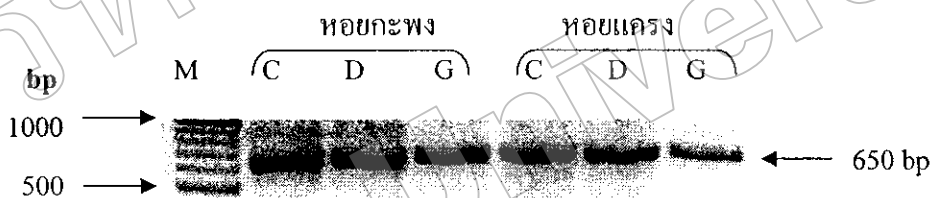


บทที่ 4 ผลการวิจัย

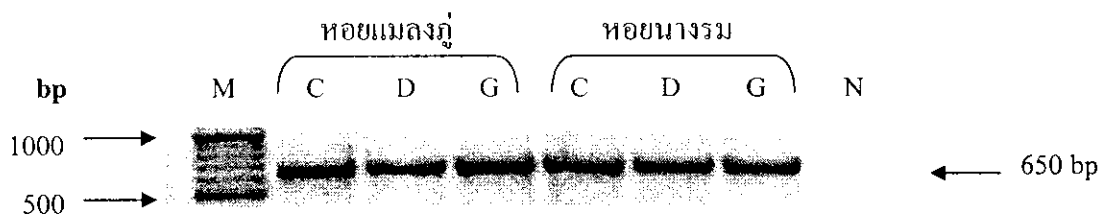
4.1 การตรวจหาอินที่สังเคราะห์เอนไซม์ย่อยเซลลูโลสจากหอยสองฝา

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของอินที่สังเคราะห์เบต้าแอกติน (internal control)

ภายหลังจากนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ของเนื้อเยื่อเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และคริสตัลลินสไตล์ของหอยแครง หอยแมลงภู่ หอยกะพง และหอยนางรมมาถอดรหัสแบบย้อนกลับให้เป็นซีดีเอ็นเอ โดยใช้ First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) ด้วย random primer และทำการเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะกับอินที่สังเคราะห์เบต้าแอกติน (mga_Actin-L และ mga_Actin-R) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาควบคุม พบแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมีขนาดประมาณ 650 bp ดังแสดงในภาพที่ 8 และภาพที่ 9



ภาพที่ 8 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณอินเบต้าแอกตินขนาดประมาณ 650 bp ได้จากปฏิกิริยาถอดรหัสโพลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (RT-PCR) ของหอยกะพงและหอยแครงที่เตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณ คริสตัลลินสไตล์ (C) ต่อมย่อยอาหาร (D) และเหงือก (G) หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 0.8% ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder Plus (M)

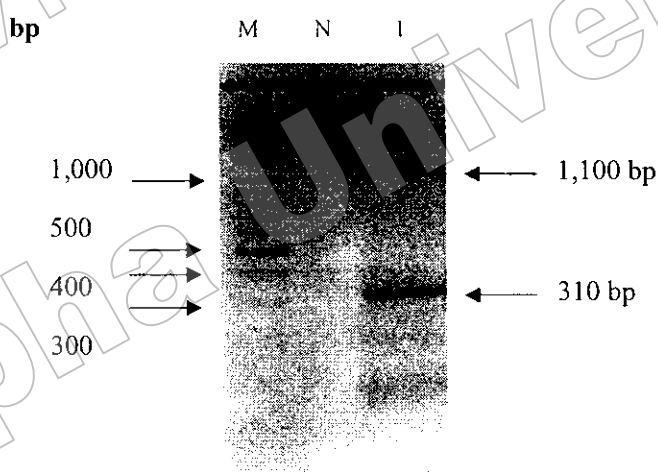


ภาพที่ 9 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณอินเบต้าแอกตินขนาดประมาณ 650 bp ได้จากปฏิกิริยาถอดรหัสโพลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (RT-PCR) ของหอยแมลงภู่และหอยนางรมที่เตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณ คริสตัลลินสไตล์ (C) ต่อมย่อยอาหาร (D) และเหงือก (G)

หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสความเข้มข้น 0.8% ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์เป็นเวลา 60 นาทีเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder Plus (M); N = negative control (เติม nuclease free water แทน cDNA)

4.1.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

การเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอบางส่วนของยีนที่สังเคราะห์เซลลูเลส เกิดจากการใช้อาร์เอ็นเอ และซีดีเอ็นเอ ในชุดทดลองเดียวกับยีนที่สังเคราะห์เบต้าแอกติน แต่เปลี่ยนคู่ไพรเมอร์เป็นยีนที่สังเคราะห์เซลลูเลส (GHF9_310-L และ GHF9_310-R) (Sakamoto et al., 2007) พบว่ามีเพียง cDNA บริเวณต่อมย่อยอาหารของหอยแครงเท่านั้นที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์มี 2 ขนาดคือประมาณ 1,100 คู่เบสและ 310 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 10 และได้ทำการตัดแถบดีเอ็นเอเฉพาะขนาด 310 คู่เบส เพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป เนื่องจากน่าจะมีความจำเพาะมากกว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส



ภาพที่ 10 ผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนบริเวณยีนเซลลูเลสด้วยคู่ไพรเมอร์ GHF9_310 จากต่อมย่อยอาหารของหอยแครง ภายหลังจากทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ความเข้มข้น 0.8% ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder Plus (M); N = negative control (เติม nuclease free water แทน cDNA)

4.1.3 การโคลนผลผลิตพีซีอาร์

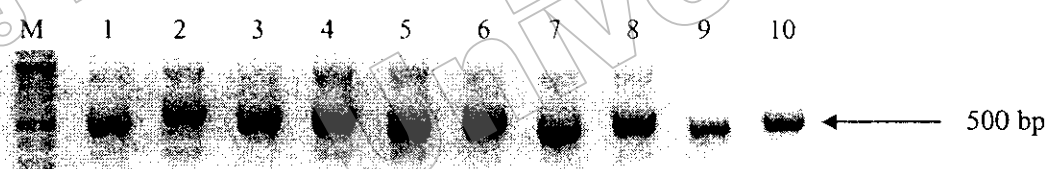
4.1.3.1 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์กับพลาสมิดเวกเตอร์ และการทรานส์ฟอร์มเมชัน

เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของเบต้าแอกตินของหอยแครงที่มีขนาดประมาณ 650 bp (จากภาพที่ 8) ผลผลิตจากยีนสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสที่มีขนาดประมาณ

310 (ภาพที่ 10) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pCR 2.1-TOPO ขนาด 3,931 bp พลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* TOP10F และนำไปเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน และ X-gal ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบโคโลนีสีขาวและสีขาวอมฟ้าซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมที่อาจได้รับการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอของเซลล์ลูเลส นำไปทำการตรวจสอบพลาสมิดต่อไป

4.1.3.2 การตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีนในพลาสมิดลูกผสม โดยวิธีพีซีอาร์

ผลการตรวจสอบ โคลนที่ได้รับชิ้นส่วนของยีน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse ในการทำพีซีอาร์ ซึ่งคู่ไพรเมอร์นี้จะให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์เพิ่มขึ้นจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าไปเชื่อมต่อกับเดิมประมาณ 200 คู่เบส ทั้งนี้ทำการตรวจสอบ โคลนแบบสุ่มของชิ้นส่วนของยีนที่สังเคราะห์เซลล์ลูเลสในพลาสมิดลูกผสมพบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 11 ส่วนการตรวจสอบโคลนที่ได้รับชิ้นส่วนของยีนที่สังเคราะห์เบต้าแอกติน (CA) พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ไม่ได้แสดงผล)



ภาพที่ 11 ผลผลิตพีซีอาร์จากการตรวจสอบโคลนที่มีส่วนของยีนเซลล์ลูเลสจากตัวอย่างต่อมย่อยอาหารของหอยแครง โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse จำนวน 10 ตัวอย่าง (1-10) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (M)

4.1.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส

4.1.4.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีนสังเคราะห์เบต้าแอกติน

เมื่อนำดีเอ็นเอจากพลาสมิดลูกผสมโดยสุ่มเฉพาะจากโคลนที่เตรียมจากเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแครงไปอ่านลำดับเบส โดยบริษัท First Base Laboratories SdnBhd (Malaysia) แล้วนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Bioedit พบว่า ในส่วนของยีนที่สังเคราะห์เบต้าแอกตินของหอยแครงมีขนาด 631 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสเปรียบเทียบกับความเหมือนกัมนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม blastn พบว่ามีความเหมือนสูงสุดกับเอ็มอาร์เอ็นเอของเบต้าแอกตินของหอยเมลงู Mediterranean

mussel (*Mytilus galloprovincialis*) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) เท่ากับ 89% เมื่อเปรียบเทียบกับ 568 คู่เบสและ 87% กับยีนเบต้าแอกตินของหอยเชลล์และหมีก ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสซีดีเอ็นเอของเบต้าแอกตินของหอยแครงจำนวน 631 คู่เบสกับสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ผลการวิเคราะห์ยีนในฐานข้อมูล GenBank	GenBank รหัสหมายเลข	จำนวนเบสที่เทียบเคียง	ความเหมือน (%)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Actin	AF157491	568/ 635	89
<i>Pecten maximus</i>	Actin	AF494455	555/ 636	87
<i>Octopoteuthis nielsenii</i>	Actin	AF234955	554/ 635	87

4.1.4.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสังเคราะห์เซลลูเลส

การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีนที่สังเคราะห์เซลลูเลสจากพลาสมิดถูกผสมที่ได้จากต่อมย่อยอาหารของหอยแครง พบว่ามีขนาด 235 bp และเปลี่ยนเป็นลำดับของกรดอะมิโน (โปรแกรม BCM search luncher) ได้จำนวน 78 กรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 12

```

1 TAT GAT GCG CGG GAT TAT GTC AAG TTT AAT CTT CCA ATG TCG TCT
  Y  D  A  R  D  Y  V  K  F  N  L  P  M  S  S
46 TCT ACA ACC GTT TTA TTG TGG GGT CTA ACA AAA TGG AAG GAT GGT
  S  T  T  V  L  L  W  G  L  T  K  W  K  D  G
91 TAT GAA GCT GCT GGA CAG TTG GAC ATG ATG TAT GAC ATG ATT AGG
  Y  E  A  A  G  Q  L  D  M  M  Y  D  M  I  R
136 TGG CCC TTG GAA TAT TTC TTA AAA TGT TGG AGA CCA CAA CAA CAA
  W  P  L  E  Y  F  L  K  C  W  R  P  Q  Q  Q
181 GAA TAT TAC GTA CAG GTA TCT ATA AGC AGA GTT GCA ACG AGG TTG
  E  Y  Y  V  Q  V  S  I  S  R  V  A  T  R  L
226 CCT GCG ACT A
  P  A  T
  
```

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (แถวบน) และกรดอะมิโน (แถวล่าง) ของเอนไซม์เซลลูเลสของหอยแครงจำนวน 253 คู่เบส

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนเป็นลำดับกรด

อะมิโนของยีนที่สังเคราะห์เซลลูเลสจากหอยแครงกับข้อมูลที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม tblastn พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุด (% homology) เท่ากับ 68% กับเอ็มอาร์เอ็นเอของ *CjCel9A* ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูเลสในหอยสองฝา *Corbicula japonica* (GenBank accession No. AB264777) ที่เปรียบเทียบกัน ได้จำนวน 67 กรดอะมิโน แสดงดังตารางที่ 2 และรายละเอียดผลของการเปรียบเทียบกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเช่น *Corbicula japonica* (AB264777), *Haliotis discus* (AB092978), *Biomphalaria glabrata* (AY651250), *Neotermes kosshunensis* (BAD12006), *Coptotermes formosanus* (AB058668), *Cherax quadricarinatus* (AF148497), *Arabidopsis thaliana* (AAC27459), *Oryza sativa* (BAB92772), *Phanerochaete chrysosporium* (AAM22492), *Cryptococcus neoformans* (AAW44965), uncultured bacterium from *Nasutitermes* (ABW39322), *Coptotermes lacteus symbiont* (BAC07551) และ *Aeromonas hydrophila* (BAF75999) ดังแสดงในภาพที่ 13 นอกจากนี้ยังสามารถนำผลการเปรียบเทียบนี้วิเคราะห์เพิ่มเติมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสจากหอยแครง (CDG4) กับเอนไซม์เซลลูเลสที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิด โดยพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสของหอยแครง (CDG4) ถูกจัดเข้ากลุ่มไว้กับเอนไซม์เซลลูเลสของหอย 3 ชนิดคือ *Corbicula japonica*, *Haliotis discus* และ *Biomphalaria glabrata* ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ถูกจัดไว้นอกกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 14

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากซีดีเอ็นเอของยีนเซลลูเลสของหอยแครงจำนวน 78 กรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม tblastn

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ผลการวิเคราะห์ยีนในฐานข้อมูล GenBank	Genbank รหัสหมายเลข	จำนวนกรดอะมิโนที่เทียบเคียง	ความเหมือน (%)
<i>Corbicula japonica</i>	Cellulase	AB264777	46/ 67	68
<i>Haliotis discus</i>	endo-1,4-beta D-glucanase 2	EF103351	46/ 71	64
<i>Biomphalaria glabrata</i>	beta-1,4-endoglucanase	AY651250	36/ 67	53

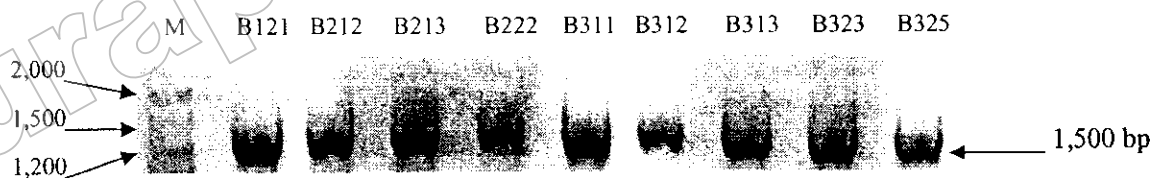
4.2 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับหอยแครงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA

4.2.1 การเพาะเลี้ยงและคัดเลือกแบคทีเรีย

หลังจากเจริญแบคทีเรียที่แยกได้จากต่อมย่อยอาหารของหอยแครงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ZoBell Agar ร่วมกับกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พบแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เป็นจำนวนมาก แต่สุ่มคัดแยกแบคทีเรีย โดยการสังเกตลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนจำนวน 23 โคโลนี ทั้งหมดนี้ถูกนำมาเจริญบนอาหาร Cellulose agar บนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันพบว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 12 โคโลนีจึงทำการแยกเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวเพื่อสกัดดีเอ็นเอต่อไป

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยง cellulose agar จำนวน 12 โคโลนีด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F/1492R ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 15, แสดงผลเพียง 9 ตัวอย่าง แต่ละช่องคือแบคทีเรียแต่ละโคโลนี) ภายหลังวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าสามารถอ่านได้ชัดเจนประมาณ 758-900 คู่เบส จากนั้นจึงเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละโคโลนีมีความเหมือนสูงสุดกับนิวคลีโอไทด์ของสกุล *Vibrio* เท่ากับ 99-84% ดังแสดงในตารางที่ 3

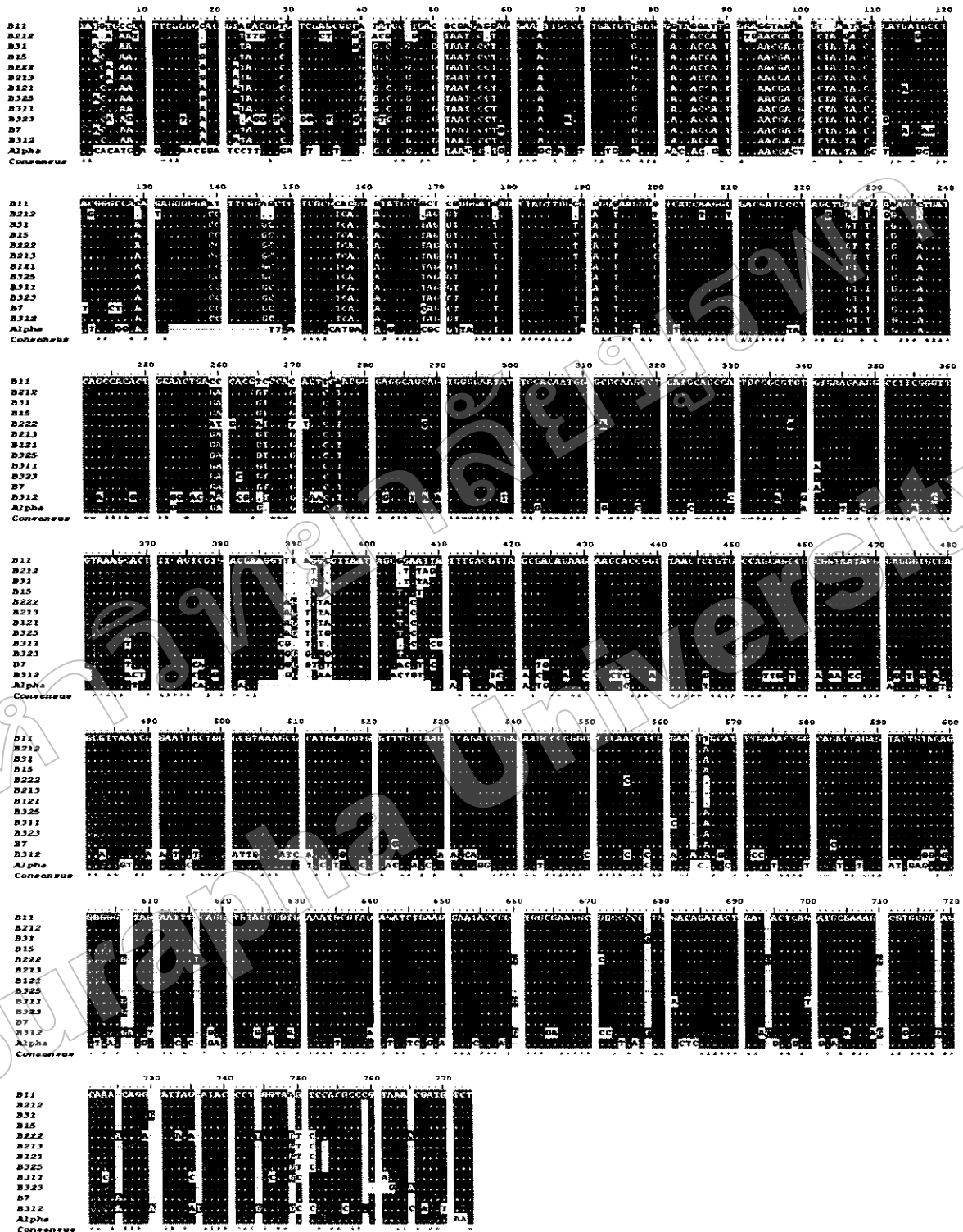


ภาพที่ 15 ผลผลิต PCR ของแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่เพิ่มจำนวนบริเวณยีน 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ภายหลังทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้น 0.8% ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder plus)

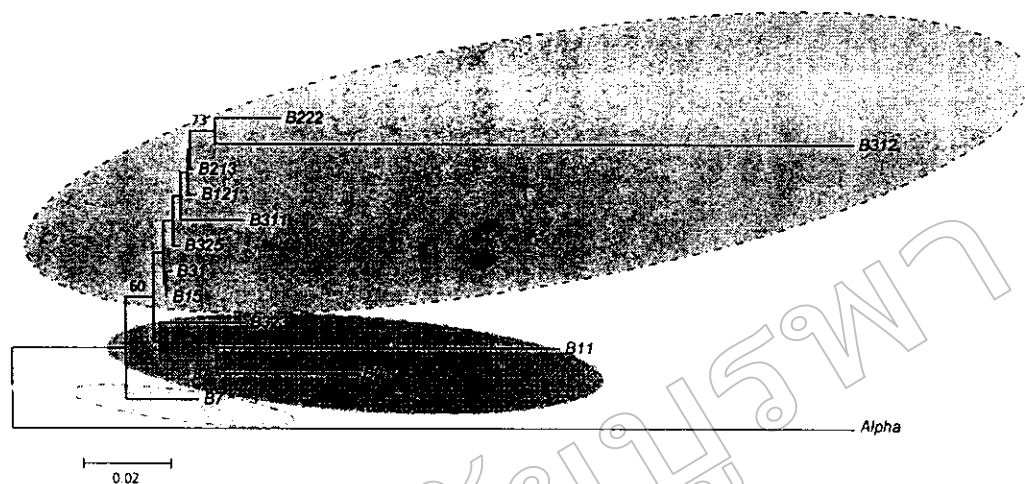
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับหอยแครงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank

รหัสแบคทีเรีย	ผลการวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rRNA	GenBank รหัสหมายเลข	จำนวนลำดับเบสที่เทียบเคียง	ความเหมือน (%)
B7	<i>Vibrio shilonii</i> strain VSS-012	FJ485944	886/ 899	98
B11	<i>Vibrio</i> sp. HN11	EU077544	683/ 751	90
B15	<i>Vibrio natriegens</i> strain WT01	FJ171336	882/ 890	99
B121	<i>Vibrio</i> sp. S428	FJ457593	890/ 892	99
B212	<i>Vibrio natriegens</i>	FJ171336	846/ 880	96
B213	<i>Vibrio</i> sp. KYJ 962	AY542526	886/ 893	99
B222	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DQ068942	864/ 907	95
B311	<i>Vibrio</i> sp. HS1	EU086102	858/ 891	96
B312	<i>Vibrio</i> sp. C22-B	EU563342	775/ 921	84
B31	<i>Vibrio</i> sp. Y4tang	EF187013	874/ 898	97
B323	<i>Vibrio</i> sp. CJ11052	AF500207	829/ 857	96
B325	<i>Vibrio pelagius</i>	X74722	890/ 894	99

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกออกจากต่อมย่อยอาหารของหอยแครงซึ่งบ่งชี้ได้เป็นสกุล *Vibrio* ทั้งหมดนั้นสามารถเทียบเคียงในตำแหน่งเดียวกันได้จำนวน 758 คู่เบสโดยใช้โปรแกรม ClustalX ซึ่งผลจากการเทียบเคียงพบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 โคลอนีนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน (ภาพที่ 16) และเมื่อนำผลการเปรียบเทียบนี้วิเคราะห์เพิ่มเติมโดยสร้างแผนภูมิกวามสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่จำแนกได้โดยใช้ *Alpha proteobacterium* (accession no. DQ097263) เป็น out group พบว่าสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ทั้ง 12 สายพันธุ์นี้ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 17 คือ 1) B222, B312, B311, B213, B121, B311, B325, B31 และ B15, 2) B323, B11 และ B212, และ 3) B7



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบคทีเรียสกุล *Vibrio* จำนวน 12 สายพันธุ์ที่แยกจากต่อมย่อยอาหารหอยแครง
 หมายเหตุ สัญลักษณ์เส้นประ (-) แสดงไม่มีลำดับเบสในตำแหน่งนั้น จุด (.) แสดงลำดับเบสที่เหมือนกันแต่ละไว้ในที่นี้ ส่วนตัวเลขด้านบนแสดงตำแหน่งลำดับเบสของตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบกัน



ภาพที่ 17 แผนภูมิความสัมพันธ์ของลำดับเบส 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. จำนวน 12 สายพันธุ์ที่แยกได้จากต่อมย่อยอาหารของหอยแครง โดยใช้ *Alpha proteobacterium* (accession no. DQ097263, *Alpha*) เป็น outgroup สร้างแผนภูมิด้วยโปรแกรม MEGA4.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) จากการ bootstrap ข้อมูล 1,000 ครั้งและแสดงค่ามากกว่า 50%