บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์

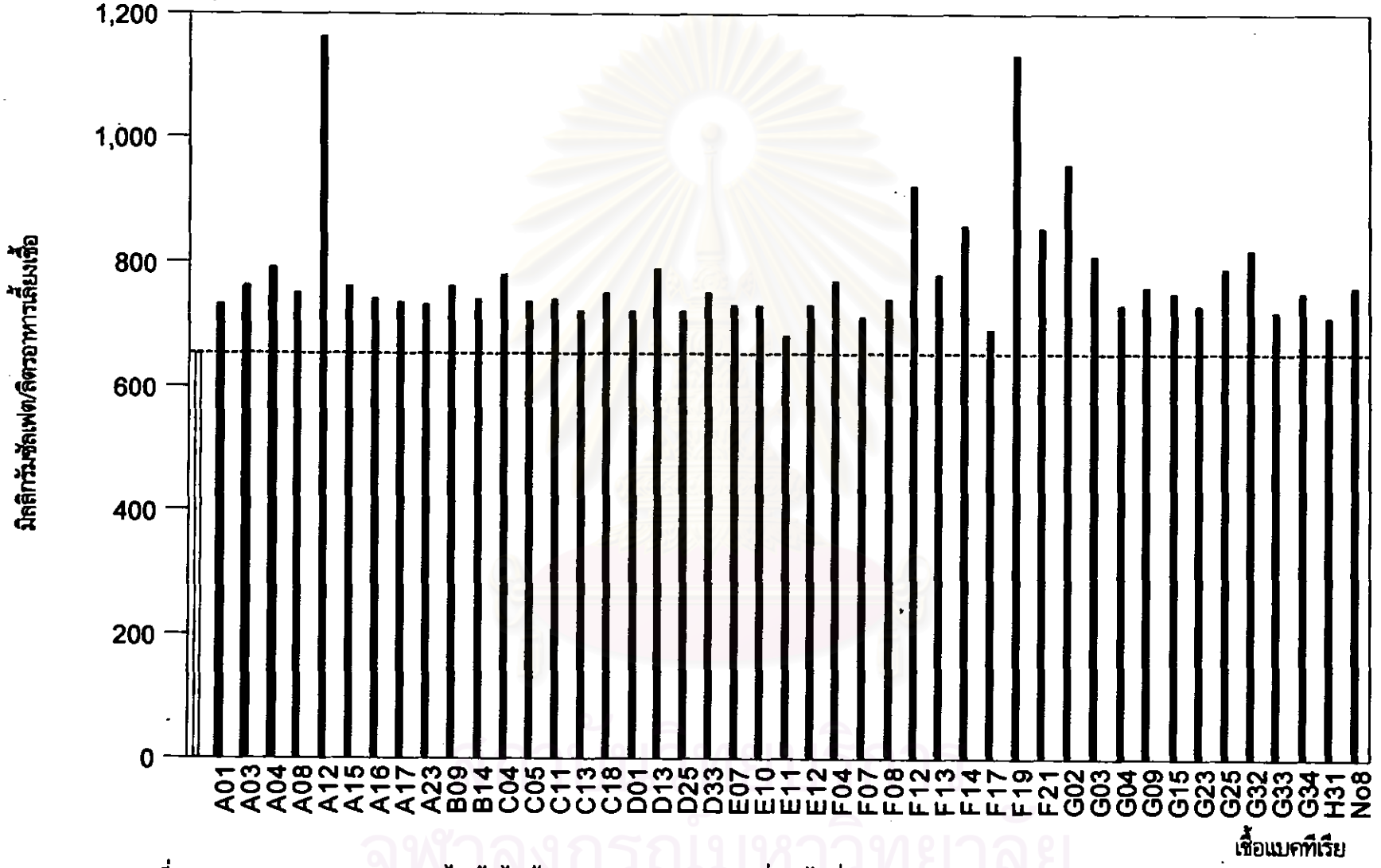
จากตัวอย่างดินจำนวน 66 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°ซ. สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 45 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไพไรต์ (FeS_2) ไปเป็นซัลเฟตได้มากกว่า 653 มก./ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นปริมาณซัลเฟตที่วิเคราะห์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ซัลเฟต (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ซึ่งยังไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (รูปที่ 3) และพบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟตได้มากกว่า 300 มก./ลิตร เมื่อหักลบปริมาณซัลเฟตที่มีอยู่เดิมในอาหารเลี้ยงออกไปแล้ว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างดิน ที่นำมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟตได้

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
ทางระบายน้ำเหมืองแม่เมาะ จ.ลำปาง	31
บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง	17
บ่อน้ำพุร้อนโป่งเดือด จ.เชียงราย	14
บ่อน้ำพุร้อนแม่ชะจาน จ.เชียงราย	4
รวม	66

ตารางที่ 2 แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟตมากกว่า 300 มก./ลิตร

สายพันธุ์	ที่มา	ปริมาณซัลเฟตที่เกิดขึ้น (มก./ลิตร)
A12	ทางระบายน้ำเหมืองแม่เมาะ จ.ลำปาง	510
F 19	บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง	490
GO2	บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง	310



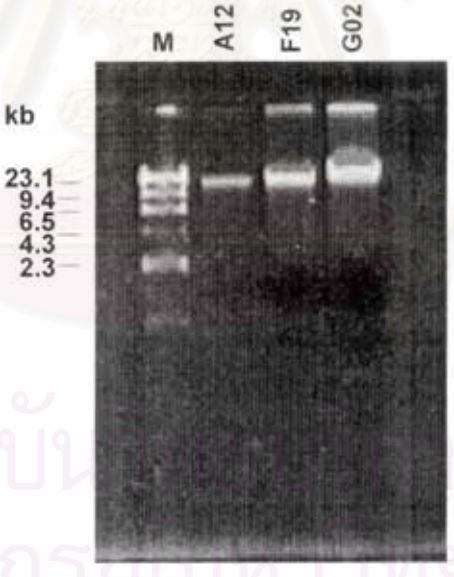
รูปที่ 3 แสดงประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

——— แสดงปริมาณของซัลเฟต 653 มิลลิกรัม / ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

▭ ปฏิกิริยาที่ไม่ปลูกเชื้อ

4.2 ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟต

สกัดแยกดีเอ็นเอรูปปลายปิด (covalently closed circular form) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟต จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 คือ สายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 ตามวิธีสกัดดีเอ็นเอในข้อ 3.3.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส โดยใช้ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาด ไม่พบพลาสมิดใด ๆ (รูปที่ 4) แสดงว่ายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลลพูรีเลสของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้นอยู่บนโครโมโซม



รูปที่ 4 แสดงผลการสกัดแยกดีเอ็นเอในรูปปลายปิด (covalently closed circular form) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2

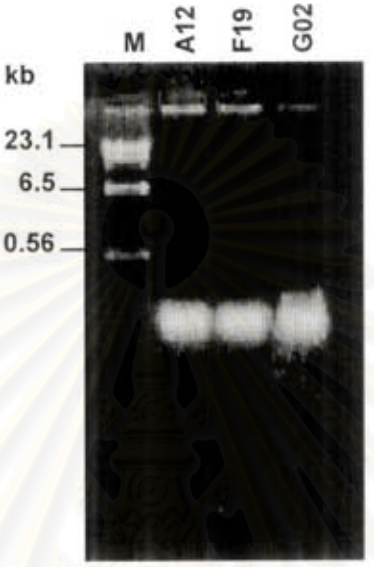
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ G02 เป็นแม่แบบ และใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นเป็นสายตั้งต้น

4.3.1 ผลการออกแบบและสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น 2 สาย

ออกแบบและสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นขนาด 26 เบส จำนวน 2 สาย จากบริเวณที่พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียกลุ่มดีโมลิโทโทรพที่เจริญอยู่บนเนื้อเยื่อโทรโปรโซมของหนอนใต้ทะเล *R.pachyptila* และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของ *Saccharomyces cerevisiae* มีความคล้ายคลึงกันสูง (Laue และ Nelson, 1994) โดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นสายที่ 1 มีลำดับเบสดังนี้คือ AACCCGATGCACCGCGCICACGAGGA และสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นสายที่ 2 มีลำดับเบสดังนี้คือ CGICCGATGATGAAGTG(G/C)GTIGCICC

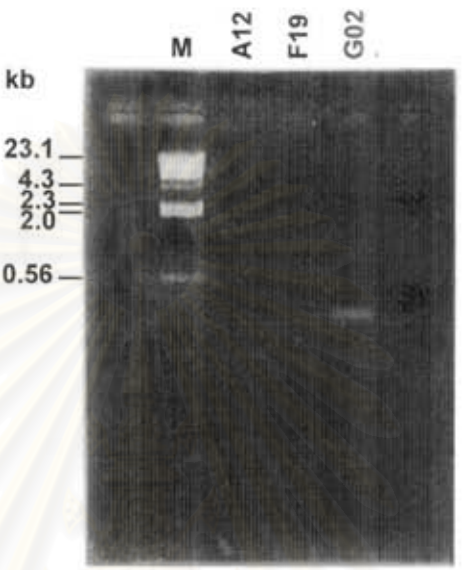
4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โคโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 ที่สกัดได้จากข้อ 4.2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จากข้อ 4.3.1 เป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ดังแสดงในรูปที่ 4ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพลิซิส ใช้ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบขนาด พบว่า ได้สายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 1 ชนิด (รูปที่ 5) ผลการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ออกจากเจลด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep-A-Gene สามารถแยกได้เฉพาะดีเอ็นเอชนิดที่ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 เป็นแม่แบบชนิดเดียวเท่านั้น (รูปที่ 6) ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกออกจากเจลได้นี้จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม เพื่อตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสจากธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ในขั้นตอนต่อไป เรียกชิ้นดีเอ็นเอติดตามที่ได้นี้ว่า ดีเอ็นเอติดตาม GO2



รูปที่ 5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น ในกระบวนการ Polymerase chain reaction.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ผลการแยกดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ Polymerase chain reaction เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบออกจากเจลโดยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep-A-Gene

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3. ผลการวิเคราะห์สมบัติของดีเอ็นเอติดตาม GO2

ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอติดตาม GO2 พบว่าดีเอ็นเอติดตาม GO2 มีขนาด 243 เบส และมีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 7 พบบริเวณเกาะของสายโอลิโกนิวโอไทด์ตั้งต้นในขั้นตอนการทำ Polymerase chain reaction ผลการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อหาจำนวนกรอบรหัส (open reading frame) และแผนที่เรสติกชัน พบว่าดีเอ็นเอติดตาม GO2 มีจำนวนกรอบรหัสของโปรตีน 3 กรอบรหัส ดังแสดงในรูปที่ 8 และมีแผนที่เรสตริกชันดังแสดงในรูปที่ 9

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AACCCGATGC	ACCGCGCGCA	CGAGGAGCCA	CCATIGCAATA	CCGTCAGNIC	50
GGCCGCACGG	ATGTGAAGGT	CAGCAGCCTC	TGCCTCGGCA	CCATGACCTG	100
GGGCGAGCAG	AACTCCCAGG	CCGAGGCATT	CGCCCAGATC	GAACGCGCCA	150
AGGCCTACGG	CATCAACTTC	ATGGACGTGG	CGGAGATGTA	CCCCGTCCCT	250
CCTCGCCCCG	AGACCTACGG	NGCCACCCAC	TTCATCATCG	GNCAAGCCGA	250

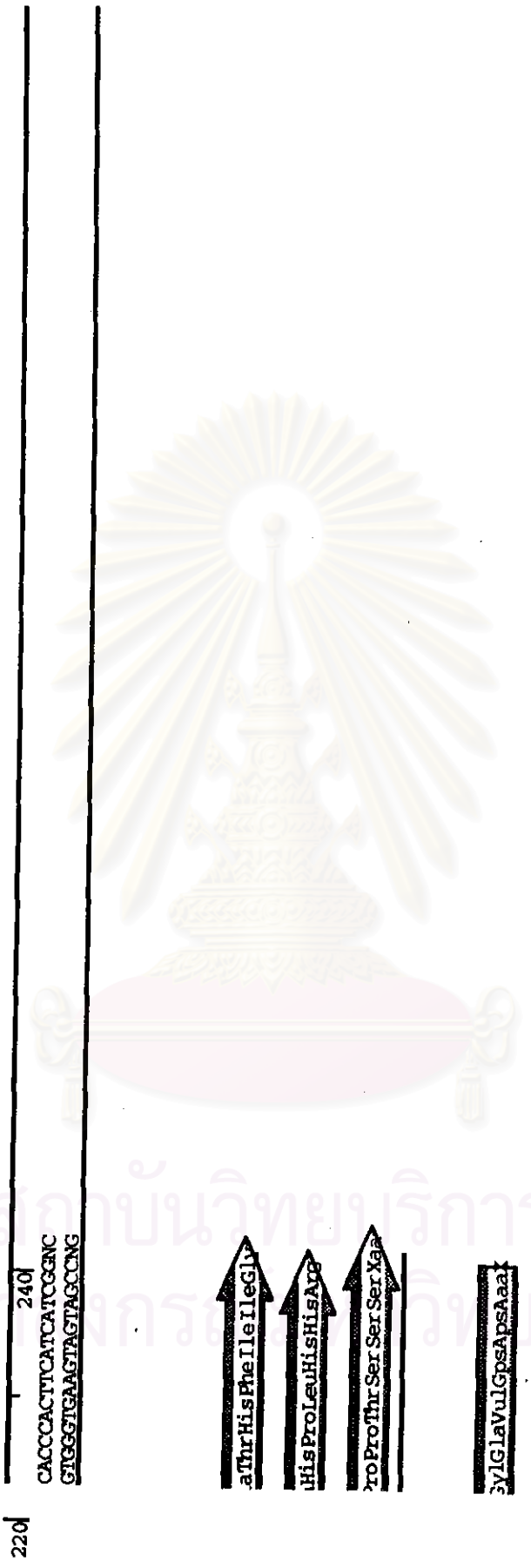
รูปที่ 7 ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอติดตาม GO2 บริเวณขีดเส้นใต้คือบริเวณเกาะของสายโอลิโกนิวโอไทด์ตั้งต้น

รูปที่ 8 กรอบรหัสของโปรตีนของดีเอ็นเอติดตาม GO2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

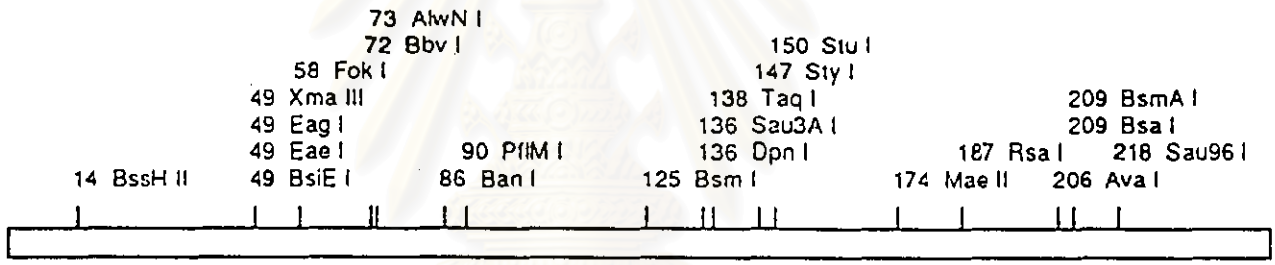
รูปที่ 8 (ต่อ) กรอบรหัสของโปรตีนของดีเอ็นเอติดตาม GO2

I 17134614



รูปที่ 8 (ต่อ) กรอบรหัสของโปรตีนของดีเอ็นเอดิดตาม GO2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



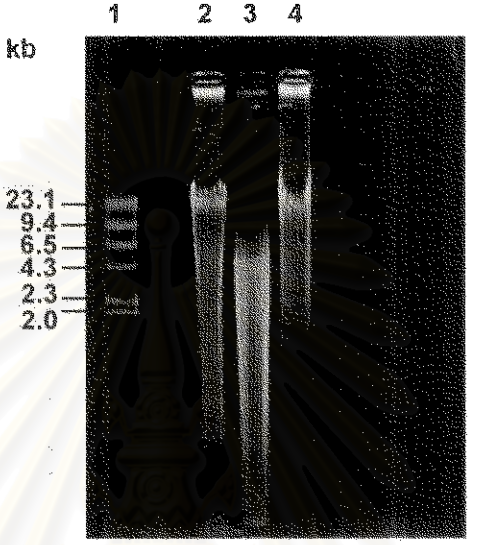
รูปที่ 9 แผนที่เรสตริกชั่นของดีเอ็นเอติดตาม GO2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

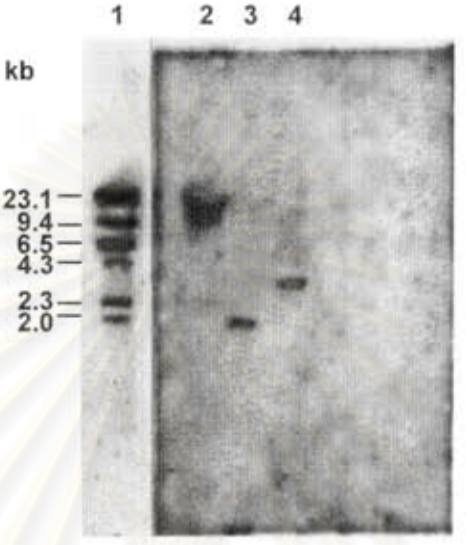
4.4 ผลการหาชนิดของเอนไซม์เรสตริกชันที่สามารถนำมาตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 แบบสมบูรณ์ได้ เพื่อใช้ในขั้นตอนการสร้างธนาคารยีน

ผลการนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.3.1 มาตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *EcoRI Pst* I และ *Bam* HI ตามวิธีในข้อ 3.7 และทำการวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสโดยใช้ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาด ได้สายดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กันมากมาย (ดังแสดงในรูปที่ 10) แต่เมื่อทำการย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากเจลที่ได้ข้างต้นมาไว้บนแผ่นเมมเบรนไนลอนโดยวิธี Southern -blot ตามวิธีในข้อ 3.11.2 แล้วทำการไฮบริไดซ์แผ่นเมมเบรนไนลอนที่ได้โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ได้จากข้อ 4.3 ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีตามวิธีในข้อ 3.11.1 เป็นดีเอ็นเอติดตามผลการตรวจหาสัญญาณการเกิดไฮบริดด้วยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟี ได้สัญญาการเกิดไฮบริดของแถบดีเอ็นเอขนาด 2 และ 3 กิโลเบส เมื่อโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I และ *Bam*HI ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 11) เลือกใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I อย่างสมบูรณ์ แล้วแยกเอาดีเอ็นเอที่ได้ขนาด 2 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep-A-Gene เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสร้างธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสเพื่อตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI *Pst* I และ *Bam* HI ฟาจแลมป์ดาดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน*Hind* IIIเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่องที่ 1) โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI (ช่องที่ 2) *Pst* I (ช่องที่ 3) และ *Bam* HI (ช่องที่ 4)



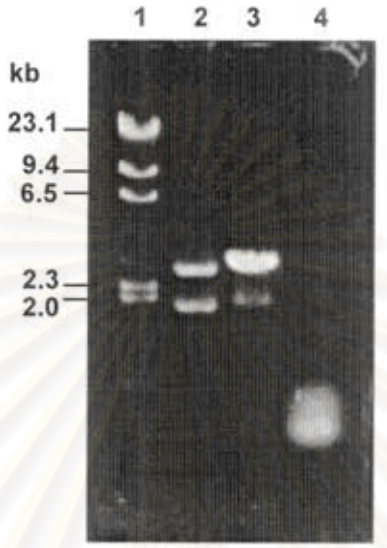
รูปที่ 11 ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Southern hybridization ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นอย่างสมบูรณ์ โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลาดด้วยสารปลอดรังสีเป็นดีเอ็นเอติดตาม ฟาจแลมบ์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบขนาด (ช่องที่ 1) โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสติกชั่น *Eco*RI(ช่องที่ 2) *Pst* I (ช่องที่ 3) และ*Bam* HI (ช่องที่ 4)

4.5 ผลการตรวจสอบสัญญาณการเกิดไฮบริดระหว่างพลาสมิดพาหะ pBlue scipt SK⁻ และ ดีเอ็นเอติดตาม GO2

พลาสมิดพาหะที่ใช้คือพลาสมิด pBlue scipt SK⁻ มีขนาด 2.961 กิโลเบส มียีนต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และมียีน *lac* Z ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ *B*-galactosidase มีบริเวณสอดแทรกยีนจากภายนอก (multiple cloning site) อยู่ภายในยีน *lac* Z ดังแสดงแผนที่เรสตริกชันของพลาสมิดพาหะนี้ในภาคผนวก ค. ดังนั้นจึงสามารถตรวจหาพลาสมิดลูกผสมของพลาสมิดพาหะที่ได้จากลักษณะโคโลนีสีขาวของเซลล์เจ้าบ้านที่รับเอาพลาสมิดพาหะนี้เข้าไป เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม IPTG เป็นสารเหนี่ยวนำและเติม X-gal เป็นสารตั้งต้นในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ *B*-galactosidase ผลการตรวจสอบสมบัติของพลาสมิดพาหะด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส พบว่าเมื่อไม่ตัดพลาสมิดพาหะด้วยเอนไซม์เรสติกชันใด ๆ ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 2.6 และ 1.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดพาหะรูปแบบต่าง ๆ (ดังแสดงในรูปที่ 12 ช่องที่ 2) และเมื่อตัดพลาสมิดพาหะด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2.9 กิโลเบส (ดังแสดงในรูปที่ 12 ช่องที่ 3) ผลการทำออโตเรดิโอกราฟฟีของ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดพาหะ โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีที่เตรียมได้จากข้อ 4.3.2 เป็นดีเอ็นเอติดตาม ไม่พบสัญญาณการเกิดไฮบริด (ดังแสดงในรูปที่ 13 ช่องที่ 2 และ 3) แสดงว่าพลาสมิดพาหะไม่สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม GO2 ได้ จึงสามารถใช้พลาสมิด pBlue script SK⁻ นี้ที่เป็นพลาสมิดพาหะในการสร้างธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 เพื่อการตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส ด้วยดีเอ็นเอติดตาม GO2 ได้

4.6 ผลการสร้างธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.3.1 มาตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I อย่างสมบูรณ์ แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 กิโลเบส ที่ได้ออกมาจากเจลด้วยชุดแยกยีน Prep-A-Gene แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pBlue script SK⁻ ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I และกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5′ ออกด้วย calf intestine alkaline phosphatase ตามวิธีในข้อ 3.9 การเชื่อมต่อใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ตามวิธีในข้อ 3.10.1 นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนซ์ *E. coli* XL-1 Blue ที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.2.1 โดยวิธีตามข้อ 3.10.2.2 ได้ทรานฟอร์แมนท์ที่ต้องการคือโคโลนีมีสีขาวเมื่อเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เติม IPTG เป็นสารเหนี่ยวนำและเติม X-gal เป็นสารตั้งต้นสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ *B*-galactosidase แสดงว่าเป็นโคโลนีที่รับเอาพลาสมิดลูกผสมเข้าไป ได้จำนวนโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ทั้งสิ้น 8,600 โคโลนี



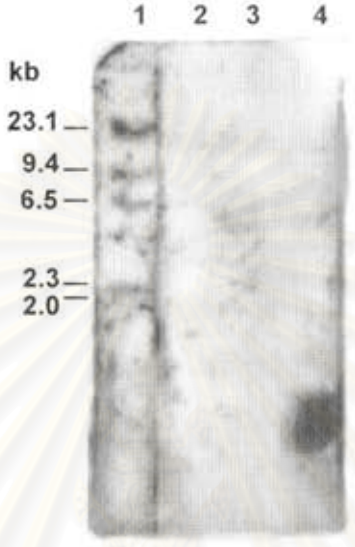
รูปที่ 12 ภาพอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ และดีเอ็นเอติดตาม GO2

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของฟาจแลมด้าตัดด้วยเอนไซม์เรสตริชัน *Hind* III

ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$

ช่องที่ 3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริชัน *Pst* I

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอติดตาม GO2



รูปที่ 13 ภาพออโตเรดิโอแกรมของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดพาหะ pBluescript SK⁻ ดีเอ็นเอติดตาม GO2

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของฟาจแลมด้าตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK⁻

ช่องที่ 3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK⁻ ตัดด้วยเอนไซม์เรสติกชัน *Pst* I

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอติดตาม GO2

4.7 ผลการตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสจากธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2

4.7.1 ผลการทำ Colony hybridization

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของทรานฟอร์แมนท์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal และลงบนผิวหน้าของแผ่นเมมเบรนไนลอนที่วางทับบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิมกับข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีทรานฟอร์แมนท์เจริญอยู่ที่ 4°ซ. ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนที่มีโคโลนีทรานฟอร์แมนท์มาทำ Colony hybridization ตามวิธีในข้อ 3. 11. 3 และ 3.11.6 โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีเป็นดีเอ็นเอติดตามผลการตรวจสอบสัญญาณของการเกิดไฮบริด พบว่าได้สัญญาณการเกิดไฮบริดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ 7 โคโลนี หมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/4 13/1 13/2 และ 13/2 ดังแสดงในรูปที่ 14

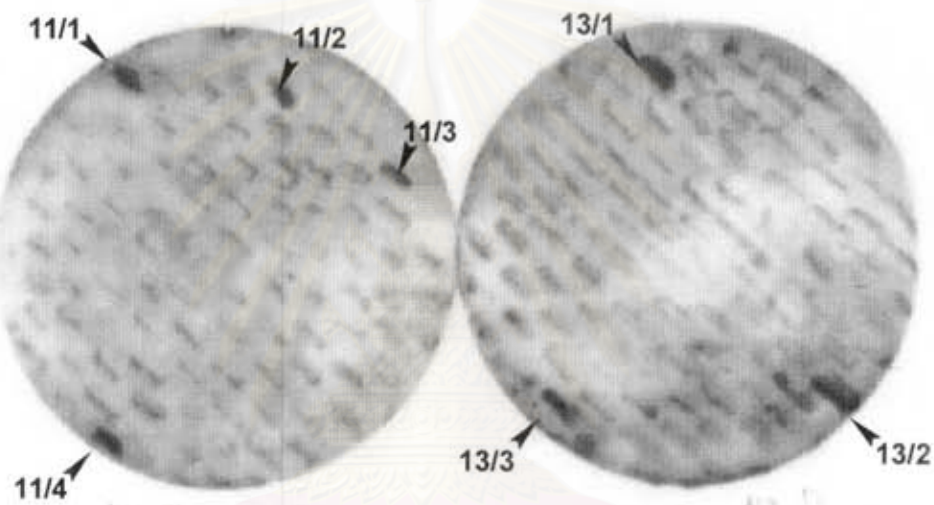
4.7.2 ผลการทำ Dot blot hybridization

นำโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ที่ได้จากข้อ 4.7.1 ทั้ง 7 โคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน(ภาคผนวก ข ข้อ 10) แล้วปลูกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม ทำการสกัดเอาพลาสมิดลูกผสมออกมาจากเซลล์ทรานฟอร์แมนท์ทั้ง 7 ที่ได้ในข้อ 4.7.1 แล้วนำมาทำ Dot blot hybridization ตามวิธีในข้อ 3.11.4 และ 3.11.6 โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีเป็นดีเอ็นเอติดตาม ดังแสดงในรูปที่ 15 ใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 เป็นตัวควบคุมให้ผลบวก (positive control) และใช้พลาสมิดพาหะ เป็นตัวควบคุมให้ผลลบ (negative control) พบว่าเฉพาะพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 เท่านั้นที่ให้สัญญาณการเกิดไฮบริด

4.7.3 ผลการทำ Southern hybridization

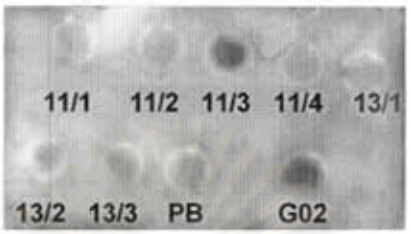
นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 มาตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst I* วิเคราะห์ผลโดยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส พบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert DNA) ขนาด 1.8 กิโลเบส ในพลาสมิดลูกผสม ดังแสดงในรูปที่ 16 นำเจลอะกาโรสที่ได้มาทำ Southern hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีเป็นดีเอ็นเอติดตาม ผลการทำออโตเรดิโอกราฟพบสัญญาณการเกิดไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจาก

โคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 และดีเอ็นเอติดตาม GO2 ดังแสดงในรูปที่ 17 แสดงว่าโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 มียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส

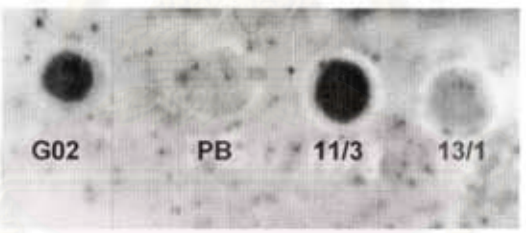


รูปที่ 14 ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Colony hybridization แสดงสัญญาณของการเกิดไฮบริดของโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ หมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/4 13/1 13/2 และ 13/3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



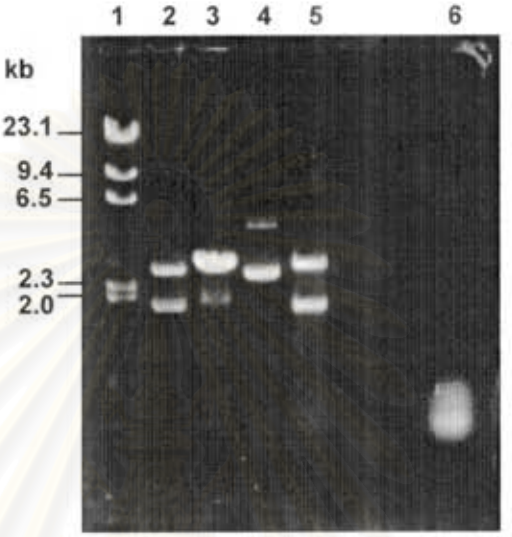
ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

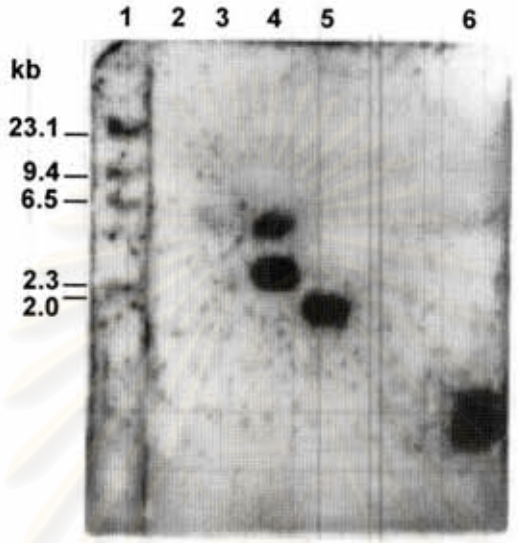
รูปที่ 15 ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Dot- blot hybridization

ก. พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/4 13/1 13/2 13/3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK^- (PB) และดีเอ็นเอติดตาม GO2

ข. พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 และ 13/1 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK^- (PB) และดีเอ็นเอติดตาม GO2



รูปที่ 16 ภาพอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์และดีเอ็นเอติดตาม GO2
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของฟาจแลมด้าตัดด้วยเอนไซม์เรสตริชัน *Hind* III
ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK^-
ช่องที่ 3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK^- ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริชัน *Pst* I
ช่องที่ 4 พลาสมิดลูกผสมสกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3
ช่องที่5 พลาสมิดลูกผสมสกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอติดตาม GO2



รูปที่ 17 ภาพออโตเรดิโอแกรมของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11 / 3 และดีเอ็นเอติดตาม GO2

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของฟาจแลมด้าตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK⁻

ช่องที่ 3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK⁻ ตัดด้วยเอนไซม์เรสติกชัน *Pst* I

ช่องที่ 4 พลาสมิดลูกผสมสกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3

ช่องที่ 5 พลาสมิดลูกผสมสกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอติดตาม GO2

4.8 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 ทางอนุกรมวิธานในระดับจีนัส

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดก์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต พบว่า ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ มีลักษณะกลม สีเหลืองใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 3-4 มม. ผลการนำเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 มาย้อมสีกรัมแล้วตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนติดสีแดงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียชนิดกรัมลบ ผลการนำเซลล์มาย้อมสีแบบ differential stain เพื่อศึกษาว่าเซลล์สร้างสปอร์หรือไม่ ไม่พบเอนโดสปอร์ (ตารางที่ 3) ตารางที่ 4 แสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมี

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
โคโลนีเจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์	กลม : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 มม. สีเหลืองใส
เซลล์ : รูปร่าง	ท่อนตรง
: ผลการย้อมสีกรัม	ติดสีแดง (Gram negative)
การเคลื่อนที่	**การเคลื่อนที่ได้**

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Characteristics)

ปฏิกิริยาที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ
การทดสอบคาตาเลส	+
การทดสอบออกซิเดส	+
การทดสอบ OF	Oxidation
การทดสอบ phemol red	+

หมายเหตุ - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ

\+ หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก