสิ่งมีชีวิต โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค ด้วยกลไกต่าง ๆ (Heydari และ Pessarakli, 2010; Jamalizadeh และคณะ, 2011) ดังนี้

1. การแข่งขัน (competition) กลไกนี้เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อกันมาอยู่ร่วมในบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน แล้วเกิดการแข่งกันเพื่อแก่งแย่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญที่มีอยู่อย่างจำกัดในบริเวณนั้น เช่น ธาตุอาหาร สารต่าง ๆ น้ำ อากาศ ตลอดจนการครอบครองพื้นที่สำหรับการเจริญ กลไกนี้เป็นหนึ่งในวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดี โดยการแก่งแย่งสารอาหารและสารสำคัญต่อการเจริญต่าง ๆ ของเชื้อก่อโรค ส่งผลให้เชื้อก่อโรคขาดธาตุอาหารและสารที่จำเป็นต่อการเจริญและเพิ่มจำนวน จึงไม่สามารถบุกรุก เข้าทำลายหรือก่อโรคได้ ตัวอย่างการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น การยับยั้ง *Penicillium expansum* และ *B. cinerea* ซึ่งเป็นราก่อโรคในแอปเปิ้ล โดยใช้ *Cryptococcus laurentii* และ *Candida ciferrii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบได้บริเวณผิวของผลแอปเปิ้ล ซึ่งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการแก่งแย่งไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารสำคัญที่มีอยู่อย่างจำกัดได้ดีกว่าราก่อโรค จึงสามารถยับยั้งราก่อโรคได้ดี (Vero และคณะ, 2002) การยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. cinerea, Phoma betae* และ *Cladosporium herbarum* บนใบบีทรูทโดย *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีความสามารถในการแก่งแย่งกรดอะมิโนได้ดีกว่าราก่อโรค (Blakeman และ Brodie, 1977) การยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของสายใย *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นราก่อโรคเน่าคอดิน (damping-off) โดยการแก่งแย่งคาร์บอนซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักสำหรับการเจริญของราก่อโรคด้วย *P. fluorescens* (Ellis และคณะ, 1999) การยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ด้วย *Pseudomonas putida* โดยการแก่งแย่งธาตุเหล็ก เนื่องจาก *P. putida* มีความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore) จึงสามารถแย่งจับธาตุเหล็กที่อยู่ในดินได้ดี (López-Berges และคณะ, 2012)

2. การทำลายชีวิต (antibiosis) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารบางชนิดซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ได้แก่ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารพิษ ตัวอย่างของการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น สารปฏิชีวนะแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) จาก *B. subtilis* สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsica*, *B. cineria*, *Verticillium dahlia, Pytium* sp. และ *Fusarium* sp. (Hammami และคณะ, 2011) สารปฏิชีวนะไพร์โรลนิตริน (pyrrolnitrin) จากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สามารถยับยั้งการเจริญของราในสกุล *Fusarium, Pyricularia, Pythium, Rhizoctonia, Sclerotinia,* และ *Verticillium* (Burkhead และคณะ, 1994) สารปฏิชีวนะฟีนาซีน (phenazine) จากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สามารถยับยั้ง *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* และ *F. oxysporum* (Park และคณะ, 2011) และการยับยั้งราในสกุล *Fusarium* และ *Rhizoctonia* โดยสารปฏิชีวนะ 2-เมธิลเฮปทิลไอโซนิโคทิเนต (2-methylheptyl isonicotinate) จาก *Streptomyces* sp. 201 (Bordoloi และคณะ, 2002) การยับยั้ง *R. solani* และ *Pythium aphanidermatum* โดยไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide; HCN) จาก *P. fluorescens* (Michelsen และ Stougaard, 2012)

3. การผลิตสารเมทาบอไลท์ (metabolite production) เป็นการผลิตและปลดปล่อยสารเมทาบอไลท์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ทำลายสารประกอบพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในการดำรงชีวิตอยู่ได้ของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารเมทาบอไลท์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น การผลิตเอนไซม์ สารประกอบเพปไทด์ สารลดแรงตึงผิว ตัวอย่างของการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น การยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *F. solani* โดย *Pseudomonas stutzeri* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และลามินาริเนส (laminarinase) ก่อให้เกิดการสลายตัวของสายใยและ germ tube (Lim และคณะ, 1991) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) จาก *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* (Guleria และคณะ, 2016) การยับยั้งการเจริญของ *R. solani* โดยเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก *B. subtilis* ATCC 11774 (Saber และคณะ, 2015) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราก่อโรค จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ นอกจากนี้สารประกอบเพปไทด์ยังมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ เช่น การยับยั้ง *Fusarium moniliforme* โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารประกอบไลโปเพปไทด์จากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งประกอบไปด้วย อิทูริน เอ (iturin A), บาซิโลมัยซิน (Bacillomycin) และเฟนจิซิน (fengycin) (Gond และคณะ, 2015)

4. การเป็นปรสิต (parasitism) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการบุกรุก เข้าไปเจริญอยู่ภายในและทำลายสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ ตัวอย่างการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น การควบคุม *Cryphonectria parasitica* ซึ่งเป็นราก่อโรคใบไหม้ในเกาลัดโดยไวรัสในแฟมิลี Hypoviridae ซึ่งมีกลไกในการลดความรุนแรงของการก่อโรค การติดเชื้อ และการเข้าครอบครองพื้นที่ในการก่อโรคได้ (Milgroom และ Cortesi, 2004) การยับยั้ง *S. sclerotiorum* โดย *Aspergillus aculeatus* ด้วยการติดเชื้อบริเวณสเคอโรเตีย (sclerotia) ทำให้ไม่สามารถสร้างอะโพทีเชีย (apothecia) ส่งผลให้ *S. sclerotiorum* ไม่สามารถงอกและเจริญต่อไปได้ (Wiwattanapatapee และคณะ, 2013) และการยับยั้ง *R. solani* โดย *Trichoderma harzianum* SQR-T37 ด้วยการขดรัด (coilling) สายใยของ *R. solani* โดยการสร้างตะขอ (hook) ในการเจาะและแทรกซึมเข้าไปในสายใยส่งผลให้เกิดการรั่วออกของไซโทพลาซึมและการหงิกงอของสายใย (Huang และคณะ, 2011)

5. การชักนำให้เกิดการต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นความสามารถของจุลินทรีย์ที่ชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อการเกิดโรคมากขึ้น โดยกลไกการต้านทานโรคของพืชประกอบด้วย ความต้านทานที่มีอยู่แล้วของพืช (constitutive resistance) ได้แก่ ผนังเซลล์ที่มีความหนาและแข็งแรง การมีชั้นเคลือบผนังเซลล์เพื่อป้องการการติดเชื้อหรือเกิดบาดแผล เช่น คิวติเคิลและแวกซ์ ตลอดจนสารบางอย่างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้ (induced resistance) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อพืชมีการติดเชื้อ และจะเกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อนั้น เช่น การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การสะสมลิกนิน (lignification) ที่มากขึ้นบริเวณผนังเซลล์เพื่อยับยั้งการเข้าบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรค การสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค การสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenesis-related protein; PR protein) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง และการตอบสนองต่อจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างทันทีทันใดเมื่อมีการบุกรุก (hypersensitive response) โดยการฆ่าตัวตายของเซลล์ เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการกระจายของจุลินทรีย์ก่อโรค (นงลักษณ์ เภรินทวงศ์, 2556) โดยจุลินทรีย์ที่ทีความสามารถในการชักนำก็อาจชักนำให้พืชเกิดความต้านทานที่มีอยู่เดิมมากขึ้น หรืออาศัยกลไกอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้

พืชสามารถต้านทานโรคได้ดียิ่งขึ้น เช่น การชักนำให้ *Arabidopsis* ต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *B. cinerea* โดยใช้ *Bacillus cereus* AR156 ซึ่งชักนำให้พืชเกิดการต้านทานโรคผ่านหลายกลไก ได้แก่ การสะสมของโปรตีน PR1 ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณให้เกิดการต้านทานต่อราก่อโรค การสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) และการสะสมแคลโลส (callose) เพื่อให้เซลล์พืชมีผนังที่หนาขึ้น (Nie และคณะ, 2017) การชักนำให้หญ้าแฝกต้านทานต่อ *Magnaporthe oryzae* ซึ่งเป็นราก่อโรคใบจุดสีเทา (grey leaf spot) โดยใช้เซลล์ของ *B. amyloliquefaciens* และเซอแฟกติน (surfactin) ซึ่งเป็นสารประกอบไลโปเพปไทด์ที่ *B. amyloliquefaciens* ผลิตขึ้น โดยมีผลทำให้พืชมีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้น ส่งผลให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดสเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณผนังเซลล์และทางลำเลียงน้ำผ่านผนังเซลล์หรืออะโพพลาส (apoplast) มีการสะสมของแคลโลสและสารประกอบฟีนอลภายใต้แอพเพรสซอเรีย (appressoria) ของราก่อโรค ทำให้ราก่อโรคบุกรุกเข้าสู่พืชได้ยากยิ่งขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคได้ (Rahman และคณะ, 2015)

2.1.3 การควบคุม *C. lunata* โดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมและยับยั้งการเจริญและการก่อโรคของ *C. lunata* โดยใช้วิธีการทางชีวภาพประกอบไปด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยตรงและการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยมีตัวอย่างงานวิจัย เช่น

งานวิจัยของ Basha และ Ulaganathan (2002) ศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* sp. BC121 ต่อ *C. lunata* พบว่า *Bacillus* sp. BC121 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าสายใยของราก่อโรคเกิดการแตกสลาย เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ราได้

งานวิจัยของ Srivastava และ Shalini (2008) ศึกษาการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้ *P. fluorescens* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *C. lunata* ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยของ Wicklow และ Poling (2009) ศึกษาการใช้สารไพร์โรซิดีน (pyrrocidine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนชนิดพอลีคีไทด์ (polyketide amino acid) ที่สังเคราะห์ได้จาก *Acremonium zeae* ในการยับยั้งราก่อโรคในพืช พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ *C. lunata* ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยของ Tekade และคณะ (2017) ศึกษาการใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้ง *C. lunata* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในฤษีผสม พบว่า *Trichoderma viride, T. harzianum* และ *P. fluorescens* สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้สูงสุด 60.81, 50.71 และ 33.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

งานวิจัยของ Huyly และ Soytong (2017) ศึกษาการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าวที่มีสาเหตุมาจาก *C. lunata* โดยวิธีการทางชีวภาพ พบว่า *Chaetomium cupreum* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. lunata* ได้ดี อีกทั้งเมื่อฉีดพ่นสปอร์ของ *C. cupreum* ลงบนต้นกล้าข้าว พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดโรคได้ถึง 68.79 เปอร์เซ็นต์

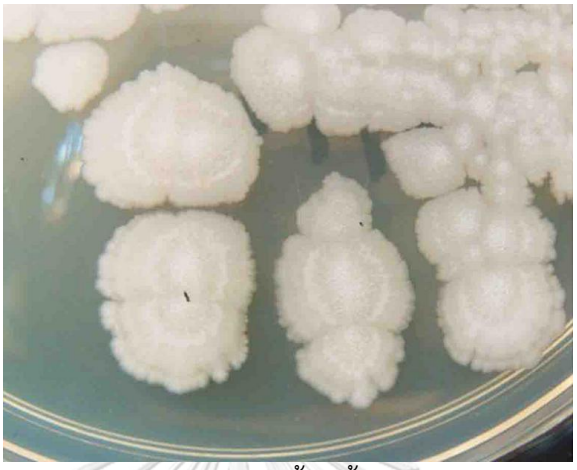
งานวิจัยของ Saechow และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. amyloliquefaciens* BAS23 ในการยับยั้งราก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับราโดยใช้เทคนิค dual culture นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *B. amyloliquefaciens* BAS23 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ถึง 92.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีสารประกอบไลโปเพปไทด์ นั่นคือ อิทูริน เอ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค

2.2 Bacillus subtilis

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ซึ่งจัดอยู่ในโดเมน Prokarya อาณาจักร Bacteria, ไฟลัม Firmicutes, คลาส Bacilli, อันดับ Bacillales และแฟมิลี Bacillaceae ลักษณะของโคโลนีมีสีขาวครีม ผิวด้าน มีรอยย่น (รูปที่ 5) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) มักเรียงติดกันเป็นสายยาว แต่ละเซลล์มีความยาวประมาณ 1.2-10.0 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.5-2.5 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobic) แต่สามารถดำรงอยู่ได้ในภาวะที่มีออกซิเจนน้อย ๆ ได้ (facultative anaerobe) มีการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) รูปร่างเป็นวงรีหรือทรงกระบอก ซึ่งสามารถทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เพื่อความอยู่รอด เช่น ความร้อน รังสี ความแห้งแล้ง ความเค็ม ภาวะออสโมติก ภาวะขาดแคลนอาหาร ความเป็นกรดเบสสูง และสารซักล้าง เป็นต้น เมื่อภาวะเหมาะสมเอนโดสปอร์จะงอกและสามารถเจริญต่อไปเป็นเซลล์ปกติได้ *B. subtilis* สามารถพบได้ทั่วไปในดิน พบได้บ้างในน้ำ อากาศ ลำไส้ของสัตว์บางชนิดและบริเวณรอบ ๆ รากพืช เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ จึงมีการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ทั้งในภาคอุตสาหกรรมและการเกษตรอย่างแพร่หลาย (Turnbull, 1996; Waites และคณะ, 2001)



<u>รูปที่ 5</u> ลักษณะโคโลนีของ *B. subtilis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSY
ที่มา : (Science Prof Online, 2015)

2.2.1 บทบาทของ *B. subtilis* ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ

B. subtilis เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่ดี เนื่องจากมีกลไกในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth promoting rhizobacteria; PGPR) โดยมีงานวิจัยมากมายที่แสดงถึงความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

งานวิจัยของ Chaurasia และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของสารประกอบที่สามารถแพร่และระเหยได้จาก *B. subtilis* ในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยสารประกอบดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Alternaria alternata, Cladosporium oxysporum, F. oxysporum, Paecilomyces lilacinus, Paecilomyces variotii*, และ *Pythium afertile* ได้โดยมีผลให้เกิดความผิดปกติของสปอร์และสายใยรา เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2008) ที่พบว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการยืดยาวออกของ germ tube ของราก่อโรคได้

งานวิจัยของ Chen และคณะ (2013) ศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจาก *Ralstonia solanacearum* โดยใช้ *B. subtilis* พบว่า *B. subtilis* มีการสร้างไบโอฟิล์มที่ช่วยส่งเสริมการเข้าครอบครองบริเวณรากและป้องกันการบุกรุกของราก่อโรค อีกทั้งยังมีการสร้างเซอแฟกตินซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยสร้างไบโอฟิล์มและผลิตเซอแฟกติน (Bais และคณะ, 2004; Zhang และคณะ, 2011)

งานวิจัยของ Ashwini และ Srividya (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ในการควบคุม *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 ซึ่งเป็นราก่อโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดี เนื่องจากมีสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส กลูคาเนส และเซลลูเลส ซึ่งมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ของรา

งานวิจัยของ Ben Khedher และคณะ (2015) ศึกษาการยับยั้ง *R. solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแบล็คสเคิฟ (black scurf) ในมันฝรั่งโดย *B. subtilis* V26 และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ได้ดีและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของสายใยรา เช่น การเกิดแวคิวโอล การไหลออกของโพรโตพลาส และการแตกหักออกของสายใย อีกทั้งยังสามารถลดความรุนแรงของโรคที่บริเวณรากและหัวมันฝรั่งได้ 63 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมันฝรั่งให้ดียิ่งขึ้นด้วย

งานวิจัยของ Shternshis และคณะ (2016) ศึกษาการยับยั้ง *Didymella applanate* ซึ่งก่อให้เกิดโรคข้อไหม้ (spur blight) ในราสพ์เบอร์รี่ พบว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดี อีกทั้งยังช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคทั้งในเชิงพื้นที่ของรอยโรคและจำนวนของผลที่เกิดการติดเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis*

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสมบัติในการต้านราสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ โปรตีนที่ผลิตจากไรโบโซม (ribosome synthesis protein) ซึ่งประกอบไปด้วยแบคเทอริโอซินและเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรา เช่น ไคติเนส โปรติเอส กลูคาเนส เป็นต้น และอีกประเภทหนึ่งคือ โปรตีนที่ไม่ได้ผลิตจากไรโบโซม (non-ribosome synthesis protein) เช่น เพปไทด์ที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์อื่น (antimicrobial peptide) (Zhao และคณะ, 2013b)

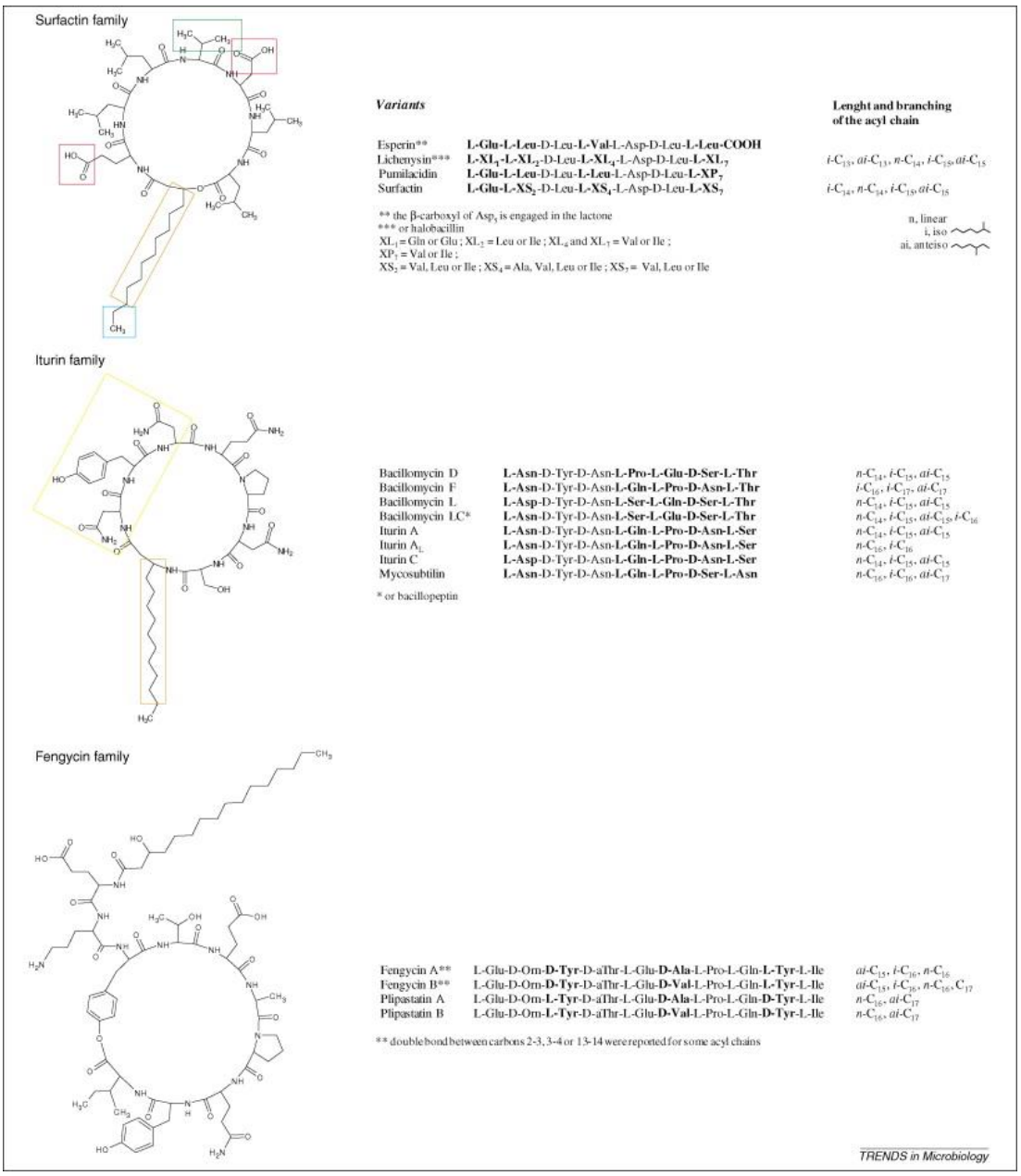
เพปไทด์ที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทไลโปเพปไทด์ ซึ่งสังเคราะห์โดยเอนไซม์ non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปมักประกอบด้วยวงของเพปไทด์ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันไปและสายโซ่ของกรดไขมัน สามารถแบ่งกลุ่มของสารประกอบไลโปเพปไทด์ออกตามโครงสร้างออกเป็น 3 กลุ่ม (Ongena และ Jacques, 2008; Stein, 2005) ดังนี้

กลุ่มของเซอแฟกติน มีโครงสร้างหลักเป็นวงของแลคโตน (lactone) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันของเฮปตะเพปไทด์และกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซี (β-hydroxy fatty acid) (รูปที่ 6) สารประกอบไลโปเพปไทด์ในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถทำให้เกิดฟองและอิมัลชัน เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) สามารถแทรกเข้าไปในชั้นไขมันได้ ด้วยเหตุนี้เอง จึงส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิพิดและสเตอรอลมีความผิดปกติ นำไปสู่การมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรีย

กลุ่มของอิทูริน มีโครงสร้างหลักเป็นวงของเฮปตะเพปไทด์เชื่อมกับกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซี มีความยาวคาร์บอน 14-17 อะตอม (รูปที่ 6) ประกอบด้วย อิทูริน บาซิโลมัยซิน และมัยโคซับทิลิน (mycosubtilin) สารประกอบไลโปเพปไทด์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่มยีสต์และราได้ดี โดยมีผลในการทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์

กลุ่มของเฟนจิซิน หรือ พลิพาสเตติน (plipastatin) มีโครงสร้างหลักเป็นวงของเดคะเพปไทด์เชื่อมกับกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซี (รูปที่ 6) สารประกอบไลโปเพปไทด์ในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งราโดยเฉพาะอย่างยิ่งในราสายใย โดยมีปฏิสัมพันธ์กับชั้นไขมันและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติในการผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



<u>รูปที่ 6</u> โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของไลโปเพปไทด์ในกลุ่มเซอแฟกติน อิทูริน และเฟนจิซิน
ที่มา : (Ongena และ Jacques, 2008)

จากงานวิจัยที่มีการศึกษาการควบคุมการชีวภาพโดยใช้ *B. subtilis* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า *B. subtilis* มักมีการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด (Mora และคณะ, 2011) และสารประกอบดังกล่าวยังสามารถเสริมฤทธิ์กัน (synergistic) เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสูงขึ้น เช่น เซอแฟกตินและอิทูริน (Maget-Dana และคณะ, 1992)

หรืออิทูรินและเฟนจิซิน (Romero และคณะ, 2007) ตัวอย่างของไลโปเพปไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การยับยั้งราก่อโรคพืชโดยไลโปเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ของ *B. subtilis*	**ราก่อโรคพืช**	**ไลโปเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา**	**อ้างอิง**
B. subtilis RB14	*R. solani*	เซอแฟกติน อิทูริน	(Asaka และ Shoda, 1996)
B. subtilis BIA	*R. solani*	เซอแฟกติน อิทูริน	(Alajlani และคณะ, 2016)
B. subtilis KS03	*Gloeosporium gloeosporioides*	อิทูริน เอ	(Cho และคณะ, 2003)
B. subtilis Y-IVI	*F. oxysporum* *R. solani* *V. dahilae*	อิทูริน เอ เฟนจิซิน	(Zhao และคณะ, 2016)
B. subtilis L194	*Phoma medicaginis*	เซอแฟกติน อิทูริน เฟนจิซิน	(Ben Slimene และคณะ, 2012)
B. subtilis RP24	*Macrophomina phaseolina* *P. ultimum* *P. aphanidermatum* *R. solani* *F. solani* *F. oxysporum* *F. moniliforme* *Fusarium udum* *A. solani* *A. alternata* *A. niger*	อิทูริน	(Grover และคณะ, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

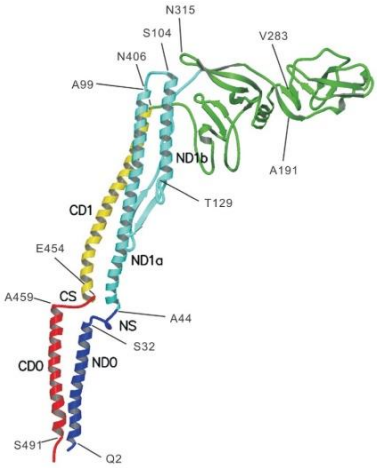
ตารางที่ 1 การยับยั้งราก่อโรคพืชโดยไลโปเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ (ต่อ)

สายพันธุ์ของ *B. subtilis*	ราก่อโรคพืช	ไลโปเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา	อ้างอิง
B. subtilis B-FS01	*F. moniliforme*	เฟนจิซิน เอ เฟนจิซิน บี	(Hu และคณะ, 2007)
B. subtilis BH072	*A. niger* *F. oxysporum* *B. cinereal* *Pythium* sp.	อิทูริน เอ แฟลกเจลลิน (flagellin)	(Zhao และคณะ, 2013b)

2.3 แฟลกเจลลิน (flagellin)

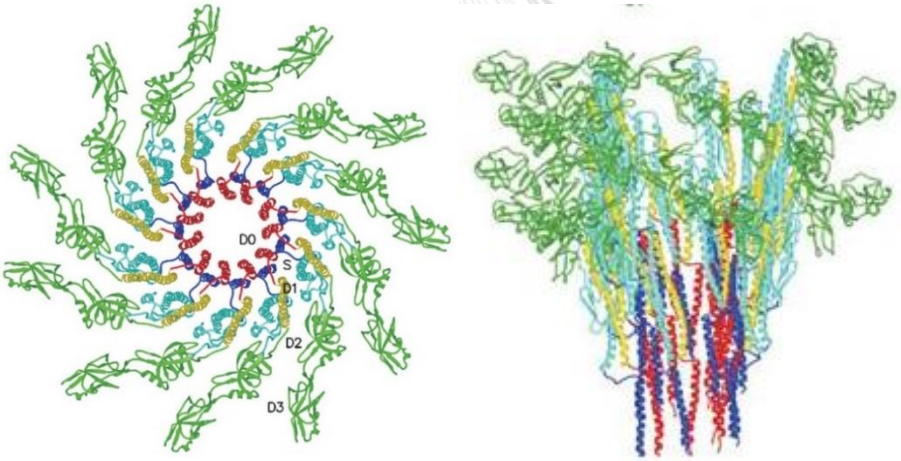
แฟลกเจลลินเป็นยูนิตโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของแฟลกเจลลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยมีลักษณะเป็นโปรตีนก้อนกลมและจัดเรียงตัวกันเป็นสายใยแฟลกเจลลาที่มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก แฟลกเจลลิน 1 ยูนิตจะมีขนาดประมาณ 30 ถึง 60 kDa ประกอบด้วย 3 โดเมนหลัก คือ โดเมนที่ปลายด้าน N (N-terminal), โดนเมนที่ปลายด้าน C (C-teriminal) และโดเมนกลาง (central domain) (รูปที่ 7) ซึ่งโดเมนปลายด้าน N และโดเมนปลายด้าน C จะเป็นโดเมนที่ลำดับกรดอะมิโนมีการอนุรักษ์ และโดเมนกลางจะมีความหลากหลายทั้งลำดับของกรดอะมิโนและความยาวของสายเพปไทด์โดยขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียผู้ผลิต สายใยแฟลกเจลลา 1 สายใยประกอบด้วยแฟลกเจลลินประมาณ 30,000 ยูนิต ซึ่งจะมีความยาวประมาณ 15 ไมโครเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 120-250 อังสตรอม (Vonderviszt และ Namba, 2013; Yonekura และคณะ, 2003) (รูปที่ 8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



<u>รูปที่ 7</u> แบบจำลองโครงสร้างแบบริบบิ้นของแฟลกเจลลิน แสดงโดเมนปลายด้าน C (CD), โดเมนกลาง และโดเมนปลายด้าน N (ND)

ที่มา : (Yonekura และคณะ, 2003)



<u>รูปที่ 8</u> แบบจำลองโครงสร้างแบบริบบิ้นของสายใยแฟลกเจลลินที่ประกอบด้วยยูนิตของแฟลกเจลลินจากมุมมองด้านบน (ซ้าย) จากมุมมองด้านข้าง (ขวา)

ที่มา : (Yonekura และคณะ, 2003)

2.3.1 ประโยชน์ของแฟลกเจลลินในการเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker)

แฟลกเจลลินนอกจากจะเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของแฟลกเจลลาแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากแฟลกเจลลินในการเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการตรวจหา (detection), การระบุชนิด (identification), การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic), และการวิเคราะห์วิทยาการการระบาด (epidemiological analysis) ของแบคทีเรีย

เนื่องจากแฟลกเจลลินมีโดเมนที่มีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโนจึงใช้ในการตรวจหาชนิดของแบคทีเรีย และใช้ส่วนของโดเมนที่มีความหลากหลายในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกัน (Winstanley และ Morgan, 1997) เช่น การจำแนก *Borrelia hermsii* และ *B. burgdorferi* โดยใช้ความแตกต่างของลำดับบนยีนแฟลกเจลลิน (Picken, 1992), การตรวจหา *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli* ผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแฟลกเจลลิน ได้แก่ *fla*A และ *fla*B (Rasmussen และคณะ, 1996), และการตรวจหาและจำแนก *B. subtilis* ด้วยยีนแฟลกเจลลิน (*hag*) เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดในการตรวจหาสายพันธุ์ของ *B. subtilis* ที่มีสมบัติในการต้านรา (Asano และคณะ, 2001)

2.3.2 การยับยั้งราก่อโรคพืชโดยแฟลกเจลลิน

แฟลกเจลลินเป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งมีรายงานว่าแฟลกเจลลินสามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ เช่น งานวิจัยของ Zhao และคณะ (2013b) ศึกษาโปรตีนที่มีสมบัติในการต้านราจาก *Bacillus* sp. BH072 พบว่า *Bacillus* sp. BH072 มีความสามารถในการต้านราหลายชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Pythium* sp., และ *Botrytis cinerea* และมีการตรวจพบยีนแฟลกเจลลิน (*hag*) ขนาด 1002 คู่เบสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน แล้วทำโปรตีนดังกล่าวให้บริสุทธิ์พบว่ามีขนาดประมาณ 35 kDa และมีความคล้ายกับโปรตีนแฟลกเจลลิน ซึ่งโปรตีนบริสุทธิ์นี้มีความสามารถในการยับยั้ง *A. niger* ได้ดี

งานวิจัยของ Liu และคณะ (2013) คัดแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีน จาก *B. subtilis* F3 ที่มีฤทธิ์ต้าน *Monilinia fructicola* พบว่าโปรตีนนี้มีความใกล้เคียงกับแฟลกเจลลิน ซึ่งมีผลต่อการสร้างสปอร์ ทำให้ปริมาณคอนิเดียน้อยลง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของรา ได้แก่ ทำให้ผิวเซลล์ขรุขระ มีการสะสมแกรนูลภายในเซลล์ มีการสลายตัวของผนังเซลล์ และการสร้างแวคิวโอลภายในสายใย นอกจากนี้โปรตีนบริสุทธิ์ดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. capsicum* และ *C. gloeosporioides* ได้

งานวิจัยของ Ren และคณะ (2013) ศึกษาการยับยั้ง *B. cinerea* โดย *B. subtilis* RN-061 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่คล้ายแฟลกเจลลินซึ่งมีขนาดประมาณ 32 kDa และเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ก็ยังคงแสดงสมบัติยับยั้งราได้ จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน แล้วโคลนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* ที่มียีนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ได้ถึง 47 เปอร์เซ็นต์

และงานวิจัยของ Fang และคณะ (2017) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Stachybotrys chartarum* และ *P. expansum* ซึ่งเป็นราก่อโรคในเกาลัด จาก *B. amyloliquefaciens* CMN1308 พบว่าหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 29.5 kDa ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรีแล้ว พบว่าโปรตีนนี้มีความคล้ายกับโปรตีนแฟลกเจลลิน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าส่วนใดของโปรตีนแฟลกเจลลินที่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา

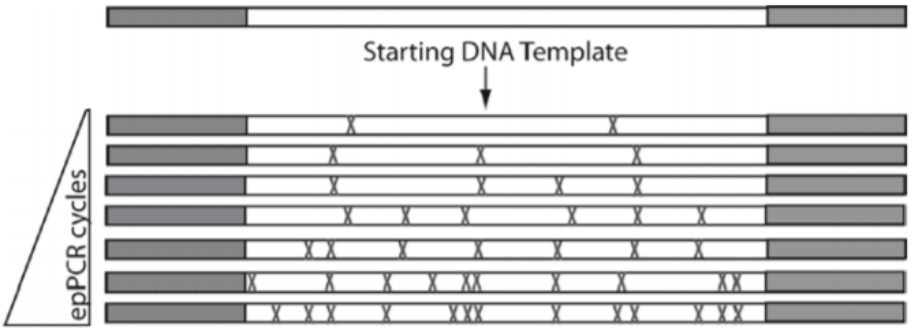
จากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการใช้ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสและโรคจุดสนิมในกล้วยไม้ โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ เมื่อตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยง *B. subtilis* N3 และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีขนาดประมาณ 39.88 KDa และจากการวิเคราะห์โปรตีนนี้ด้วยแมสสเปกโตสโกปีพบว่าเป็นโปรตีนที่มีความคล้ายกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอ ของแบคทีเรียในกลุ่ม *B. subtilis* ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนบริสุทธิ์นี้ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* โดยมีผลทำให้การงอกของสปอร์ราผิดปกติและทำให้สายใยรามีการบวม โป่งพองออกและมีการแตกแขนงบริเวณปลายสายใย (Sowanpreecha, 2018; รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2559) ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลิน โดยเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน แล้วโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน แล้วชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนนั้น จากนั้นทำโปรตีนดังกล่าวให้บริสุทธิ์ โดยมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนแฟลกเจลลินที่บริสุทธิ์ในการยับยั้ง *C. lunata* จากนั้นศึกษาบริเวณของโปรตีนแฟลกเจลลินที่มีผลต่อการยับยั้ง *C. lunata* โดยการตัดลำดับบางส่วนบนยีนออก โคลนและแสดงออกโปรตีน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* เพื่อระบุว่าบริเวณใดบนยีนและโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการยับยั้ง *C. lunata*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาดเป็นวิธีการที่ก่อให้เกิดการกลายแบบสุ่มโดยการรบกวนภาวะในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (รูปที่ 9) เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase และการใช้ *Taq* DNA polymerase ที่ไม่มีสมบัติ

3´→ 5´ exonuclease ซึ่งจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เนื่องจาก *Taq* DNA polymerase อาจนำนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องมาเชื่อมต่อ ส่งผลให้เกิดการกลายแบบทรานสิชัน (transition mutation) โดยการแทนที่เบสจาก AT เป็น GC (Keohavong และ Thilly, 1989) และเมื่อไม่มีสมบัติ 3´→ 5´ exonuclease จึงทำให้ขาดสมบัติในการตรวจสอบและแก้ไขนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้อง โดยอัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดจากความผิดพลาดของเอนไซม์นี้อยู่ที่ประมาณ 2×10^{-4} ถึง 1.2×10^{-5} ต่อนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 รอบปฏิกิริยา นอกจากการใช้สมบัติของเอนไซม์แล้ว การเพิ่มเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension time), การเพิ่มปริมาณของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในปฏิกิริยาซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของ DNA polymerase ก็มีส่งผลให้เกิดการกลายโดยการแทนที่เบส (base substitution) และเกิดการกลายแบบเฟรมชิฟท์ (frameshift mutation) โดยปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่มากเกินพอในระบบจะทำให้มีอัตราความผิดพลาดอยู่ที่ประมาณ 1 ใน 5,000 ต่อนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 รอบปฏิกิริยา (Eckert และ Kunkel, 1990) หรือการใช้แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) ทดแทนการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์ที่มีคุณภาพต่ำ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการคัดเลือกเบสที่จะนำมาต่อบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเบส (insertion) และยับยั้งสมบัติ exonuclease ของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบแก้ไขความผิดพลาดได้ (Beckman และคณะ, 1985) หรือการเพิ่มความเข้มข้นของ dNTPs และการทำให้ปริมาณของ dNTPs ทั้ง 4 ชนิดไม่สมดุลกัน เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจะทำให้เบสบางชนิดไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์ จึงมีการนำเบสที่ไม่ถูกต้องมาใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (Cadwell และ Joyce, 1992)



<u>รูปที่ 9</u> การกลายแบบสุ่มโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด ภายใต้ภาวะที่ลดความแม่นยำของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase
ซึ่งการกลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีจำนวนรอบของปฏิกิริยามากขึ้น โดยสัญลักษณ์ X แสดงถึงจุดที่เกิดการกลายแบบสุ่ม (random point mutation)
ที่มา : (Mccullum และคณะ, 2010)

ตัวอย่างของงานวิจัยที่มีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด เช่น การปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสใน *E. coli* พบว่า *E. coli* ที่มีการกลายของยีน *Cel8M* ส่งผลให้ได้กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปจากอะลานีนไปเป็นวาลีนในตำแหน่งที่ 9 และจากกลูตามีนไปเป็นไลซีนในตำแหน่งที่ 353 ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.42 เท่า และการเปลี่ยนแปลงจากเซอรีนไปเป็นไกลซีนในตำแหน่งที่ 117 ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.61 เท่า (Lin และคณะ, 2016) การปรับปรุงอัลฟาอะไมเลส (α-amylase) จาก *Bacillus licheniformis* พบว่าการกลายของยีนเกี่ยวข้องกับความเสถียรของเอนไซม์ในภาะที่เป็นกรด โดยโคลนที่มีการกลายของยีนและมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากธรีโอนีนไปเป็นไอโซลิวซีนในตำแหน่งที่ 353 จากฮิสติดีนไปเป็นอาร์จีนีนในตำแหน่งที่ 400 และมีการกลายทั้งสองตำแหน่งภายใต้ภาวะที่มี pH ต่ำพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3.5, 6.0 และ 11.3 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่มีการกลาย (Liu และคณะ, 2012)

ข้อดีของการใช้วิธีนี้ในการก่อให้เกิดการกลายแบบสุ่ม คือ เป็นเทคนิคที่เรียบง่าย ทำได้สะดวก เหมาะสำหรับทำการกลายบนยีนเดียว และมีการกลายน้อย นำไปสู่การปรับปรุงเพื่อเพิ่มเสถียรภาพหรือประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีนที่สนใจ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ไม่สามารถทราบได้ว่าการกลายเกิดขึ้นอย่างไรในบริเวณใดของยีน และจำเป็นจะต้องส่งโคลนต่าง ๆ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง (Mccullum และคณะ, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. คอร์ก บอเรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
3. คอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC (Ni-sepharose) Histrap HP ของบริษัท GE Healthcare, USA
4. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องเขย่าสารละลาย (rocking shaker)
6. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น EV1450 ของบริษัท Cleaver Scientific, UK
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Metter Toledo, Switzerland
8. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
10. เครื่องบ่มแบบเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 ของบริษัท New Brunwick Scientific, USA
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
14. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น MyCycler Thermal Cycler ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
16. เครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน ÄKTA start ของบริษัท GE Healthcare, USA
17. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA และ รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic , USA
19. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน รุ่น 2000C (Nanodrop 2000C spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
20. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
21. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
22. ชุดอุปกรณ์ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN tetra cell, 2-gel system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
23. ชุดอุปกรณ์ทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส ของบริษัท Major Science, USA
24. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
25. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
26. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
27. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
28. ไมโครปิเปตต์และทิปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, USA
29. หลอดคิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
4. กานามัยซิน (kanamycin) ของบริษัท PhytoTechnology Laboratories, USA
5. คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
6. ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJet plasmid Miniprep kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA

7. ชุดสำหรับการโคลนสำเร็จรูป TArget Clone -Plus- cloning kit ของบริษัท Tobayo, Japan
8. ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
12. ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1 Kb DNA ladder ของบริษัท Thermo Scientific, USA
13. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
14. เปปโทน (peptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
15. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
16. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
17. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
18. ไลโซไซม์ (lysozyme) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
19. สารละลาย Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) ของบริษัท AMRESCO, USA
20. สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของบริษัท Siberian Enzyme, Russia
21. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
22. สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka, Switzerland
23. สีย้อมดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า (6X loading dye) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
24. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
25. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
26. เอนไซม์ DNase ของบริษัท Thermo Scientific, USA
27. เอนไซม์ Proteinase K ของบริษัท Thermo Scientific, USA
28. เอนไซม์ RNase A ของบริษัท Thermo Scientific, USA
29. เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI ของบริษัท Thermo Scientific, USA
30. เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Xho*I ของบริษัท Thermo Scientific, USA
31. แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

32. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA
33. Bacterial cell lysis buffer ของบริษัท Gold Biotechnology, USA
34. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
35. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ของบริษัท Thermo Scientific, USA
36. SeaKem® LE Agarose For gel electrophoresis ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
37. SERVA DNA stain G ของบริษัท Serva Electrophoresis Gmbh, Germany
38. T4 DNA ligase ของบริษัท Thermo Scientific, USA
39. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
40. Tris base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Research Organics, USA
41. Tween 20 ของบริษัท Bio Basic, Canada

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.1 แบคทีเรีย

นำ *Bacillus subtilis* N3 ที่คัดแยกได้จากดินที่จังหวัดกาญจนบุรีโดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรณีต้องการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงผสมกับ 15% กลีเซอรอลปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำ *Escherichia coli* DH5α และ *Escherichia coli* BL21(DE3) เลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรณีต้องการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงผสมกับ 15% กลีเซอรอลปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.2 ราก่อโรคพืช

เลี้ยง *Curvularia lunata* ที่ได้รับมาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเกี่ยวสปอร์โดยการล้างด้วย 0.1% Tween 20 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโทมีเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 40 เท่า และเจือจางสปอร์ให้มีจำนวน $2X10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร กรณีต้องการเก็บรักษาเป็นเวลานานผสมสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้กับ 15% กลีเซอรอล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย

อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA), อาหารเหลว Nutrient Broth (NB), อาหารแข็ง Luria Bertani (LB) Agar, อาหารเหลว Luria Bertani (LB) Broth

3.4.2 สำหรับรา

อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน

3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *B. subtilis* N3

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยวิธีของ LMU-Munich (LMU-Munich Team, 2012) ดังนี้ เลี้ยง *B. subtilis* N3 บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.8-1.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และแขวนลอยตะกอนเซลล์ในสารละลาย TEN (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 นาที และเติม RNase A (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร, proteinase K ปริมาณเล็กน้อย และสารละลาย TEN* (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล (phenol; Bio Basic, Canada) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอีกครั้ง แล้วเติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform:isoamylalcohol; Bio Basic, Canada) อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบน ย้ายไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ที่เย็น ปริมาตรสองเท่า แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TEN* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.5.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์และการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแฟลกเจลลิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของยีนแฟลกเจลลินซึ่งมีการแสดงออกให้โปรตีนแฟลกเจลลินโดยใช้ข้อมูลลำดับจีโนมของ *B. subtilis* หลายสายพันธุ์ จากฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของแฟลกเจลลินเพื่อเป็นนิวคลีโอไทด์ต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแฟลกเจลลินโดยมีการใส่ลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ลงในฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ตามลำดับ และศึกษาโดเมนหลักของโปรตีนแฟลกเจลลินจากฐานข้อมูล Pfam (https://pfam.xfam.org/)

3.5.3 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบ และใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้นเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) และเตรียมส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

5X Phusion HF Buffer	5	ไมโครลิตร
50 µM forward primer	1	ไมโครลิตร
50 µM reverse primer	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ (50 ng/µl)	1	ไมโครลิตร
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	35.5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์ และสารละลายต้องอยู่ในภาวะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดยชั่งอะกาโรส แล้วละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) แล้วหลอมอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด ตั้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายสำหรับย้อมดีเอ็นเอ SERVA DNA stain G (Serva Electrophoresis Gmbh, Germany) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรในสารละลายอะกาโรส 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจลตั้งไว้ให้แข็ง จากนั้นนำเจลที่เตรียมเสร็จใส่ลงในเครื่องอีเล็กโทรโฟเรซิส (Major Science, USA) และโหลดสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.3 ที่ผสมกับ 6X loading dye (Thermo Scientific, USA) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA) สำหรับเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ลงในหลุมสำหรับโหลดตัวอย่าง โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วถ่ายรูปเจลด้วยชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA)

3.5.5 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) โดยตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการละลายใน binding buffer ปริมาตรเท่ากับเจล ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ประกอบคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์เข้ากับหลอดเก็บสารละลาย จากนั้นใส่สารละลายเจลลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เปล่ามาประกอบเข้ากับคอลัมน์แทนหลอดเก็บสารละลาย ใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอ แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nanodrop; Thermo Scientific, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 การโคลนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector)

3.6.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลิน โดยใช้ชุดโคลนดีเอ็นเอสำเร็จรูป TArget Clone -Plus- (Toyobo, Japan) โดยเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.5.5 เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการโคลน pTA2 (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) โดยเตรียมชิ้นยีนแฟลกเจลลินสำหรับทำปฏิกิริยาโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอรเรส ปริมาตร 9 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X A-attachment mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเตรียมสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยาเชื่อมชิ้นยีนแฟลกเจลลินเข้ากับเวกเตอร์ ดังนี้

2X ligation buffer	5	ไมโครลิตร
pTA2 vector (50 ng/µl)	1	ไมโครลิตร
dA-attached PCR product	2	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
nuclease-free water	1	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดีด้วยปิเปตต์ แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6.2 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

3.6.2.1 เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α โดยขีดเชื้อ *E. coli* DH5α บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นปิเปตต์หัวเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ 0.3-0.5 จากนั้นเทใส่ในขวดสำหรับปั่นเหวี่ยงที่แช่เย็น แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ

ออก จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์-แคลเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$-$CaCl_2$) (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ที่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออก จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) ที่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออก จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย 0.085 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ที่มี 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2.2 ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชั่น (transformation) ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) โดยใส่สารละลายผสมจากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้ว heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาบ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6.3 การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.6.3.1 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJet plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, USA) โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วย

resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเติม lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นเติม neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนของสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ที่ประกอบเข้ากับหลอดเก็บสารละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง เติม wash solution และปั่นเหวี่ยงเช่นเดิมซ้ำอีก 1 ครั้ง เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วนำหลอดหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เปล่ามาประกอบเข้ากับคอลัมน์แทนที่หลอดเก็บสารละลาย จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายแล้ววัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nanodrop; Thermo Scientific, USA)

3.6.3.2 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I โดยเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

10X FastDigest Buffer	2	ไมโครลิตร
plasmid DNA	2	ไมโครลิตร (1 ไมโครกรัม)
FastDigest *Bam*HI	1	ไมโครลิตร
FastDigest *Xho*I	1	ไมโครลิตร
nuclease-free water	15	ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วตรวจสอบด้วยวิธีเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส ตามข้อ 3.5.4 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7 การโคลนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector)

3.7.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลิน โดยเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) โดยสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJet plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, USA) ตามข้อ 3.6.3.1 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ตามข้อ 3.6.3.2 จากนั้นทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นยีนแฟลกเจลลิน และทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) แล้วเชื่อมเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เช่นเดียวกัน โดยเตรียมสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยาเชื่อมชิ้นยีนแฟลกเจลลินเข้ากับเวกเตอร์ ดังนี้

Linear vector DNA	50 นาโนกรัม
Insert DNA	อัตราส่วนต่อเวกเตอร์ เท่ากับ 3 : 1
10X T4 DNA ligase buffer	2 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1 Weiss U
Nuclease-free water	ปรับปริมาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดีด้วยปิเปตต์ แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α โดยใส่สารละลายผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้ว heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาบ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.7.2. การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.7.2.1 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJet plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, USA) ตามข้อ 3.6.3.1

3.7.2.2 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ โดยการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I ตามข้อ 3.6.3.2 แล้วตรวจสอบด้วยวิธีเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตรวจสอบความถูกต้องในการเชื่อมกับโปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัสเปิด (open reading frame) รวมทั้งลำดับแท็ก (tag sequence) ได้อย่างถูกต้อง โดยใช้โปรแกรม ORF finder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)

3.8 การแสดงออกแฟลกเจลลิน

3.8.1 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3)

3.8.1.1 เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) โดยใช้วิธีการตามข้อ 3.6.2 จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8.1.2 ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) ด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชั่น ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) ตามข้อ 3.6.2 จากนั้นเกลี่ยเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคลีนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.8.2. การคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.8.2.1 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJet plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, USA) ตามข้อ 3.6.3.1

3.8.2.2 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ โดยการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I ตามข้อ 3.6.3.2 แล้วตรวจสอบด้วยวิธีเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส ตามข้อ 3.6.4 เพื่อตรวจสอบการรับเข้าของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.8.3 การชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนแฟลกเจลลินใน *E. coli* BL21(DE3)

3.8.3.1 ขีดเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.8.2.1 และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น เขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์มาใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่าปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์น้ำเลี้ยงเชื้อออก แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นตัวอย่างของเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารแขวนลอยเซลล์ที่เหลือด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ โดยผสมสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา

8 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์แยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เก็บตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

3.9 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่ารวมทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ทั้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.8.3 มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE (Sambrook และ Russell, 2001)

3.9.1 การเตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับทำ SDS-PAGE

เตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับทำ SDS-PAGE โดยทำความสะอาดแผ่นแก้วขนาด 8.2X10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.4X10.2 เซนติเมตร ด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วนำมาประกบกัน โดยมีช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว 1.5 มิลลิเมตร จากนั้นประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล Mini PROTEAN tetra cell (Bio-Rad Laboratories, USA) แล้วปิเปตต์สารละลายผสมเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12.5% ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว โดยการเตรียมสารละลายผสมเซพาเรติงเจล ที่ความเข้มข้น 12.5% สำหรับการเตรียม 2 เจล มีส่วนผสมของสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

น้ำปราศจากไอออน	5.62	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 15)	4.50	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 16)	180	ไมโครลิตร
Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) solution	7.50	มิลลิลิตร
TEMED	15	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate (ภาคผนวก ข หมายเลข 17)	150	ไมโครลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันตามลำดับ แล้วปิเปตต์สารละลายผสมดังกล่าวลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว โดยให้มีความสูงของสารละลายห่างจากปลายช่องใส่ตัวอย่าง (slot former)

ประมาณ 5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนจนเต็มช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบและไม่มีฟองอากาศ ตั้งไว้ประมาณ 20 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว จากนั้นเทน้ำที่บริเวณผิวหน้าของเจลออก แล้วเติมสารละลายผสม สแต็กกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 5% ซึ่งเตรียมส่วนประกอบต่าง ๆ สำหรับ 2 เจล ดังนี้

น้ำปราศจากไอออน	2.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 18)	1.25	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) solution	830	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันตามลำดับ จากนั้นบรรจุสารละลายผสมของสแต็กกิงเจลลงในช่องว่างที่เหลือระหว่างแผ่นแก้ว วางแผ่นหวีพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งไว้ประมาณ 20 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัว นำเจลที่เตรียมแล้วประกอบเข้ากับชุดอีเล็กโทรโฟเรซิส เติมสารละลาย 1X running buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) ลงในช่องว่างด้านในจนเต็ม และด้านนอกให้มีความสูงตามกำหนด ดึงแผ่นหวีพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างออก เพื่อเตรียมบรรจุโปรตีนตัวอย่าง

3.9.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับ SDS-PAGE

3.9.2.1. เตรียมตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน โดยนำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Unstained Protein Molecular Weight Marker; Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นเพื่อเตรียมโหลดลงใน SDS-PAGE

3.9.2.2. เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์ โดยนำตะกอนเซลล์ *E. coli BL21(DE3)* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ทั้งที่ไม่ผ่านและที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.8.3 มาแขวนลอยด้วย 1X SDS sample buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.9.2.3 เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ โดยผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์กับ 4X SDS sample buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) อัตราส่วน 3 ต่อ 1

จากนั้นบรรจุสารละลายโปรตีนทั้งหมด รวมทั้งสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ลงในช่องใส่ตัวอย่างแต่ละช่องของเจลที่เตรียมไว้ แล้วทำอีเล็กโทรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 90 นาที

3.9.3 การตรวจสอบโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซีบลู (coomassie blue) โดยนำเจลไปแช่ในสารละลายสีย้อมคูแมสซีบลู (Coomassie blue staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 21) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า (rocking shaker) ตลอดเวลา หลังจากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 22) โดยมีการเขย่าเบา ๆ ตลอดเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสามารถเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จึงเทสารละลายสำหรับล้างสีออก แล้วเติมสารละลายสำหรับการตรึง (fix solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 23) จากนั้นประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีการแสดงออกโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.10 การหาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.10.1 การแปรผันความเข้มข้น IPTG

ขีดเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.8.2.1 และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น เขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์มาใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นเก็บ

ตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่าปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์แยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เก็บตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นตัวอย่างของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารแขวนลอยเซลล์ที่เหลือด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยผสมสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์แยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เก็บตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE

3.10.2 การแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขีดเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.8.2.1 และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น เขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์มาใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่าปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์แยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เก็บตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นตัวอย่างของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารแขวนลอยเซลล์ที่เหลือด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุดจากข้อ 3.11.1 โดยผสมสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ปิเปตต์แยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เก็บตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE

3.11 การทำบริสุทธิ์โปรตีนแฟลกเจลลินโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC

ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นทำโปรตีนนั้นให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC (Ni-sepharose) Histrap HP (GE Healthcare, USA) โดยใช้เครื่องสำหรับทำบริสุทธิ์โปรตีน ÄKTA start(GE Healthcare, USA) เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีพอลิฮิสทิดีน (His-tag) เชื่อมอยู่ ดังนี้

3.11.1 ขีดเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.6.1.2 และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์มาใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์

แล้วบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.11.2 กรองน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากของ 3.11.1 ผ่านชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อ ขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน เพื่อให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์สำหรับการทำบริสุทธิ์ต่อไป

3.11.3 ทำสารละลายโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC (Ni-sepharose) Histrap HP (GE Healthcare, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องสำหรับทำบริสุทธิ์ ÄKTA start (GE Healthcare, USA) ซึ่งมีการทำบริสุทธิ์แบบไล่ระดับ (gradient) ตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

ปริมาตรของคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์	0.962	มิลลิลิตร
ความดันจำกัด	0.30	เมกะปาสกาล
อัตราการไหลของสารละลายผ่านคอลัมน์	1.0	มิลลิลิตร/นาที
สารละลายบัฟเฟอร์ A (ภาคผนวก ข หมายเลข 24)	5	เท่าของปริมาตรคอลัมน์
ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง	20.00	มิลลิลิตร
สารละลาย wash buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 25)	10	เท่าของปริมาตรคอลัมน์
ปริมาตรของ elution ทั้งหมด	10.0	มิลลิลิตร โดยกำหนดให้
สารละลายบัฟเฟอร์ B (ภาคผนวก ข หมายเลข 26) ความเข้มข้นเริ่มต้น	0	%
สารละลายบัฟเฟอร์ B ความเข้มข้นสุดท้าย	100	%
ปริมาตรของสารละลายที่เก็บในแต่ละแฟลกชัน	1.0	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เตรียมสารละลายทั้งหมด ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ซึ่งใช้เป็นสารละลายตัวอย่าง บัฟเฟอร์ต่าง ๆ เข้าสู่ระบบการทำงานของเครื่อง จากนั้นเครื่องจะดำเนินงานตามคำสั่งและพารามิเตอร์ที่ตั้งไว้ เมื่อเครื่องสิ้นสุดการทำงาน เก็บสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ทั้งหมด เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE

3.12 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.12.1 เลี้ยง *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นราสำหรับการทดสอบ

3.12.2 ขีดเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.6.1.2 และ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์มาใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุดจากข้อ 3.11.1 โดยผสมสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุดจากข้อ 3.11.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อ เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมากรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ไปทดสอบการยับยั้งราด้วยการเทผสมกับอาหารแข็ง PDA ความเข้มข้น 2 เท่า ที่หลอมเหลวไว้ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.11.3 วางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *C. lunata* ที่เจาะด้วยคอร์กบอเรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วตรวจสอบการยับยั้งรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ผสมกับอาหารเหลว LB ที่มี IPTG และชุดที่ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า เป็นชุดควบคุมลบ

3.11.4 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามรัศมีการเจริญ (percentage of inhibition of radial growth (PIRG %)) ของ *C. lunata* จากสมการ

$$\text{PIRG\%} = \left(\frac{R1 - R2}{R1}\right) \times 100$$

R1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ *C. lunata* ที่เจริญในชุดควบคุม

R2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ *C. lunata* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์

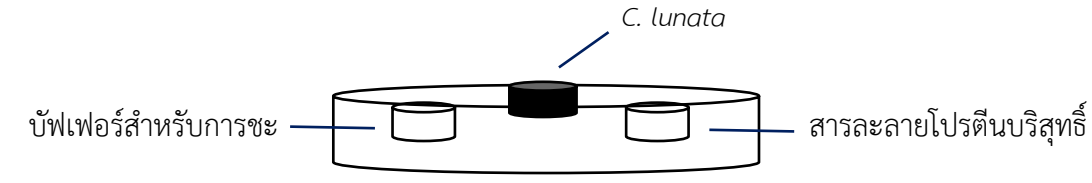
3.13 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนบริสุทธิ์

3.13.1 เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ด้วยคอร์กบอเรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลุมโดยให้หลุมทั้งสอง ห่างกัน 3 เซนติเมตร (รูปที่ 10)

3.13.3 ปิเปตต์บัฟเฟอร์สำหรับการชะที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรก และปิเปตต์สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จาก ข้อ 3.11 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมถัดไป (รูปที่ 10)

3.13.3 วางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *C. lunata* ที่เจาะด้วยคอร์กบอเรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วตรวจสอบการยับยั้งรา (รูปที่ 10)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



<u>รูปที่ 10</u> วิธีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนบริสุทธิ์

3.14 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ *C. lunata*

3.14.1 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อสายใย *C. lunata*

เขี่ยสายใย *C. lunata* จากบริเวณที่มีการยับยั้งโดยสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ จากข้อ 3.13 ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้นสังเกตลักษณะของสายใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เปรียบเทียบกับสายใยที่เขี่ยจากบริเวณที่ใกล้กับหลุมที่มี elution buffer

3.14.2 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการงอกของสปอร์ *C. lunata*

เลี้ยง *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นขูดสปอร์ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ใส่ลงในสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ elution buffer ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นของสปอร์สุดท้ายเป็น 1×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.15 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata*

3.15.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata*

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของยีนแฟลกเจลลินและโปรตีนแฟลกเจลลินที่แปลรหัสได้จาก *B. subtilis* N3 กับลำดับเบสของยีนแฟลกเจลลินและโปรตีนแฟลกเจลลินของ *Bacillus* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งรา ก่อโรคพืชได้ โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI แล้วออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับเบสที่แปลรหัสได้โดเมนโปรตีนบนยีนแฟลกเจลลิน โดยมีการใส่ลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ลงในฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ ตามลำดับ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.15.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินที่สกัดได้จาก *E. coli* BL21(DE3) จากข้อ 3.8.3 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้น เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) และเตรียมส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

5X Phusion HF Buffer	5	ไมโครลิตร
50 µM forward primer	1	ไมโครลิตร
50 µM reverse primer	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ (50 ng/µl)	1	ไมโครลิตร
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	35.5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์ และสารละลายต้องอยู่ในภาวะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที		
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที	⎫	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	⎬	30 รอบ
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที	⎭	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที		

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสและทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.4.4 และ 3.4.5 ตามลำดับ

3.15.3 การโคลนชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector)

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลิน โดยใช้ชุดโคลนดีเอ็นเอสำเร็จรูป TArget Clone -Plus- (Toyobo, Japan) ตามข้อ 3.6.1 และถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5**α** ตามข้อ 3.6.2 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.6.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนบนยีนแฟลกเจลลินที่โคลนได้

3.15.4 การโคลนชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector)

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลิน โดยเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) ตามข้อ 3.7.1 และถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5**α** ตามข้อ 3.7.2 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.7.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตรวจสอบการเชื่อมกับโปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัสเปิด (open reading frame) รวมทั้งลำดับแท็ก (tag sequence) ได้อย่างถูกต้อง โดยใช้โปรแกรม ORF finder

3.15.5 การแสดงออกของโปรตีนจากชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลิน

ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) ตามข้อ 3.8.1 และคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.8.2 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนจากชิ้นส่วนของยีนแฟลกเจลลิน ตามข้อ 3.8.3

3.15.6 การตรวจสอบโปรตีนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

นำเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.12.5 มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE (Sambrook และ Russell, 2001) ตามข้อ 3.9

3.16 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR)

3.16.1 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด

เพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Mccullum และคณะ, 2010) โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินที่สกัดได้โนจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.8.2 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.5.2 เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) และเตรียมส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

10X *Taq* Buffer	5	ไมโครลิตร
50 µM forward primer	0.5	ไมโครลิตร
50 µM reverse primer	0.5	ไมโครลิตร
20 mM dCTP	2.5	ไมโครลิตร
20 mM dTTP	2.5	ไมโครลิตร
20 mM dATP	0.5	ไมโครลิตร
20 mM dGTP	0.5	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	10	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ (50 ng/µl)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	26.5	ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์ และสารละลายต้องอยู่ในภาวะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	64 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.4.5

3.16.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้าในเวกเตอร์สำหรับการโคลน (cloning vector)

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม โดยใช้ชุดโคลนดีเอ็นเอสำเร็จรูป TArget Clone -Plus- (Toyobo, Japan) ตามข้อ 3.6.1 และถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ตามข้อ 3.6.2 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.6.3

3.16.3 การโคลนยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector)

สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม โดยเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม เข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) ตามข้อ 3.7.1 และถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ตามข้อ 3.7.2 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.7.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.16.4 การแสดงออกของโปรตีนจากชิ้นส่วนของยีนแฟลกเจลลิน

ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) ตามข้อ 3.8.1 และคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.8.2 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนจากชิ้นส่วนของยีนแฟลกเจลลิน ตามข้อ 3.8.3

3.16.5 การตรวจสอบโปรตีนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

นำเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.16.4 มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE (Sambrook และ Russell, 2001) ตามข้อ 3.9

3.16.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามข้อ 3.12 แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* ระหว่างโปรตีนที่ได้จากยีนแฟลกเจลลินทั้งยีนและโปรตีนที่ได้จากยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย คัดเลือกโคลนที่แสดงประสิทธิภาพยับยั้ง *C. lunata* และไม่สามารถยับยั้งได้เพื่อสกัดพลาสมิด และวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.16.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata*

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนในข้อ 3.13.6 และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับยีนแฟลกเจลลินเดิม แปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเพื่อให้ได้ลำดับของกรดอะมิโน และนำมาสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2) และโปรแกรมสร้างภาพโมเลกุล PyMOL เพื่อตรวจสอบบริเวณที่เกิดการกลายและหาบริเวณบนยีนแฟลกเจลลินที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

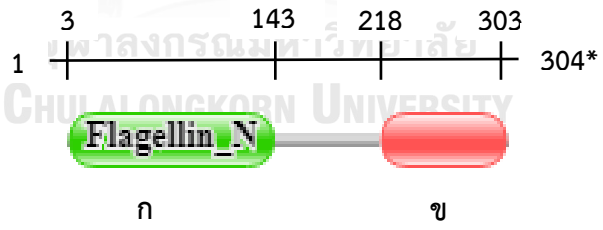
ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้อมูลด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 22

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลิน

4.1.1การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์และการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแฟลกเจลลิน

เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลินของ *Bacillus subtilis* จากฐานข้อมูล แล้วนำมาใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแฟลกเจลลิน ได้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่มีลำดับเป็น 5´-GGAAGGATCCAATGAGAATTAACCACAATATTGC-3´และ 5´-GCATTTCTCGAGTAACGTAATAATTGAAGTACGT-3´ ตามลำดับ และโปรตีนแฟลกเจลลินในกลุ่ม *B. subtilis* นี้มีความยาว 304 กรดอะมิโนซึ่งประกอบไปด้วยโดเมนหลัก 2 โดเมน คือ flagellin-N หรือโดเมน N และ flagellin-C หรือ โดเมน C ซึ่งมีความยาว 140 และ 85 เรซิดิวของกรดอะมิโน ตามลำดับ โดยโดเมน N จะเริ่มที่กรดอะมิโนลำดับที่ 3 ไปจนถึงกรดอะมิโนลำดับที่ 143 (หมายเลขการเข้าถึง PF00669) และโดเมน C จะเริ่มที่กรดอะมิโนลำดับที่ 218 ไปจนถึงกรดอะมิโนลำดับที่ 303 (หมายเลขการเข้าถึง PF00700) (รูปที่ 11)



<u>รูปที่ 11</u> ตำแหน่งของโดเมน N และโดเมน C บนโปรตีนแฟลกเจลลิน

ก. ตำแหน่งของโดเมน N;

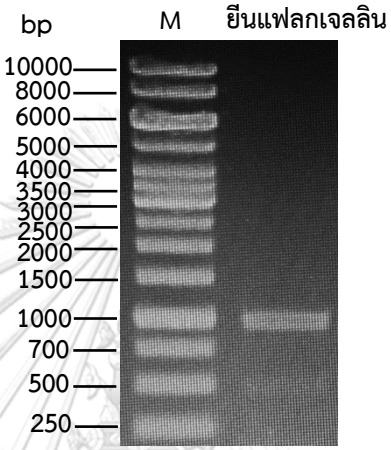
ข. ตำแหน่งของโดเมน C

* แสดงหมายเลขลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนแฟลกเจลลิน

ที่มา : (https://pfam.xfam.org/protein/A0A162QQD4)

4.1.2 การเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบ พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส (รูปที่ 12)



<u>รูปที่ 12</u> ผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
ช่อง 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1 Kb DNA ladder; ช่อง 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลิน

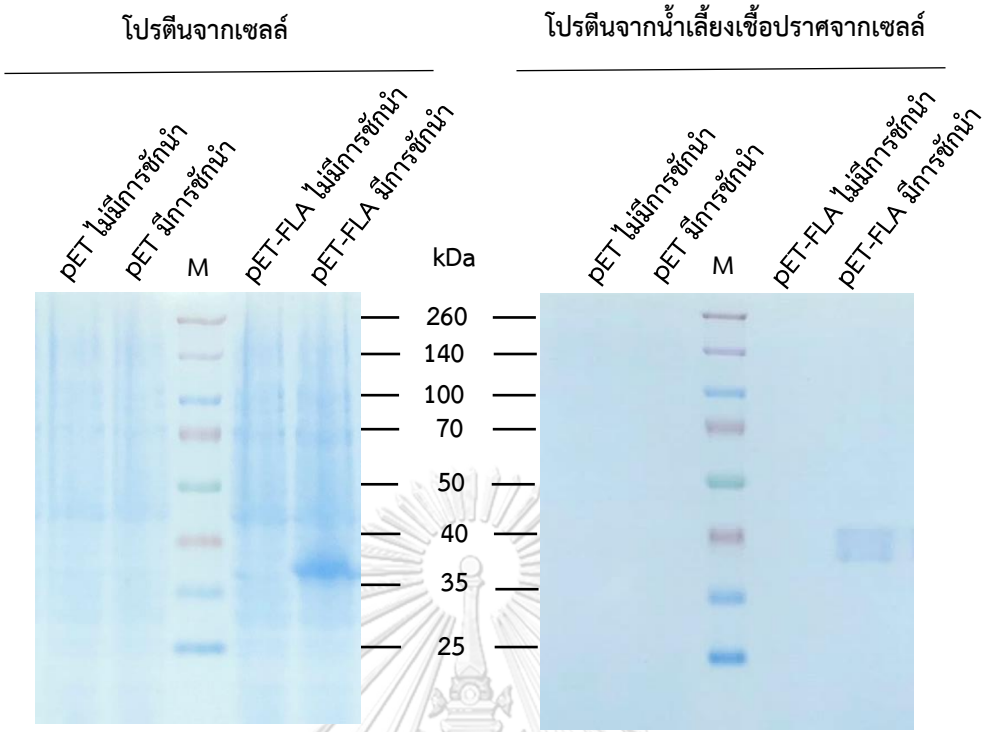
เมื่อทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการโคลน pTA2 จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α แล้วตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีขนาด 990 คู่เบส (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) และมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสให้แฟลกเจลลิน (*hag* gene) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ W-S7 (หมายเลขการเข้าถึง AB039913.1) สูงสุดถึง 99 % และมีความใกล้เคียงกับยีนที่ประมวลรหัสให้แฟลกเจลลินใน *Bacillus* สายพันธุ์อื่น (ภาคผนวก ง หมายเลข 2)

เมื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α แล้วตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสให้แฟลกเจลลินของ *B. subtilis* เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากเวกเตอร์สำหรับการโคลน และลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถเชื่อมกับโปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัส รวมทั้งลำดับแท็กได้ตรงกรอบ (inframe) อย่างถูกต้อง และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาแปลงเพื่อให้ได้กรดอะมิโน แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม blastx พบว่าสามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 330 เรซิดิว (ภาคผนวก ง หมายเลข 3) และมีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* (หมายเลขการเข้าถึง WP_022553864.1) มากที่สุดถึง 100% และมีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลินในกลุ่ม *Bacillus* อื่นด้วย (ภาคผนวก ง หมายเลข 4)

4.3 การแสดงออกแฟลกเจลลิน

เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) พบว่า สารละลายโปรตีนจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 37 kDa ในปริมาณมาก และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 37-41 kDa เมื่อเทียบกับสารละลายโปรตีนจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) (รูปที่ 13)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



<u>รูปที่ 13</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

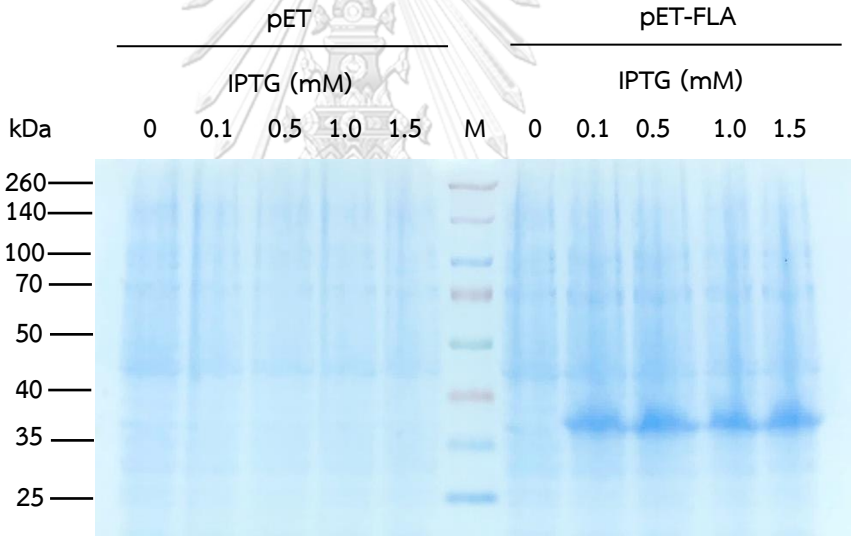
(ซ้าย) การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของสารละลายโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3); ช่อง 1 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 2 E. coli BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 4 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีการชักนำด้วย IPTG; (ขวา) การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ช่อง 1 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 2 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 4 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG; ช่อง 5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีการชักนำด้วย IPTG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุด

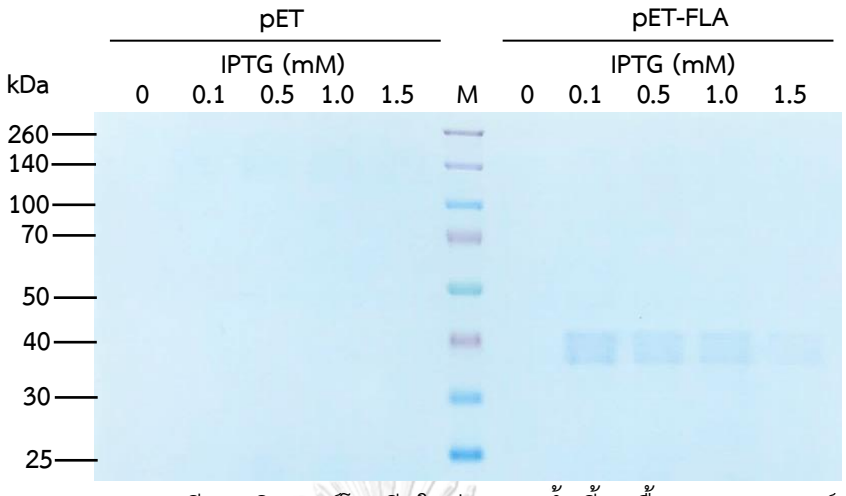
4.4.1 การแปรผันความเข้มข้น IPTG

เมื่อนำเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลินมาชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ แล้วเก็บตัวอย่างของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ จากนั้นตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) พบว่าสารละลายโปรตีนจากเซลล์ทุกความเข้มข้นของ IPTG สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 14) แต่ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์พบว่าความเข้มข้นของ IPTG ที่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากที่สุด คือ 0.1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 15) จึงเลือกความเข้มข้นของ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ในการแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนต่อไป



<u>รูปที่ 14</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของสารละลายโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

ช่อง 1-5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG, มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; ช่อง 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 7-11 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG, มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

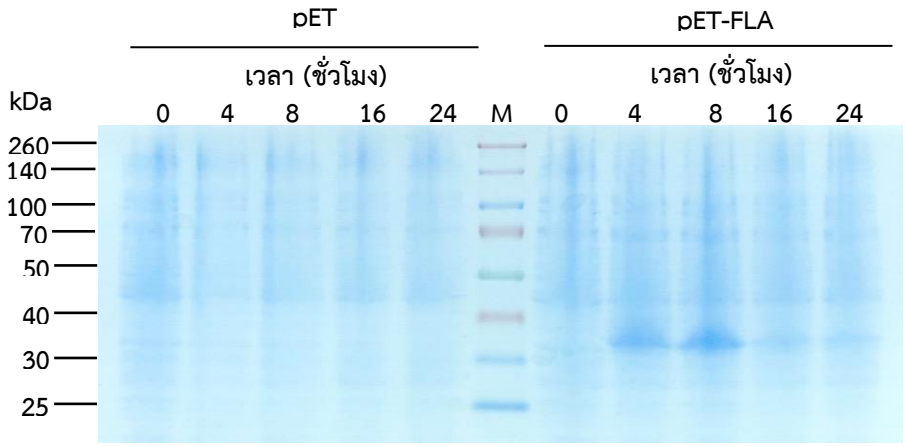


<u>รูปที่ 15</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน
ช่อง 1-5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG, มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; ช่อง 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 7-11 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG, มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4.4.2 การแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

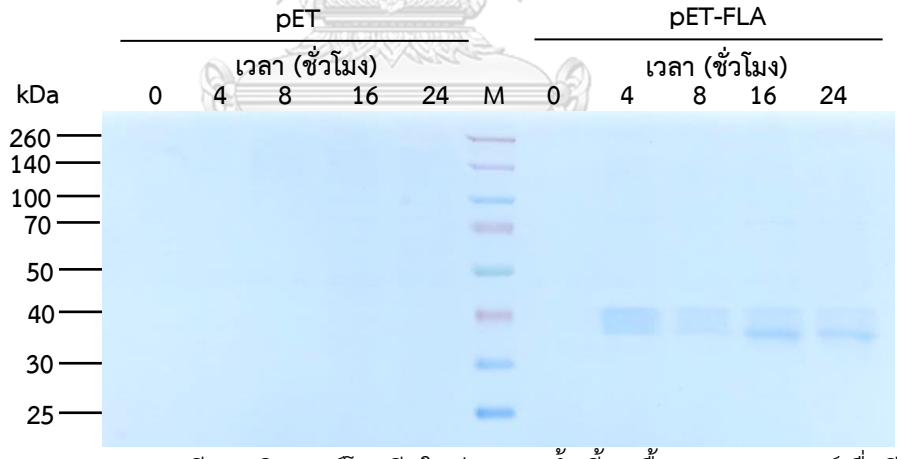
เมื่อนำเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลินมาชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ จากนั้นตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) พบว่า ในส่วนของสารละลายโปรตีนจากเซลล์ที่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง มีการการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมากที่สุด และมีการแสดงออกของโปรตีนลดลงใน 16 และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 16) และในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมากที่สุดเมื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง (รูปที่ 17) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ดีที่สุดคือการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG เป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงในส่วนของเซลล์ และเป็นเวลา 16 ชั่วโมงในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



<u>รูปที่ 16</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เมื่อมีการแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

ช่อง 1-5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน, มีการชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4, 8 ,16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ; ช่อง 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 7-11 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน, มีการชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4, 8 ,16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

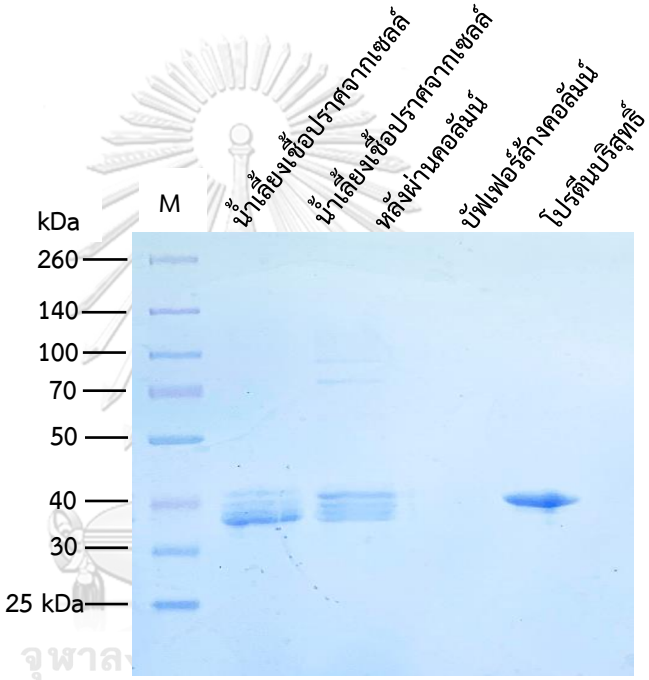


<u>รูปที่ 17</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการแปรผันเวลาในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

ช่อง 1-5 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน, มีการชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4, 8 ,16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ; ช่อง 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 7-11 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน, มีการชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4, 8 ,16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

4.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีนแฟลกเจลลิน

เมื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC (Ni-NTA resin) และนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่า โปรตีนบริสุทธิ์ที่มีพอลิฮิสทิดีน (His-tag) เชื่อมอยู่ มีขนาดประมาณ 41 kDA (รูปที่ 18)



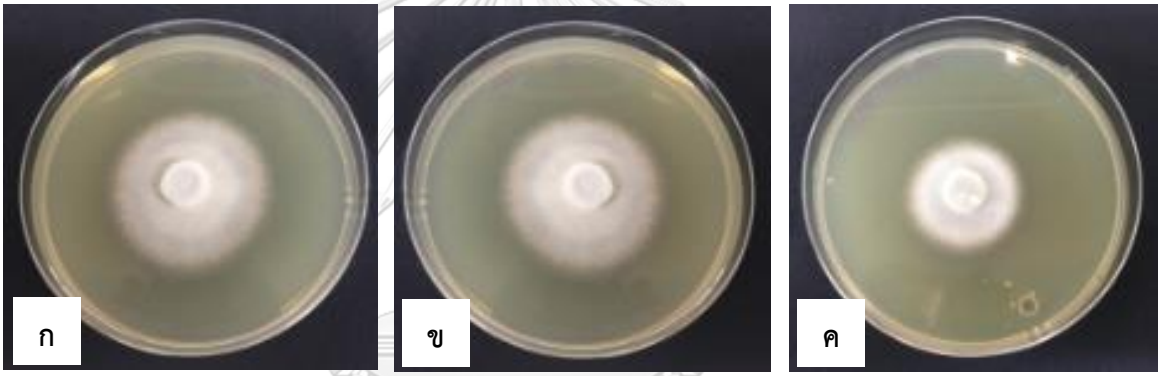
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>รูปที่ 18</u> โปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์

ช่อง 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 2 น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด; ช่อง 3 น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli BL21*(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากผ่านคอลัมน์ (flow through); ช่อง 4 สารละลายบัฟเฟอร์หลังจากชะล้างส่วนเกินออกจากคอลัมน์ (wash); ช่อง 5 สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากคอลัมน์

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) มาผสมกับอาหารแข็ง PDA แล้ววางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *C. lunata* ลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการวางชิ้นวุ้นของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ 21.3 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 19)



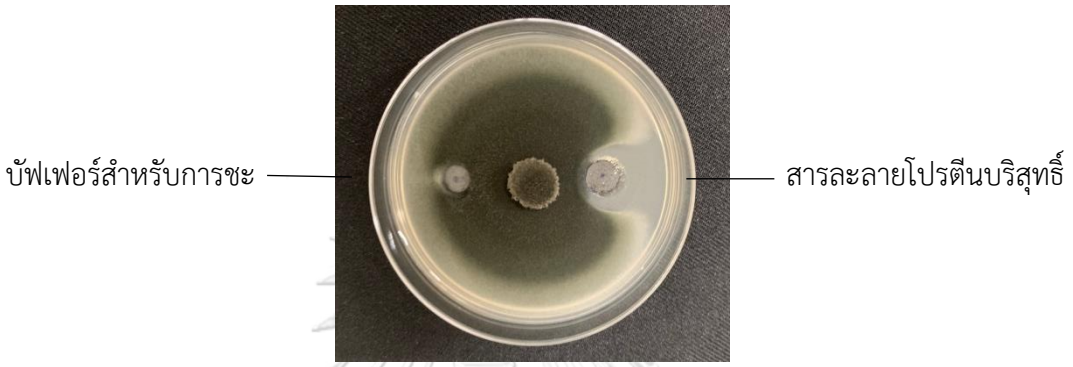
<u>รูปที่ 19</u> ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ก. การเจริญของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG; ข. การเจริญของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+); ค. การเจริญของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.7 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนบริสุทธิ์

เมื่อนำสารละลายโปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาหยอดลงในหลุมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* พบว่าสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ เมื่อเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการชะซึ่งไม่แสดงการยับยั้ง (รูปที่ 20)

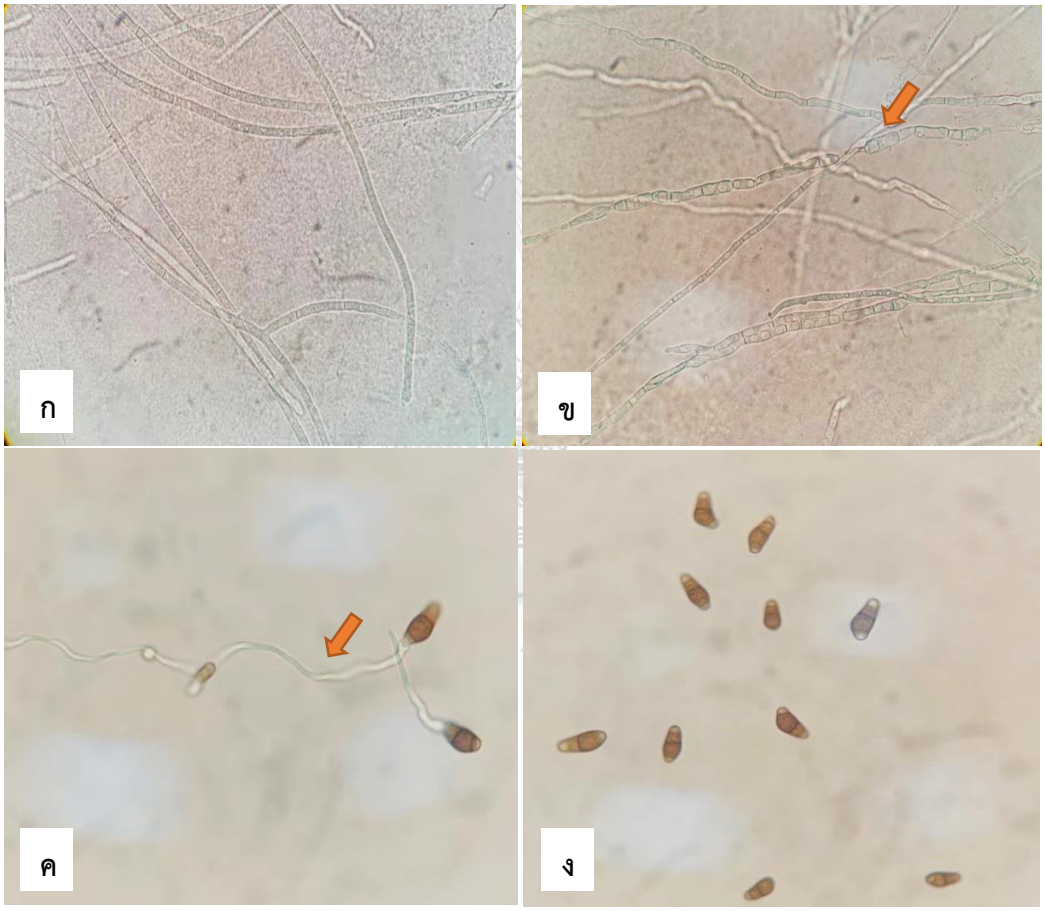


<u>รูปที่ 20</u> ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของสารละลายโปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.8 การทดสอบผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ *C. lunata*

เมื่อเขี่ยสายใยของ *C. lunata* จากบริเวณที่มีการยับยั้งโดยสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ ในข้อ 4.7 แล้วมาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า สายใยจากบริเวณที่มีการยับยั้งมีการหงิกงอ โป่งพองออกและมีแวคิวโอลอยู่ภายในสายใยจำนวนมากเมื่อเทียบกับสายใยจากบริเวณที่ไม่มีการยับยั้ง (รูปที่ 21) และเมื่อผสมสปอร์กับสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์ เมื่อเทียบกับสปอร์ที่ผสมกับ elution buffer ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนซึ่งมีการงอกของสปอร์ (รูปที่ 21)



<u>รูปที่ 21</u> ผลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีต่อสายใยและการงอกของสปอร์ *C. lunata*
ก. ลักษณะของสายใยจากบริเวณที่ไม่มีการยับยั้ง; ข. ลักษณะของสายใยจากบริเวณที่มีการยับยั้ง; ค. ลักษณะของสปอร์ที่ผสมกับ elution buffer เป็นเวลา 16 ชั่วโมง; ง. ลักษณะของสปอร์ที่ผสมกับสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผลการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 40 เท่า

4.9 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata*

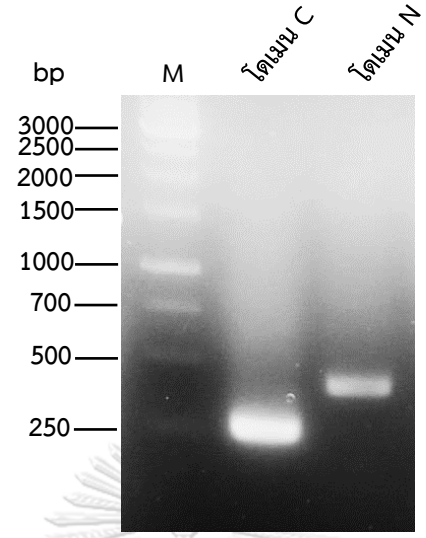
4.9.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata*

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ พบว่าโปรตีนแฟลกเจลลินนี้ประกอบไปด้วยโดนเมนหลัก 2 โดเมน ได้แก่ flagellin-N หรือโดเมน N และ flagellin-C หรือ โดเมน C จึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโดเมนทั้งสองนี้ โดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ของโดเมน N มีลำดับเบส คือ 5´-TTAATTCGGATCCATGAGAATTAACCACAATATCGCGG-3´ และ 5´-GTAAGCTCGAGTGCAGTTCCGTCAAGAAG-3´ตามลำดับ ส่วน ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ของโดเมน C มีลำดับเบส คือ 5´-CGTCTTCAGGATCCATGACAACAATCAAAACAGC-3´ และ 5´-CACCCTCGAGAGCTAACAATTGAAGAACTTGC-3´ ตามลำดับ

4.9.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

หลังจากเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินเป็นแม่แบบ พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมเรสจากโดเมน N และโดเมน C มีขนาดประมาณ 420 คู่เบส และ 250 คู่เบสตามลำดับ (รูปที่ 22)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



<u>รูปที่ 22</u> ผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดเมน N และโดเมน C ช่อง 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1 Kb DNA ladder, ช่อง 2 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดเมน C ของยีนแฟลกเจลลินจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส, ช่อง 3 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดเมน N ของยีนแฟลกเจลลินจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

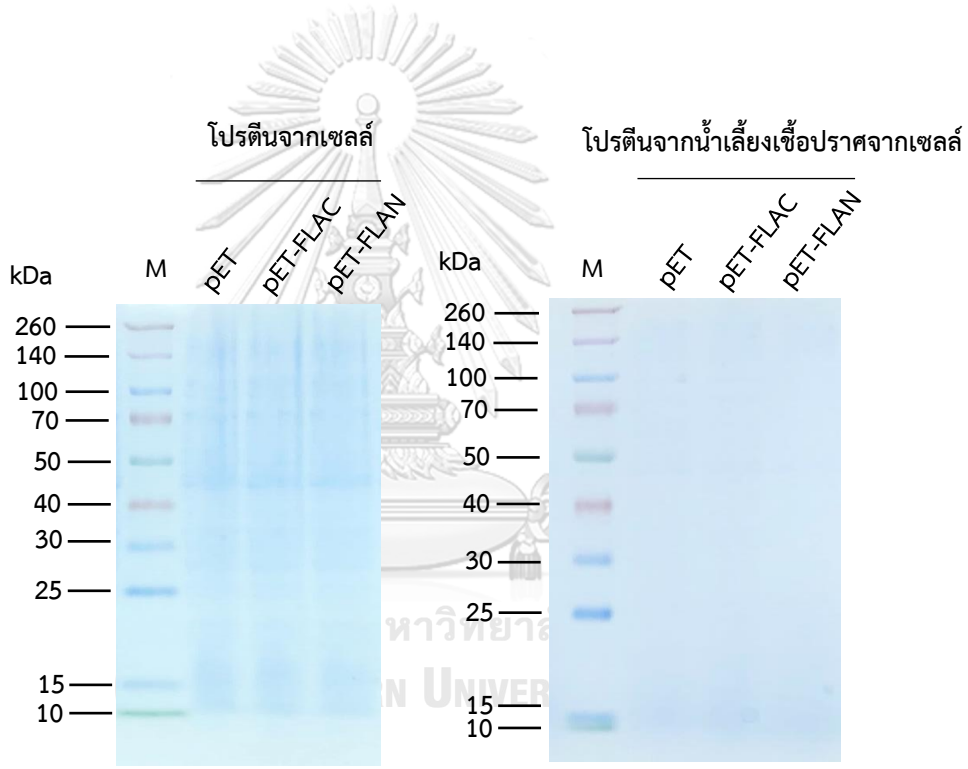
4.9.2 การโคลนยีนแฟลกเจลลิน

เมื่อทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการโคลน pTA2 จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α แล้วตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I จากนั้น โคลนชิ้นดีเอ็นเอของทั้งสองโดเมนเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α และตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน N และโดเมน C ที่ถูกต้องซึ่งมีขนาด 420 และ 261 คู่เบสตามลำดับ (ภาคผนวก ง หมายเลข 5 และ 6) อีกทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถเชื่อมกับโปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัส รวมทั้งลำดับแท็ก ได้ตรงกรอบอย่างถูกต้อง และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของโดเมน N และโดเมน C ได้ 142 และ 89 กรดอะมิโน ตามลำดับ (ภาคผนวก ง หมายเลข 7 และ 8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.9.3 การแสดงออกโปรตีนจากโดเมนบนแฟลกเจลลิน

เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของโดเมนบนยีนแฟลกเจลลิน เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ ของ *E. coli* BL21(DE3) แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) พบว่า ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งโปรตีนที่ได้จากโดเมน N ควรมีขนาดประมาณ 16 kDa และโปรตีนที่ได้จากโดเมน C ควรมีขนาดประมาณ 10 kDa (รูปที่ 23)



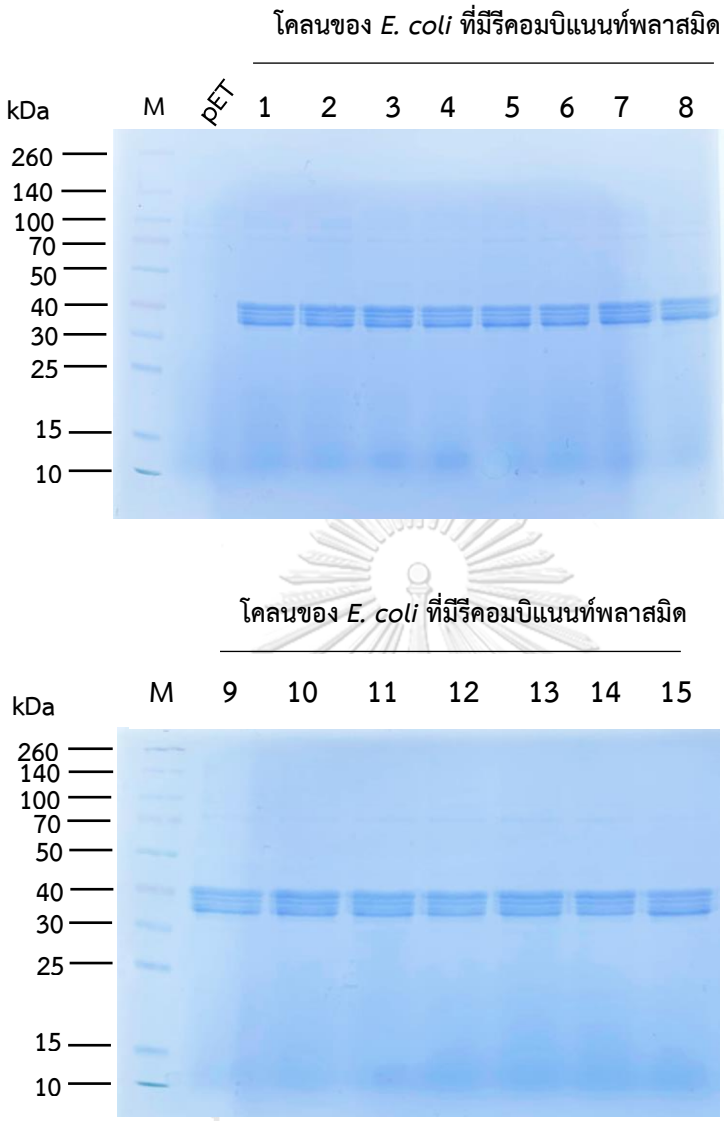
<u>รูปที่ 23</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโดเมน N และโดเมน C (ซ้าย) ส่วนของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ช่อง 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 2 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+); ช่อง 3 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโดเมน C; ช่อง 4 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโดเมน N; (ขวา) ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ช่อง 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 2 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+); ช่อง 3 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโดเมน C; ช่อง 4 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโดเมน N

4.10 การหาบริเวณบนแฟลกเจลลินที่สามารถยับยั้ง *C. lunata* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR)

4.10.1 การเพิ่มปริมาณ, การโคลนและการแสดงออกของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่ม

เมื่อเพิ่มปริมาณยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินที่สกัดได้จาก *E. coli* BL21(DE3) เป็นแบบแม่และทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการโคลน pTA2 จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α แล้วสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest *Bam*HI และ FastDigest *Xho*I จากนั้นโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* DH5α สกัดพลาสมิดแล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายแบบสุ่มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนซึ่งน่าจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* พบว่ามีโคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนทั้งสิ้น 15 โคลน โดยทั้ง 15 โคลนนี้มีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 37-41 kDa (รูปที่ 24) จึงนำทั้ง 15 โคลนนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



<u>รูปที่ 24</u> การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เมื่อมีการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG

(บน) ช่อง 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่อง 2 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+), ช่องที่ 3-10 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 1-8 ตามลำดับ; (ล่าง) ช่อง 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน; ช่องที่ 2-8 *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 9-15 ตามลำดับ

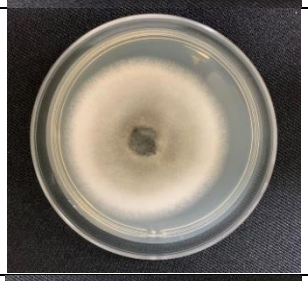
4.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการกลายแบบสุ่ม

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) มาผสมกับอาหารแข็ง PDA แล้ววางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *C. lunata* ลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการวางชิ้นวุ้นของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ไม่มีการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนหมายเลขที่ 1-4, 6-12, 14 และ 15 ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลลบ ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) โดยแสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอยู่ที่ 23.3% และ 25.6% ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งทั้งสองค่านี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และแสดงผลยับยั้งได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมผลบวกที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนหมายเลข 5 และโคลนหมายเลข 13 สูญเสียการยับยั้งการเจริญของรา ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมผลบวกที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ

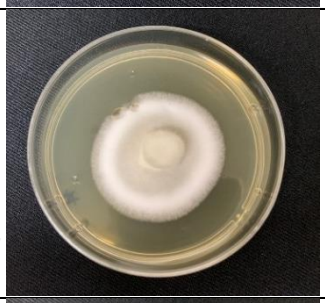
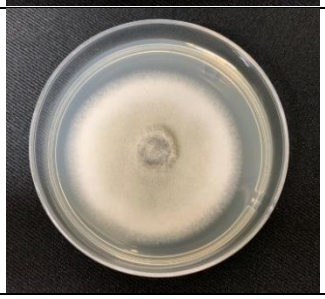
การทดสอบ (ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA)	**เส้นผ่านศูนย์กลาง *C. lunata** (มิลลิเมตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* (%)**	**ภาพแสดงการยับยั้ง**
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG (ชุดควบคุมผลลบ)	43.0±0.0[a**]	0.0[a]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีเฉพาะเวกเตอร์เปล่า pET-26b(+) (ชุดควบคุมผลลบ)	43.0±0.8[a]	0.0[a]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลิน (ชุดควบคุมผลบวก)	33.0±0.0[b]	23.3[b]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 1	32.0±0.4[b]	25.6[b]	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ (ต่อ)

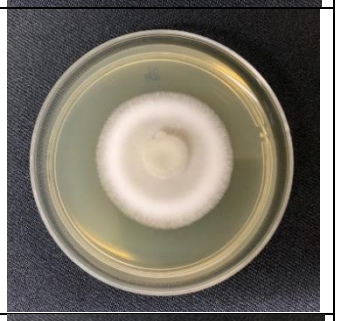
การทดสอบด้วย (ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA)	**เส้นผ่านศูนย์กลาง *C. lunata** (มิลลิเมตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* (%)**	**ภาพแสดงการยับยั้ง**
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 2	33.0±0.8^{b**}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 3	32.0±0.0^{b}	25.6^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 4	33.0±0.4^{b}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 5	43.0±0.8^{a}	0.00^{a}	

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ (ต่อ)

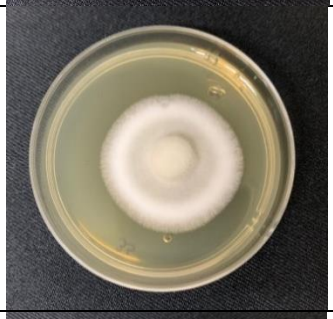
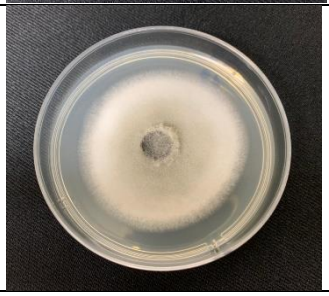
การทดสอบด้วย (ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA)	**เส้นผ่านศูนย์กลาง *C. lunata** (มิลลิเมตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* (%)**	**ภาพแสดงการยับยั้ง**
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 6	33.0±0.0[b**]	23.3[b]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 7	33.0±0.0[b]	23.3[b]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 8	32.0±0.4[b]	25.6[b]	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 9	33.0±0.8[b]	23.3[b]	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ (ต่อ)

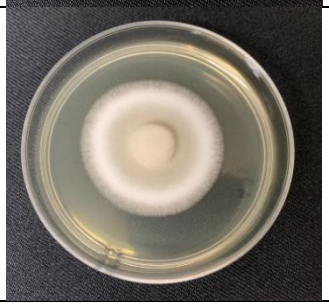
การทดสอบด้วย (ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA)	**เส้นผ่านศูนย์กลาง *C. lunata* * (มิลลิเมตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* (%)**	**ภาพแสดงการยับยั้ง**
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 10	33.0±0.4^{b**}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 11	33.0±0.4^{b}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 12	33.0±0.8^{b}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 13	43.0±0.0^{a}	0.00^{a}	

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. lunata* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนต่าง ๆ (ต่อ)

การทดสอบด้วย (ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA)	**เส้นผ่านศูนย์กลาง *C. lunata* * (มิลลิเมตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* (%)**	**ภาพแสดงการยับยั้ง**
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 14	33.0±0.8^{b**}	23.3^{b}	
น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดโคลนที่ 15	32.0±0.4^{b}	25.6^{b}	

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

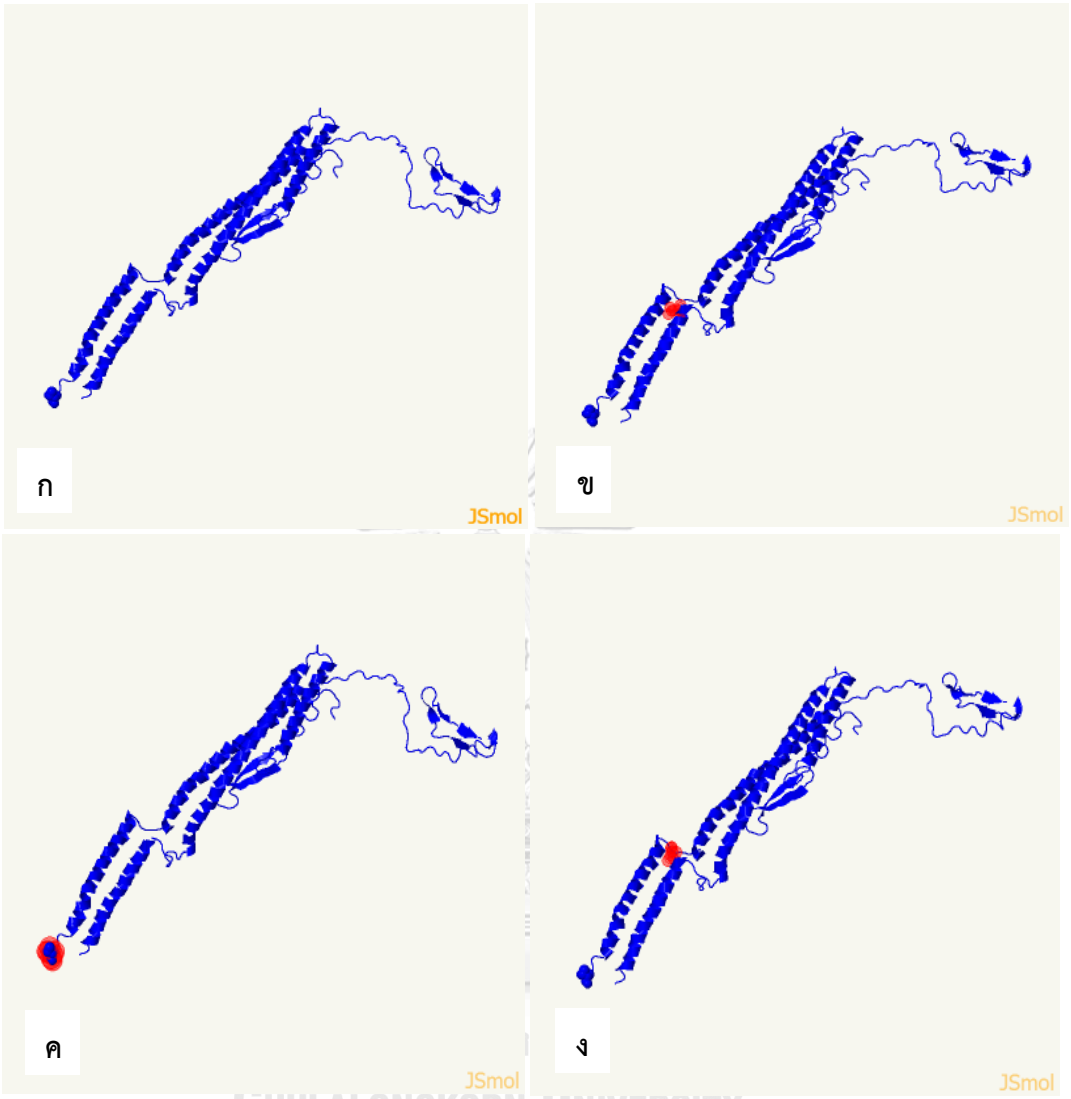
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.10.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาการกลายบนยีนแฟลกเจลลินที่มีผลต่อการยับยั้ง *C. lunata*

เมื่อสกัดพลาสมิดจากทั้ง 15 โคลน ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินตั้งต้น พบว่า โคลนหมายเลข 1 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 175 จากเบสไทมีน (thymine) ไปเป็นเบสไซโตซีน (cytocine) ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนพบว่าทำให้เกิดไซเลนท์มิวเทชัน (silent mutation) เนื่องจากเบสที่เปลี่ยนแปลงไปยังคงแปลรหัสได้กรดอะมิโนลิวซีน (leucine) ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 59 เช่นเดิม (L59L) (ภาคผนวก ง หมายเลข 9 และ 10) ส่วนโคลนหมายเลข 5 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 988 จากเบสกวานีน (guanine) ไปเป็นเบสอะดีนีน (adenine) ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากอะลานีน (alanine) ไปเป็นธรีโอนีน (threonine) ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 330 (A330T) (ภาคผนวก ง หมายเลข 11 และ 12) ซึ่งเป็นการกลายแบบมิสเซนส์มิวเทชัน (missense mutation) และโคลนหมายเลข 13 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 877 จากเบสกวานีนไปเป็นเบสอะดีนีน ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ไปเป็นแอสปาราจีน (asparagine) ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 293 (D293N) (ภาคผนวก ง หมายเลข 13 และ 14) ซึ่งเป็นการกลายแบบมิสเซนส์มิวเทชัน ทั้งนี้โคลนอื่น ๆ นอกเหนือจากโคลนทั้งสามนี้ไม่มีการกลายเกิดขึ้น โดยยังคงมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนแฟลกเจลลินเดิมทุกประการ

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแฟลกเจลลิน และโคลนที่มีการกลายนั่นคือ โคลนหมายเลข 1, 5 และ 13 มาสร้างโครงสร้างสามมิติ พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนของทั้งโปรตีนแฟลกเจลลินและโคลนที่มีการกลายให้โครงสร้างทุติยภูมิโดยภาพรวมของโปรตีนไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 25) แต่โครงสร้างของกรดอะมิโนที่มีการกลายจากโคลนหมายเลข 5 และ 13 มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนของโปรตีนแฟลกเจลลิน โดยในโคลนหมายเลข 5 มีการเปลี่ยนแปลงจากอะลานีนซึ่งเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วไปเป็นธรีโอนีนซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว อีกทั้งมีลักษณะของโมเลกุลและโซ่ข้างต่างกัน ส่วนโคลนหมายเลข 13 มีการเปลี่ยนแปลงจากกรดแอสปาร์ติกซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วและมีประจุลบไปเป็นแอสปาราจีนซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ อีกทั้งมีลักษณะของโมเลกุลและโซ่ข้างต่างกัน (รูปที่ 26)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

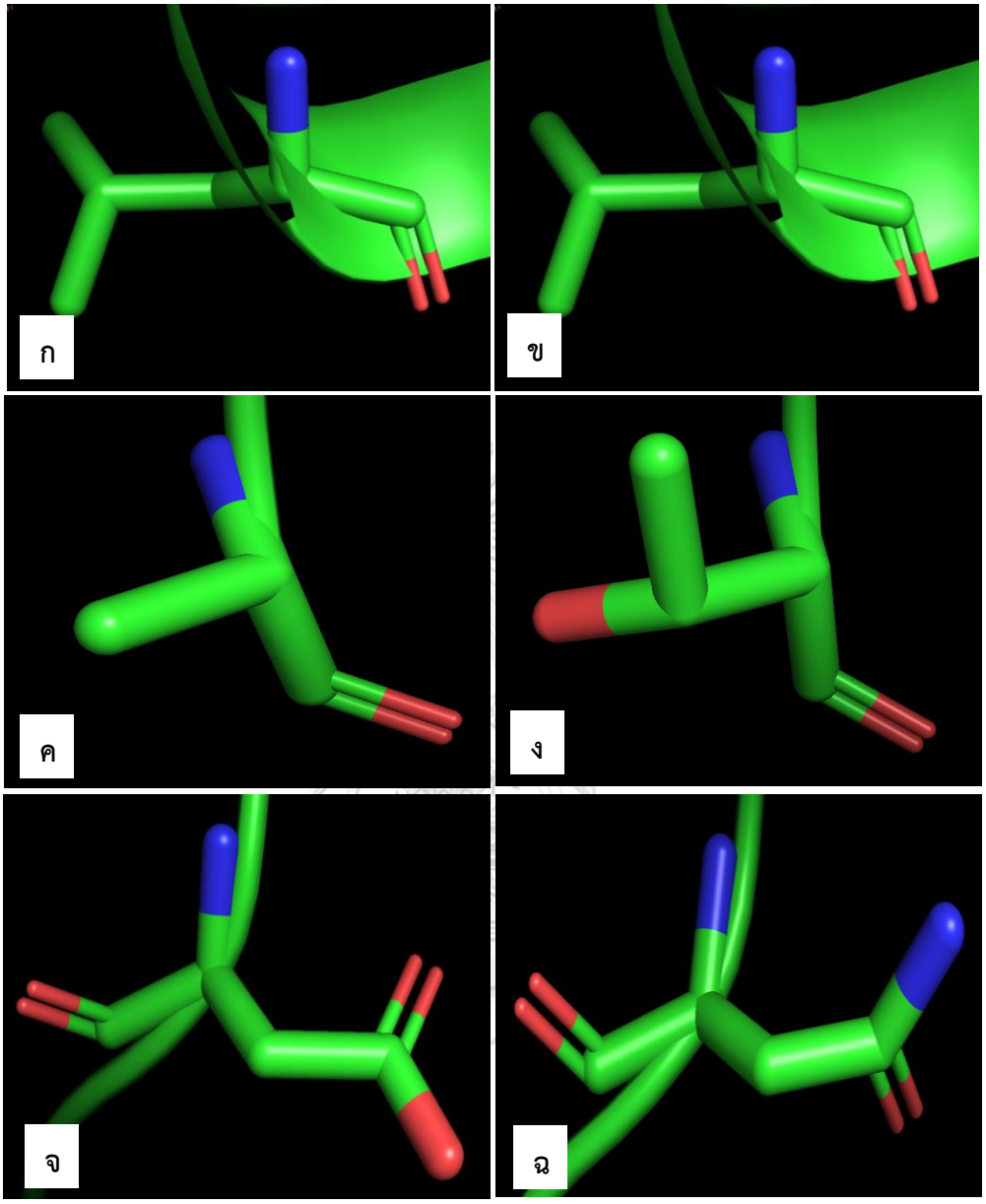


CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>รูปที่ 25</u> โครงสร้างสามมิติแบบริบบิ้นของโปรตีนแฟลกเจลลิน

ก. โปรตีนแฟลกเจลลินจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแฟลกเจลลิน; ข. โปรตีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนหมายเลข 1; ค. โปรตีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนหมายเลข 5; ง. โปรตีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนหมายเลข 13

* บริเวณจุดสีแดงแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการกลาย



<u>รูปที่ 26</u> โครงสร้างสามมิติแบบแท่งของกรดอะมิโนจากโปรตีนแฟลกเจลลินในตำแหน่งที่ 59, 330 และ 293

กรดอะมิโนจากยีนแฟลกเจลลินตั้งต้น (ก., ค., จ.), และ กรดอะมิโนจากยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย (ข., ง., ฉ.) ซึ่งมีการกลาย L59L, A330T และ D293N ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการประมวลรหัสให้โปรตีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2559) ซึ่งยีนแฟลกเจลลินที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบนี้มีขนาด 990 คู่เบส และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสให้แฟลกเจลลิน (*hag* gene) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ W-S7 สูงสุด 99 % และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาแปลงเพื่อให้ได้กรดอะมิโน แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าสามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 330 เรซิดิว และมีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอ ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มากที่สุดถึง 100%

เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแฟลกเจลลินเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *Escherichia coli* BL21(DE3) แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า สารละลายโปรตีนจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 37 kDa ปริมาณมาก และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 37-41 kDa ซึ่งอาจจะเกิดจากการแปลรหัสที่ไม่สมบูรณ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน หรือโปรตีนหลายขนาดที่ได้เหล่านี้อาจมีสาเหตุมาจากการเริ่มต้นอ่านกรอบรหัสเปิดที่ตำแหน่งต่างกัน ทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดต่างกัน หรือเกิดจากการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสและเพปทิเดส โดยลำดับเพปไทด์ส่งสัญญาณมักถูกตัดออกโดยเอนไซม์เพปทิเดสก่อนจะส่งโปรตีนเข้าสู่เพอริพลาสซึม (Auclair และคณะ, 2012) หรือถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสบริเวณไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์ (Novak และ Dev, 1988) เช่นเดียวกับลำดับแท็กที่อาจถูกตัดออกโดยเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Lykkemark และคณะ, 2014) จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุดโดยแปรผันความเข้มข้นของ IPTG และเวลาในการชักนำ พบว่า การใช้ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ดีที่สุดทั้งโปรตีนจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ โดยเวลาที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในส่วนของเซลล์คือ 8 ชั่วโมง และในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์คือ 16 ชั่วโมง ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่ลดลงอย่างมากใน 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

และ 24 ชั่วโมง อาจมีสาเหตุมาจากโปรตีนดังกล่าวได้ถูกผลิตภายในเซลล์ที่ประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นส่งออกไปนอกเซลล์เพื่อประกอบเป็นแฟลกเจลลาที่ประมาณ 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Aono และคณะ, 1992; Martinez และ Gordee, 1966) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากกระบวนการดัดแปลงภายหลังการถอดรหัส (post-transcriptional modification) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการทำ northern hybridization เป็นต้น (Udekwu, 2010)

เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพชนิด IMAC (Ni-sepharose) และนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนนี้มีขนาดประมาณ 41 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนแฟลกเจลลินรวมกับลำดับเพปไทด์ส่งสัญญาณและลำดับฮิสทิดีนแท็ก จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ 21.3% โดยมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าโปรตีนแฟลกเจลลินสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ ซึ่งโปรตีนแฟลกเจลลินที่มีรายงานนั้นมีขนาดตั้งแต่ 29.5 ถึง 36 kDa ซึ่งสามารถยับยั้งราได้หลายชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Pythium* sp., *Botrytis cinereal*, *Stachybotrys chartarum* และ *Penicillium expansum* เป็นต้น (Fang และคณะ, 2017; Ren และคณะ, 2013; Zhao และคณะ, 2013a) เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* ของสารละลายโปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ ซึ่งโปรตีนบริสุทธิ์นี้ส่งผลให้สายใยของ *C. lunata* หงิกงอ โป่งพองออก มีการสะสมแวคิวโอลขนาดใหญ่จำนวนมาก และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2013) ที่รายงานว่าโปรตีนแฟลกเจลลินบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* F3 สามารถยับยั้งการเจริญ *M. fructicola* ได้ซึ่งโปรตีนดังกล่าวส่งผลให้สายใยของรามีความผิดปกติและสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ยีนแฟลกเจลลินประกอบไปด้วย 3 ส่วนคือ โดเมน N, โดเมน C ซึ่งเป็นสองโดเมนหลักที่มีการอนุรักษ์และส่วนของยีนที่อยู่ตรงกลางซึ่งมีความแปรผันได้ (Liu และคณะ, 2013) งานวิจัยนี้จึงศึกษาโปรตีนที่มีการแปลรหัสจากโดเมนหลักทั้งสองเพื่อหาบริเวณที่รับผิดชอบสำหรับการยับยั้ง *C. lunata* จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยมียีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบ พบว่าโดเมน N และโดเมน C มีขนาด 420 และ 261 คู่เบสตามลำดับ เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีแต่ละโดเมนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* BL21(DE3) แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG จากนั้นเก็บส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีขนาดเล็ก (ขนาดของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากโดเมน N และ C ควรมีขนาด 16 และ 10 kDa) ซึ่งอาจถูกย่อยสลายเพราะโปรตีนขนาดเล็กเหล่านี้อาจทำหน้าที่ขัดขวางการ

สังเคราะห์โปรตีนอื่น เป็นพิษต่อเซลล์ หรือถูกนำไปเป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์โปรตีนอื่นในเซลล์ (Storz และคณะ, 2014) เนื่องจากโปรตีนจากโดเมนทั้งสองเป็นส่วนประกอบของการสังเคราะห์แฟลกเจลลาใน *E. coli* (Silverman และ Simon, 1974; Suzuki และ Komeda, 1981) นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกโปรตีนเพียงโดเมนใดโดเมนหนึ่งนั้น จะสื่อไปยังแบคทีเรียว่าเป็นโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นแบคทีเรียจึงทำลายโปรตีนดังกล่าว และส่งผลทำให้ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนได้ (Baneyx และ Mujacic, 2004)

การทำให้เกิดการกลายแบบสุ่มบนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด โดยมียีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 เป็นแม่แบบ โดยเมื่อเพิ่มจำนวนของยีน โคลน และชักนำให้เกิดการแสดงของโปรตีนพบว่ามี *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่อาจมียีนที่เกิดการกลายมีการแสดงออกของโปรตีนขนาด 37-41 kDa จำนวนทั้งสิ้น 15 โคลน จึงนำมาศึกษาการยับยั้ง *C. lunata* และพบว่า *E. coli* BL21(DE3)ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 5 และ 13 สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ในขณะที่โคลนอื่นแสดงการยับยั้งระหว่าง 23.3 - 25.6% เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบระหว่าง *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและยีนแฟลกเจลลินเดิม พบว่า โคลนหมายเลข 1 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 175 จากเบสไทมีนไปเป็นเบสไซโตซีน แต่เมื่อแปลรหัสแล้วจะได้กรดอะมิโนลิวซีนเช่นเดิมในลำดับกรดอะมิโนที่ 59 (L59L) ซึ่งเป็นการกลายแบบไซเลนท์มิวเทชัน ดังนั้นจึงยังคงแสดงผลการยับยั้งได้เช่นเดียวกันกับแฟลกเจลลินเดิม ส่วนโคลนหมายเลข 5 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 988 จากเบสกวานีน ไปเป็นเบสอะดีนีน ซึ่งเมื่อแปลรหัสทำให้กรดอะมิโนในลำดับที่ 330 เปลี่ยนจากอะลานีนไปเป็นธรีโอนีน (A330T) ซึ่งเป็นการกลายแบบมิสเซนส์มิวเทชันชนิดไม่อนุรักษ์ (non-conservative missence mutation) เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสองมีสมบัติการมีขั้วและโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยอะลานีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว ไม่มีประจุ และไม่ชอบน้ำ ในขณะที่ธรีโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว ไม่มีประจุ และชอบน้ำ ด้วยเหตุนี้อาจส่งผลให้ตำแหน่งกัมมันต์ (active site) หรือ ตำแหน่งจับ (binding site) ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป (Betts และ Russell, 2003) จึงส่งผลให้โคลนที่มีการกลายนี้สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* ส่วนโคลนหมายเลข 13 มีการกลายบริเวณลำดับเบสที่ 877 จากเบสกวานีนไปเป็นเบสอะดีนีน ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนลำดับที่ 293 จากกรดแอสปาร์ติกไปเป็นแอสปาราจีน (D293N) ซึ่งเป็นการกลายแบบมิสเซนส์มิวเทชันชนิดอนุรักษ์ (conservative missence mutation) เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสองมีสมบัติการมีขั้วที่เหมือนกันและมีโครงสร้างใกล้เคียงกัน โดยกรดอะมิโนทั้งสองเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้วและชอบน้ำ ต่างกันที่แอสปาร์ติกมีประจุลบแต่แอสปาราจีนไม่มีประจุ (Betts และ Russell, 2003) ซึ่งความแตกต่างกันเล็กน้อยนี้อาจส่งผลต่อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความสามารถของโปรตีนในการยับยั้งราเนื่องจากโคลนที่มีการกลายนี้ไม่สามารถในการยับยั้ง *C. lunata* ได้ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการกลายของยีนและการเปลี่ยนแปลงไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 330 และ 293 ดังกล่าว มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* ของโปรตีนแฟลกเจลลิน โดยตำแหน่งที่เกิดการกลายในทั้งสองโคลนนั้นอยู่บนบริเวณโดเมน C ของยีนแฟลกเจลลิน ดังนั้นโดเมน C จึงมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata*

โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาบริเวณของยีนแฟลกเจลลินที่มีผลต่อการยับยั้งรา และยังไม่มีรายงานใดที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่โปรตีนแฟลกเจลลินใช้ในการยับยั้งการเจริญของรา ดังนั้น หากมีการวิจัยต่อไปในอนาคตควรศึกษาเกี่ยวกับการกลายในบริเวณอื่นบนยีนแฟลกเจลลิน เพื่อจะได้บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งราที่แน่นอน รวมทั้งการศึกษากลไกในการยับยั้งราด้วย เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานสำหรับการนำไปต่อยอดใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการมองหาตัวควบคุมทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

Alajlani, M., Shiekh, A., Hasnain, S., Brantner, A., 2016. Purification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strain BIA. Chromatographia, 79, 1527-1532.

Aono, R., Ogino, H., Horikoshi, K., 1992. pH-dependent flagella formation by facultative alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56, 48-53.

Asaka, O., Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology, 62, 4081-4085.

Asano, Y., Onishi, H., Tajima, K., Shinozawa, T., 2001. Flagellin as a biomarker for *Bacillus subtilis* strains; application to the DB9011 strain and the study of interspecific diversity in amino-acid sequences. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65, 1218-1222.

Ashwini, N., Srividya, S., 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech, 4, 127-136.

Auclair, S.M., Bhanu, M.K., Kendall, D.A., 2012. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. Protein Science, 21, 13-25.

Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134, 307.

Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nature biotechnology, 22, 1399-1408.

Basha, S., Ulaganathan, K., 2002. Antagonism of *Bacillus* sp. BC121 towards *Curvularia lunata*. Current Science, 82, 1457-1463.

Beckman, R.A., Mildvan, A.S., Loeb, L.A., 1985. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis *in vitro*. Biochemistry, 24, 5810-5817.

Ben Slimene, I., Tabbene, O., Djebali, N., Cosette, P., Schmitter, J.M., Jouenne, T., Urdaci, M.C., Limam, F., 2012. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. Research in Microbiology, 163, 388-397.

Betts, M.J., Russell, R.B., 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. Bioinformatics for Geneticists, 289-316.

Blakeman, J.P., Brodie, I.D.S., 1977. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. Physiological Plant Pathology, 10, 29-42.

Bordoloi, G.N., Kumari, B., Guha, A., Thakur, D., Bordoloi, M., Roy, M.K., Bora, T.C., 2002. Potential of a novel antibiotic, 2-methylheptyl isonicotinate, as a biocontrol agent against fusarial wilt of crucifers. Pest Management Science, 58, 297-302.

Burkhead, K.D., Schisler, D.A., Slininger, P.J., 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2031-2039.

Bussaban, B., Kodchasee, P., Apinyanuwat, S., Kosawang, C., Jonglaekha, N., 2017. First report of *Curvularia lunata* causing leaf blight on mulberry (*Morus* sp.) in Thailand. Plant Disease, 101, 1951.

Cadwell, R.C., Joyce, G.F., 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods and Applications, 2, 28-33.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N., 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiological Research, 160, 75-81.

Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z., 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnology Letters, 30, 919-923.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., Guo, J.-h., 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology, 15, 848-864.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Cho, S.J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H., Shin, K.S., 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters, 223, 47-51.

Eckert, K.A., Kunkel, T.A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acids Research, 18, 3739-3744.

Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M., Beringer, J.E., Rhodes, D., Renwick, A., Stevenson, L., Bailey, M.J., 1999. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. Journal of Applied Microbiology, 87, 454-463.

Fang, Y., Li, L., Zheng, Y., Yuan, H., Zhang, X., Cheng, S., Hua, C., 2017. Extraction, ısolation and identification of antimicrobial substances from *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 45, 308-315.

Gao, B.D., Huang, W., Xia, H., 2012. A new rice disease, black sheath spot, caused by *Curvularia fallax* in China. Plant Disease, 96, 1224-1224.

Gond, S.K., Bergen, M.S., Torres, M.S., White Jr, J.F., 2015. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiological Research, 172, 79-87.

Groth, D., 2009. brown spot of rice (*Cochliobolus miyabeanus*) [Online]. Available from: https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5390485 [31 August 2018].

Groth, D., 2010. *Cochliobolus* leaf spot / black kernel (*Cochliobolus lunatus*). [Online]. Available from: https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5410619 [31 August 2018].

Grover, M., Nain, L., Singh, S.B., Saxena, A.K., 2010. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. Current Microbiology, 60, 99-106.

Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., Shirkot, C.K., 2016. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. International Journal of Food Microbiology, 232, 134-143.

Hammami, I., Triki, M.A., Rebai, A., 2011. Purification and characterization of the novel bacteriocin IH7 with antifungal and antibacterial properties. Journal of Plant Pathology, 93, 443-454.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Han, y., Fan, J., Zhou, Z., Tan, X., Zhao, X., 2015. Cloning and efficient expression of *Bacillus* sp. BH072 tasA gene in *Escherichia coli*. Transactions of Tianjin University, 21, 26-31.

Heydari, A., Pessarakli, M., 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of Biological Sciences, 10, 273-290.

Hu, L.B., Shi, Z.Q., Zhang, T., Yang, Z.M., 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. FEMS Microbiology Letters, 272, 91-98.

Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q., Yang, X., 2011. *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 741-755.

Huyly, T., Soytong, K., 2017. Biological control of brown leaf spot disease caused by *Curvularia lunata* and field application method on rice variety IR66 in Cambodia. Agrivita Journal of Agricultural Science, 39, 111-117.

Iftikhar, S., Shahid, A.A., Ali, S., 2016a. First report of *Curvularia Lunata* var. *Aeria* causing leaf blight on tomato in Pakistan. Journal of Plant Pathology, 98, 180.

Iftikhar, S., Shahid, A.A., Nawaz, K., Ali, S.W., 2016b. First report of *Curvularia lunata* causing fruit rot of tomato (*Lycopersicum esculentum*) in Pakistan. Plant Disease, 100, 1013.

Jamalizadeh, M., Etebarian, H., Aminian, H., Alizadeh, A., 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. EPPO Bulletin, 41, 65-71.

Jin, M.Z., 1989. Preliminary study of discoloured rice grains caused by *Curvularia*. Acta Phytopathologica Sinica, 19, 21-26.

Kamaluddeen, S.S., Abhilasha, A.L., 2013. A new blight disease of rice caused by *Curvularia lunata* from Uttar pradesh. International Journal of Agricultural Science and Research, 3, 13-16.

Keohavong, P., Thilly, W.G., 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 9253-9257.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Lim, H.-S., Kim, Y.-S., Kim, S.-D., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. Applied and Environmental Microbiology, 57, 510-516.

Lin, L., Fu, C., Huang, W., 2016. Improving the activity of the endoglucanase, *Cel8M* from *Escherichia coli* by error-prone PCR. Enzyme and Microbial Technology, 86, 52-58.

Liu, Y.H., Hu, B., Xu, Y.J., Bo, J.X., Fan, S., Wang, J.L., Lu, F.P., 2012. Improvement of the acid stability of *Bacillus licheniformis* alpha amylase by error-prone PCR. Journal of Applied Microbiology, 113, 541-549.

Liu, Z., Zhao, X., Zhao, X., Wei, Y., Shang, Q., 2013. Isolation and identification of a novel antifungal protein from a Rhizobacterium *Bacillus subtilis* strain F3. Journal of Phytopathology, 161, 43-48.

LMU-Munich Team, 2012. Isolation of genomic DNA from *Bacillus* (for PCR). [Online]. Available from: [21 July 2018].

López-Berges, M.S., Capilla, J., Turrà, D., Schafferer, L., Matthijs, S., Jöchl, C., Cornelis, P., Guarro, J., Haas, H., Di Pietro, A., 2012. HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. Plant Cell, 24, 3805-3822.

Lykkemark, S., Mandrup, O.A., Friis, N.A., Kristensen, P., 2014. Degradation of C-terminal tag sequences on domain antibodies purified from *E. coli* supernatant. MAbs, 6, 1551-1559.

Macri, F., Di Lenna, P., 1974. Corn leaf blight incited by *Curvularia lunata* (wakk.) boed. Rivista di Patologia Vegetale, 10, 27-35.

Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. Biochimie, 74, 1047-1051.

Majeed, R.A., Shahid, A.A., Ashfaq, M., Saleem, M.Z., Haider, M.S., 2015. First report of *Curvularia lunata* causing brown leaf spots of rice in Punjab, Pakistan. Plant Disease, 100, 219-219.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Hyde, K.D., 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. Fungal Diversity, 56, 131-144.

Martinez, R.J., Gordee, E.Z., 1966. Formation of bacterial flagella I. Demonstration of a functional flagellin pool in *Spirillum serpens* and *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 91, 870.

Mccullum, E.O., Williams, B.A., Zhang, J., Chaput, J.C., 2010. Random mutagenesis by error-prone PCR. In Vitro Mutagenesis Protocols. Springer, pp. 103-109.

McGrath, M.T., 2009. Managing plant diseases with crop rotation. in: Mohler, C.l., Johnson, S.E. (Eds.), Crop rotation on organic farms : a planning manual. Plant and Life Sciences Publishing, pp. 32-41.

McKenzie, E., 2013. *Curvularia lunata*. [Online]. Available from: http://www.padil.gov.au/maf-border/pest/main/143020 [4 August 2018].

Michelsen, C.F., Stougaard, P., 2012. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. Canadian Journal of Microbiology, 58, 381-390.

Milgroom, M.G., Cortesi, P., 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annual review of phytopathology, 42, 311-338.

Monteiro, F.T., Vieira, B.S., Barreto, R., 2003. *Curvularia lunata* and *Phyllachora* sp.: two fungal pathogens of the grassy weed *Hymenachne amplexicaulis* from Brazil. Australasian Plant Pathology, 32, 449-453.

Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E., 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. International Microbiology, 14, 213-223.

Mycology online, 2016. *Curvularia*. [Online]. Available from: https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/curvularia/ [4 August 2018].

Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., Niu, D., 2017. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science, 8, 238.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Nishi, N., Muta, T., Nakamura, M., Takemure, M., Tsukiboshi, T., 2008. Leaf spot of *Saccharum officinarum* caused by *Curvularia lunata*. Japanese Journal of Phytopathology, 74, 118-120.

Novak, P., Dev, I.K., 1988. Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. Journal of Bacteriology, 170, 5067.

Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16, 115-125.

Orbera, T., González Giro, Z., Serrat, M., Díaz, Suyén, Pérez, R., 2012. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. Annals of Microbiology, 62, 545-551.

Pandey, R.K., Gupta, P.K., Srivastava, M., Singh, S.R., Robin, G., 2011. First report of brown leaf spot disease caused by *Curvularia lunata* infecting Indian spinach or poi (*Basella rubra*). Indian Phytopathology, 64, 207.

Park, J.Y., Oh, S.A., Anderson, A.J., Neiswender, J., Kim, J.C., Kim, Y.C., 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. Letters in Applied Microbiology, 52, 532-537.

Picken, R.N., 1992. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. Journal of Clinical Microbiology, 30, 99-114.

Rahman, A., Uddin, W., Wenner, N.G., 2015. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. Molecular Plant Pathology, 16, 546-558.

Ram, D., Devi, T.P., Kamil, D., Tyagi, A., Sekhar, V.C., 2017. A combined morpho-molecular approach towards identification of *Curvularia* species. Annals of Plant Protection Sciences, 25, 144-151.

Rasmussen, H.N., Olsen, J.E., Jørgensen, K., Rasmussen, O.F., 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. Letters in Applied Microbiology, 23, 363-366.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Ren, J.J., Shi, G.L., Wang, X.Q., Liu, J.G., Wang, Y.N., 2013. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 2343-2352.

Revankar, S.G., Sutton, D.A., 2010. Melanized fungi in human disease. Clinical Microbiology Reviews, 23, 884.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20, 430-440.

Saber, W.I., Ghoneem, K.M., Al-Askar, A.A., Rashad, Y.M., Ali, A.A., Rashad, E.M., 2015. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia diseases* of potato. Acta Biologica Hungarica, 66, 436-448.

Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittikoop, P., Prachya, S., Thammasittirong, S.N., 2018. Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 1527-1535.

Salleh, B., Safininat, A., Julia, L., Teo, C.H., 1996. Brown spot caused by *Curvularia* spp. a new disease of Asparagus. Journal of Biotropia, 9, 26-37.

Sambrook, J.F., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, N.Y.

Saoussen, B.K., Olfa, K.-F., Mouna, D., Hayfa, J.-K., Mejda, D.-R., Slim, T., 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. Comptes Rendus Biologies, 338, 784-792.

Science Prof Online, 2015. Bacterial colony photos. [Online]. Available from: http://www.scienceprofonline.com/science-image-libr/sci-image-libr-bacterial-colonies.html [31 August 2018].

Shternshis, M., Shpatova, T., Belyaev, A., 2016. Effect of two biological formulations based on *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on control of *Didymella applanata*, the causal agent of red raspberry cane spur blight. International Journal of Agronomy, 2016.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Silverman, M., Simon, M., 1974. Positioning flagellar genes in *Escherichia coli* by deletion analysis. Journal of Bacteriology, 117, 73-79.

Singh, V.K., Pandey, P., 2012. Physical methods in management of plant diseases. in: Singh, V.K., Singh, Y., Singh, A. (Eds.), Eco-friendly innovative approaches in plant disease management. International Book Distributors and Publisher, New Delhi, pp. 21-30.

Sowanpreecha, R., 2018. *Bacillus subtilis* N3 as a biocontrol agent for *Curvularia lunata* and its antifungal protein properties. International Journal of Agriculture and Biology, 20, 531-538.

Srivastava, R., Shalini, 2008. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. Internet Journal of Microbiology, 7, 2881-2889.

Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56, 845-857.

Storz, G., Wolf, Y.I., Ramamurthi, K.S., 2014. Small proteins can no longer be ignored. Annual Review of Biochemistry, 83, 753-777.

Suzuki, T., Komeda, Y., 1981. Incomplete flagellar structures in *Escherichia coli* mutants. Journal of Bacteriology, 145, 1036-1041.

Tekade, A., Koche, M.D., Kothikar, R.B., Surpam, A.N., 2017. Efficacy of fungicides and bioagents against *Curvularia lunata* causing blight of coleus under laboratory conditions. Journal of Medicinal Plants Studies, 5, 189-191.

Turnbull, P.C.B., 1996. *Bacillus*. in: th, Baron, S. (Eds.), Medical Microbiology, Galveston (TX).

Udekwu, K.I., 2010. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the *Escherichia coli* luxS mRNA; involvement of the sRNA MicA. PloS one, 5, 13449.

Vero, S., Mondino, P., Burgueno, J., Soubes, M., Wisniewski, M., 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest Biology and Technology, 26, 91-98.

Vonderviszt, F., Namba, K., 2013. Structure, function and assembly of flagellar axial proteins. [Online]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6250/

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G., 2001. Industrial Microbiology: An Introduction. Wiley.

Wicklow, D.T., Poling, S.M., 2009. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. Phytopathology, 99, 109-115.

Winstanley, C., Morgan, J.A.W., 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. Microbiology, 143, 3071-3084.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., 2013. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 1487-1497.

Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Namba, K., 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. Nature, 424, 643.

Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S.q., Zhang, Z.H., Shen, B., Yang, X.M., Zhang, R.F., Huang, Q.W., Shen, Q.R., 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. Plant and Soil, 344, 87-97.

Zhao, Q., Mei, X., Xu, Y., 2016. Isolation and identification of antifungal compounds produced by *Bacillus* Y-IVI for suppressing *Fusarium* wilt of muskmelon. Plant Protection Science, 52, 167-175.

Zhao, X., Zhou, Z.-j., Han, Y., Wang, Z.-z., Fan, J., Xiao, H.-z., 2013a. Isolation and identification of antifungal peptides from Bacillus BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiological Research, 168, 598-606.

Zhao, X., Zhou, Z.J., Han, Y., Wang, Z.Z., Fan, J., Xiao, H.Z., 2013b. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiological Research, 168, 598-606.

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.

นงลักษณ์ เภรินทวงศ์, 2556. กลไกการต้านทานโรคของพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 3, 76-82.

รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2559. สารออกฤทธิ์จาก *Bacillus subtilis* N3 และ *Pseudomonas aeruginosa* RS1. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 9, 50-62.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

1. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)

แบคโตเปบโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปบโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. อาหารแข็ง Luria Bertani (LB) Agar

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลว Luria Bertani (LB) Broth

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้มีค่าประมาณ 5.1-5.3 แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

1. กลีเซอรอล 15%

กลีเซอรอล 87%	17.24	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	82.76	มิลลิลิตร

ผสมกลีเซอรอลให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 0.1% Tween 20

Tween 20	0.1	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ผสม Tween 20 ให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

ผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นเก็บไว้ในขวดพลาสติกพอลิโพรไพลีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลาย 1 โมลาร์ EDTA

เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (EDTA)	29.224	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ในน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์	5.844	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. สารละลาย TEN

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 4)	100 ไมโครลิตร
สารละลาย 1 โมลาร์ EDTA (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)	100 ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6)	1.5 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายตามลำดับ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. ไลโซไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งไลโซไซม์ 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

9. RNase A 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง RNase A 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. สารละลาย TEN*

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย 1 โมลาร์ EDTA	10	ไมโครลิตร
สารละลาย1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์	500	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายตามลำดับ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
EDTA	18.61	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	กรัม

ละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane และ EDTA ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติก ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เตรียมบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยเจือจางบัฟเฟอร์ 50X TAE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปริมาตร 990 มิลลิลิตร

12. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์-แคลเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$-$CaCl_2$)

แมกนีเซียมคลอไรด์	3.25	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.6	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	200	มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีตามลำดับให้เข้ากันในน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. สารละลาย 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์

แคลเซียมคลอไรด์	2.95	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	200	มิลลิลิตร

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

14. สารละลาย 0.085 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ที่มี 15% กลีเซอรอล

สารละลาย 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์	35.1	มิลลิลิตร
87% กลีเซอรอล	8.62	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	6.28	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายตามลำดับให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

15. สารละลาย 1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	181.71	กรัม

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

16. สารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	กรัม

ค่อย ๆ ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร โดยทำในตู้ดูดควัน และต้องใส่มาสก์ปิดจมูกเพื่อป้องกันฝุ่นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต อาจต้องการอุ่นด้วยความร้อนเพื่อช่วยการละลาย เมื่อละลายหมดเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

17. สารละลาย 10% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

18. สารละลาย 0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	60.57	กรัม

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

19. สารละลาย 10X running buffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$))	30.3	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	กรัม

แยกละลายสารเคมีทั้งสามชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำมารวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เตรียม 1X running buffer โดยเจือจาง 10X running buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 900 มิลลิลิตร

20. สารละลาย 4X SDS sample buffer

สารละลาย 1 M Tris-HCl, pH 6.8	2	มิลลิลิตร
สารละลาย 0.5 M EDTA	1	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.8	กรัม
บรอมฟีนอลบลู	0.08	กรัม
100% กลีเซอรอล	4	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	2.6	มิลลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันตามลำดับ เตรียม 1X SDS sample buffer โดยเจือจาง 4X SDS sample buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 300 มิลลิลิตร และมีการเติม 1% β-mercaptoethanol ก่อนใช้งาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

21. สารละลายสีย้อมคูแมสซีบลู (coomassie blue staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	1	กรัม
เมทานอล	500	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	400	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร

22. สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	300	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	600	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันตามลำดับ

23. สารละลายสำหรับตรึง (fix solution)

เมทานอล	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
87% กลีเซอรอล	50	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	750	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

24. สารละลายบัฟเฟอร์ A

ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	7.098	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	17.532	กรัม
imidazole	0.68	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

ละลายไดโซเดียมฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตรประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 แล้วละลาย imidazole ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

25. สารละลาย wash buffer

ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	7.098	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	17.532	กรัม
imidazole	1.36	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

ละลายไดโซเดียมฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตรประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 แล้วละลาย imidazole ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

26. สารละลายบัฟเฟอร์ B

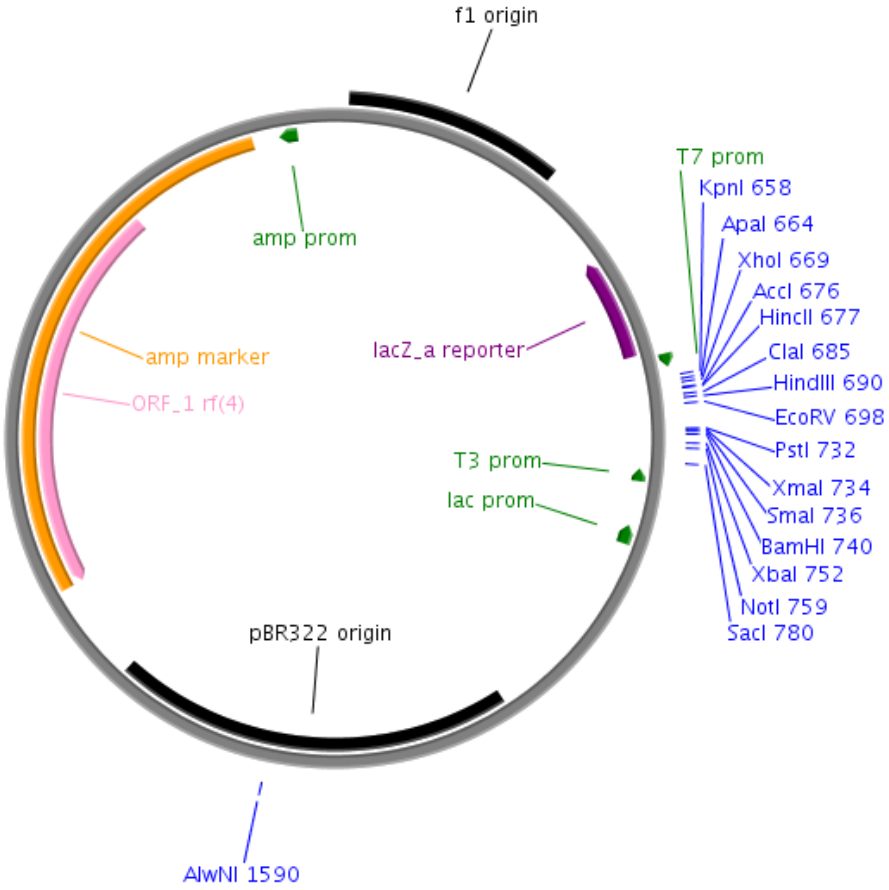
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	7.098	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	17.532	กรัม
imidazole	34.00	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

ละลายไดโซเดียมฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตรประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 แล้วละลาย imidazole ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

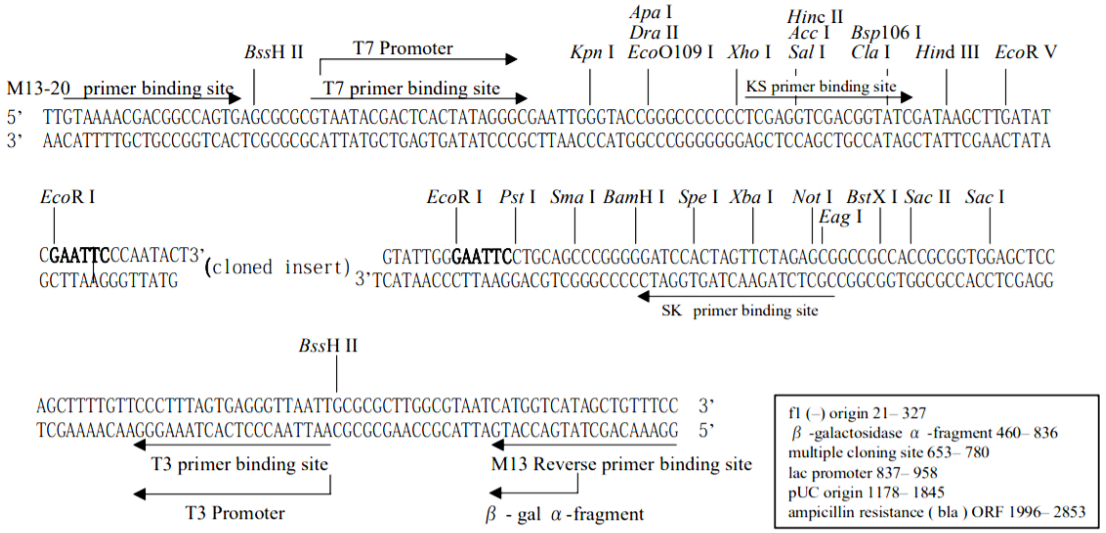
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

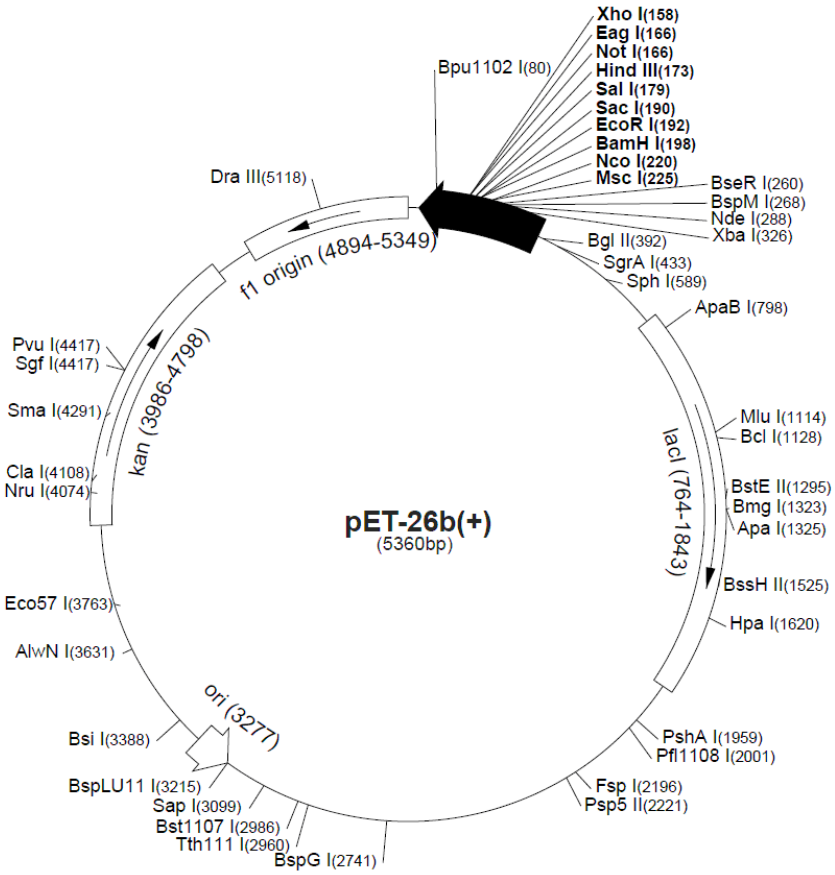
1. เวกเตอร์สำหรับการโคลน pTA2



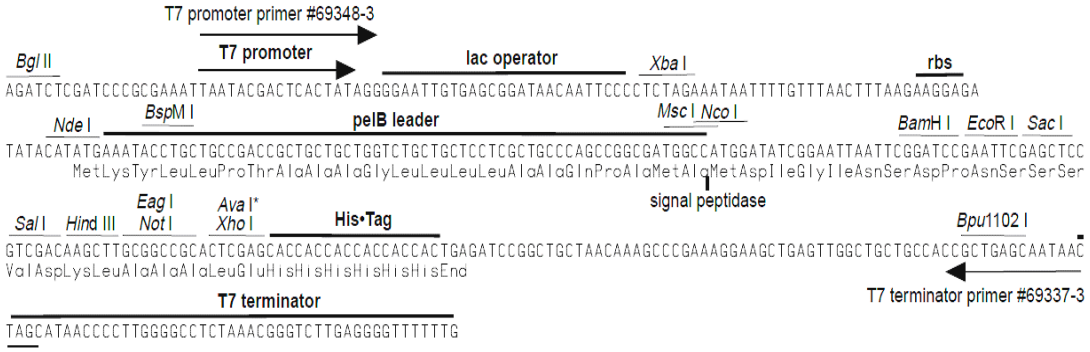
CHULALONGKORN UNIVERSITY



2. เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-26b(+)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาคผนวก ง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินจาก *Bacillus subtilis* N3

ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAGGTTCAAACTCTG
CTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAACCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGG
TCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAAATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAA
GACGGAATCTCTCTTATCCAAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTA
TGAGCGAGCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTTCAAAA
AGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTGAGTTCAACACGAAGAAA
CTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAATCGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCT
ATCAATAAAATGGACTCTGAAAGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATC
AGGTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGTTACAAAAGAAGCTGGT
TATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAACTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCG
ACATCTCTTCTTCAGCTAAAGCTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGC
GAGCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTTGGTACTTCTTCTGAGA
ACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACATGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAA
CATCCTTACTCAGGCTTCTCAAGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAG
CT

* ลำดับเบสที่มีเป็นตัวหนาแสดง โดเมน N
ลำดับเบสที่มีการขีดเส้นใต้แสดง โดเมน C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastn

หมายเลขการเข้าถึง	รายละเอียด	E value	ความใกล้เคียง	เอกสารอ้างอิง
AB039913.1	*Bacillus subtilis hag* gene for flagellin, partial cds, isolate: W-S7	0.0	99 %	(Asano และคณะ, 2001)
AB039905.1	*Bacillus subtilis hag* gene for flagellin, partial cds, strain: NB22	0.0	98 %	(Asano และคณะ, 2001)
AB033501.1	*Bacillus subtilis hag* gene for flagellin, complete cds	0.0	93 %	(Asano และคณะ, 2001)
AB039907.1	*Bacillus subtilis hag* gene for flagellin, partial cds, isolate: W-S1	0.0	92 %	(Asano และคณะ, 2001)
AB039911.1	*Bacillus subtilis hag* gene for flagellin, partial cds, isolate: W-S5	0.0	92 %	(Asano และคณะ, 2001)
EF362756.1	*Bacillus subtilis* strain B-FS01 flagellin (*hag*) gene, partial cds	0.0	91 %	(Hu และคณะ, 2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากยีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3

MRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAKNMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISL
IQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLT
FQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSE
KLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEM
MEYTKNNILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALE

* ลำดับกรดอะมิโนที่มีเป็นตัวหนาแสดง โดเมน N
ลำดับกรดอะมิโนที่มีการขีดเส้นใต้แสดง โดเมน C

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนจากยีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastx

หมายเลขการเข้าถึง	รายละเอียด	E value	ความใกล้เคียง	เอกสารอ้างอิง
WP_022553864.1	MULTISPECIES: flagellin A [*Bacillus*]	0.0	100%	
BAB58986.1	flagellin, partial [*Bacillus subtilis*]	0.0	100%	(Asano และคณะ, 2001)
WP_017418819.1	MULTISPECIES: flagellin [*Bacillus amyloliquefaciens* group]	0.0	99%	
WP_057080256.1	MULTISPECIES: flagellin [*Bacillus amyloliquefaciens* group]	0.0	98%	
WP_057080256.1	MULTISPECIES: flagellin [*Bacillus*]	0.0	98%	
WP_060964151.1	MULTISPECIES: flagellin [*Bacillus*]	0.0	97%	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน N บนยีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3

ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAGGTTCAAACTCTGCTGCAA
AAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAACCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTC
TGAAAAAATGCGTTCTCAAATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC
AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGAGCTTGCTACACAAGCGGC
AAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTTCAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAA
GAATCTCTACTGACACTGAGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCA

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน C บนยีนแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* N3

ATGACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGAGCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTT
TAGAGCACACAATCAACAACCTTGGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTA
GACATGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCAAGCTATGCTTGCGC
AAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT

7. ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากโดเมน N บนยีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3

MRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAKNMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSE
GALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTALE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

8. ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากโดเมน C บนยีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3

MTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAMLAQAN
QQPQQVLQLLALE

9. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย จาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
  clone_1/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG

  clone_1/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA

  clone_1/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA

  clone_1/1-1017 ATCCGCGGTCTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC
                 |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC

  clone_1/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA

  clone_1/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT

  clone_1/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG

  clone_1/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT

  clone_1/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA

  clone_1/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG

  clone_1/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT

  clone_1/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA

  clone_1/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
```

```
  clone_1/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA

  clone_1/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT

  clone_1/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACA

  clone_1/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA

  clone_1/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT

  clone_1/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
                 ||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
```


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

10. ลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย จาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 1 เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของได้จากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
    clone/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK

    clone/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN

    clone/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD

    clone/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA

    clone/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT

    clone/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNN
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNN

    clone/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALEHHHHHH
                ||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALEHHHHHH
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย จาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
  clone_5/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG

  clone_5/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA

  clone_5/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA

  clone_5/1-1017 ATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC

  clone_5/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA

  clone_5/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT

  clone_5/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG

  clone_5/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT

  clone_5/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA

  clone_5/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG

  clone_5/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT

  clone_5/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA

  clone_5/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
```

```
  clone_5/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA

  clone_5/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT

  clone_5/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACA

  clone_5/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA

  clone_5/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAACT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Flagellin/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT

  clone_5/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
                 ||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
```


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. ลำดับกรดอะมิโนของได้จากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 5 เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของได้จากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
  clone_5/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK

  clone_5/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN

  clone_5/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD

  clone_5/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA

  clone_5/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT

  clone_5/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNN
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNN

  clone_5/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLTLEHHHHHH
                ||||||||||||||||||||||.||||||||
Flagellin/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALEHHHHHH
```

13. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลาย จาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 13 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
 clone_13/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATGAGAATTAACCACAATATCGCGGCTCTTAACACTAGCCGTCAGCTGAATGCAG

 clone_13/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTTCAAACTCTGCTGCAAAAAACATGGAAAAATTATCTTCAGGTCTTCGCATCAA

 clone_13/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CCGCGCTGGTGATGACGCTGCGGGTCTTGCGATCTCTGAAAAAATGCGTTCTCAA

 clone_13/1-1017 ATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 ATCCGCGGTTTAGACATGGCGTCTAAAAACGCTCAAGACGGAATCTCTCTTATCC

 clone_13/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AAACATCTGAGGGTGCATTGAACGAAACTCACAGCATTCTTCAGCGTATGAGCGA

 clone_13/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCTTGCTACACAAGCGGCAAACGATACAAACACAGATTCTGACCGTTCTGAGCTT

 clone_13/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CAAAAAGAGATGGACCAATTATCATCTGAAGTAACAAGAATCTCTACTGACACTG

 clone_13/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGTTCAACACGAAGAAACTTCTTGACGGAACTGCAAAAGATCTTACGTTCCAAAT

 clone_13/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CGGAGCTAACGAAGGTCAAACCATGACTTTGTCTATCAATAAAATGGACTCTGAA

 clone_13/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGCCTGAAAGTTGGTACGACTTATACAGCTCAAGCTGATGGAACACTTAAATCAG

 clone_13/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GTGATGGAAATAGCACTGCTACTTGGGCAGATGAAGAAGTAACAGACGGTAAAGT

 clone_13/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TACAAAAGAAGCTGGTTATTATGATGATAAAGGTGCTCTAGTAGGAAGTGAAAAA

 clone_13/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTAGAAGAAGGCGAAAAGTTATCTAAAGGTATCGACATCTCTTCTTCAGCTAAAG
```

```
 clone_13/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTGCGTCTTCAGCTCTTACAACAATCAAAACAGCTATCGACACAGTATCTAGCGA

 clone_13/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 GCGCGCTAAACTTGGTGCGGTTCAAAACCGTTTAGAGCACACAATCAACAACCTT

 clone_13/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAAACA
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Flagellin/1-1017 GGTACTTCTTCTGAGAACCTGACTTCTGCTGAATCACGTATCCGTGACGTAGACA

 clone_13/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 TGGCTTCTGAGATGATGGAGTACACGAAAAACAACATCCTTACTCAGGCTTCTCA

 clone_13/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 AGCTATGCTTGCGCAAGCTAACCAACAGCCTCAGCAAGTTCTTCAATTGTTAGCT

 clone_13/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
                 ||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-1017 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
```


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14. ลำดับกรดอะมิโนของได้จากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินที่มีการกลายจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โคลนที่ 13 เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของได้จากการแปลรหัสยีนแฟลกเจลลินเดิม

```
 clone_13/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPMRINHNIAALNTSRQLNAGSNSAAK

 clone_13/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 NMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGISLIQTSEGALN

 clone_13/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 ETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDRSELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLD

 clone_13/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 GTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESLKVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWA

 clone_13/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 DEEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVGSEKLEEGEKLSKGIDISSSAKAASSALTTIKT

 clone_13/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVNMASEMMEYTKNN
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||.|||||||||||
Flagellin/1-369 AIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAESRIRDVDMASEMMEYTKNN

 clone_13/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALEHHHHHH
                ||||||||||||||||||||||||||||||||
Flagellin/1-369 ILTQASQAMLAQANQQPQQVLQLLALEHHHHHH
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว จุฑากาญจน์ นามสง่า
วัน เดือน ปี เกิด	7 มกราคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559
ที่อยู่ปัจจุบัน	13 ซอยเพชรเกษม 58 แยก 10 ถนนเพชรเกษม แขวงบางด้วน เขตภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160
ผลงานตีพิมพ์	ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ International Conference of Agriculture and Natural Resources (ANRES 2018) ระหว่างวันที่ 26–28 เมษายน 2561 ณ โรงแรม วินด์เซอร์ สวีทส์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง "Cloning and proliminary expression of flagellin-like protein from Bacillus subtilis N3 in Escherichia coli"
รางวัลที่ได้รับ	ได้รับรางวัล Student Poster Award จากการเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ANRES 2018

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University