

การสร้างชุดเทิลเวกเตอร์และการศึกษาเบื้องต้นของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก
Arthrobacter sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่แสดงออกใน *Bacillus subtilis*



นางสาววรรณศพรพรณ นาควัชระ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

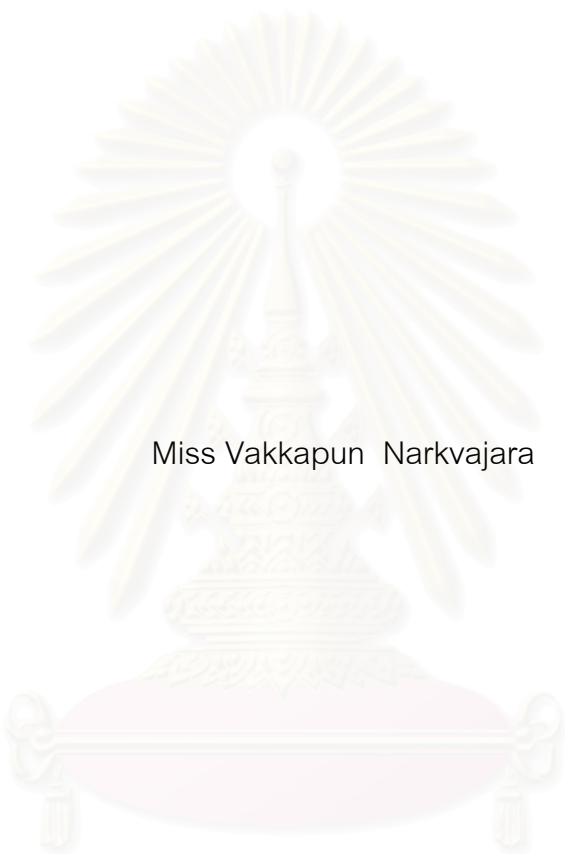
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2742-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR AND PRELIMINARY STUDY OF
DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2
EXPRESSED IN *Bacillus subtilis*



Miss Vakkapun Narkvajara

สภามหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology

Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2742-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสร้างชุดเทิลเวกเตอร์และการศึกษาเบื้องต้นของยีนเดซท์แทรนเนส
จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่แสดงออกใน *Bacillus*
subtilis

โดย

นางสาววรรคพรรณ นาควิษระ

สาขาวิชา

จุลชีวิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

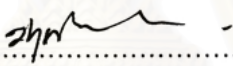
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

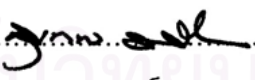
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

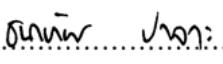
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปานัน เริงสำราญ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

วรรณกรรม นาควัชระ : การสร้างขั้วเทิลเวกเตอร์และการศึกษาเบื้องต้นของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่แสดงออกใน *Bacillus subtilis* (CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR AND PRELIMINARY STUDY OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 EXPRESSED IN *Bacillus subtilis*) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุเทพ ธีรยวัน; 80 หน้า. ISBN 974-53-2742-5.

pGEMTF เป็นขั้วเทิลเวกเตอร์ขนาด 8 กิโลเบสที่สร้างขึ้นโดยการเชื่อมกันระหว่าง pGEM-7Zf(+) และ pTF6 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถ่ายแบบใน *Escherichia coli* และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ใน *Bacillus subtilis* โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. โดยออกแบบให้ปลายของไพรเมอร์ทั้งสองฝั่งมีจุดตัดเอนไซม์ *A/w21I* แล้วโคลนเข้าไปใน pGEM-7Zf(+) ตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pGEMDEX จากนั้นตัด pGEMDEX ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *A/w21I* ได้ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสขนาดประมาณ 2 กิโลเบส นำมาโคลนลงใน pGEMTF ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นคู่สมกับ *A/w21I* โดยใช้ *E.coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าได้พลาสมิดขนาด 10 กิโลเบส ตั้งชื่อว่า pBUNDEX จากนั้นทรานสฟอร์ม pBUNDEX เข้าสู่ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ คือ MI111, MI111 low protease และ MI113 ขนาดของพลาสมิดที่พบใน *Bacillus subtilis* ทั้งสามชนิดนั้นมีขนาดเล็กกว่า pBUNDEX และไม่สามารถตรวจพบส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสได้ด้วยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการตัดออกของยีนเกิดขึ้น

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572633723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DEXTRANASE/ *Arthrobacter* sp./ EXPRESSION VECTOR

VAKKAPUN NARKVAJARA : CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR AND PRELIMINARY STUDY OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 EXPRESSED IN *Bacillus subtilis*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP THANEEYAWAN, Ph.D., 80 pp. ISBN 974-53-2742-5.

pGEMTF (8 Kb), a shuttle vector that was constructed from pGEM+7Zf(+) and pTF6, capable of replicating in *E.coli* and *Bacillus* sp. was used as an expression vector for dextranase gene (*dex*) isolated from *Arthrobacter* sp. strain AG-2 in *Bacillus subtilis*. The *dex* amplified by BUN+F and BUN+R primers, with *Alw21I* restriction site at their 5'end, was cloned into pGEM-7Zf(+) and designated as pGEMDEX. The *Alw21I* fragment from pGEMDEX containing *dex* was cloned into *PstI* cut pGEMTF by using *E. coli* DH5 α as host. The 10 Kb product that contained *dex* was found and designated as pBUNDEX. Finally, pBUNDEX was transformed into 3 *Bacillus subtilis* strain; MI111, MI111 low protease and MI113 host. Plasmid size in these *Bacillus subtilis* strains was smaller than pBUNDEX in *E.coli* and *dex* could not be detected by PCR amplified. The result showed that constructed plasmid was deleted when transformed into *Bacillus subtilis* hosts.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Microbiology.....Student's signature.....*Vakkapun Narkvajara*
Field of study.....Industrial Microbiology.....Advisor's signature.....*Supat Chareonpornwattana*
Academic year.....2005.....Co-advisor's signature.....*Suthep Thaneeyawan*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ และความปรารถนาดี แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจ

ขอขอบคุณ คุณวศิน บัวศรี สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	26
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	27
3.3 แบคทีเรีย.....	29
3.4 พลาสมีดและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟรเมอร์.....	30
3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	31
3.6 เตรียมพลาสมีดดีเอ็นเอ.....	31
3.7 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	33
3.8 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมีดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ.....	34
3.9 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมีดเข้าสู่ <i>E. coli</i>	35
3.10 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมีดเข้าสู่ <i>B. subtilis</i>	37
4. ผลการทดลอง.....	38
4.1 การสร้างชุดเทลเวกเตอร์เพื่อใช้สำหรับการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนส.....	38
4.2 การขยายส่วนที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	41
4.3 โคลนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เข้าไปใน pGEM-7Zf(+).....	42
4.4 โคลนส่วนที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสเข้าไปในชุดเทลเวกเตอร์.....	43

4.5 ทรานสฟอร์ม pBUNDEX เข้าใน <i>Bacillus</i> sp.....	46
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	49
รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	66
ภาคผนวก ข.....	68
ภาคผนวก ค.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	80



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	6
3.1	29
3.2	30
3.3	30



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 การเกาะของแบคทีเรียกับพื้นโดยมีแคลเซียมเป็นสะพาน (จินตกร คุ้มมนสุชาติ, 2542).....	7
2.2 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์ กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (จินตกร คุ้มมนสุชาติ, 2542).....	8
2.3 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Glazer และ Nikaido, 1995).....	8
2.4 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ -35 และ -10 (Old และ Primrose, 1994).....	15
2.5 แสดงลักษณะของการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ inducible และ repressible (Brown, 1995).....	15
2.6 แสดงลักษณะการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย Strong และ Weak promoter (Brown, 1995).....	16
2.7 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรโมเตอร์ของ <i>E.coli</i> และของสัตว์ (Brown, 1995).....	17
2.8 แสดงถึงการใช้ดีเอ็นเอพาหะเพื่อการแสดงออกของ Foreign gene (Brown, 1995).....	19
4.1.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของขั้วเทิลเวกเตอร์ pGEMTF ที่สร้างได้.....	39
4.1.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของทรานสפורแมนต์ที่ถูกตัดด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> I.....	40
4.1.3 แผนที่แสดงทิศทางการเชื่อมต่อกันของ pGEM-7Zf(+) และ pTF6 ในขั้วเทิลเวกเตอร์ที่สร้างได้.....	40
4.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จาก ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	41
4.3.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของทรานสפורแมนต์ที่ถูกตัด ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Bam</i> HI.....	42
4.3.2 แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pGEMDEX.....	43

4.4.1	ภาพอะการอสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของพลาสมิดที่ได้จากการ ทรานสฟอร์มชันส่วนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าใน pGEMTF แล้วตัดด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI	44
4.4.2	ภาพอะการอสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส.....	45
4.4.3	แผนที่แสดงลักษณะของ pBUNDEX.....	45
4.5.1	ภาพอะการอสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของทรานสฟอร์มแมนต์ จาก <i>Bacillus</i> sp.....	46
4.5.2	ภาพอะการอสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	47
4.5.3	ภาพอะการอสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จาก ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	48
5.1	ภาพแสดงลักษณะของซัตเทลเวกเตอร์ pBUNDEX.....	50
5.2	การเกิด illegitimate recombination A แสดง Copy-choice และ B และ Breakage and reunion recombination (Brunier และคณะ, 1988).....	53
5.3	การเกิดการตัดออกไปของพลาสมิดซึ่งมีผลมาจากโทโปไอโซเมอเรสใน <i>Bacillus subtilis</i> (Meima และคณะ, 1998).....	54

บทที่ 1

บทนำ

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในช่องปาก และนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับเนื้อฟัน มีการทำลายเนื้อฟัน และละลายเป็นโพรง เมื่อปล่อยทิ้งไว้จะลุกลามไปถึงประสาทฟัน ทำให้เกิดอาการเสียวฟันและปวดฟัน ถ้าปล่อยไว้ไม่ทำการรักษาอาจจำเป็นต้องถอนฟันทิ้ง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบริโภคอาหารลดลง และจะเป็นสาเหตุให้ฟันซี่อื่นๆ เสื่อมมากขึ้น เพราะฟันติดอยู่กับกระดูกแบบข้อต่อมีการเคลื่อนที่ได้ เมื่อมีที่ว่างฟันซี่ถัดไปจะเคลื่อนเอียงได้ทำให้ช่องว่างระหว่างฟันมากขึ้นอันจะทำให้เศษอาหารติดและก่อให้เกิดโรคฟันผุได้ง่ายยิ่งขึ้น

โรคฟันผุนั้นเกิดจากสาเหตุสำคัญของประการ ได้แก่การที่จุลินทรีย์ในช่องปากใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นพลังงานผ่านกระบวนการไกลโคลิซิส แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโปรพิโอนิก ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจะละลายแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผิวเคลือบฟันและเนื้อฟันจนลุกลามเกิดเป็นโรคฟันผุ (demineralization) (Melville และ Russell, 1981; Thystrup และ Fejerkov, 1986) และอีกสาเหตุหนึ่งคือ พฤติกรรมการบริโภคอาหาร (Noltel, 1973; Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988) ยกตัวอย่างเช่น ความถี่ในการรับประทานอาหารและชนิดของอาหาร เป็นต้น

จุลินทรีย์ในช่องปากที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Streptococci* และ *Lactobacilli* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptococcus mutans* (Schuster, 1983) แบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทกุกูแคนที่ประกอบด้วยกุกูโคสหน่วยย่อย โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของ กุกูแคนที่ละลายน้ำ (เดกซ์แทรน) ซึ่งประกอบด้วยกุกูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 เป็นส่วนใหญ่ และกลุ่มของกุกูแคนที่ไม่ละลายน้ำ (มิวแทน) ประกอบด้วยกุกูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,3 เป็นส่วนใหญ่ (Ceska และคณะ 1972; Guggenheim, 1970) โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะยึดเกาะกับผิวฟันและสร้างเดกซ์แทรนซูโครสหรือกุกูโคซิลทรานสเฟอไรส (GTF) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันส่วนกุกูโคสของซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรนและปล่อยฟรักโทสอิสระออกมา (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986)

เดกซ์แทรนเป็นฮอมอพอลิเมอร์ของกุกูโคสที่มีหน่วยย่อยของกุกูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกและมีสายที่แตกแขนงออกจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3-ไกลโคซิดิก เดกซ์แทรนเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ละลายน้ำได้ยาก และมีลักษณะเหนียวหนืดสามารถจับกับผิวฟัน และยังสามารถจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารในช่องปาก เกิดเป็นคราบ

พื้ (plaques) ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์ต่างๆเกาะผิวพื้ได้มากขึ้น และนำไปสู่การเกิดโรคพื้ (Guggenheim, 1970)

การป้องกันพื้พื้สามารถทำได้โดยใช้หลักการ เพิ่มความต้านทานให้กับพื้ ป้องกันการเกิดครดในคราบพื้ และควบคุมจุลินทรีย์ในคราบพื้ โดยวิธีป้องกันพื้พื้ ได้แก่ การแปรงพื้ให้ถูกต้อง การเคลือบร่องพื้ การใช้สารฟลูออไรด์ การใช้น้ำตาลเทียม การใช้ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ และการใช้วัคซีนป้องกันพื้พื้ โดยวิธีการเหล่านี้สามารถป้องกันพื้พื้ได้ในระดับหนึ่ง แต่วิธีที่สามารถป้องกันไม่ให้เกิดโรคพื้พื้ได้เป็นอย่างดี คือการทำให้พื้ผิวภายในปากไม่เหมาะต่อการตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ (จินตกร คุ้มสนสุชาติ, 2544) เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นสาเหตุหลักของการจับเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเดกซ์แทรนทำให้ความหนืดลดลงส่งผลให้การจับเกาะของจุลินทรีย์ลดลงตามไปด้วย จึงเป็นอีกวิธีที่เหมาะสมในการป้องกันพื้พื้ โดยพบว่าเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดไม่ละลายน้ำที่จุลินทรีย์ขับออกมา ซึ่งเป็นการลดการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้พื้ได้ (Melville และ Russel, 1981, Wolinsky, 1988)

เดกซ์แทรนเนส (α -1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase; E.C.3.3.1.11) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการสลายพื้พื้ α -1,6 ที่เชื่อมหน่วยย่อยกลูแคนภายในสายเดกซ์แทรน ทำให้โมเลกุลของเดกซ์แทรนมีขนาดเล็กลง และความหนืดลดลง จากการศึกษาพบว่าเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถลดคราบพื้พื้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดเช่น รา สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ แต่ราส่วนมากนั้นมักจะมีส่วนของผนังเซลล์ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ และราบางชนิดยังสร้างแอฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในภาวะเดียวกันกับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ (Leach, 1969) ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจึงนิยมใช้จุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่แยกได้ตามธรรมชาตินั้น จะมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสค่อนข้างต่ำ ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมจึงต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้ได้เดกซ์แทรนเนสในระดับที่สูงขึ้น โดยทั่วไปในเบื้องต้นมักทำการคัดเลือกอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตแล้ว การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ก็เป็นสิ่งที่มีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิต การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี (Baltz, 1986) อาทิเช่น การกลายพันธุ์ (mutation) ทั้งแบบสุ่มและชนิดเจาะจงตำแหน่ง โดยการใช้สิ่งชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น รังสี และสารเคมี การใช้ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสให้สูงขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเวกเตอร์การแสดงออก (expression vector) สำหรับเพิ่มปริมาณในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วยการแสดงออกใน *Bacillus subtilis* และศึกษาการแสดงออกเบื้องต้นของเดกซ์แทรนเนสใน *Bacillus subtilis* เพื่อนำมาใช้ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการช่วยลดฟืนฟูในรูปแบบจำลองสัตว์ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

โรคในช่องปากจัดเป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่ง ซึ่งนับวันจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และโรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคในช่องปากที่เป็นกันอย่างแพร่หลายโรคหนึ่ง เนื่องจากเป็นโรคที่สามารถเกิดขึ้นได้กับคนทุกเพศทุกวัย แม้ว่าโรคฟัน จะไม่รุนแรงจนทำให้ถึงแก่ชีวิตแต่จะทำให้เกิดการสูญเสียหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความเจ็บปวดและการบั่นทอนสุขภาพ เป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนของระบบอื่นในร่างกาย นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจทั้งทางด้านส่วนตัวและส่วนรวม (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2544)

จุลินทรีย์ในช่องปาก

เนื่องด้วยภายในปากนั้นไม่ได้มีลักษณะเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันทั้งหมด พื้นผิวภายในปากหลายแห่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพและทางกายภาพแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างกันอาศัยอยู่ พื้นผิวเหล่านี้ได้แก่ เหงือก ริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม เพดาน ลิ้น และฟัน ซึ่งฟันเป็นโครงสร้างเดียวเท่านั้นในช่องปากที่มีลักษณะแข็ง และทำหน้าที่เป็นพื้นผิวให้แบคทีเรียและผลิตภัณฑ์ของเชื้อจำนวนมากมาเกาะอยู่จนกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ โดยไม่มีการลอกหลุดของผิวนั้น จุลินทรีย์ที่อาศัยในช่องปากนั้นมีหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส และโพรทิสต์ โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่องปาก (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2544) ได้แก่

1. อุณหภูมิ นอกเหนือจากผลกระทบต่อการใช้พลังงานของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์แล้วอุณหภูมียังมีผลต่อความเป็นอยู่ของจุลินทรีย์อีกด้วย ปัจจัยอื่นที่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิได้แก่ความเป็นกรด-เบส การทำงานของประจุไฟฟ้า การรวมตัวกันของโมเลกุลขนาดใหญ่ และความสามารถในการละลายน้ำของแก๊ส ภายในช่องปากของ มนุษย์นั้นมีอุณหภูมิคงที่ประมาณ 35-36°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิด
2. ออกซิเจน ในช่องปากนั้นมีทั้งจุลินทรีย์พวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic microorganism) จุลินทรีย์พวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic microorganism) และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic microorganism) โดยปริมาณของออกซิเจนจะแตกต่างกันไปตามบริเวณต่างๆ ภายในช่องปาก

3. สภาพความเป็นกรด-เบส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องการค่าความเป็นกรด-เบสที่ค่อนข้างเป็นกลางเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-เบสในช่องปากขึ้นอยู่กับน้ำลายและอาหารที่รับประทาน ค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-เบสของน้ำลายคือ 6.75 เมื่อมีของหวานอยู่ในปากค่าความเป็นกรดเบสจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 5.0 เป็นผลมาจากการเผาผลาญอาหารของแบคทีเรียแล้วเกิดกรดแลคติกขึ้น โดยน้ำลายจะทำหน้าที่ลดกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จนค่าความเป็นกรด-เบสคืนสู่ระดับความเป็นกลาง ความเป็นกรด-เบสภายในคราบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับรอยผุของฟันอาจมีค่าต่ำกว่าความเป็นกลางทำให้จุลินทรีย์ที่ทนต่อกรดได้เท่านั้นที่มีชีวิตอยู่รอดได้ เช่น *Streptococci* และ *Lactobacilli*
4. โภชนาการ อาหารที่จุลินทรีย์ในช่องปากนำไปใช้นั้นได้มาจากน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก (crevicular fluid) นอกจากนี้ในคราบจุลินทรีย์มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งภายในเซลล์และผลิตออกมานอกตัวเซลล์จากน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ขณะที่ขาดแคลนอาหารพวกแป้ง จะเห็นว่าช่องปากมีภาวะโภชนาการที่เหมาะสม ทำให้เกิดความหลากหลายของจุลินทรีย์ขึ้น
5. การยึดเกาะติดแน่น การบดเคี้ยวอาหารและการไหลเวียนของน้ำลายนั้นทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะติดไม่แน่นกับพื้นผิวในช่องปากถูกกำจัดออกไป การกลืนอาหารจึงเป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกจากปากได้เป็นอย่างดี แต่ในบริเวณที่จุลินทรีย์ได้รับการป้องกันเป็นอย่างดี เช่น ร่องฟัน ร่องเหงือก และซอกฟัน เป็นต้น จุลินทรีย์จะถูกกำจัดออกไปยากกว่าบริเวณอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างสารพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดไม่ละลายน้ำจากน้ำตาลซูโครสออกมานอกตัวเซลล์ได้ ซึ่งช่วยในการยึดเกาะ

จากปัจจัยเหล่านี้ทำให้พบจุลินทรีย์หลากหลายชนิดภายในช่องปาก โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในช่องปากส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถแยกได้โดยทั่วไปจากปากมนุษย์ แสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก (จินตกร คุ้มมนสุชาติ, 2544)

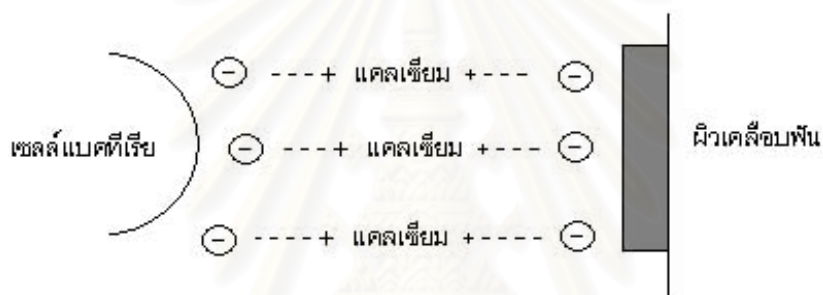
แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Celenomonas</i>
<i>Rothia</i>	<i>Centipeda</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Treponema</i>
	<i>Bacteroides</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Wolinella</i>

คราบจุลินทรีย์

คราบจุลินทรีย์ (dental plaques) เกิดจากการเกาะติดกันอย่างเหนียวแน่นของแบคทีเรียพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตนอกตัวเซลล์ของแบคทีเรีย (extracellular polysaccharides) และพอลิเมอร์ที่เกิดจากน้ำลายบนผิวฟัน (Gibbons และ Van Houte, 1980) คราบจุลินทรีย์นี้ถือได้ว่าเป็นที่อยู่อาศัยขนาดใหญ่ของจุลินทรีย์ มีลักษณะนุ่ม หนืด ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน คราบจุลินทรีย์ที่มีแคลเซียมมาเกาะสะสม (calcified) จะเปลี่ยนไปเป็นหินน้ำลาย (calculus หรือ tartar) คราบจุลินทรีย์ที่ติดบนผิวฟันนี้สามารถเห็นได้โดยการบ้วนปากด้วยสารละลายที่เป็นสี เช่น erythrosin (Burnette และ Scherp, 1962) คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยแบคทีเรีย 70-80 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือกลุ่มของ *Streptococcus* (Robrich, 1986) ซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ และเป็นสาเหตุให้เกิดฟันผุ อย่างไรก็ตามสัดส่วนของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันไปตามอายุและตำแหน่งของคราบจุลินทรีย์

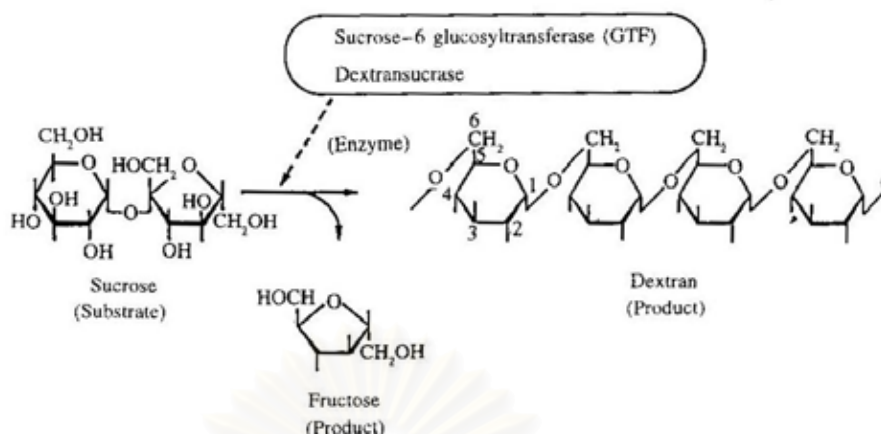
การเกิดคราบจุลินทรีย์

การเกิดคราบจุลินทรีย์ เริ่มต้นจากการเกิดการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับผิวฟัน โดยการเริ่มยึดเกาะจะได้รับอิทธิพลจากน้ำลายและการบดเคี้ยว (Lyndhe, 1984) โดยการยึดเกาะของแบคทีเรียกับฟันในช่วงแรกนั้นจะอาศัยอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) โดยทั่วไปผิวฟันนั้นจะเป็นประจุลบ และแบคทีเรียในช่องปากก็มีสมบัติเป็นประจุลบเช่นกันซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกรดไลโปไทโคอิก (lipoteichoic acid) ในผนังเซลล์ การยึดเกาะจึงจำเป็นต้องอาศัยประจุไฟฟ้าบวกที่เป็นพวกไดวาเลนต์ (divalents) ได้แก่ แคลเซียม เป็นสะพานเชื่อมโยง (Gibbons และ Van Houte, 1980)



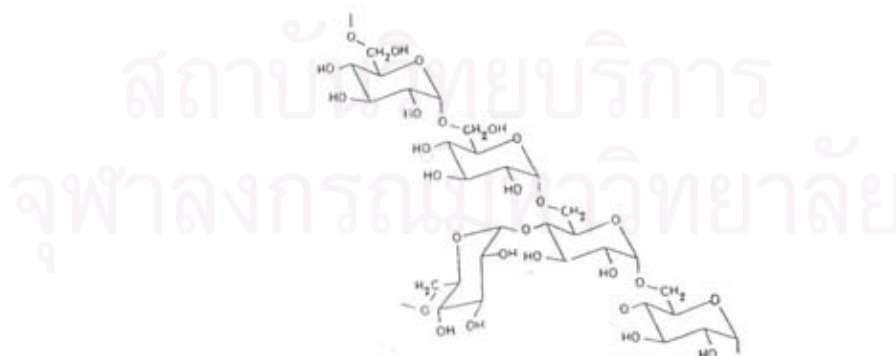
รูปที่ 2.1 การเกาะของแบคทีเรียกับฟันโดยมีแคลเซียมเป็นสะพาน (จินตกร คุ้มณสุชาติ, 2544)

หลังจากเกิดการยึดเกาะด้วยสะพานแคลเซียมแล้วจะมีการเกาะติดแน่น (adherence) ของแบคทีเรียกับผิวฟันเกิดขึ้นตามมา โดยมีพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยในการยึดเกาะ แบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในระดับสูงและมีความเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุคือ *Streptococci* โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) หรือเดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) โดยจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสพร้อมกับปลดปล่อยฟรักโทสอิสระออกมาด้วย (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986) ดังแสดงในรูป 2.2



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรน โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (จินตกร คุ้มณสูชาติ, 2544)

เดกซ์แทรนเป็นฮอโมพอลิเมอร์ของกลูโคสที่มีหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังมีสายที่แตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วย-1,3-ไกลโคซิดิก โครงสร้างของเดกซ์แทรนแสดงในรูปที่ 2.3 เดกซ์แทรนมีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้ละลายน้ำได้ยากและมีลักษณะเหนียวหนืด จับกับผิวพื้นได้ดี ซึ่งลักษณะเหนียวนี้ทำหน้าที่เป็นกาวยึดคราบจุลินทรีย์ให้ติดกับผิวฟัน นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารต่างๆเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ และยังเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรียในภาวะที่ช่องปากขาดแคลนคาร์โบไฮเดรต (Guggenheim, 1970)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Glazer และ Nikaido, 1995)

การเกิดโรคฟันผุ

ฟันผุเกิดจากคราบจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียที่เรียกใช้แป้งและน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการไกลโคลิซิส แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์หลายชนิด โดยกรดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติก ซึ่งกรดนี้สามารถละลายอะพาไทต์ที่ผิวเคลือบฟันและเนื้อฟันโดยกระบวนการดีมีเนอรัลไรเซชัน (demineralization) ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันหรือฟันผุ

แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้ช้าหรือเร็วต่างกัน *Streptococci* และ *Lactobacilli* และยีสต์ จะสามารถสร้างกรดได้เร็ว โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ที่นอกจากผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วแล้วยังสร้างเดกซ์แทรนทำให้เกิดการจับกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ (McGhee และ Michalek, 1981; Loeache, 1986) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อพบว่า *Streptococcus mutans* สามารถก่อให้เกิดโรคฟันผุได้มากที่สุด ในขณะที่ *Lactobacilli* นั้นจะมีบทบาทกับฟันที่ผุอยู่แล้วมากกว่า (Hamada และ Slade, 1980) ความเป็นกรดของคราบจุลินทรีย์นั้นพบวก่อนรับประทานอาหารจะมีค่าความเป็นกรด-เบสระหว่าง 6.5-7.0 หลังจากรับประทานอาหารค่าความเป็นกรด-เบสจะลดลงอย่างรวดเร็วและจะมีระยะหนึ่งที่มีค่าต่ำกว่า 5.5 ซึ่งทำให้เคลือบฟันอ่อนตัวและสลายออกมาได้ง่ายทำให้เกิดฟันผุในเวลาต่อมา เรียกค่าความเป็นกรด-เบสนี้ว่า ค่าความเป็นกรด-เบสวิกฤติ (critical pH) การลดลงของค่าความเป็นกรด-เบสขึ้นอยู่กับอาหารที่บริโภค พบว่าคนที่ชอบบริโภคของหวานที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นจำนวนมากจะมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-เบสวิกฤติมากกว่าคนที่บริโภคเฉพาะอาหารมีอหลักเพียงอย่างเดียว (Burnett และ Scherp, 1962; Shaw และ Roussos, 1978; Schachtele, 1982) สำหรับน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายนั้นมักนิยมมาใช้ทำอาหารมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นเนื่องจากราคาถูก หาง่าย และมีรสชาติดี นอกจากนี้น้ำตาลทรายเกือบทั้งหมดในประเทศไทยผลิตมาจากอ้อยซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจราคาถูกในประเทศด้วย ดังนั้นจึงยังพบปัญหาฟันผุในกลุ่มประชากรโดยตลอด

การป้องกันฟันผุ

มีหลักการสำคัญ คือ การเพิ่มความต้านทานให้กับฟัน การป้องกันการเกิดกรดในคราบจุลินทรีย์ และการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ โดยการป้องกันฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ (จินตกร คุวัฒนสุชาติ, 2544)

1. การเคลือบร่องฟัน เนื่องจากตำแหน่งที่เกิดฟันผุได้ง่ายที่สุดในช่องปากคือ บริเวณหลุมและร่องฟัน ที่อยู่ด้านบนของการบดเคี้ยว ซึ่งบริเวณดังกล่าวยากต่อการทำความสะอาด

และป้องกันสิ่งเกาะติด จึงมีการนำวัสดุที่มีคุณสมบัติยึดเกาะกับผิวฟันเหนียวแน่นมาเคลือบปิดร่องฟัน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปอาศัยในร่องฟัน

2. การใช้สารประกอบฟลูออไรด์ (Burnette และ Schuster, 1978; Wolinsky, 1988) มีการใช้อย่างแพร่หลาย โดยมีผลผสมลงในน้ำดื่มและยาสีฟัน ฟลูออไรด์สามารถช่วยป้องกันฟันผุได้ เนื่องจากฟลูออไรด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซีของไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของฟัน กลายเป็นผลึกของพวกอะพาไทต์ เรียกว่าฟลูออโรอะพาไทต์ ซึ่งมีความคงทน สลายตัวได้ยากและทนต่อการละลายจากกรดได้ดีกว่าพวกไฮดรอกซีอะพาไทต์ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการใช้ฟลูออไรด์อย่างสม่ำเสมอแต่ก็ยังพบการเกิดฟันผุได้ และหากใช้สารนี้ในปริมาณมากเกินไปทำให้กระดูกและฟันเปราะ
3. การใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซึบสเตรตของกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ในการให้ความหวาน (Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981) เช่นการใช้น้ำตาลไซลิทอลและซอร์บิทอล แต่ยังมีปัญหาในเรื่องของรสชาติและต้นทุนการผลิต ในอาหารและเครื่องดื่ม
4. การใช้อยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981; Schuster, 1983) การใช้อยาปฏิชีวนะเช่น เพนิซิลลิน เทตราไซคลิน และอีริโทรมัยซิน สามารถช่วยป้องกันฟันผุได้ แต่การใช้นั้นอาจเกิดผลข้างเคียง คือการแพ้ยาและการดื้อยาของเชื้อ สารยับยั้งจุลินทรีย์อีกชนิดที่นิยมใช้ในการป้องกันฟันผุคือ คลอเฮกซิดีน ซึ่งเป็นสารเคมีพวกบิสโบกัวโนด์ มีสมบัติในการยับยั้งรา และแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่อาศัยอยู่ในช่องปาก นิยมนำมาใช้เป็นน้ำยาบ้วนปาก โดยจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ฉีกขาดและเซลล์แตกในที่สุด แต่ข้อเสียของคลอเฮกซิดีน คือมีรสขม บางครั้งอาจทำให้ตุ่มรับรสผิดปกติไปหลังจากการบ้วนปาก
5. การใช้วัคซีนในการป้องกันฟันผุ (Hamada และ Slade, 1980; Michalek และ Childers, 1990) มีการผลิตวัคซีนจาก *S. mutans* แต่มีปัญหาคือการเกิดของแอนติบอดี-แอนติเจนคอมเพล็กซ์ ซึ่งมีผลทำลายเนื้อเยื่อหัวใจและยังก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการไหลเวียนของเลือด เช่น ไต
6. การใช้สารยับยั้งการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Bowen, 1978) เช่น น้ำตาลฟรักโตส และสารพวกเลคติน แต่สารส่วนใหญ่ที่พบยังไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอและต้องใช้ในปริมาณที่สูง

อย่างไรก็ตามการป้องกันฟันผุด้วยวิธีดังกล่าวสามารถป้องกันฟันผุได้ในระดับหนึ่ง แต่วิธีที่สามารถป้องกันฟันผุได้เป็นอย่างดีคือการทำให้พื้นผิวภายในช่องปากไม่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย เนื่องด้วยเดกซ์แทรนเป็นสาเหตุหลักของการจับเกาะของแบคทีเรียบนผิวฟัน

การใช้เอนไซม์เพื่อการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเดกซ์แทรนส่งผลให้ความหนืดลดลงจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันฟันผุ โดยได้มีการพบว่าเดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำที่แบคทีเรียขับออกมาเป็นการลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนฟันลงได้ (Bernette และ Scherp, 1962; Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988)

เดกซ์แทรนเนส

สามารถแบ่งเดกซ์แทรนเนสได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะการตัดบนสายเดกซ์แทรน (Mizuno และคณะ, 1999)

1. เอนโดเดกซ์แทรนเนส

เอนโดเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนบริเวณตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,6 ที่ตำแหน่งใดๆในสายเดกซ์แทรนและปลดปล่อยไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์หลายๆ ชนิด เช่น ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรออส และไอโซมอลโทเพนทาออส เป็นต้น เอนโดเดกซ์แทรนเนสมีชื่อตามระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ว่า 1,6-แอลฟา-ดี-กลูแคนโนไฮโดรเลส (E.C.3.2.1.11) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991), *Streptococcus salivarius* สายพันธุ์ PC-1 (Lawman และ Bleiweis, 1991), *S. salivarius* สายพันธุ์ M-33 (Ohnishi และคณะ, 1995), *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996), *Penicillium notatum* (Pleszczynska และคณะ, 1997), *Sporothrix schenckii* สายพันธุ์ IT-29 (Arnold และคณะ, 1998), *Fusarium* sp. (Shimizu และคณะ, 1998) และ *Paenibacillus* sp. (Finnegan และคณะ, 2005) เป็นต้น

2. เอกโซเดกซ์แทรนเนส

เอกโซเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนบริเวณตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,6 โดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะที่เชื่อมหน่วยของกลูโคสจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่น้ำตาลรีดิวซ์และตัดเข้าไปบนสายเดกซ์แทรนที่ละโมเลกุลและปลดปล่อยกลูโคสหรือไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์ออกมา เอกโซเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานในปัจจุบันมีสามชนิด โดยแบ่งตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน ได้แก่

- 2.1 ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ได้แก่ กลูโคเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.70) ชื่อที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้คือ *Streptococcus mitis* (Walker และ Pulkownik, 1973), *Streptococcus mutans* (Dewar และ Walker, 1975), *Thermomyces lanuginosus* (Jensen และ Olsen, 1996) และ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

- 2.2 ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโซมอลโทส ได้แก่ ไฮโซมอลโทเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.94) เชื้อที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ คือ *Achromobacter* sp. (Sawai และคณะ, 1974)
- 2.3 ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโซมอลโทไทรโอส ได้แก่ ไฮโซมอลโทไทรโอเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.95) เชื้อที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ คือ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

นอกจากนี้พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ทั้ง 2 กลุ่ม คือ *A. globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) ซึ่งสามารถสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular endodextranase) และสร้างเอกโซเดกซ์แทรนเนสสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ (intracellular exodextranase)

เดกซ์แทรนเนสกับการป้องกันฟันผุ

เดกซ์แทรนเนสถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันฟันผุ เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยสลายสายเดกซ์แทรนให้เล็กลง ช่วยลดความเหนียวหนืดและทำให้เดกซ์แทรนสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงยับยั้งการเกาะติดของจุลินทรีย์กับผิวฟันได้ (Schachtele และคณะ, 1975; Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนโดยไฮโซมอลโทเดกซ์แทรนเนสคือ ไฮโซมอลโทส ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิตกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำที่เป็นองค์ประกอบหลักของคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ (Ebisu และคณะ, 1974) นอกจากนี้ยังพบว่าการสังเคราะห์กลูแคนที่ไม่ละลายน้ำลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของเดกซ์แทรนเนส (Felgenhauer และ Trautner, 1983)

ในปี 1968 Fitzgerald และคณะ พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Penicillium funiculosum* สามารถยับยั้งการเกิดฟันผุได้ในหนูแฮมสเตอร์ เมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสลงในอาหารและน้ำดื่ม และพบว่าการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปทั้งในน้ำดื่มและอาหารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุมากกว่าการเติมลงในน้ำดื่มเพียงอย่างเดียว

ต่อมาในปี 1969 Block และคณะ ได้ศึกษาผลการใช้เดกซ์แทรนเนสป้องกันและรักษาการเกิดคราบจุลินทรีย์และฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ พบว่าหนูที่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบจุลินทรีย์ลดลงและไม่พบอาการฟันผุ ในขณะที่เดียวกันหนูที่ไม่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบจุลินทรีย์ในปริมาณมากและเกิดฟันผุมาก ในด้านการรักษาพบว่าเมื่อเลี้ยงหนูในอาหารที่มีซูโครสสูงเมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสลงในน้ำให้กิน พบว่าภายในสองวันคราบจุลินทรีย์ถูกขจัดออกไปหมด และมีอัตราการเกิดคราบจุลินทรีย์ใหม่ลดลง ต่อมาพบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรามีข้อเสียคือ ราคาส่งแพงจะมีส่วนของผนังเซลล์ที่ก่ออาการแพ้และบางชนิดยังสร้างอะฟลาทอกซิน ออกมาในภาวะที่มีการผลิต

เดกซ์แทรนเนส จึงได้เริ่มนำเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียมาใช้แทน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว (Leach, 1969) นอกจากนี้ยังมีการทดลองผสมเดกซ์แทรนเนสกับยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก พบว่าช่วยลดการเกิดคราบฟันได้แต่ต้องใช้ในความเข้มข้นสูง (Caldwell และคณะ, 1971; Keyes และคณะ, 1971; Murayama และคณะ, 1973)

แม้จะมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้หลายชนิดก็ตาม แต่เอนไซม์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ขจัดคราบจุลินทรีย์และป้องกันฟันผุนั้นควรทำงานได้ดีที่ภาวะภายในช่องปากของมนุษย์ เช่น เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 ซึ่งมีความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมกับการทำงานที่ 5.5-7.5 และเสถียรที่ 37°C (Okushima และคณะ, 1991)

การปรับปรุงสายพันธุ์

จุลินทรีย์ที่แยกได้ตามธรรมชาติโดยเฉพาะแบคทีเรีย นั้น ตามปกติจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการในปริมาณที่ต่ำ แบคทีเรียที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสก็เช่นเดียวกัน ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจำเป็นจะต้องเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพื่อให้เกิดผลผลิตสูงขึ้น โดยทั่วไปมักทำการคัดเลือกอาหารและภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีนี้จะถูกจำกัดด้วยความสามารถสูงสุดในการผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรม นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะในการผลิตแล้ว การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ก็เป็นสิ่งที่จำเป็น และมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกด้วย กล่าวคือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้หากมีลักษณะพันธุกรรมตามที่ต้องการก็จะทำให้กระบวนการผลิตและผลผลิตเป็นไปตามที่วางไว้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในธรรมชาติมักจะต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้บรรลุเป้าหมายดังกล่าว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้นแบ่งได้เป็น 3 วิธีการหลัก ดังนี้ (Baltz, 1986)

1. การกลายพันธุ์ (mutation) เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวก ใช้ความรู้ด้านพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงสายพันธุ์น้อย มีเทคนิคที่ง่ายและราคาไม่แพง ประสิทธิภาพของการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และความถูกต้องในการคัดเลือกเชื้อ แต่มักให้ผลแบบสุ่ม และต้องคัดเลือกเป็นจำนวนมาก เช่น การใช้รังสี UV (Russel, 1996) และ NTG (Mendell และ Greenberg, 1960) เหนียวนาให้เกิดการกลายพันธุ์
2. Genetic recombination เป็นวิธีที่ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทั้งทางพันธุกรรมและทางสรีรวิทยาของเชื้อ รวมถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่ทำการศึกษ เช่น การหลอมโพรโทพลาสต์ (protoplast fusion) การทรานสเฟอร์เมชัน คอนจูเกชัน และทรานสดักชัน (Vinci และ Byng, 1999)

3. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ดังที่ทราบกันมาแล้วว่าข้อมูลทางพันธุกรรมจะถูกเก็บอยู่บนลำดับเบสของยีน ข้อมูลเหล่านี้จะถูกถ่ายถอดไปยัง mRNA และถูกแปลรหัสออกมาเป็นสายพอลิเพปไทด์หรือที่เรียกว่าการสังเคราะห์โปรตีน ผลผลิตของยีนบางยีนมีความจำเป็นต่อเซลล์ในปริมาณมากและตลอดเวลาเพื่อให้เซลล์สามารถทำงานได้อย่างปกติ ยีนเหล่านี้จึงมีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลา (house keeping gene หรือ constitutive gene) และมียีนบางส่วนเท่านั้นที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกในระยะเวลาหนึ่งๆตามความจำเป็นของเซลล์ (inducible gene) ซึ่งการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะต้องมีการควบคุมเพื่อให้สิ่งมีชีวิตสามารถอยู่รอดได้ (สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2542) การนำเทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้สามารถปรับปรุงการแสดงออกของยีนที่ประมวผลรหัสให้สูงขึ้นได้ และเป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน ข้อจำกัดของพันธุวิศวกรรมนั้นคือ ต้องอาศัยความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้ออย่างลึกซึ้ง เทคนิคต่างๆมีความซับซ้อนและราคาแพง ตัวอย่างการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเช่น การโคลนยีน การเปลี่ยนแปลงโปรโมเตอร์ การลดหรือจำกัดเอนไซม์ที่มีส่วนในการขีดขวางผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เป็นต้น (Baltz, 1986)

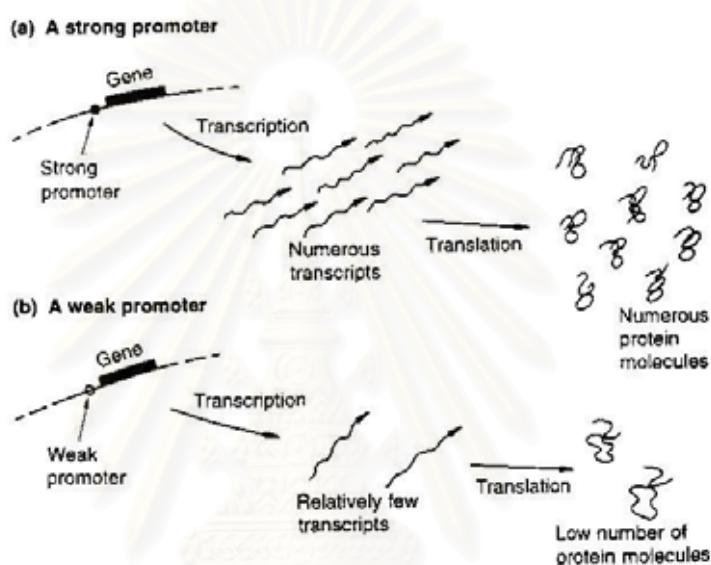
หลักการโดยย่อของพันธุวิศวกรรมคือ กระบวนการที่นำเอาโมเลกุลดีเอ็นเอมาตัดต่อและจัดการเพื่อให้ได้การเรียงตัวของเบสหรือยีนตามต้องการภายนอกเซลล์แล้วนำกลับเข้าไปในเซลล์ผู้รับที่ไม่ได้มียีนนี้โดยธรรมชาติ ผ่านระบบเวกเตอร์ เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มปริมาณของยีนนั้นๆ อันจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตจากยีนเมื่อมีการแสดงออกนั่นเอง ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนเพื่อประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด (Old และ Primrose, 1994; Brown, 1995) ได้แก่

- โปรโมเตอร์ (Promoter)

เป็นส่วนที่มีความสำคัญที่สุดของยีนเนื่องจากโปรโมเตอร์เป็นตำแหน่งที่อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสมาจับเพื่อเริ่มกระบวนการถอดรหัส ลักษณะโดยทั่วไปของโปรโมเตอร์จะประกอบไปด้วยลำดับคอนเซนซัส (consensus sequence) ในบริเวณ -35 และ -10 ซึ่ง ลำดับคอนเซนซัสจะมีลำดับเบสไม่แตกต่างกันมากนัก (เช่นเปลี่ยนจาก TTGACA เป็น TTTACA) ตัวอย่างลำดับเบสบริเวณ -35 และ -10 แสดงในรูปที่ 2.4 ระยะห่างระหว่าง บริเวณทั้งสองนี้ จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน โดยที่ถ้ามีระยะห่างกัน 17 คู่เบสจะทำให้เกิดการแสดงออกของยีนสูงสุด (Howley และ McClure, 1983)

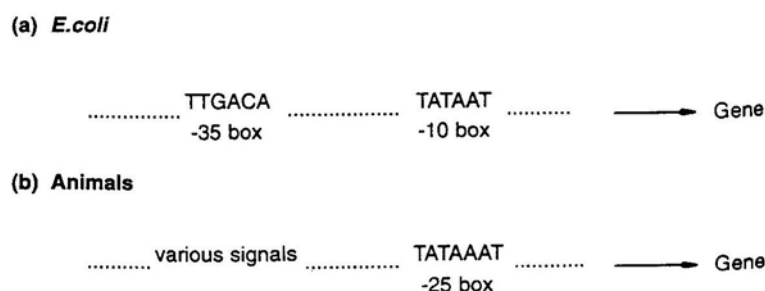
โปรโมเตอร์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ constitutive promoter ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนตลอดเวลา และ inducible promoter และ repressible promoter

โปรโมเตอร์อาจแบ่งได้เป็นในลักษณะของ strong promoter และ weak promoter อีกด้วย โดย strong promoter คือ โปรโมเตอร์ที่ทำให้เกิดอัตราการถอดรหัสสูง (high rate of transcription) และ weak promoter คือ โปรโมเตอร์ที่มีอัตราการถอดรหัสต่ำ ทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการในปริมาณน้อย ซึ่งในการเลือกใช้โปรโมเตอร์นั้นควรจะเลือกใช้โปรโมเตอร์ที่เป็น strong promoter เพื่อที่จะให้เกิดการถอดรหัสในระดับสูง (Russell และ Bennett, 1982; Makrides, 1996) ลักษณะการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย strong และ weak promoter แสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย strong และ weak promoter (Brown, 1995)

ถึงแม้ว่าโปรโมเตอร์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกันในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังเช่นตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรโมเตอร์ของ *E.coli* และของสัตว์ ที่แสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้ อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสของ *E.coli* นั้นไม่สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของสัตว์ได้ ส่งผลให้ยีนนั้นไม่สามารถแสดงออกใน *E.coli* ได้ วิธีการแก้ปัญหาคือ ต้องนำเอายีนที่ต้องการใส่ลงในเวกเตอร์ซึ่งสามารถทำให้เกิดการแสดงออกใน *E.coli* ได้ (Brown, 1995)



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรโมเตอร์ของ *E.coli* และของสัตว์ (Brown, 1995)

- ประสิทธิภาพในการถอดรหัส (transcription)

ในการถอดรหัสนั้นอาจเกิดปัญหาได้หลายอย่าง ประการแรกคือ การเกิดการถอดรหัสแล้วได้ mRNA ที่ยาวเกินความจำเป็น ประการที่สองคือ อาจมีโครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่ต้องการให้เกิด ปรากฏขึ้นมาได้ในระหว่างการถอดรหัส ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของการแปลรหัสลดลง และประการสุดท้ายคือ เกิดการถอดรหัสก่อนที่จะถึงโปรโมเตอร์และส่วนของโปรโมเตอร์นั้นถูกถอดรหัสไปด้วย ทำให้ไม่สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ วิธีที่จะทำการแก้ไขปัญหานี้สามารถทำได้โดยการใส่ transcriptional terminator ลงไป บริเวณปลาย 5' ของโปรโมเตอร์เพื่อป้องกันการเกิดการถอดรหัสผ่านโปรโมเตอร์ และการใส่ transcriptional terminator บริเวณปลาย 3' ของโคลนยีน เพื่อป้องกันการถอดรหัสที่ยาวเกินความจำเป็น โดย terminator นั้นจะทำให้เกิดการหยุดการถอดรหัส โดยทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ หรือ stem loop (Old และ Primrose, 1994; Brown, 1995)

- ประสิทธิภาพในการแปลรหัส (translation)

การแปลรหัสของแบคทีเรียมักขึ้นอยู่กับการจับกับ ribosome binding site (RBS) โดยปกติแล้วใน mRNA ของ *E.coli* RBS จะมีขนาดประมาณ 3-12 เบส และประกอบไปด้วยสององค์ประกอบคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 3-9 เบส ที่เรียกว่า ลำดับ Shine-Dalgarno หรือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ SD ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์นี้จะจับคู่กับปลายด้าน 3' ของ 16S rRNA ลำดับเบส SD นั้นจะมีลักษณะเป็น semi-conserved sequence โดยที่ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ SD จะมีผลต่อการควบคุมการแปลรหัส และอีกองค์ประกอบหนึ่งคือ โคดอนเริ่มแปลรหัส (initiation codon) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคดอนเริ่มแปลรหัสจะมีผลต่อการแปลรหัสเช่นกัน โดยพบว่าโคดอนเริ่มแปลรหัสที่พบโดยทั่วไป คือ AUG แต่ในบางครั้งอาจจะเป็นตัวอื่น เช่น

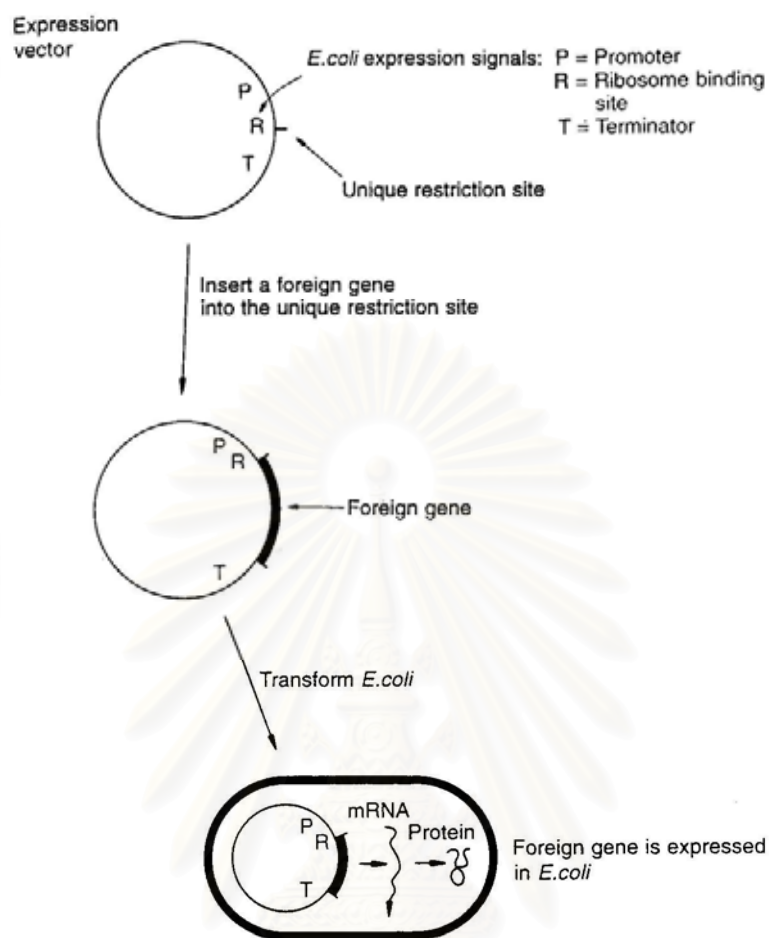
GUG และ UUG (Hui และคณะ, 1984) ในการสร้าง RBS ที่มีประสิทธิภาพนั้น อาจทำได้โดยการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขึ้นมา โดยที่ว่าจะต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมในการแปลรหัสของโปรตีนที่ต้องการ นอกจากนี้ RBS นั้นจะต้องอยู่ในบริเวณที่ใกล้กับโปรโมเตอร์จึงจะทำให้มีประสิทธิภาพในการแปลรหัสสูง (Old และ Primrose, 1994)

- โคดอน (codon)

เนื่องจากว่ากรดอะมิโนตัวหนึ่งๆ นั้นสามารถเกิดได้จาก triplet codon ที่มากกว่า 1 แบบ โดยในสิ่งมีชีวิตนั้นจะมีการเรียงตัวของโคดอนของกรดอะมิโนแต่ละตัวที่พบบ่อย แต่บางโคดอนก็จะพบได้น้อยมาก ลักษณะของโคดอนที่ใช้กันนั้นจะมีผลต่อการแปลรหัส ถ้าในยีนนั้นมีโคดอนที่พบได้ไม่บ่อย อาจทำให้ไม่สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการหรือโปรตีนที่ได้อาจมีลักษณะผิดปกติไป (Old และ Primrose, 1994; Bell, 2001)

- เวกเตอร์ (vector)

เวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนเข้าสู่แบคทีเรียจะใช้เป็นพลาสมิด จำนวนชุดของยีนนั้นจะมีผลต่อการถอดรหัส โดยทั่วไปเมื่อจำนวนชุดของยีนมากขึ้นก็จะส่งผลให้เกิดโปรตีนที่ต้องการได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยวิธีที่ง่ายที่สุดในการจะเพิ่มชุดของยีนนั้นสามารถทำได้โดยการใช้พลาสมิดที่มีจำนวนชุดสูง (high copy number) โดยเวกเตอร์ที่มีจำนวนชุดสูง ที่นิยมนำมาใช้คือ pBR322 นอกจากนี้พลาสมิดที่เลือกใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้าน ไมเช่นนั้นแล้ว เมื่อ พลาสมิดเข้าไปอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านแล้วอาจถูกทำลายโดยนิวคลีเอสในเซลล์เจ้าบ้านได้ และ พลาสมิดที่ใช้จะต้องไม่ผลิตสารพิษที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Old และ Primrose, 1994)



รูปที่ 2.8 แสดงถึงการใช้เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของ foreign gene (Brown, 1995)

- ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เจ้าบ้าน

ในการผลิตโปรตีนปริมาณสูง ในแบคทีเรียที่เรี่ยนั้นอาจทำให้เกิดการ folding ของโปรตีนที่ไม่ถูกต้อง เกิดโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ หรือที่เรียกว่าอินคลูชันบอดี้ (inclusion body) ซึ่งโปรตีนในลักษณะนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์ ได้ง่าย แต่มักจะไม่สามารถ folding กลับไปเป็นโครงสร้างที่ถูกต้องได้ ทำให้โปรตีนนั้นไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้เซลล์เจ้าบ้านยังอาจย่อยสลายโปรตีนที่ผลิตได้ วิธีแก้ไข ควรจะใช้เซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ที่ไม่มีแอกติวิตีของโปรตีเอส (Old และ Primrose, 1994; Brown, 1995; Bell, 2001)

- ความเสถียรของโปรตีน

ความเสถียรของโปรตีนที่ผลิตได้สามารถแบ่งตามตำแหน่งที่แสดงออก โดยแบ่งออกเป็นสามส่วนด้วยกัน คือ cytoplasmic protein, periplasmic protein และ extracellular protein ซึ่งแต่ละชนิดก็จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป โดย cytoplasmic protein นั้นจะได้โปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก มีโอกาสเกิดอินคลูชันบอดีสูง ทำให้โปรตีนไม่ถูกย่อยด้วยโปรตีเอสและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย แต่โปรตีนที่ได้จะไม่สามารถทำงานได้ periplasmic protein จะสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย มีการสลายโปรตีนน้อย บางครั้งอาจเกิดอินคลูชันบอดี และ extracellular protein จะไม่เกิดเป็นอินคลูชันบอดี และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า เนื่องจากชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์มีน้อย แต่ปริมาณโปรตีนนอกเซลล์จะค่อนข้างเจือจาง นอกจากนี้ยังเกิดการสลายโปรตีนน้อย (Brown, 1995; Pines และ Inouye, 1999; Bell, 2001)

การผลิตโปรตีนในแบคทีเรียในลักษณะของโปรตีนเชื่อม (fusion protein) ซึ่งจะมีส่วนของคู่เชื่อม (fusion partner) ติดอยู่กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดการย่อยช้าลง ช่วยในเรื่องเสถียรภาพของโปรตีน การละลายน้ำ การนำออกนอกเซลล์และช่วยในการติดตามการแสดงออกของโปรตีน ในกรณีที่โปรตีนนั้นๆ สังเกตเห็นการแสดงออกได้ยากสามารถใช้การศึกษาการแสดงออกของคู่เชื่อมแทน ก็จะสามารถทราบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เราต้องการได้ (Murrell และ Robert, 1989) นอกจากนี้คู่เชื่อมยังช่วยทำให้การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์เป็นไปได้ง่ายขึ้นอีกด้วย โดยใช้หลักการของโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ให้ส่วนของคู่เชื่อมนั้นจับกับคอลัมน์เพื่อ แยกโปรตีนที่ต้องการออกจากโปรตีนชนิดอื่น จากนั้นทำการตัดส่วนคู่เชื่อมทิ้งไป เพื่อแยกเอาเฉพาะโปรตีนที่ต้องการออกมา แต่บางครั้งการใช้คู่เชื่อมอาจทำให้เกิดปัญหาได้เนื่องจากคู่เชื่อมอาจเกิดการ folding ทำให้โปรตีนที่ต้องการไม่สามารถแสดงออกได้ (Brown, 1995)

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการโคลนยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนที่ต้องการในดีเอ็นเอเฉพาะที่มีโปรโมเตอร์เพื่อการแสดงออกเกิน แล้วทำให้เกิดการแสดงออกเกินขึ้นมานั้น ได้มีการวิจัยกันอย่างกว้างขวาง เช่น Miettinen และคณะ (1997) ได้ทำการโคลนยีน acid phosphatase จาก *Aspergillus niger* เพื่อทำให้เกิดการแสดงออกเกิน ใน *Trichoderma reesei* โดยใช้โปรโมเตอร์ cellobiohydrolase I (CBH1) ซึ่งสามารถนำเอนไซม์ที่ได้นี้ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม โดยพบว่าเมื่อใช้โปรโมเตอร์จากยีน *cry3A* ของ *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับโปรโมเตอร์จากยีน *amyQ* ของ *Bacillus amyloliquefaciens* ทำให้ *aprL* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสองเท่า (Widner และคณะ, 2000)

Omidinia และคณะ (2002) ได้โคลนยีน phenylalanine dehydrogenase (*pdh*) จาก *Bacillus sphaericus* ลงใน pUC19 และ pET16b เพื่อศึกษาการแสดงออกใน *E.coli* พบว่ามีการแสดงออกของยีนสูงขึ้น 140 เท่า Kuo และคณะ (2003) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการเพิ่มจำนวนยีน leucine aminopeptidase จาก *Bacillus stearothermophilus* มาโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pQE-32 ที่มีโปรโมเตอร์ T5 แล้วศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* พบว่ามีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น Madhusudan และ Nagaraja (2004) ได้โคลนยีน DNA gyrase จาก *Mycobacterium smegmatis* ลงใน *E. coli* โดยใช้โปรโมเตอร์ T7 เพื่อทำให้เกิดการแสดงออกเกิน เป็นต้น

ถึงแม้ว่าหลายการทดลองนิยมใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากสามารถทรานสฟอร์มได้ง่าย และมีระบบเวกเตอร์ที่มีการพัฒนา ทำให้เวกเตอร์มีคุณสมบัติหลากหลายให้เลือกใช้ อย่างไรก็ตามการใช้ *E. coli* เป็นเจ้าบ้านนั้นก็อาจเกิดปัญหาได้ เพราะ *E. coli* นั้น ไม่มีวิถีชีวเคมีบางอย่างที่จำเป็นในการแสดงออก เช่น การย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก (Old และ Primrose, 1994) และโดยทั่วไปจะไม่ใช้ *E. coli* ในอุตสาหกรรมการหมัก *Bacillus sp.* นั้น มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการหมักระดับใหญ่ การใช้ *Bacillus sp.* เป็นเซลล์เจ้าบ้านแทนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ มีข้อได้เปรียบคือ *Bacillus sp.* นั้นสามารถผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆซึ่งหลั่งออกมานอกเซลล์ (Priest, 1977) ทั้งยังมีความแตกต่างกันในสปีชีส์ค่อนข้างกว้าง การหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์นี้ ทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และนำไปใช้นอกจากนี้ *Bacillus sp.* แต่ละชนิดยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (Hardy, 1985) แต่ปัญหาของ *Bacillus sp.* คือ ความไม่เสถียรของ พลาสมิด (plasmid instability) และ *Bacillus sp.* มีแอกติวิตีของโปรติเอสสูง นอกจากนี้พลาสมิด เวกเตอร์ของ *Bacillus sp.* นั้น ยังไม่มีการพัฒนาเทียบเท่าใน *E. coli* strong promoter ที่มีประสิทธิภาพในการแสดงออกบน *E. coli* เช่น *trp tac* และ λ pL ไม่สามารถแสดงออกได้ดีใน *Bacillus sp.* การโคลนยีนที่ต้องการเข้าสู่ *Bacillus sp.* นั้นมีความยุ่งยากมากกว่าการโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* เนื่องจากโครงสร้างที่แตกต่างกันของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Winnacker, 1987)

มีเวกเตอร์หลายชนิดที่ถูกพัฒนาเพื่อการแสดงออกใน *Bacillus sp.* ในปี 1986 Hirata และคณะ พบว่าโปรโมเตอร์ *bgaB* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน β -galactosidase I จาก *Bacillus stearothermophilus* IAM11001 เป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถทำให้เกิดการแสดงออกเกินได้ และยังสามารถแสดงออกได้ดีใน *Bacillus subtilis* อีกด้วย (Hirata และคณะ, 1985) โดย Hirata และคณะ ได้โคลนยีนดีเอ็นเอบริเวณเหนือโคดอนเริ่มถอดรหัสของยีน β -galactosidase I ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *PstI* ขนาดต่างๆกันลงใน pPL703 ซึ่งเป็น promoter cloning vector ที่มียีนคลอแรมเฟนิคอลลอะเซทิลทรานสเฟอเรส (CAT86) เป็นยีน

รายงาน (reporter gene) (Duvall และคณะ, 1983; Monkolsuk และคณะ, 1984) พบว่า พลาสมิด pTF6 ที่ได้ ซึ่งมีขึ้นดีเอ็นเอจากบริเวณเหนือโคดอนเริ่มถอดรหัสของ β -galactosidase I ขนาด 107 คู่เบส ให้แอกติวิตีของ CAT86 สูงที่สุด และเฉพาะขึ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนเหลื่อมกับ 107 คู่เบสของ pTF6 เท่านั้นที่พบแอกติวิตีของ CAT86 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า pTF6 นั้น ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ *bgaB* และ pTF6 นั้นสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของยีนอื่น นอกเหนือจาก β -galactosidase I ได้อีกด้วย ในปี 2000 Panbangred และคณะ ได้ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน penicillin G acylase (*pac*) จาก *Bacillus megaterium* สาย พันธุ์ UN-1 ใน Bm-UNcat และ *Bacillus subtilis* โดยใช้ pTF6 พบว่ามีการแสดงออกของ *pac* เพิ่มขึ้น 20 เท่า

การศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนส

ในปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาและทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย ชนิดต่างๆ แล้วเป็นจำนวนมากทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci ที่อาศัยในช่องปาก เช่น *S. rattus* (Igarashi และคณะ, 2004) และแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน เช่น *Paenibacillus* sp. (Finnegan และคณะ, 2005) เป็นต้น

Okushima และคณะ (1991) ได้โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สาย พันธุ์ CB-8 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* โดยใช้ pUC19 เป็นเวกเตอร์ ทำการคัดเลือกโคลนใน อาหารที่ผสมบลูเดกซ์แทรน เมื่อศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสมีการ แสดงออกสูงสุดในส่วนเพอริพลาซึม และพบแอกติวิตีเป็นส่วนน้อยในไซโทพลาซึม และในน้ำเลี้ยง เชื้อ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสมีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1920 คู่เบส ที่แปลรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 640 หมู่ พบบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายลำดับ Shine-Dalgarno อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นคือ GAGGAA และเมื่อทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับ กรดอะมิโนทางด้านปลาย N พบว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 มี ส่วนที่เป็นเพพไทด์สัญญาณประกอบด้วยกรดอะมิโน 49 หมู่ ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสที่สมบูรณ์จะมี กรดอะมิโน 591 หมู่ และมีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดัลตัน

Kubo และคณะ (1993) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 ใน *S. gordonii* โดยการเชื่อมโปรโมเตอร์และเพพไทด์สัญญาณของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (*gtfI*) ของ *S. downei* เข้ากับยีนเดกซ์แทรนเนสจากสายพันธุ์ CB-8 และตาม ด้วย *rnnBt₂* terminator ของ *E. coli* และใช้พลาสมิดลูกผสม pVA838 เป็นเวกเตอร์ เมื่อนำ

โคลนที่ได้เลี้ยงในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคฟันผุคือ *S. sobrinus* พบว่าสามารถลดการเกาะติดของกลูแคนที่ *S. sobrinus* สร้างขึ้นได้

Wanda และ Curtiss (1994) ได้ศึกษาการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *S. sobrinus* ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pYA902 (Barrett และคณะ, 1987) โดยทรานสฟอร์มลงใน *E. coli* X2831 พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้อยู่ในส่วนเพอริพลาซึม ซึ่งมีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม รวมทั้ง isoelectric point ใกล้เคียงกับ *S. sobrinus* และลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของเพพไทด์สัญญาณซึ่งมีกรดอะมิโน 30 หมู่หายไป เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย C เป็น serine และ threonine rich

Iwai และคณะ (1994) ได้โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T6 โดยใช้พลาจ λEMBL3 เป็นเวกเตอร์และใช้ *E. coli* สายพันธุ์ NM539 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบโคลนที่ต้องการซึ่งมีขึ้นดีเอ็นเอ *Pst*I ขนาด 3.5 กิโลเบส จากนั้นทำการหาแผนที่เรสทริกชัน และซับโคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาด 2.2 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUC119 เมื่อทำการวิเคราะห์โคลนนี้พบว่าบริเวณเพอริพลาซึมมีแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสูงสุด 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคือส่วนไซโทพลาซึม 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถแสดงออกได้ในภาวะไม่มี IPTG แสดงว่ายีนที่โคลนได้มีโปรโมเตอร์เป็นของตัวเองซึ่งสอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,926 คู่เบส และพบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์ลำดับ Shine-Dalgarno และสามารถวิเคราะห์ได้ว่ากรอบอ่านรหัสเปิดสร้างเพพไทด์สัญญาณที่มีกรดอะมิโน 39 หมู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N ด้วย

Igarashi และคณะ (1995) ได้ศึกษายีนเดกซ์แทรนเนสของ *S. mutans* โดยโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* DH5α และใช้ charomid 9-36 เป็นเวกเตอร์ ใช้อาหารที่มีบิลูเดกซ์แทรน 2000 ในการคัดเลือกโคลน โดยโคลนที่ได้มีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 8 กิโลเบส นำพลาสมิดจากโคลนที่ได้มาสร้างแผนที่เรสทริกชันของขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังกล่าวแล้วซับโคลนเฉพาะบริเวณที่ทำหน้าที่สร้างเดกซ์แทรนเนสเข้าพลาสมิด pUC18 และ pUC19 พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสสามารถแสดงออกได้ในพลาสมิดทั้งสองชนิด และ IPTG ไม่มีผลต่อการแสดงออกแต่อย่างใด แสดงว่ายีนที่โคลนได้มีโปรโมเตอร์ติดมาด้วย และสามารถแสดงออกได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ *E. coli* DH5α เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 2550 คู่เบสมีรหัสเริ่มต้นคือ ATG และรหัสหยุดคือ TGA บริเวณจับเกาะของไรโบโซมอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้น 2 คู่เบส คือ GAGG บริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์คือ -10 และ -35 อยู่ห่างกัน 21 คู่เบส คือ GATGAT และ TTTACA หลังรหัสหยุดพบบริเวณ inverted repeat จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากกรอบอ่านรหัสเปิดพบว่ามีกรดอะมิโน 850 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดัลตัน การเปรียบเทียบความเหมือนของ

โปรตีน DexA กับเดกซ์แทรนเนสและเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ชนิดอื่นของ *Streptococci* ในช่องปาก มีความเหมือนในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับ เดกซ์แทรนเนสของ *S. sobrinus* สายพันธุ์ UAB เท่ากับ 57.8 และ 47.0% ตามลำดับแต่ไม่พบ ความเหมือนใดๆกับเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 ทั้งลำดับกรดอะมิโน และลำดับนิวคลีโอไทด์

Oguma และคณะ (1999) ใช้เทคนิค shot-gun cloning ในการโคลนยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนส (*dex*) จาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 โดยใช้พลาสมิด pUC118 และใช้ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เป็นเซลล์เจ้าบ้าน คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ก่อให้เกิดวงใส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งบลูเดกซ์แทรน ได้โคลน 8 ชนิด ซึ่งมีขึ้นดีเอ็นเอขนาด 3-5 กิโลเบส สามารถแบ่งยีน *dex* ออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของแผนที่เรสทริกชัน คือ *dex1* และ *dex2* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *dex1* และ *dex2* (DXase1 และ DXase2) กับเอนโดเดกซ์แทรนเนส (DXase) ของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) พบว่ามีความเหมือน 93 % และ 65% ตามลำดับ ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้นี้มีแอกติวิตีของกลูโคเดกซ์แทรนเนส ต่ำกว่าแอกติวิตีใน *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 และมีแอกติวิตีเพียง 40mU/ml นอกจากนี้ยังไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกได้ด้วย IPTG แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนไม่ได้อยู่ใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *lacZ*

Igarashi และคณะ (2001) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเดกซ์แทรนเนส จาก *Streptococcus downei* พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 3891 คู่เบส มีกรดอะมิโน 1297 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 139.7 กิโลดัลตัน และ isoelectric point 4.49 ลำดับอนุกรมเหมือนกับ เดกซ์แทรนเนสจาก *S. mutans*, *S. salivarius* และ *S. sobrinus* นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอ ติดตาม *dex* สำหรับ *S. downei* นั้นสามารถไฮบริดซ์กับโครมอซอมอลดีเอ็นเอของ *S. sobrinus* ได้ และได้ศึกษาการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสใน *E. coli* โดยใช้เวกเตอร์ pT7blue พบว่าเกิด บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีบลูเดกซ์แทรนและ IPTG

Hatada และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* T6 โดยใช้ *Bacillus subtilis* ที่ไม่มีโปรตีนเอสแอกติวิตีเป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าเอนไซม์ ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนั้นมีน้ำหนัก 65.5 กิโลดัลตัน มีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม คือ 60°C และ 3.5 ตามลำดับ

Igarashi และคณะ (2004) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเดกซ์แทรนเนส จาก *Streptococcus rattus* ATCC 19645 พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 2760 คู่เบส มีกรดอะมิโน 920 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100.1 กิโลดัลตัน โดยรีคอมบิแนนท์เซลล์ใน *E. coli* นั้นมี

แอสดีคตีวดีของเดคค์แทรนเนสซึ่งมีซึ่งมีอุนหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม รวมนั้ง isoelectric point ไกล้เคียงกับ *S. sobrinus* และ *S. mutans*

Finnegan และคณะ (2005) คึ่กษายีนเดคค์แทรนเนสจาก *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ Dex40-8 และ Dex50-2. ซึ่งคัดแยกจากดิน ในสายพันธุ์ Dex40-8 นั้งพบเฉพาะยีน *dex1* ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 716 หมู่ และมีน้ำหนั้โมเลกุล 80.8 กิโลดัลตัน ในสายพันธุ์ Dex50-2 พบนั้งยีน *dex1* และ *dex2* ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 905 และ 596 หมู่ และมีน้ำหนั้โมเลกุล 100.1 กิโลดัลตันและ 68.3 กิโลดัลตันตามลำดับ ยีน *dex2* ในสายพันธุ์ Dex50-2 นั้งมีความเหมือนในระดับลำดับกรดอะมิโนกับ thermotolerant dextranases ของ thermophilic *Paenibacillus* sp. และพบว่ายีนนั้งสามตัวสามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* โดยทำให้เกิดบริเวณไลบโนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งที่มีบลูเดคค์แทรน โดยเดคค์แทรนเนสที่พบนั้งมีคุณสมบัติเป็นเอนโดเดคค์แทรนเนส

ในปี 2540 ณัฐินี สุวรรณสิงห์ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่สามารถสร้างเดคค์แทรนเนสจากดินในจังหวัดนนทบุรี เมื่อคึ่กษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าสามารถผลิตเดคค์แทรนเนสที่มีแอสดีคตีวดี 4.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ทำการปรับปรุงแล้วโดยณัฐินี สุวรรณสิงห์ โดยค่าความเป็นกรด-เบสและอุนหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คึ่คือ 6.5 และ 40°C ตามลำดับ และมีความเสถียรที่ความเป็นกรด-ด่างและอุนหภูมิ 4.0-7.0 และ 30-37°C ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ได้ถูกจัดจำแนกเป็น *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA โดย Chareonpornwattana และคณะ (2001) ต่อมาได้มีการทดลองปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเดคค์แทรนเนส *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยใช้หลักการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าสามารถผลิตเดคค์แทรนเนสเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า และมีแอสดีคตีวดีเท่ากับ 6.276 หน่วยต่อมิลลิลิตร (สุทธยา จิระนันท์พิพร, 2543) และได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดคค์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp.สายพันธุ์ AG-2 พบว่ายีนมีขนาด 1,899 คู่เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 633 หมู่ ขนาดประมาณ 70.3 กิโลดัลตัน และพบบริเวณจับเกาะของไรโบโซมและ inverted repeat นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเหมือนกับเอนโดเดคค์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044, เดคค์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 และไฮโซมอลโทโทรโอเดคค์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 83%, 82% และ 79% ตามลำดับ (สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ, 2546)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
 - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
 - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขย่าเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C ของบริษัท Forma Scientific, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
 - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
 - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.

15. ไมโครปิเปต (micropipette) ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTM Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
18. กระจกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
19. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
20. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
21. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
22. Gene pulser II Electroporation system ของบริษัท Bio-Rad, USA.
23. Gel documentation ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตเนน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. พอลิเปปโตเนน (polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan.
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
6. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
8. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
9. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
10. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
11. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.
12. KH_2PO_4 ของบริษัท E Merck, Germany.
13. แมนนิทอลของ บริษัท Difco Laboratories, USA.
14. 2-โพรพานอลของ บริษัท E Merck, Germany.
15. ไลโซไซม์ ของบริษัท Sigma, USA.
16. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ของบริษัท Sigma, USA.

17. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
18. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
19. K_2HPO_4 ของบริษัท E Merck, Germany.
20. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ของบริษัท E Merck, Germany.
21. HEPES ของบริษัท Sigma, USA.
22. PEG6000 (Polyethyleneglycol6000) ของบริษัท Fluka chemika, Switzerland.
23. สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
24. เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI , *Eco*RI ของบริษัท Promega, USA.
25. เรสทริกชันเอนไซม์ *Alw*21I , *Pst*I ของบริษัท Fermentas, USA.
26. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
27. KOD DNA polymerase ของบริษัท TOYOBO, Japan.
28. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท TOYOBO, Japan.
29. T4-ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) ของบริษัท Promega, USA.
30. แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
31. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
32. เดกซ์แทรน (industrial grade) ของบริษัท Sigma, USA.
33. บลูเดกซ์แทรน (blue dextran) ของบริษัท Sigma, USA.
34. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
35. IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
36. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
37. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนม/พินโทป	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherchia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	ϕ 80dlacZ Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> (pSUDEX)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX	สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ, 2546
<i>Bacillus subtilis</i> MI111	<i>arg-15leuA8</i> r _M ⁻ Amy ⁺	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด*
<i>Bacillus subtilis</i> MI111 low protease	<i>arg-15leuA8</i> r _M ⁻ Amy ⁺ , low protease activity	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด*
<i>Bacillus subtilis</i> MI113	<i>arg-15 trpC2</i> r _M ⁻ m _M ⁻ Amy ⁺	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด*
<i>E. coli</i> (pGEMTF)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMTF	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> (pBUNDEX)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBUNDEX	สร้างในการทดลองนี้
<i>Arthrobacter sp.</i> สายพันธุ์ AG-2	สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรน	ณัฐณี สุวรรณสิงห์, 2540

* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟิโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pGEM-7Zf(+)	Ap ^r , α lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pTF6	Km ^r , Cm ^r	Hirata, 1986
pGEMTF	Ap ^r , Km ^r , Cm ^r	สร้างในการทดลองนี้
pBUNDEX	Ap ^r , Km ^r	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
BUN+F	5'-AGTGTGCACCGAGAGGAACTATCATGCCCG-3' (70 ^o ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
BUN+R	5'-ACAGTGCACCTCGATGCCAATGAGATGGCTG-3' (71 ^o ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
PROBUNF	5'-ATATTGTTGTTGACAAATAC-3' (47.2 ^o ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37^oซ กรณีสที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข) ใช้แอมพิซิลลิน (Am) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 16-18 ชั่วโมง

3.5.2 เลี้ยง *Bacillus subtilis* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37^oซ กรณีสที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข) ใช้กานามัยซิน (Km) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 16-18 ชั่วโมง

3.5.3 เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) เมื่อต้องการกระตุ้นการสร้างเดกซ์แทรนเนสหรือเพื่อการเก็บรักษาเชื้อ โดยเลี้ยงนาน 2-3 วัน และเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารแข็ง LB เมื่อต้องการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงนาน 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30^oซ

3.5.4 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli*, *B. subtilis* ทุกสายพันธุ์ และ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 ถึง 3.5.3 ตามลำดับนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3:7 โดยปริมาตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -70^oซ

3.6 เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.6.1 สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ 5 มิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37^oซ นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิพพ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์นาน 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข) 100 ไมโครลิตร

กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข) ที่เตรียมใหม่ๆ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทานอล 95 % ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนของเอทานอล 95 % ที่ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนนาน 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ในกรณีที่ต้องการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Bacillus subtilis* หลังจากเติมสารละลาย I แล้วให้ทำการเติมไลโซไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย II (วัฒนธรรม ปานบ้านเกร็ด, 2536)

3.6.2 สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3)

สกัดพลาสมิดตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *B. subtilis* หรือ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการและปั่นเก็บเซลล์ตามวิธีในข้อที่ 3.6.1 แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งของผสมเริ่มเหนียวและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติบบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติบบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพเจ็ทใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 50-100

ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสติกอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสติกที่ อุณหภูมิ -20°C

3.6.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

3.7 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สำหรับการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ไพรเมอร์ BUN+F และ BUN+R ได้ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 (สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ, 2545) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.3

ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมีความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละส่วนประกอบเป็นดังนี้ สารละลาย MgCl_2 ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด) สารละลายไพรเมอร์ BUN+F และ BUN+R ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ 1X *KOD* polymerase *KOD* DNA polymerase (Toyobo, Japan) ปริมาณ 2.5 หน่วย ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม โดยภาวะที่ใช้ในปฏิกริยาเป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 98°C	นาน 1 นาที	} 25 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 98°C	นาน 15 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 68°C	นาน 2 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	นาน 30 วินาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	นาน 10 นาที	

ดำเนินปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) (Perkin Elmer, USA)

3.8 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.8.1 ตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ โดยใช้บัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเรสทริกชันเอนไซม์ตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.8.2 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยมีวิธีการดังนี้คือ ผสมพลาสมิดปริมาณที่เหมาะสมกับสัติดตาม (Promega, USA) หยอดสารละลายลงในช่องและใช้ 1 kb DNA ladder (Promega, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งเจลประกอบไปด้วย อะกาโรสเจล 0.7% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสด้วยชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT หรือชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 50-100 โวลต์ ที่วิ่งจนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Biorad, USA)

3.8.3 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ตามขนาด ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV-light Transilluminator ตัดเจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดและนำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครพิพพ์ แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรส QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50^o นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลที่อุณหภูมิ 50^o ปริมาณ 1 เท่าของชิ้นอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง

เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคออลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคออลัมน์ ย้ายคออลัมน์มายังหลอดไมโครพีพิจใหม่ เติมน้ำปลอด ประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไป ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซินดีเอ็นเอจะอยู่ ในส่วนน้ำใส เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.8.4 เชื่อมต่อซินดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

เชื่อมต่อซินดีเอ็นเอและพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่ที่เหมาะสม โดยใช้ T4-ดีเอ็นเอไลเกส (Promega, USA) อัตราส่วนโมลาร์ของซินดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ที่ใช้ในการ เชื่อมต่อโดยทั่วไปคือ 5:1 หรือ 3:1 ปริมาณสูงสุดท้ายของสารผสมปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดลอง นี้ให้เป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ นำของผสมซินดีเอ็นเอ พลาสมิดเวกเตอร์และน้ำไปให้ความร้อนที่ 65°C นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ และ ทีโพรดีเอ็น เอไลเกส บ่มของผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16°C นานข้ามคืนก่อนที่จะนำไป ทรานสฟอร์มเข้าสู่ เซลล์เจ้าบ้าน

3.9 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

3.9.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *E. coli*

เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหาร เลี้ยงเชื้อเหลว 2YT 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน armed flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.3-0.5 ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้ทำการเตรียมสารละลาย $\text{MgSO}_4/\text{CaCl}_2$ (เตรียมก่อนใช้และสารละลายทุกชนิดที่ใช้เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ต้องแช่ในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็น 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย CaCl_2 1 โมลาร์ ที่ปลอด เชื้อและเย็น 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง ให้ได้อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเติมสารละลาย MgSO_4 1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อและเย็น 1 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้

เมื่อได้ค่า OD₆₀₀ ตามที่ต้องการแล้วให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ 35 มิลลิลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4^oซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4^oซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย MgSO₄/CaCl₂ ที่เย็น 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO₄/CaCl₂ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย MgSO₄/CaCl₂ ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30-45 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4^oซ ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย MgSO₄/CaCl₂ ที่เย็น 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO₄/CaCl₂ แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 45 นาที ขึ้นไป แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 875 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันเบาๆ สุดท้ายทำการแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นประมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บคอมพีเทนท์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70^oซ

3.9.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

ทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4^oซ ยกเว้นช่วงทำ heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70^oซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้ใส่รีคอมบีแนนท์พลาสมิดลงในคอมพีเทนท์เซลล์ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42^oซ นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^oซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย 50 ไมโครลิตร ของ X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ 7 ไมโครลิตร ของ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) (ทำการเตรียมเกลี่ยสารดังกล่าวก่อนใช้ทุกครั้ง) บ่มที่อุณหภูมิ 37^oซ นานข้ามคืน

3.10 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *B. subtilis*

3.10.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *B. subtilis*

เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (สุชาติ บันจัยสิทธิ์, 2538) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *B. subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 100 ไมโครลิตรลงใน LB broth 100 มิลลิิตร ที่บรรจุใน armed flask ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วปั่นล้างเซลล์ด้วย 1mM HEPES buffer pH 7.0 10 มิลลิิตร (ภาคผนวก ข) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลาย PM 10 มิลลิิตร (ภาคผนวก ข) ค่อยๆเทสารละลาย PM ทิ้งและกระจายเซลล์ในสารละลาย PM ประมาณ 200 มิลลิิตร ที่เหลืออยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เซลล์นี้สามารถนำไปใช้ได้ทันที หรือเก็บไว้ที่ -70°C จนกว่าจะใช้

3.10.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *B. subtilis*

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *B. subtilis* (สุชาติ บันจัยสิทธิ์, 2536) โดยใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) ดังนี้ ผสมคอมพีเทนท์เซลล์ 100 ไมโครลิตรกับดีเอ็นเอ 20 ไมโครกรัมในหลอด Eppendorf ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติม PEG 6000 40% ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเซลล์ที่ผสมพลาสมิดและ PEG ปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงในคิวเวตต์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้วประมาณ 0.2 ซม. ระวังอย่าให้เกิดฟอง ปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านเซลล์ 1 ครั้ง โดยปรับเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ 2400 โวลต์ (12 – 16 กิโลโวลต์ต่อชั่วโมง) ความต้านทาน 4 กิโลโห์ม (เวลาที่ใช้ในการปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 5/1000 วินาที) ดูดเซลล์จากคิวเวตต์มากระจายใน LB broth 1 มิลลิิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิิตรและบลูเดกซ์แทรน 0.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

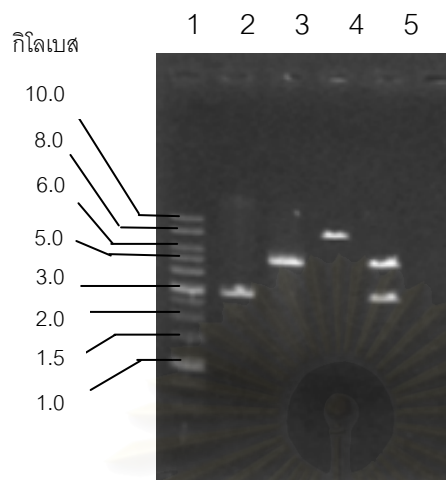
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสร้างชุดเทิลเวกเตอร์เพื่อใช้สำหรับการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนส

การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์และทรานสฟอร์มโดยตรงเข้าใน *Bacillus* sp. นั้นทำได้ยากเนื่องจากลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีชั้นเพปทิโดไกลแคนหนา ทำให้การส่งผ่านสารต่างๆ รวมทั้งโมเลกุลดีเอ็นเอนั้นทำได้ลำบาก จึงทำการสร้างเวกเตอร์ที่มีลักษณะเป็นชุดเทิลเวกเตอร์ (shuttle vector) เสียก่อน เพื่อทำการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าแล้วทรานสฟอร์มสู่ *E. coli* ก่อน จากนั้นจึงค่อยทำการเพิ่มปริมาณโดยการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก *E. coli* เพื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Bacillus* sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป โดยทำการสร้างชุดเทิลเวกเตอร์จากพลาสมิด pGEM-7Zf(+) ที่สามารถถ่ายแบบได้ใน *E. coli* และพลาสมิด pTF6 ที่สามารถถ่ายแบบได้ใน *Bacillus* sp. ตัดพลาสมิดทั้งสองชนิดด้วยเอนไซม์รีstriction EcoRI แล้วเชื่อมด้วยทีไพร์ดีเอ็นเอไลเกส จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าใน *E. coli* DH5 α ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้โดยการใช้เทคนิค blue-white colony selection ตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนต์ที่มีพลาสมิดขนาดประมาณ 8 กิโลเบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์รีstriction PstI (ช่องที่4) และเมื่อตัดด้วย EcoRI แล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอสองชิ้นซึ่งจะมีขนาดประมาณ 5 และ 3 กิโลเบสตามลำดับ (ช่องที่5) ชุดเทิลเวกเตอร์ที่ได้ใช้ชื่อว่า "pGEMTF" ดังแสดงในรูปที่

4.1.1

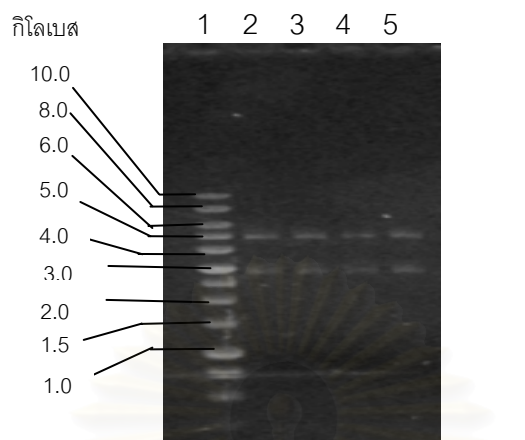


รูปที่ 4.1.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชุดเทิลเวกเตอร์ pGEMTF ที่สร้างได้

ช่องที่ 1	1 kb DNA ladder
ช่องที่ 2	พลาสมิด pGEM-7Zf(+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>
ช่องที่ 3	พลาสมิด pTF6 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>
ช่องที่ 4	ชุดเทิลเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i>
ช่องที่ 5	ชุดเทิลเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>

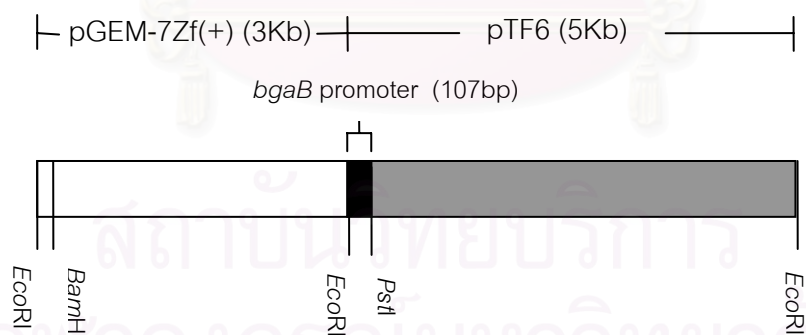
เมื่อได้ชุดเทิลเวกเตอร์ที่ต้องการแล้ว ทำการตรวจสอบทิศทางของพลาสมิด โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *PstI* จากรูปที่ 4.1.2 พบว่าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5 และ 3 กิโลเบส (ช่องที่ 2-5) จากชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏนี้ทำให้สามารถทราบทิศทางการเชื่อมกันของพลาสมิดทั้งสองชิ้นได้ดังรูปที่ 4.1.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของ pGEMTF ที่ถูกตัดด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I

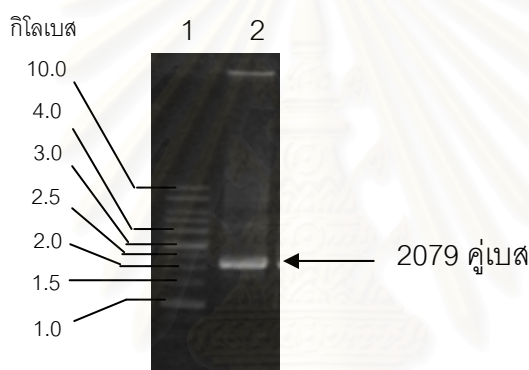
- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder
 ช่องที่ 2-5 ชุดเทิลเวกเตอร์ pGEMTF1-4 จากทรานสฟอร์มแมนต์ 1,2,3 และ 4
 ตามลำดับ ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I



รูปที่ 4.1.3 แผนที่แสดงทิศทางการเชื่อมต่อกันของ pGEM-7Zf(+) และ pTF6 ในชุดเทิล
เวกเตอร์ที่สร้างได้

4.2 การเพิ่มจำนวนส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มจำนวนส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพรมเมอร์ที่ใช้ใน ปฏิกิริยาคือ BUN+F และ BUN+R (ตารางที่ 3.2) ซึ่งออกแบบให้ครอบคลุมตั้งแต่ลำดับ Shine-Dalgarno จนถึง Terminator ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 (ภาคผนวก ค.) อีกทั้งยังออกแบบให้ปลายของคู่ไพรมเมอร์นั้นมีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *A*w21I และใช้ KOD เป็นเอนไซม์พอลิเมอเรส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 2079 คู่เบสตามความต้องการ ผลของการเพิ่มจำนวนยีนนั้นแสดงไว้ในรูปที่ 4.2

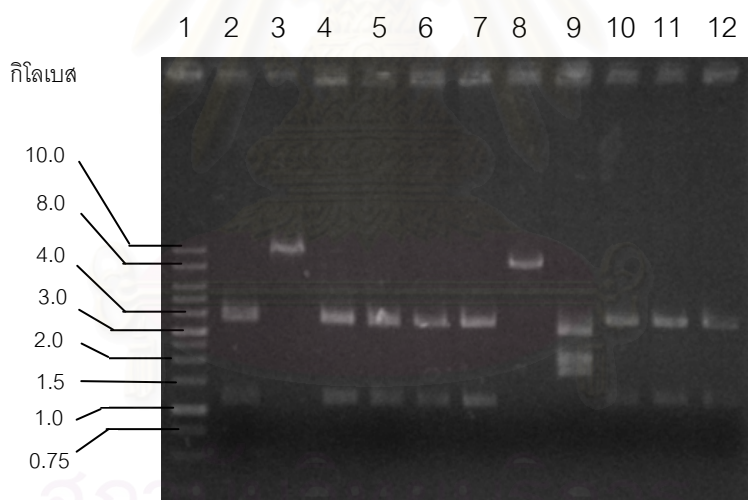


รูปที่ 4.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder
 ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

4.3 โคลนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เข้าไปใน pGEM-7Zf(+)

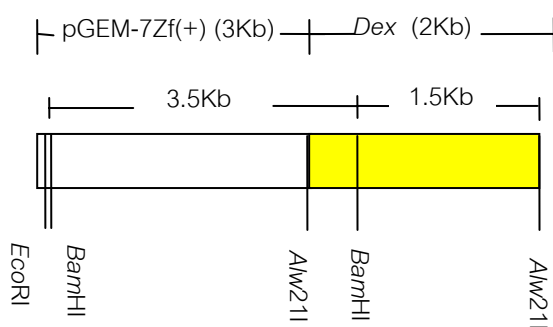
โคลนผลิตภัณฑ์ PCR จากการทดลองที่ 4.2 เข้าใน pGEM-7Zf(+) โดยตัดพลาสมิดด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI* เชื่อมพลาสมิดที่ตัดแล้วกับผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส โดยใช้ที่ไพรอดีเอ็นเอไลเกส จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* DH5 α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้โดยใช้ blue-white colony selection โดยที่ขนาดพลาสมิดที่ต้องการคือประมาณ 5 กิโลเบส ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอสองชิ้นซึ่งจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับทิศทางการเชื่อมของดีเอ็นเอ โดยจะมีขนาดประมาณ 3.5 กับ 1.5 กิโลเบสและขนาดประมาณ 4.5 กับ 0.5 กิโลเบสตามลำดับ จากการตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้นั้นพบขนาดและทิศทางที่ถูกต้องเพียงรูปแบบเดียว คือ ขนาดประมาณ 3.5 กับ 1.5 กิโลเบสตามลำดับ (ช่องที่ 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12) ตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้นี้ว่า "pGEMDEX" ดังแสดงในรูป 4.3.1 และแผนที่แสดงลักษณะของ pGEMDEX นั้นแสดงในรูปที่ 4.3.2



รูปที่ 4.3.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องที่ 2-12 ทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*



รูปที่ 4.3.2 แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pGEMDEX

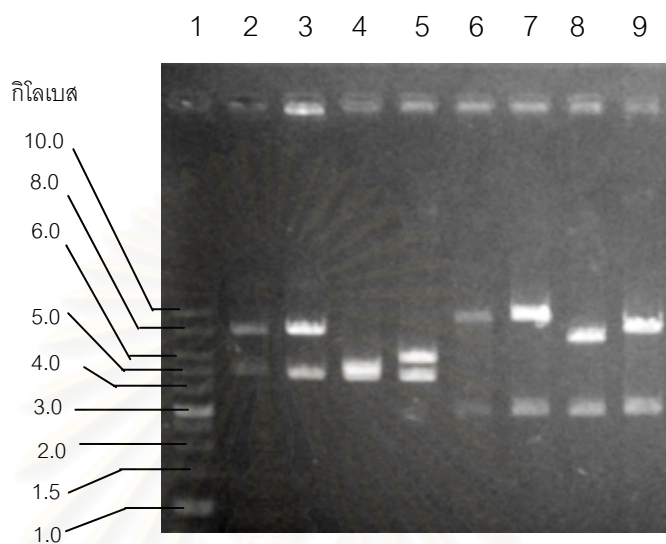
4.4 โคลนส่วนที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสเข้าในชุดเทิลเวกเตอร์

เนื่องจากเอนไซม์ *Awa211* และ *PstI* เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณปลายยื่นที่เป็นคู่สมกัน จึงทำการตัดพลาสมิด pGEMDEX ที่ได้จากข้อ 4.3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Awa211* นำไปทำอเล็กโทรพอเรซิส จากนั้นแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบสออกจากอะกาโรสเจล จากนั้นนำมาเชื่อมกับชุดเทิลเวกเตอร์ pGEMTF ที่ตัดไว้ก่อนด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI* โดยใช้เอนไซม์ทีโพรดีเอ็นเอไลเกส จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าใน *E. coli* DH5 α และทำการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการตัดพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอสองชิ้นขนาดประมาณ 5.5 และ 4.5 กิโลเบสตามลำดับ (ช่องที่5) และเมื่อตัดด้วย *EcoRI* แล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอสองชิ้นซึ่งจะมีขนาดประมาณ 7 และ 3 กิโลเบสตามลำดับ (ช่องที่9) ดังแสดงในรูปที่ 4.4.1 และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า “pBUNDEX”

จากนั้นทำการตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้ว่ามีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสและโปรโมเตอร์ของยีน *bgaB* ครบสมบูรณ์หรือไม่ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ PROBUN+F และ BUN+R (ตารางที่ 3.2) ซึ่งออกแบบให้จำเพาะกับส่วนของ โปรโมเตอร์ *bgaB* จาก pTF6 จนถึง Terminator ของยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 และใช้ KOD เป็นเอนไซม์พอลิเมอเรส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 2200 คู่เบส ผลของการเพิ่มจำนวนยีนนั้นแสดงให้เห็นในรูปที่ 4.4.2

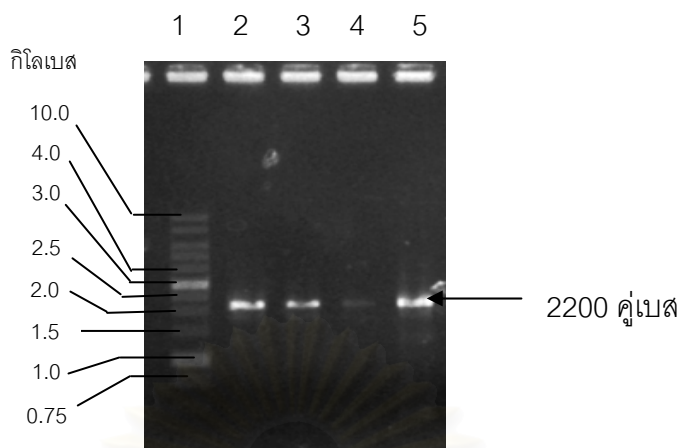
จากผลการทดลองในข้อ 4.4 นี้ พบว่า pBUNDEX นั้นมีขนาดและจุดตัดเอนไซม์ตรงตามที่ต้องการ และมีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสรวมทั้งโปรโมเตอร์ *bgaB* ครบถ้วน ดังนั้นจึงใช้

พลาสมิดนี้เป็นพลาสมิดที่จะทรานสฟอร์มเข้าใน *Bacillus* sp. ในการทดลองข้อ 4.5 ต่อไป โดยลักษณะของ pBUNDEX นั้นแสดงในรูปที่ 4.4.3



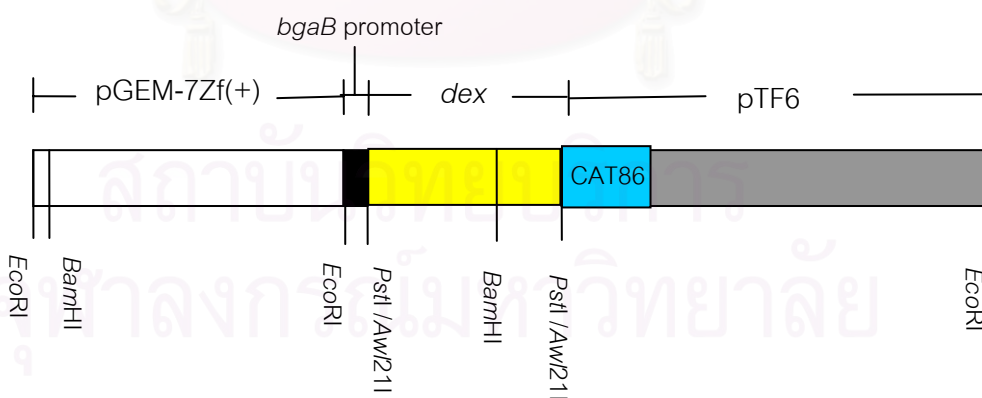
รูปที่ 4.4.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิดที่ได้จากการทรานสฟอร์มชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าใน pGEMTF แล้วตัดด้วยเอนไซม์ทรินชันเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI

- | | |
|-------------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 kb DNA ladder |
| ช่องที่ 2,6 | พลาสมิดจากทรานสฟอร์มแมนต์ตัวที่ 1 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI ตามลำดับ |
| ช่องที่ 3,7 | พลาสมิดจากทรานสฟอร์มแมนต์ตัวที่ 2 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI ตามลำดับ |
| ช่องที่ 4,8 | พลาสมิดจากทรานสฟอร์มแมนต์ตัวที่ 3 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI ตามลำดับ |
| ช่องที่ 5,9 | พลาสมิดจากทรานสฟอร์มแมนต์ตัวที่ 4 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI ตามลำดับ |



รูปที่ 4.4.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส

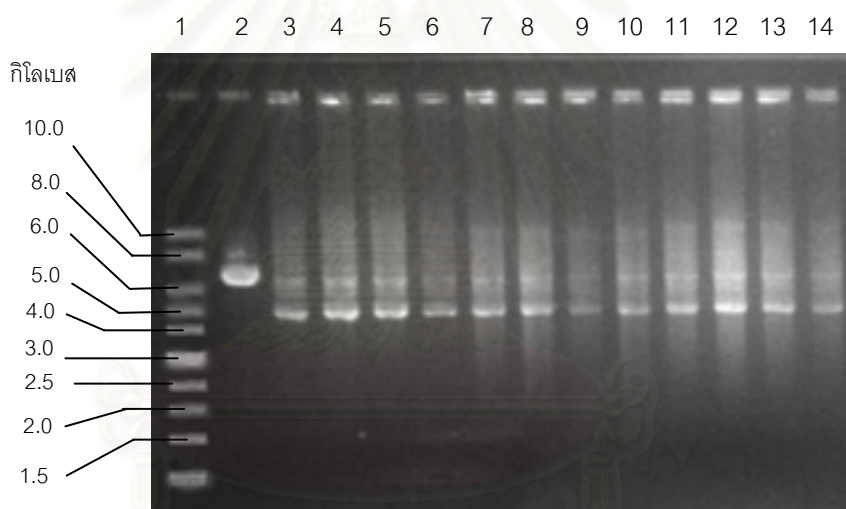
- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder
- ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทรานสฟอร์มเมนต์ 1
- ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทรานสฟอร์มเมนต์ 2
- ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทรานสฟอร์มเมนต์ 3
- ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทรานสฟอร์มเมนต์ 4



รูปที่ 4.4.3 แผนที่แสดงลักษณะของ pBUNDEX

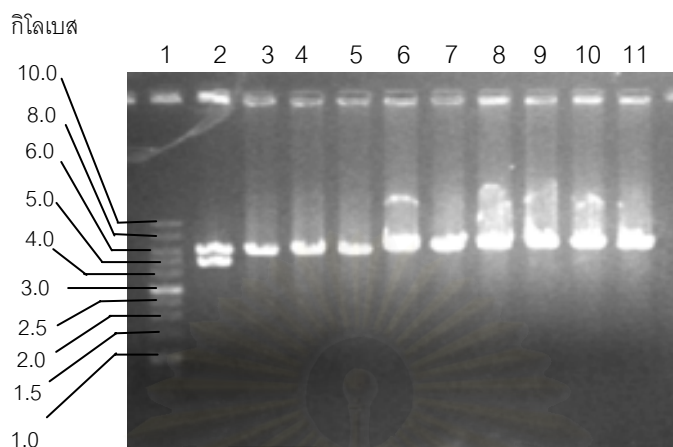
4.5 ทรานสเฟอร์ม pBUNDEX เข้าใน *Bacillus* sp.

ทรานสเฟอร์ม pBUNDEX ที่ได้จากข้อ 4.4 เข้าในคอมพีเทนท์เซลล์ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ MI111, MI111 low protease และ MI113 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน คัดเลือกทรานสเฟอร์แมนต์โดยนำมาสกัดพลาสมิดเปรียบเทียบขนาดกับ pBUNDEX ที่สกัดจาก *E.coli* DH5 α พบว่าขนาดของทรานสเฟอร์แมนต์ที่พบใน *Bacillus* sp. ทั้งสามสายพันธุ์นั้นมีขนาดเท่ากันและพบว่ามีขนาดเล็กกว่า pBUNDEX ดังแสดงในรูปที่ 4.5.1 และเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6 กิโลเบสเพียงชิ้นเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.5.2 จากนั้นได้ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อตรวจสอบว่าในทรานสเฟอร์แมนต์ที่ได้นั้นยังคงมียีน *dek* แทนเนสอยู่หรือไม่ โดยใช้ไพรเมอร์ PROBUN+F และ BUN+R พบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 2200 คู่เบส ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5.3



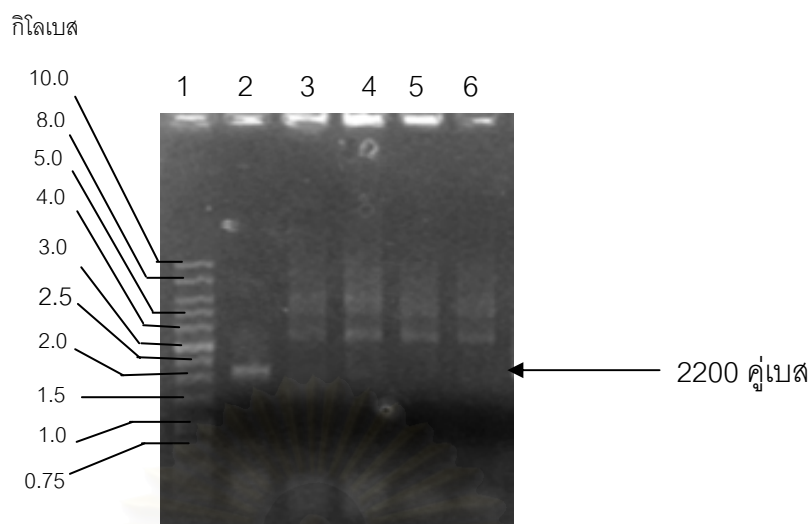
รูปที่ 4.5.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของทรานสเฟอร์แมนต์จาก *Bacillus* sp.

- | | |
|---------------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 kb DNA ladder |
| ช่องที่ 2 | pBUNDEX ที่สกัดจาก <i>E.coli</i> DH5 α |
| ช่องที่ 3-6 | พลาสมิดที่สกัดจาก <i>Bacillus subtilis</i> MI111 low protease |
| ช่องที่ 7-10 | พลาสมิดที่สกัดจาก <i>Bacillus subtilis</i> MI111 |
| ช่องที่ 11-14 | พลาสมิดที่สกัดจาก <i>Bacillus subtilis</i> MI113 |



รูปที่ 4.5.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

- | | |
|---------------|---|
| ช่องที่ 1 | 1 kb DNA ladder |
| ช่องที่ 2 | pBUNDEX ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 3-7 | ทรานสฟอร์มแมนท์จาก <i>Bacillus subtilis</i> MI111 low protease ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 8-12 | ทรานสฟอร์มแมนท์จาก <i>Bacillus subtilis</i> MI111 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 13-17 | ทรานสฟอร์มแมนท์จาก <i>Bacillus subtilis</i> MI113 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI |



รูปที่ 4.5.3 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส

- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder
- ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR จาก pBUNDEX
- ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากพลาสมิดใน *Bacillus subtilis* MI111 low protease
- ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากพลาสมิดใน *Bacillus subtilis* MI111
- ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากพลาสมิดใน *Bacillus subtilis* MI113

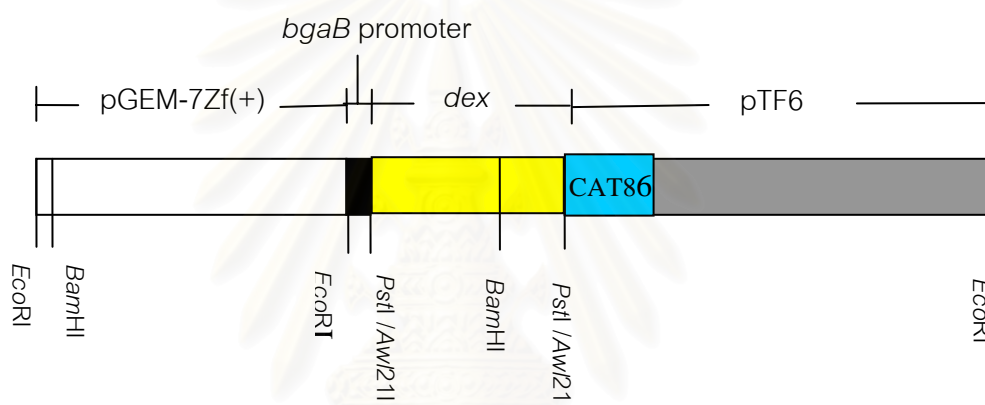
บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยยับยั้งการผลิตเดกซ์แทรนและสามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ของเดกซ์แทรน จึงช่วยลดการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียต่อผิวฟันและใช้ในการป้องกันฟันผุได้ (Fitzgerald และคณะ, 1968) มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ เช่น *Streptococcus salivarius* สายพันธุ์ PC-1 (Lawman และ Bleiweis, 1991), *Penicillium notatum* (Pleszczynska และคณะ, 1997), *Sporothrix schenckii* สายพันธุ์ IT-29 (Arnold และคณะ, 1998), *Fusarium* sp. (Shimizu และคณะ, 1998), *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) และ *Paenibacillus* sp. (Finnegan และคณะ, 2005) โดยเฉพาะเราสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในระดับสูง อย่างไรก็ตามการเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากราส่วนมากจะมีส่วนของผนังเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดการแพ้และบางชนิดยังสร้างแอฟลาทอกซินออกมาในภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เช่นกัน (Leach, 1969) ดังนั้นจึงนิยมให้แบคทีเรียในการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องระดับการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ณัฐณี สุวรรณสิงห์ (2540) ได้แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสจากดินในจังหวัดนนทบุรี ซึ่งมีแอกติวิตีเดกซ์แทรนเนส 4.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 นี้ได้ถูกจัดจำแนกเป็น *Arthrobacter* sp.สายพันธุ์ AG-2 จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA โดย Chareonpornwattana และคณะ (2001) ในปี 2543 สุัททยา จิระนันทิพร ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยใช้หลักการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า และมีแอกติวิตีเท่ากับ 6.276 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp.สายพันธุ์ AG-2 โดย สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ (2546) พบว่ายีนมีขนาด 1,899 คู่เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 633 หมู่ ขนาดประมาณ 70.3 กิโลดัลตัน และพบบริเวณจับเกาะของไรโบโซมและ inverted repeat เพื่อเพิ่มระดับการผลิตเดกซ์แทรนเนสจึงได้สร้างเวกเตอร์การแสดงออก (expression vector) สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp.สายพันธุ์ AG-2 และศึกษาการแสดงออกใน *Bacillus subtilis*

Bacillus sp. นั้น เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีข้อได้เปรียบกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เนื่องจาก *Bacillus* sp. สามารถผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งหลั่งออกมานอกเซลล์ ทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และนำไปใช้ (Priest, 1977) อย่างไรก็ตามการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสลงใน *Bacillus* sp. นั้นสามารถทำได้ยากเนื่องจากลักษณะของผนังเซลล์ เพื่อให้การโคลนยีนเข้าสู่ *Bacillus* sp. ทำได้ง่ายขึ้น จึงสร้างชุดเทิลเวกเตอร์ pGEMTF จากการเชื่อม pGEM-7Zf(+) เข้ากับ pTF6 (ภาคผนวก ค.) ชุดเทิลเวกเตอร์ที่ได้นี้มีขนาด 8 กิโลเบส สามารถถ่ายแบบได้ทั้งใน *E.coli* และ *Bacillus* sp. สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, กานามัยซิน และ คลอแรมเฟนิคอล มีแผนที่จุดตัดเอนไซม์ดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ภาพแสดงลักษณะของชุดเทิลเวกเตอร์ pBUNDEX

โปรโมเตอร์ *bgaB* นั้นเป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน β -galactosidase I จาก *Bacillus stearothermophilus* IAM11001 เป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถทำให้เกิดการแสดงออกเกินได้ และยังสามารถแสดงออกได้ดีใน *Bacillus subtilis* อีกด้วย (Hirata และคณะ, 1985) โดย Hirata และคณะ ได้โคลนขึ้นดิเอ็นเอบริเวณเหนือโคดอนเริ่มถอดรหัสของยีน β -galactosidase I ลงใน pPL703 ซึ่งเป็น promoter cloning vector ที่มียีนคลอแรมเฟนิคอลอะเซทิลทรานสเฟอเรส (CAT86) เป็นยีนรายงาน (reporter gene) (Duvall และคณะ, 1983; Monkolsuk และคณะ, 1984) จากผลการทดลองแสดงพบว่าพลาสมิด pTF6 นั้นมีขึ้นโปรโมเตอร์ *bgaB* และมีแอกติวิตีของ CAT86 นอกจากนี้ pTF6 ยังสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของยีนอื่นนอกเหนือจาก β -galactosidase I ได้อีกด้วย ในปี 2000 มีการศึกษาการแสดงออกของยีน penicillin G acylase

(*pac*) จาก *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ UN-1 ใน Bm-UNcat และ *Bacillus subtilis* โดยใช้ pTF6 พบว่ามีการแสดงออกของ *pac* เพิ่มขึ้น 20 เท่า (Panbangred และคณะ, 2000)

จากนั้นนำส่วนที่ประมวลรหัสเดคซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 2079 คู่เบส โคลนเข้าใน pGEMTF โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาด 10 กิโลเบส ตั้งชื่อว่า pBUNDEX โดยที่ในส่วนของประมวลรหัสเดคซ์แทรนเนสนี้มีส่วนเพพไทด์สัญญาณของยีนเดคซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อทำให้เกิดการหลั่งเดคซ์แทรนเนสออกมานอกเซลล์ในการแสดงออกของเดคซ์แทรนเนสใน *Bacillus subtilis* เนื่องจากเพพไทด์สัญญาณของแบคทีเรียกรัมบวกนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Edman และคณะ, 1999) และจากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวก และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบ เป็นเจ้าบ้านในการศึกษาการแสดงออกของยีนเพนิซิลินจีอะไซเลส จาก *Arthrobacter viscosus* โดยใช้เพพไทด์สัญญาณจากยีนใน *Arthrobacter viscosus* เองนั้น พบแอกติวิตีของเอนไซม์เพนิซิลินจีอะไซเลสในส่วนเพอริพลาซึมของ *E. coli* และในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* โดยใน *B. subtilis* นั้นมีแอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น 7.5 เท่า ในขณะที่ *E. coli* นั้นมีแอกติวิตีเพียงเล็กน้อย (Ohashi และคณะ, 1989)

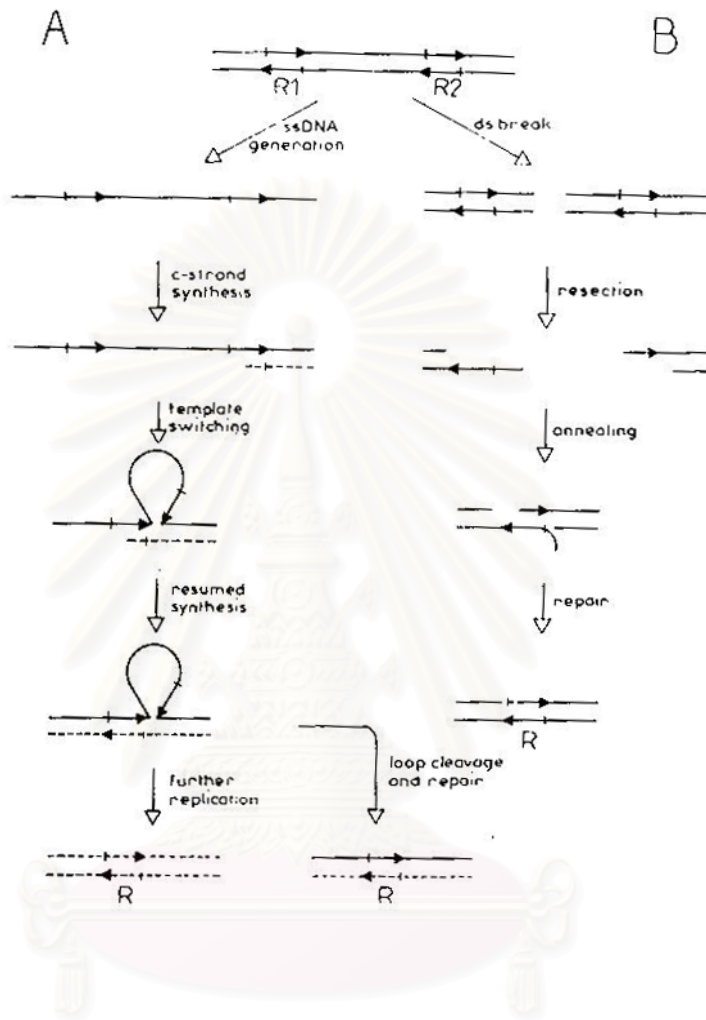
เมื่อทรานสฟอร์ม pBUNDEX ลงใน *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ MI111, MI111 low protease และ MI113 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าเกิดการขาดหายไปของดีเอ็นเอบางส่วน (deletion formation) ทำให้ขนาดของพลาสมิดที่สกัดจาก *Bacillus subtilis* เหล่านี้มีขนาดเล็กกว่าพลาสมิดก่อนทำการทรานสฟอร์ม และพบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่หายไปนั้นอยู่ในส่วนของยีนเดคซ์แทรนเนส เนื่องจากทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไม่สามารถตรวจพบยีนเดคซ์แทรนเนสโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อใช้ PROBUN+F และ BUN+R เป็นไพรเมอร์

การที่ดีเอ็นเอได้ถูกตัดหายไปบางส่วนนั้นคาดว่าเกิดจากกระบวนการตัดออก (deletion) ซึ่งมีรายงานว่า พบการเกิดการตัดออกบ่อยครั้งใน *Bacillus* sp. และพบในพลาสมิดดีเอ็นเอมากกว่าโครโมโซมดีเอ็นเอ (Janniere และ Ehrlich, 1987) และการเกิดการตัดออกนั้นสามารถพบได้ใน ไคเมอริคพลาสมิด (chimeric plasmid) ที่สามารถถ่ายแบบ ได้ทั้งใน *E. coli* และ *B. subtilis* (Ehrlich และคณะ, 1981; Kreft และ Hughes, 1981) การเกิดการตัดออกขึ้นเองเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดของเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับจำลองตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอ เช่น โทโปไอโซเมอเรส I (Henningfeld และ Hecht, 1995; Meima และคณะ, 1998), เฮลิเคส (Meima และคณะ, 1997) หรือโปรตีน Rep (Gruss และ Ehrlich, 1989), เกิดจากลำดับฮอมอโลกัส (homologous sequence) เช่น direct repeat sequences หรือ DRs, invert repeat sequences หรือ IRs และ

การเกิดทรานโพซอน (Brunier และคณะ, 1988; Peijnenburg และคณะ, 1988; Peeter และคณะ 1988; Ehrlich และคณะ, 1993; Janniere และคณะ, 1993)

การจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (DNA rearrangement) เช่น การเกิดการถอดแบบ, การตัดออก, การย้ายตำแหน่งและการสอทดแทน นั้นมีความสำคัญในแง่ของวิวัฒนาการ และสามารถเกิดได้จาก 2 ลักษณะ คือ legitimate replication ระหว่างลำดับฮอมอโลกัสที่มีขนาดยาว (long homologous sequence) หรือ รีคอมบิเนชันที่เจาะจงตำแหน่ง เช่น ทรานสโพซอน อีกลักษณะคือ illegitimate recombination ซึ่งเกิดขึ้นจากลำดับเบสที่มีความเหมือนกันน้อยจนถึงไม่เหมือนเลย (little or no homology) การเกิด illegitimate recombination นี้พบได้ในทุกสิ่งมีชีวิตและสามารถพบได้บ่อยกว่าการเกิด legitimate recombination (Ehrlich และคณะ, 1993)

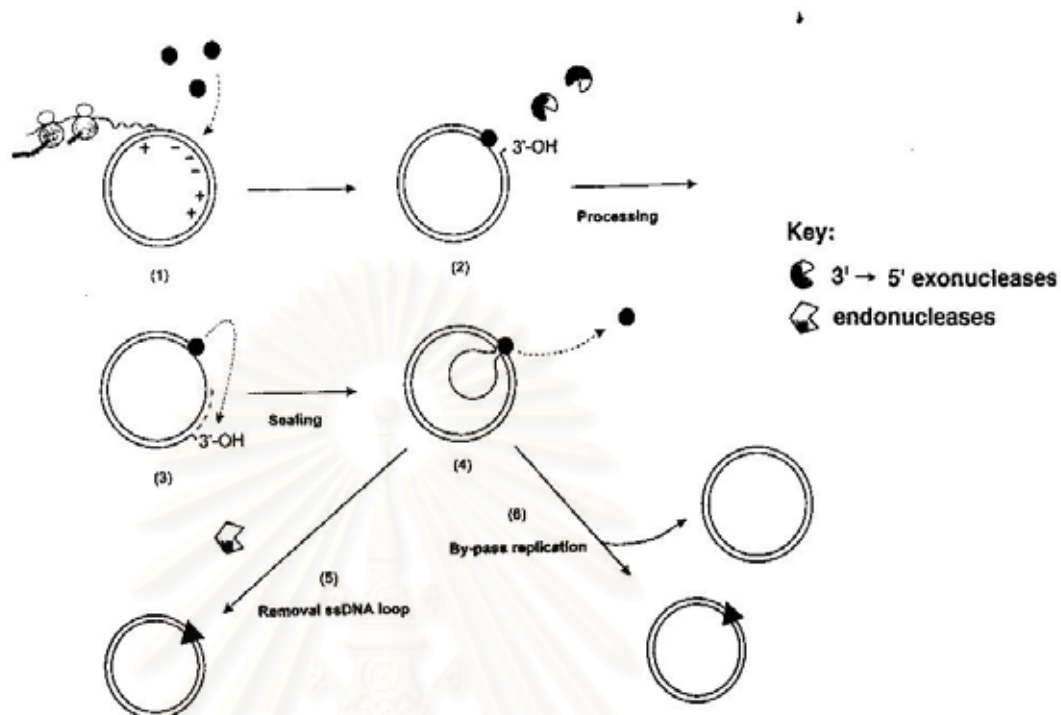
กลไกของ illegitimate recombination เกิดได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ คือ Copy-choice recombination และ Breakage and reunion recombination กลไกแบบแรกนั้นเกิดการสับเปลี่ยนในขั้นตอนการจำลองตัวของดีเอ็นเอไปเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) โดยลำดับซ้ำหายไปหนึ่งข้างหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับซ้ำนั้นหายไป เมื่อเกิดการจำลองตัวรอบต่อไป ส่วนที่หายไปอาจคืนสภาพกลับมาหรือทำให้เกิดเป็นลูป และถูกตัดทิ้งไป (slipped mispairing) (Peijnenburg และคณะ, 1988) กลไกแบบที่สองเกิดจากการขาดในสายดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันและเกิด exonucleolytic resection และซ่อมแซมดีเอ็นเอส่วนที่ขาดให้กลับมาเชื่อมต่อกัน (Brunier และคณะ, 1988) ซึ่งแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 การเกิด illegitimate recombination A แสดง Copy-choice และ B และ Breakage and reunion recombination (Brunier และคณะ, 1988)

กระบวนการเกิด illegitimate recombination ดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้ อาจเกิดได้จาก เอนไซม์ที่ควบคุมการถ่ายแบบ เช่น โทโปไอโซเมอเรสซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องกับการแทนที่ฐาน (transition) ของดีเอ็นเอ โดยการเกิด illegitimate recombination จากเอนไซม์นี้จะเกิดเมื่อเกิดรอยตัดขึ้นในพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อเริ่มการจำลองตัว แล้วมีการย่อยสายดีเอ็นเอทางปลาย 3'OH เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ 3'-5' exonuclease ทำให้เกิดช่องว่าง และโทโปไอโซเมอเรสจะทำการเชื่อม gap นี้เข้าด้วยกันทำให้เกิด ssDNA loop ขึ้น ซึ่ง loop นี้จะถูกกำจัดโดยเอนโดนิวคลีเอสทำให้ได้

พลาสมิดที่มีขนาดเล็กลง หรือ อาจเกิด bypass replication ซึ่งจะทำให้ได้พลาสมิดสองแบบ (Meima และคณะ, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 การเกิดการตัดออกไปของพลาสมิดซึ่งมีผลมาจากโทโพไอโซเมอเรสใน *Bacillus subtilis* (Meima และคณะ, 1998)

สำหรับในการทดลองนี้คาดว่ามีการเกิด illegitimate recombination เกิดขึ้น โดยมีการสร้าง loop ขึ้นระหว่างการถ่ายแบบแบบพลาสมิด pBUNDEX ใน *Bacillus subtilis* และลูปที่ถูกตัดทิ้งไปนั้นมีขนาดประมาณ 4 กิโลเบส และดีเอ็นเอช่วงที่ถูกตัดไปนั้นเป็นดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส ส่งผลให้ขนาดพลาสมิดที่สกัดได้จาก *Bacillus subtilis* ทั้งสามสายพันธุ์ มีขนาดเล็กกว่า pBUNDEX และไม่มีแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จินตกร คุ้มฉนวนสุชาติ. 2544. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณัฐินี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. การแยกโครโมโซมจากแบคทีเรีย. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เล่มที่1. หน้า 11.15-11.17. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- สุชาติ ปันจัยสิทธิ์. 2538. การศึกษาและวิเคราะห์ยีน cryIVB ใน Bacillus sphaericus และ Bacillus thuringiensis. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ. 2546. การโคลนและศึกษาลักษณะยีนเดกซ์แทรนเนสจาก Arthrobacter sp. AG-2. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมาลี ตั้งประดับกุล. 2542. การควบคุมการทำงานของยีน. ชีวเคมี. หน้า 303-321. กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุหทัยา จิระนันท์พิร. 2543. การกลายพันธุ์ Arthrobacter sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้างเดกซ์แทรนเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Arnold, W. N., Nguyen, T. B. P., and Mann, L. C. 1998. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix Schenckii*. Arch. Microbiol. 170(2): 91-98.
- Baltz, R. H. 1986. Strain improvement. In A. L. Demain; and N.A. Solomon (eds.). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, pp.154-169. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

- Barrett, J. F., Barrett, T. A., and Curtiss III, R. 1987. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sobrinus* and cloning of the dextranase gene. Infect. immun. 55(3):792-802.
- Bell, P. A. 2001. *E.coli* expression systems. In A. S. Gerstein (eds.). Molecular Biology Problem Solver: a Laboratory Guide. pp.461-489. USA: Wiley-Liss.
- Block, P. L., Dooney, C. L., and Howe, E. E. 1969. The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodont. 40: 105-110.
- Bowen, W. H. 1978. Role of carbohydrate in dental caries. Shaw and G. G. Roussos (ed.). Proceeding Sweetener and Dental Caries, sp. supp. Feeding, Weight and Obesity abstract. 147-155.
- Brown, T. A. 1995. Production of protein from cloned genes. Gene Cloning and Introduction. 3rd ed. pp. 253-273. UK: Blackwell Science.
- Brunier, D., Michel, B., and Ehrlich, S. D. 1988. Copy choice illegitimate DNA recombination. Cell. 52:883-892.
- Burnette, G. W., and Scherp, K. W. 1962. Oral Microbiology and Infectious Disease. pp. 386-401. Baltimore: The Williams and Wilkins.
- Burnette, G. W., and Schuster, G. S. 1978. In Student (ed.). Oral Microbiology and Infectious Disease. pp. 204-209. Baltimore: The Williams and Wilkins.
- Caldwell, R. C., Snadham, H. J., Mann, W. V., Jr., Finn, B., and Formicola, A. J. 1971. The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque young adults and children. J. Am. Dent. Assoc. 82: 124-134.
- Ceska, M., Granath, K., Norrman, B., and Guggenheim, B. 1972. Structural and enzymatic studies on glucan synthesized with glucosyltransferase of some strains of oral streptococci. Acta. Chem. Scand. 26: 2223-2230.
- Chareonpornwattana, S., Jiranuntipon, S., Tangjitpinitkarn, S., Thaniyavarn, J., and Thaniyavarn, S. 2001. Dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 and characterization thereof. Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics. 15: 405-410.
- Cole, J. A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochem. Soc. Trans. 5(4): 1232-1239.

- Dewar, M., and Walker, G. J. 1975. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. Caries Research. 9: 21-35.
- Duvall. E. J., Williams. D. M., Lovett. P.S., Rudolph. C., Vasantha. N., and Guyer. M. 1983. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus subtilis*. Gene. 24:171-177.
- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K., and Kotani, S. 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38: 374-381.
- Edman, M., Jarhede, T., Sjostrom, M., and Wieslander, A. 1999. Different sequence patterns in signal peptides from mycoplasmas, other gram-positive bacteria, and *Escherichia coli*: a multivariate data analysis. Proteins. 35(2):195-205.
- Ehrlich, S. D., Niaudet, B., and Michel, B. 1981. Use of plasmids from *Staphylococcus aureus* for cloning of DNA in *Bacillus subtilis*. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:19-29.
- Ehrlich, S. D., Bierne, H., d'Alencon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P., and Michel, B. 1993. Mechanisms of illegitimate recombination. Gene. 135:161-166.
- Felgenhauer, B., and Trautner, K. 1983. The reciprocal action of extracellular *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and glucanhydrolase. J. Dent. Res. 62: 459.
- Finnegan, P. M., Brumbley, S. M., O'Shea, M.G., Nevalainen, H., and Bergquist, P.L. 2005. Diverse dextranase genes from Paenibacillus species. Arch Microbiol. 183(2):140-147.
- Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H., Stoudt, T. H., and Spinell, D. M. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. JADA. 76: 301-304.
- Fukumoto, J., Hiraoka, N., Hirose, T., and Tsuru, D. 1971. Studies 2 Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. Agric. Biol. Chem. 35(11): 1727-1732.
- Galvez-Mariscal, A., and Lopes-Munguia, A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paccilomyces lilacinus* strain. Applied. Microbiol. Biotechnol. 36: 327-331.

- Garcia, B., Margolles, E., Roca, H., Mateu, D., Raices, M., Gonzales, M. E., Herrera, L., and Delgado, J. 1996. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. FEMS Microbiol. Lett. 143: 175-183.
- Gibbons, R. J., and Van Houte, J. 1980. Receptors and recognition, Series B. vol. 6. In Beachey, E.H. (ed.), Bacterial Adherence. pp. 66-103. London: Chapman and Hall.
- Glazer, A. N., and Nikaido, H. 1995. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, pp. 270. USA.: W.H. Freeman and Company.
- Gruss, A., and Ehrlich, S. D. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. Microbiol. Rev. 53:231-241.
- Guggenheim, B. 1970. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int. Dent. J. 20(4): 657-678.
- Hamada, S., and Slade, H. D. 1980. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44: 371-444.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hardy, K. G. 1985. Bacillus Cloning Method. In Glover, D. M. (eds.). DNA Cloning a Practical Approach volume II. pp. 1-17.
- Hatada, Y., Hidaka, Y., Nogi, Y., Uchimura, K., Katayama, K., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Goda, S., Ito, H., Matsui, H., Ito, S., and Horikoshi, K. 2004. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties, and crystallization of the recombinant enzyme. Appl Microbiol Biotechnol. 65(5):583-592.
- Henningfeld, K. A., and Hecht, S. M. 1995. A model for topoisomerase I-mediated insertions and deletions with duplex DNA substrates containing branches, nicks, and gaps. Biochemistry. 34: 6120-6129.
- Hirata, H., Negoro, S., and Okada, S. 1985. High production of thermostable β -galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 49:1547-1549.
- Hirata, H., Fukazawa, T., Negoro, S. and Okada, H. 1986. Structure of a β -galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 166:722-727.

- Howley D. K., and McClure W. R. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res. 11:2237-55.
- Hui, A. S., Hayflick, J., Dinkelspiel, K., and de Boer, H. A. 1984. Mutagenesis of the three bases preceding the start codon of the β -galactosidase mRNA and its effect on translation in *Escherichia coli*. EMBO J. 3:623-629.
- Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1995. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* ingbritt *dexA* gene encoding extracellular dextranase. Microbiol. Immunol. 39(11): 853-860.
- Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 2001. Nucleotide sequence and molecular characterization of a dextranase gene from *Streptococcus downei*. Microbiol. Immunol. 45(5): 341-348.
- Igarashi, T., Morisaki, H., and Goto, N. 2004. Molecular characterization of dextranase from *Streptococcus rattus*. Microbiol. Immunol. 48(3): 155-162.
- Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Okada, G., and Chiba, S. 1994. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. J. Bacteriol. 176(24): 7730-7734.
- Janniere, L., and Ehrlich, S. D. 1987. Recombination between short repeated sequences is more frequent in plasmids than in the chromosome of *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet. 210:116-121.
- Janniere, L., Gruss, A., and Ehrlich, S. D. 1993. plasmids. In Sonenshein, A. L., Hock, J. A., and Losick, A. D. (eds.). Bacillus subtilis and other gram positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. pp.625-644. Washington, D.C.: American Society for microbiology.
- Jensen, B., and Olsen, J. 1996. Extracellular alpha-glucosidase with dextran-hydrolyzing activity from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. Curr. Microbiol. 33(3): 152-155.
- Keyes, P. H., Hichs, M. A., Goldman, B. M., McCabe, R. M., and Fitzgerald, R. J. 1971. Dispersion of dextranase bacterial plaques on human teeth with dextranase. J. Am. Dent. Assoc. 82: 136-141.

- Kubo, S., Kubota, H., Ohnishi, Y., Morita, T., Matsuya, T., and Matsushiro, A. 1993. Expression and secretion of an *Arthrobacter* dextranase in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. Infect. Immun. 61(10): 4375-4381.
- Kreft, J. and Hughes, C. 1981. Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:1-17.
- Kuo, L. Y., Hwang, G. Y., Lai, Y. J., Yang, S. L., and Lin, L. L. 2003. Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. Curr. microbiol. 47:40-45.
- Lawman, P., and Bleiweis, A. S. 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 173(23): 7423-7428.
- Leach, S. A. 1969. Dextranase and dental caries. British. Dental. J. pp. 325-330.
- Loeache, W. T. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev. 50 (4):353-380.
- Lyndhe, J. 1984. Textbook of Clinical Periodontology. pp. 125-153. Copenhagen: Munksgaard.
- Madhusudan, K., and Nagaraja, V. 2004. *Mycobacterium smegmatis* DNA gyrase: cloning and overexpression in *Escherichia coli*. Microbiology. 141:3029-3037.
- Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 60:512-538.
- McGhee, J. R., and Michalek, S. M. 1981. Immunology of dental caries: Microbial aspects and local immunity. Ann. Rev. Microbiol. 35: 595-638.
- Meima, R., Haijema, B. J., Dijkstra, H., Haan, G., Venema, G., and Bron, S. 1997. Role of enzymes of homologous recombination in illegitimate plasmid recombination in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 179:1219-1229.
- Meima, R., Haan, G., Venema, G., Bron, S., and de jong, S. 1998. Sequence specificity of illegitimate plasmid recombination in *Bacillus subtilis*: possible recognition sites for DNA topoisomerase I. Nucleic acids Res. 26:2366-2373.
- Melville, T. H., and Russell, C. 1981. Microbiology for Dental Students. 3rd ed. pp. 323-338. London: William Medical Book.
- Mendell, J. D., and Greenberg, J. 1960. A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 6:575-577.

- Michalek, S. M., and Childers, N. K. 1990. Development and outlook for a caries vaccine. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1: 37-54.
- Miettinen, A. O., Torkkeli, T. and Paloheimo, M. 1997. Overexpression of the *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase gene in a heterologous host *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 58:13-20.
- Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Kimura, A., and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotriose-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(9): 1582-1588.
- Mongkolsuk, S., Nicholas, P., Ambulos, JR., and Lovett, P. S. 1984. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* is independent of the chloramphenicol acetyltransferase structural gene and its promoter. J. Bacteriol. 160:1-8.
- Muller, R. F., Ana, T., Imanaka, T. and Iba, S. 1986. Complete nucleotide sequences of *Bacillus* plasmids pUB110dB, pRBH1 and its copy mutant. Molecular and General Genetics. 202:169-171.
- Murayama, Y. H., Wada, H., Hayashi, T., Uchida, I., Yokomizo, I., and Hamada, S., 1973. Effect of dextranase from *Spicaria violacea* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and human dental plaque. J. Dent. Res. 52: 658-667.
- Murrell, J. C. and Robert, L. M. 1989. Expression of foreign gene in prokaryote and eukaryote. Understanding Genetic Engineering. pp. 63-75. Ellis Horwood.
- Noltel, W. A. 1973. Oral Microbiology. pp. 251-270. Saint Louis: The C.V. Mosby.
- Oguma, T., Kurokawa, T., Tobe, K., Kitao, S., and Kobayashi, M. 1999. Cloning and sequence analysis of the gene for glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044 and expression in *Escherichia coli* cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(12): 2174-2182.
- Ohashi, H., Katsuta, Y., Nagashima, M., Kamei, T., and Yano, M. 1989. Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin G acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 55(6): 1351-1356.

- Ohnishi, Y., Kubo, S., Ono, Y., Nozaki, M., Gonda, Y., Okano, H., Matsuya, T., Matsushiro, A., and Morita, T. 1995. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. Gene. 156: 93-96.
- Okushima, M., Sugino, D., Kouno, Y., Nakano, S., Miyahara, J., Toda, H., Kubo, S., and Matsushiro, A. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Jpn. J. Genet. 66: 173-187.
- Old, R. W., and Primrose, S. B. 1994. Expression in *E.coli* of cloned DNA molecules. Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering. 5th ed. pp. 139-166. USA: Blackwell science.
- Omidinia. E., Taherkhani. H., Asano. Y., Khathami. S., Omumi. A., Ghadiri. A., van der Lelie. D., Rashidpouraie. R., Mirzahoseini. H., and Samadi. A. 2002. Affinity purification and characterization of recombinant *Bacillus sphaericus* phenylalanine dehydrogenase produced by pET expression vector system. Iran. Biomed. J. 6: 31-36.
- Panbangred. W., Weeradechapon. K., Udomvaraphant. S., Fujiyama. K., and Meevootisom. V. 2000. High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant. J. Appl. Microbiol. 89:152-157.
- Peeters, B. P. H., de Bour, J. H., Bron, S., and Venema, G. 1988. Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*: effect of direct and inverted repeats. Mol Gen Genet. 212:450-458.
- Peijnenburg, A. A. C. M., Bron, S., and Venema, G. 1988. Plasmid deletion formation in *Bacillus subtilis*. Plasmid. 20: 23-32.
- Pines. O., and Inouye. M. 1999. Expression and secretion of protein in *E.coli*. Mol. Biotechnol. 12:25-34.
- Pleszczynska, M., Szczodrak, J., Rogalski, J. and Fiedurek, J. 1997. Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion products. Mycol. Res. 101(1): 69-72.
- Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41: 711-753.

- Robrich, S. A. 1986. Biotechnology and Ecological Studies on the Oral Cavity. Microb Ecol. 12: 53-64.
- Russel, P.J. 1996. Genetics. 4th ed. New york: Harper Collins.
- Russell, D. R., and Bennett, G. N. 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene. 20: 231-243.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sawai, T., Toriyama, K., and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. J. Biochem. 75: 105-112.
- Schachtele, C. F., Staat, R. H., and Harlander, S. K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-soluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12(2): 309-317.
- Schachtele, C. F. 1982. Postgraduate dental handbook series. vol. 13. In Orland, F.J. (ed.). Microbiology in Clinical Dentistry. pp. 153-168. Massachusetts: John Wright PSG.
- Schuster, G. S. 1983. Oral Microbiology and Infectious Disease. 2nd ed. pp. 164-206. USA: The williams and Wilkins.
- Shaw, J. H., and Roussos, G. G. 1978. Sweeteners and Dental Caries. Washington D.C.: Information Retrieval.
- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., and Okada, G. 1998. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(1): 117-122.
- Thystrup, A., and Fejerkov, O. 1986. Textbook of Cariology. 1st ed. pp. 117-123. Vojens: P.J. Schmidts Bogtrykker.
- Van Houte, J., and Russo, J. 1986. In Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., and McGhee, J. R. (eds.). Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans. pp. 157-167. Netherland: Elsevier Science.
- Vinci, V.A., and Byng. G. 1999. Strain improvement by nonrecombinant methods. In Atlas, R.M. (eds.) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd ed. pp. 103-113. USA: American Society for microbiology.

- Walker, G. J., and Pulkownik, A. 1973. Degradation of dextran by an α -1,6-glucan glucohydrolase from *Streptococcus mitis*. Carbohydr. Res. 29: 1-14.
- Wanda, S. Y., and Curtiss, III. R., 1994. Purification and characterization of *Streptococcus sobrinus* dextranase produced in recombinant *Escherichia coli* and sequence analysis of the dextranase gene. J. Bacteriol. 176(13): 3839-3850.
- Widner, B., Thomas, M., Sternberg, D., Lammon, D., Behr, R., and Sloma, A. 2000. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes. J. Indust. Microbiol. Biotech. 25:204-212.
- Winnacker, E. L. 1987. Cloning in gram positive bacteria. From Gene to Clone. Introduction to Gene Technology. pp. 209-234. VCH.
- Wolinsky, L. E. 1988. Caries and Cariology. In Newman, M. G. and Nisingarrd, R. (eds.). Oral Microbiology and Immunology. pp. 389-409. Jonanovich: W.B. Saunder.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (2YT broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	16.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ณัฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

เดกซ์แทรน (ความบริสุทธิ์ระดับอุตสาหกรรม)	5.0 กรัม
พอลิเปปโตน (polypeptone)	10.0 กรัม
K_2HPO_4	2.0 กรัม
KH_2PO_4	1.0 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0 กรัม

ละลายสารทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 จากนั้นใส่เดกซ์แทรนแล้วนำไปละลายโดยการอุ่นด้วยความร้อนและปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi (ณัฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กาลีเซอรอล

นำกาลีเซอรอลมาหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/น้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

กานามัยซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/น้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

3. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

RNase A

Collection tube

QIAprep Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสติกครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงใน Buffer PE

4. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

QIAquick column

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติมเอธานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงใน Buffer PE

5. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

6. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trismabase (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

7. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

8. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

9. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

10. สารละลายฟีนอล (phenol) อิ่มตัว

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68°C จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline .ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ลงไปอีกครึ่ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ความเป็นกรด-เบสมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ที่ผสม β -mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่นได้ประมาณ 1 เดือน

11. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม 1 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

12. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

13. สารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด

สารละลาย I

กลูโคส	50 มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0	25 มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0	10 มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เข้ากับน้ำ
ปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 8.8 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 1.0
มิลลิลิตรเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตตเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับกรดอะ
ซีติกเข้มข้นปริมาตร 11.50 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ
121 °C เป็นเวลา 20 นาที

14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

15. สารละลายโซเดียมอะซีเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400
มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57
มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

16. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1
มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

17. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มิลลิกรัม ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C ในหลอดปิดสนิทและมีด

18. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรอง ผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

19. สารละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0

ละลายผง HEPES น้ำหนัก 0.026 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาณ 70 มิลลิลิตร ปรับ ค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านหัว กรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4°C

20. สารละลาย PM

แมนนิทอล	1.822	กรัม
PEG 6000	10	กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่ อุณหภูมิต่ำ 4°C

21. สารละลายเดกซ์แทรน ที่ 2000 ความเข้มข้น 0.625%

ละลายเดกซ์แทรน ที่ 2000 จำนวน 0.625 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

22. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0

KH_2PO_4	2.7	กรัม
K_2HPO_4	5.25	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 7.0 เติมน้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

23. สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (Alkaline Copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจเนอราล 71 กรัม และโซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ลงไป 100 มิลลิลิตร และเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 10% ลงไป 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

24. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ลงไป 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซิเนตที่มีความเข้มข้น 12% ลงไป 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนนำไปใช้

25. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry's method)

25.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

25.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

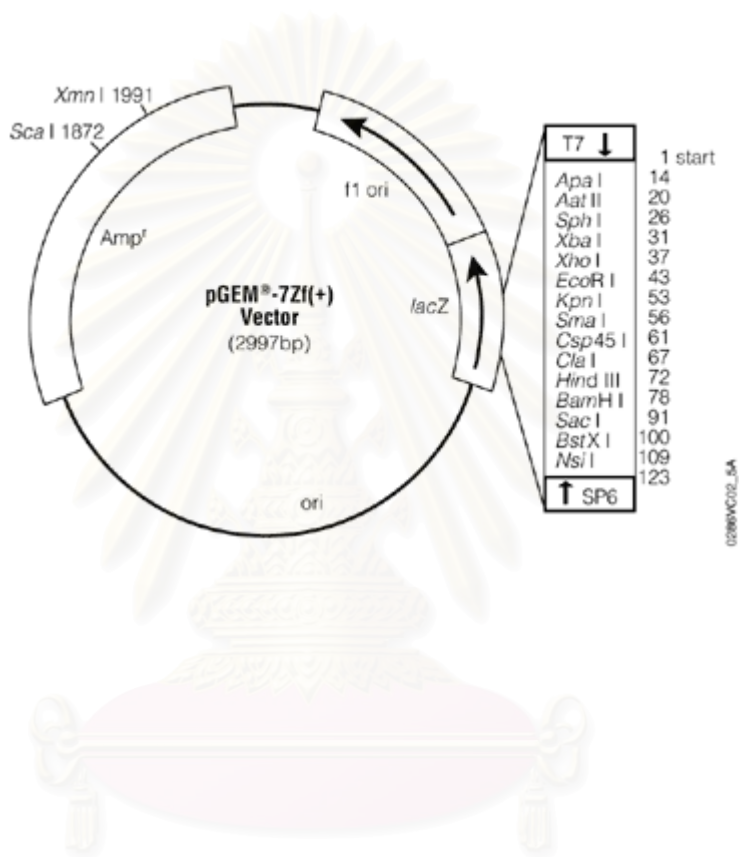
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
25.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย		
Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน
25.4 สารละลาย Lowry D (Phenol reagent) ประกอบด้วย		
สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

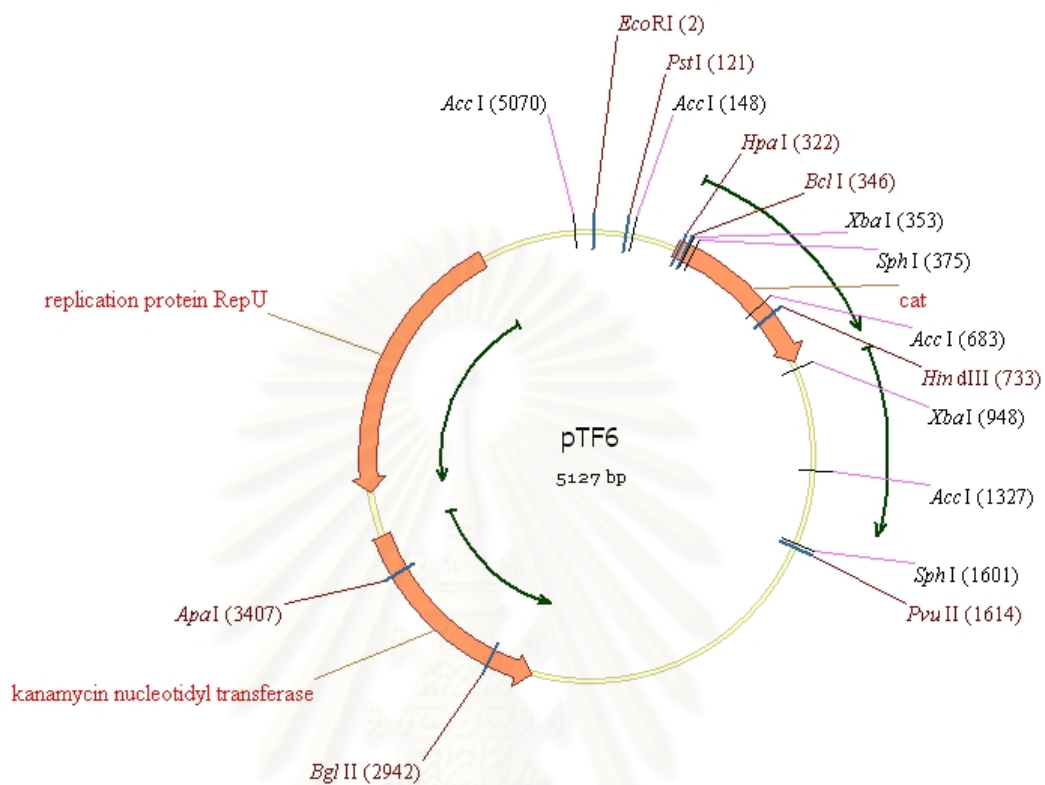
ภาคผนวก ค

1. แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pGEM-7Zf(+)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pTF6



3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *bgaB* ในพลาสมิด pTF6

- 1 GAATTCCCCTATATATTTGGTTGTTTTTAATTAAAAATATATATTTATTTAGTAAAATA
- 61 GTTGTGACAAATACTAAATTTTAACTTAATTTATAATTAAACGAAAATTAGGCTGCAGG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

SD

1 GGAGCAGTCTCCATGGGCACAACGCCGATTGACGAGAGGAACTATCATGCCCGGATCAG
 61 GGCTGACGCTACTAGCCAAAACCATCACCATCGCCGCAGCCACCGTGCTTGTGGGCAGCG
 121 GCGCTGCCATCCCGGCACAGGCCACCGGCAGCACGCCAGCTGACCCGAAGAAAGCCGCCG
 181 AAGTCAGCACCGTGACACAACGGCAACCTGCACACCTGGTGGCATGACAACGGGGTCTTCA
 241 ACACCGAAGGCCCCACCGGGGACAACGAGGTCCGCCGGTTCGTCCTTCTACGACGTCCAGG
 301 TTGCGCAGGCAACGCAGCCTGACAAGGCGTACGACGCGTTCACGTACATGAGCATCCCCA
 361 GGAGCGGGAAGGGCAAGATCGGCTACACCAAGGAGGACGGCGCCGAGTTCTCTCCAGG
 421 CGGGCCTGTCCATGAGCTGGGCCAGCTTCGAATATGCCAAGGACGTCTGGGTGGACGTCA
 481 ATCTCAAGACCGGCCAGACCATCACATCGGCCGACCAGGTCCAGATCCGGCCCAGCAGCT
 541 ACAACTTCGAAAAACAGCTCGTGGACGCGGACACCGTAAAGATCAAGGTGCCATACTCTG
 601 ACGCCGGATAACCGGTTCTCGGTGGAGTTCGAGCCGCAGCTGTACACGGCGTACAACGACA
 661 TGAGCGGCGACAGCGGCAAGCTCACCACCGAAGCCGAGGGCAACCGCGCCATCCACACTG
 721 AGCCTCGCAACTCGATGATGATCTTCGCCGAGCCCAAGCTCCGGGGCGAGCAGAAGGAGC
 781 GGCTGATTCCACGGAGGAGTCAGGCAGCATCCACTACCCGGCCGAAGGTGAGGTAACCA
 841 ACCTCAACACCGTTACCGAAGACATCATCTACTTCAAGCCCGGCACCTACAGCATGGGCT
 901 CGGACTACCATGCCGTCCTGCCGCCAACGTCAAGTGGGTGTATCTGGCCCCAGGCGCCT
 961 ACGTGAAGGGAGCCTTCCGGTTCTTCCACGACAACCAAAGCCAGTACAAGGTCACCGGCT
 1021 ATGGCGTCCTCTCCGGCGAGCAATACGTATAACGAGGCGGACACGAACAACGATTACAACC
 1081 ATCTCAGCGGGGCGTCCAACTGCCACTCATCGTGCGTGAAGATGCTGCAGTTCCGCTCAG
 1141 CCGACGCCGAGCAGAAGCTGGACCTGCAGGGCGTACCATCAATGAACCGCCCTACCACT
 1201 CGTTTGTGGTCTACGGGAACGAGCAGACCTTCCACATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGG
 1261 TGGGCAGCTGGTACTGGCAAACGGACGGCATCGAGCTGTACAAGGGCAGCAGCATGAAGA
 1321 ACACGTTCTTCAACTCCAACGACGACGTACTGAAGATGTACCACAGCGACGTCACCATTG
 1381 ATAACACCGTGATCTGGAAAAACGAGAACGGACCCGTGGTCCAGTGGGGCTGGACGCCAC
 1441 GGAACATCGACAACGTGAACGTCACCAACACCTCGGTCATCCACAACCGGATGTACTGGA
 1501 AGGACGTCAAGTACAACAACCTTGCATCTTCAATTCCTCCTCTCACTGGGAGGACATGGGAT
 1561 CCACCATCAAGGCGGACCCACCACCACGGTCAAGAACATGTCGTTTCGAAAACCTTCACGG
 1621 TTGAGGGCATGGCCAACTGCGCCATCCGCGTCTACGCCCTGTCCAACACCGAGAACATCA

1681 ACATCAAGAATCTCAAGATCGATAGCTGGAACGGACTCGACTGGACCTCCCAGGTCAGCC
 1741 ATCTCAAGCGCTACACCAACCCCGCCGGTGAAAAGGTGACCATCGGCAACGAGGTTCCCTG
 1801 CCGGCAACGGCCTTGCCCTGGAGAACTACTCGATAGGCGGCGAAGTAATCGAGAAATCTG
 1861 CAGGCAACTGGGCCGACTACCGGCTGGGCCGGCTTGGCTTCGACGGCGAGAAGTGGGACA
 1921 GCTGGAACCGCTTTAAGTCCACGCCCT**TAA**CGGACTGGGTTCCAACAGCGTCTCGGGGGG
 1981 CGGAAAGCCGAACAAAACGGCTGACCGCCCCCTTTGATCTCCGCTCAAGCGTCCCTACGG
 2041 AAAGGACCACCATGACCGTCAAGCCCGGCACGGCCAGCCATCTCATTGGCATCGACGTAG
 2101 GCGGAACCGGCATCAAAGGCGGCATTGTCAACGTCGCCTCCGGCACCCCTTGCTGGACCTT

ตัวอักษร ATG แสดงจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) ตัวอักษร TAA แสดงรหัส
 สิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอ
 ไทด์ที่อยู่ในกรอบแสดงบริเวณที่เป็น Shine-Dalgarno sequence (SD) ลำดับลำดับนิวคลี
 โอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่คาดว่าเป็น signal peptide

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วรรณพรรณ นาควัชร เกิดเมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ.2524 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2544 และเข้ารับการศึกษ ต่อในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย