การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี

Screening and identification of acrylamide – degrading bacteria from domestic wastewaters in Chonburi province

อุทุมพร ธัญญเจริญ

UTHUMPORN THANYACHAROEN

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โครงงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อโครงงานวิจัย	การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี
ชื่อนิสิต	นางสาวอุทุมพร ธัญญเจริญ
รหัสนิสิต	47031602
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช
ปีการศึกษา	2550

คณะกรรมการการสอบได้พิจารณาโครงการวิจัยฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....ประธานกรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา
(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

.....กรรมการ
(ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

.....กรรมการ
(ผศ.ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร)

ภาควิชาชีวเคมีอนุมัติรับโครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....ผู้รักษาราชการแทนหัวหน้าภาควิชาชีวเคมี
(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)
วันที่...../...../.....

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อโครงงานวิจัย	การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี
ชื่อนิสิต	นางสาวอุทุมพร ธัญญเจริญ
รหัสนิสิต	47031602
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

อะคริลาไมด์เป็นสารที่มีพิษต่อระบบประสาทและมีแนวโน้มที่จะเป็นสารก่อมะเร็ง สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักปนเปื้อนมาจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและระหว่างกระบวนการให้ความร้อนของอาหารจำพวกแป้งจากพืช ในการศึกษานี้สนใจที่จะคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี จากการเลี้ยงบำรุงตัวอย่างน้ำทิ้งในอาหารเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 3 ไอโซเลท เมื่อนำมาสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1,060 คู่เบส ทำการโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pUC118 และวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้กับฐานข้อมูลโลก รวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ พบว่าไอโซเลทที่ 1 จัดอยู่ในแบคทีเรียสกุล *Enterococcus faecalis* ขณะที่ไอโซเลทที่ 2 และ 3 จัดอยู่ในแบคทีเรียสกุล *Klebsiella pneumoniae*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

PROJECT TITLE	Screening and identification of acrylamide – degrading bacteria from domestic wastewaters in Chonburi province
NAME	Miss Uthumporn Thanyacharoen
STUDENT NUMBER	47031602
PROGRAM	Bachelor of Science (Biochemistry)
ADVISOR	Jittima Charoenpanich, Ph.D.
ACADEMIC YEAR	2007

Abstract

Acrylamide, a neurotoxin and suspected carcinogen, is typically found in nature as contaminant in industrial processes and during the heating of plant-starch food. In this study, we focused on screening and identification of acrylamide – degrading bacteria from domestic wastewaters in Chonburi province. The wastewater samples were cultivated in minimal medium containing acrylamide as a sole carbon and nitrogen sources. Three isolates that showed different morphological characteristics were found. Their chromosomal DNAs were extracted and the 16S rRNA genes were PCR amplified, which gave the PCR products about 1,060 bp. After that the PCR products were cloned into a cloning vector, pUC118 and used as templates for nucleotide sequencing. Homology searching and phylogenetic analysis showed that the acrylamide-degrading bacterium isolate 1 belongs to *Enterococcus faecalis* whereas isolate 2 and 3 belong to *Klebsiella pneumoniae.*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยทางชีวเคมีฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี ต้องขอกราบขอบพระคุณ ดร.จิตติมา เจริญพานิช ภาควิชาชีวเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาแนะนำแนวทางและให้ข้อคิดต่างๆ ทั้งในภาคทฤษฎี และปฏิบัติด้วยความเอาใจใส่เสมอ แม้กระทั่งในการไปเก็บตัวอย่างที่ยากลำบาก รวมถึงช่วยแก้ไขโครงการวิจัยฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและประทับใจเป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข ภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณามาเป็นกรรมการ และได้อบรมสั่งสอนในด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย รวมทั้งให้คำแนะนำแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการ และให้คำแนะนำแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ผู้ซึ่งอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ต่างๆ ทั้งในด้านการเรียน และการดำเนินชีวิต รวมถึงคอยดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2550 สำหรับค่าใช้จ่ายในเรื่องสารเคมีของโครงการวิจัยฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่คอยเป็นกำลังใจ และอบรมสั่งสอนมาตลอดจนลูกคนนี้ประสบความสำเร็จ รวมทั้งขอบใจน้องสาวที่คอยเป็นห่วง และให้กำลังใจ

ขอขอบพระคุณพี่ปรีดาวรรณ สาลี ที่คอยดูแลเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนภาควิชาชีวเคมีรุ่นที่ 7 ทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กันมาโดยตลอด

อุทุมพร ธัญญเจริญ

1 กุมภาพันธ์ 2551

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

		หน้า
ปกใน		ก
หน้าอนุมัติ		ข
บทคัดย่อภาษาไทย		ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ง
ประกาศคุณูปการ		จ
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญรูปภาพ		ญ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	2
	1.3 สมมติฐานของการทดลอง	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง	2
	1.5 ขอบเขตของการทดลอง	2
2	ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	2.1 ทฤษฎี	4
	2.1.1 อะคริลาไมด์	4
	2.1.2 จุลินทรีย์สลายอะคริลาไมด์	5
	2.1.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	9
	2.1.4 ชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA	10
	2.1.5 ปฏิกิริยาพีซีอาร์	12
	2.1.6 อิเล็กโตรโฟเรซิส	14
	2.1.7 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	16
	2.1.8 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม	17
	2.1.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ	18
	2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	25
	3.1 วัสดุ และอุปกรณ์	25
	3.2 สารเคมี	26
	3.3 วิธีการทดลอง	30
	3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์	30
	3.3.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA	30
	3.3.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ	35
4	ผลการทดลอง	36
	4.1 การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์	36
	4.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้	36
	4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์	40
	4.4 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	40
	4.5 การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	43
	4.6 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	43
	4.7 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์	47
	4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โลก	47
	4.9 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ	47
5	อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	55
	5.1 อภิปรายผลการทดลอง	55
	5.2 สรุปผลการทดลอง	58
	5.3 ข้อเสนอแนะ	59
เอกสารอ้างอิง		60
ภาคผนวก		64
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี		65
ภาคผนวก ข พลาสมิด pUC118		70

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ..... 71

ภาคผนวก ง รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing profile)..... 72

ภาคผนวก จ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก.... 78

ภาคผนวก ฉ การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA..... 95

ภาคผนวก ช การจัดจำพวกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA..... 101

ประวัติย่อของนิสิต..... 113

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ผลการตรวจการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในอาหารในประเทศสวีเดน โดยสำนักงานอาหารแห่งชาติสวีเดน..... 7

4-1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำคลองและแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนในจังหวัดชลบุรี..... 37

4-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร, อัตราส่วน A_{260}/A_{280} และความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้..... 38

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	โครงสร้างทางเคมีของอะคริลาไมด์	6
2-2	กลไกการสลายอะคริลาไมด์ที่มีความเป็นไปได้ทางชีวภาพ	8
2-3	ยีน 16S rRNA	11
2-4	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	13
2-5	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยวิธีของ Sanger	19
2-6	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยวิธีของ Maxam-Gilbert	21
4-1	โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท	39
4-2	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA	41
4-3	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	42
4-4	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และพลาสมิด pUC 118 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII	44
4-5	พลาสมิดสายผสมที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มปฏิกิริยาเชื่อมผสมของ pUC118 และชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท	45
4-6	ผลการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI กับ *Hin*dIII	46
4-7	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้พลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ	48
4-8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1	49
4-9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2	50
4-10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3	51
4-11	แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้	52
4-12	แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้	53
4-13	แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้	54

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อะคริลาไมด์ (acrylamide) เป็นสารประกอบคาร์บอนสามอะตอม ที่ประกอบด้วยหมู่เอไมด์และพันธะโอเลฟินไม่อิ่มตัวชนิด α และ β (α,-β unsaturated olefin) ความเป็นพิษของอะคริลาไมด์ส่งผลต่อหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) บนโปรตีน (Bergmark *et al*., 1991) อะคริลาไมด์เป็นสารที่มีพิษต่อระบบประสาท (Tilson *et al*., 1979) และมีแนวโน้มที่จะเป็นสารก่อมะเร็ง (Segerback *et al*., 1995 และ Tareke *et al*., 2000) อะคริลาไมด์สามารถพบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และถูกใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นสารที่ช่วยในการพอลิเมอร์ไรส์ การทำให้แข็ง และใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย จากการใช้ประโยชน์ของอะคริลาไมด์อย่างแพร่หลาย ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ที่ปล่อยมาจากกระบวนการอุตสาหกรรมทั้งในดิน และสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ (Cherry *et al*., 1956 และ Prasad, 1982)

เมื่อเร็วๆนี้ มีการค้นพบการก่อตัวของอะคริลาไมด์ในอาหารจำพวกแป้งที่ได้จากพืชภายหลังผ่านกระบวนการปรุงแต่งที่ต้องการอุณหภูมิสูง เช่น การทอดและการอบ (Tareke *et al*., 2000, และ Tareke *et al*., 2002) โดยก่อนผ่านกระบวนการปรุงแต่ง อาหารเหล่านี้จะมีอะคริลาไมด์ปนเปื้อนในระดับที่ตรวจสอบไม่ได้และจะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นถึง 2.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายหลังกระบวนการปรุงแต่ง (Svesson *et al*., 2003) การก่อตัวของอะคริลาไมด์เชื่อว่ามาจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างกรดอะมิโนแอสพาราจีน (asparagine) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) หรือน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) ระหว่างกระบวนการปรุงแต่ง (Gökmen and Hamide, 2007, Mottram *et al*., 2002 และ Stadler *et al*., 2002)

จากอดีตถึงปัจจุบันมีการรายงานพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถใช้สารพิษของอะคริลาไมด์ในรูปแบบโมเลกุลเดี่ยวเป็นแหล่งเดียวของคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญ (Nawaz *et al*., 1993, Nawaz *et al*., 1994a, Shanker *et al*., 1990, Wang *et al*., 2001 และ Zabaznaya *et al*., 1998) โดยพบว่าขั้นตอนแรกของการสลายเกิดจากปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น (deamination) ของเอนไซม์ดีอะมิเดส (deamidase) เปลี่ยนอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิก (acrylic acid) หรือที่รู้จักในชื่อ อะคริเลต (acrylate) (Nawaz *et al*., 1998, Nawaz *et al*., 1994b, Shanker *et al*., 1990 และ Zabaznaya *et al*., 1998) จากนั้นอะคริเลตจะถูกสลายต่อโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายอะคริเลตที่มีเองในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ หรือเซลล์ตรึงในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรมและการอาหาร เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัด รวดเร็ว และเชื่อว่าไม่เกิดผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กระทบภายหลัง จากความต้องการเหล่านี้ทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีเป้าหมายที่จะคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่สามารถสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสะสมของคราบน้ำมันที่ได้จากการปรุงแต่งอาหารโดยใช้ความร้อน เนื่องจากเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการก่อรูปของอะคริลาไมด์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการกำจัดสารพิษตกค้างของอะคริลาไมด์ที่เกิดจากกระบวนการอุตสาหกรรมและกระบวนการปรุงแต่งอาหารต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

1. เนื่องจากแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนเป็นบริเวณที่มีการสะสมของคราบน้ำมัน ที่ได้จากการทอดอาหาร ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ จึงน่าจะตรวจพบแบคทีเรียที่สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้

2. ไพรเมอร์สากลทั่วไปสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ที่เตรียมได้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก จะสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่คัดแยกได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปศึกษากระบวนการสลายอะคริลาไมด์ เพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสลาย สำหรับประยุกต์ใช้ในกระบวนการกำจัดสารพิษตกค้างของอะคริลาไมด์ที่เกิดจากกระบวนการอุตสาหกรรมและการปรุงแต่งอาหาร รวมทั้งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพสำหรับกระบวนการผลิตกรดอะคริลิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.5 ขอบเขตของการทดลอง

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งเดียวของคาร์บอนและพลังงานจากตัวอย่างน้ำคลองและแหล่งน้ำทิ้งของชุมชน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณที่มีคราบน้ำมันสำหรับการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ทำโดยการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียแล้วเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เตรียมได้เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะแล้วเคลื่อนสู่เซลล์ให้อาศัย คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 อะคริลาไมด์ (SUBSTANCE PROFILES, 1991)

อะคริลาไมด์เป็นของแข็งโมเลกุลเดี่ยวที่มีสีอ่อนจนถึงสีขาวเกิดในรูปผลึก ที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมทานอล เอทานอล ไดเมทิลเอสเตอร์ และอะซิโตน แต่ไม่ละลายในเบนซีน และเฮปเทน จุดหลอมเหลวของอะคริลาไมด์อยู่ที่อุณหภูมิ 84 ถึง 85 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ผลึกอะคริลาไมด์โมเลกุลเดี่ยวเป็นตะกอนที่มีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 98 และร้อยละ 95 ครึ่งหนึ่งของอะคริลาไมด์ที่พบมักจะอยู่ในรูปที่เป็นสารละลาย คุณสมบัติในการเป็นโมเลกุลเดี่ยวของอะคริลาไมด์ทำให้สะดวกในการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชั่น (polymerization) ที่จุดหลอมเหลว หรือภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต อะคริลาไมด์ที่เป็นของแข็งจะมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง แต่จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่นอย่างรุนแรงเมื่อถูกหลอมเหลว หรือรวมอยู่กับสารออกซิไดส์ (oxidizing agent)

จากการศึกษาโครงสร้างของอะคริลาไมด์ที่ผ่านมาพบว่า เป็นสารประกอบคาร์บอนสามอะตอม ประเภทอะลิฟาติกเอไมด์ (aliphatic amide) (Tilson and Cabe, 1979) ซึ่งประกอบด้วยหมู่เอไมด์ และพันธะโอเลฟินไม่อิ่มตัวชนิด α และ β ดังแสดงในรูปที่ 2-1 โดยอะคริลาไมด์นิยมใช้เป็นสารตัวกลางทางเคมีในการผลิต และการสังเคราะห์โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถดัดแปลงคุณสมบัติเป็นนอนไอออนิก (nonionic) แอนไอออนิก (anionic) หรือแคทไอออนิก (cationic) สำหรับการนำไปใช้ในความจำเพาะที่ต่างกัน โดยอะคริลาไมด์จะใช้เติมสำหรับการบำบัดน้ำเสีย เพิ่มการนำกลับคืนของน้ำมัน การทำให้เป็นปุย การทำกระดาษ การทำหนา และการกำจัดสิ่งโสโครก จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ทั้งในดิน และน้ำที่พบในธรรมชาติ

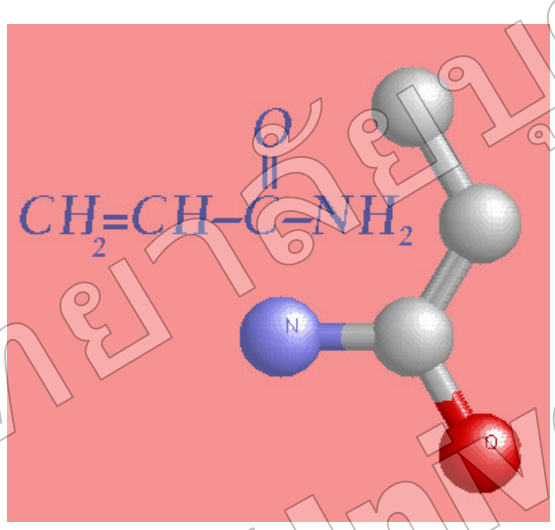
มีเหตุผลยืนยันที่คาดว่าอะคริลาไมด์จะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งได้มีการทดลองในสัตว์ทดลอง เช่น หนู โดยให้หนูดื่มน้ำ แล้ววิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของอะคริลาไมด์ด้วย ฟีโอโครโมไซโทแมส (pheochromocytomas) และมีโซทีลิโอแมส (mesotheliomas) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอะคริลาไมด์จริง และเมื่อเร็วๆ นี้ มีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮ-เดรทที่ได้จากพืช โดยเฉพาะมันฝรั่งทอดกรอบหรือมันฝรั่งชิ้นทอด ซึ่งเป็นอาหารหลักของชาวยุโรปและอเมริกา ผลจากการตรวจสอบอาหารในประเทศสวีเดนพบการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในอาหารหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2-1 สารอะคริลาไมด์นี้เป็นตัวการที่ทำให้ยีนเปลี่ยนรูปนำไปสู่การเป็นโรคมะเร็งหลายชนิด และยังเป็นพิษต่อระบบประสาทอีกด้วย สารอะคริลาไมด์ไม่ได้ถูกตรวจพบเฉพาะในกระบวนผลิตอาหารเท่านั้นยังสามารถพบได้ในน้ำดื่มด้วย เนื่องจากสารอะคริลาไมด์ที่อยู่ในรูปของ

โพลีเมอร์ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษได้ถูกนำมาใช้ผลิตเป็นไส้กรองเพื่อนำเอาสารที่ไม่ต้องการออกจากน้ำดื่ม ด้วยเหตุนี้ทางสหภาพยุโรปจึงได้กำหนดมาตรฐานความปลอดภัยว่า ต้องมีสารอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้นไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อน้ำดื่ม 1 ลิตร และอาหารบางชนิดสหภาพยุโรปได้กำหนดให้ระดับของอะคริลาไมด์ที่ปนเปื้อนสู่อาหารต้องไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

2.1.2 จุลินทรีย์สลายอะคริลาไมด์ (Nawaz *et al*., 1998)

จุลินทรีย์ทั่วไปสามารถย่อยสลายสารพวกอะลิฟาติกเอไมด์และอะโรมาติกเอไมด์ (aromatic amide) แต่ไม่สามารถย่อยสลายอะคริลาไมด์ได้ เนื่องจากอะคริลาไมด์มีผลเป็นตัวยับยั้งหมู่ซัลไฮดริลของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์ที่สามารถสลายอะคริลาไมด์จะใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญ โดยมีรายงานพบจุลินทรีย์สลายอะคริลาไมด์ได้ทั้งในแหล่งน้ำและดิน เช่น *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus rhodocrhous* J1 และ *Pseudomonas chlororaphis* B23 เป็นต้น การศึกษาทั้งหมดนับถึงปัจจุบันพบว่าในขั้นต้นของการสลายอะคริลาไมด์จะเกิดปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่นเปลี่ยนอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกหรือที่รู้จักในชื่อ อะคริเลต ส่วนการใช้ประโยชน์ของอะคริเลตต่อไปในแบคทีเรียพวกที่ใช้อะคริลาไมด์ยังไม่มีรายละเอียดแน่ชัด มีการศึกษาลักษณะเฉพาะในแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสลายอะคริเลตและต้องการออกซิเจน พบว่าเมแทบอลิซึมของอะคริเลตเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรซิเลชั่น (hydroxylation) เป็นเบตา-ไฮดรอกซีโพไพโอเนต (β-hydroxypropionate) ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) เป็นโพรไพโอเนต ความแตกต่างของการใช้ประโยชน์ของอะคริเลตภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน *Clostridium propionicum* คือสามารถเกิดการหมักอะคริเลตเป็นอะซิเตต (acetate) และโพรไพโอเนต (propionate) นอกจากนี้ยังพบว่าอะคริเลตเป็นตัวรับอิเล็กตอนตัวสุดท้ายของ *Desulfovibrio acrylicus* ส่วนโพไพโอเนตที่ผลิตขึ้นจะไม่ถูกเมแทบอไลส์ต่อไปเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการเจริญ และส่วนสกัดเซลล์ของ *C. Propionicum* แสดงการเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชั่นที่หมู่ข้างของแล็กเตสเป็นอะคริเลต แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของปฏิกิริยาย้อนกลับในกระบวนการสลายอะคริเลต (Wampler and Ensign, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของอะคริลาไมด์

(ที่มา: http://www.stami.no/IPS?module=Articles;action=Artic... สืบค้นเมื่อ 28/08/2550)

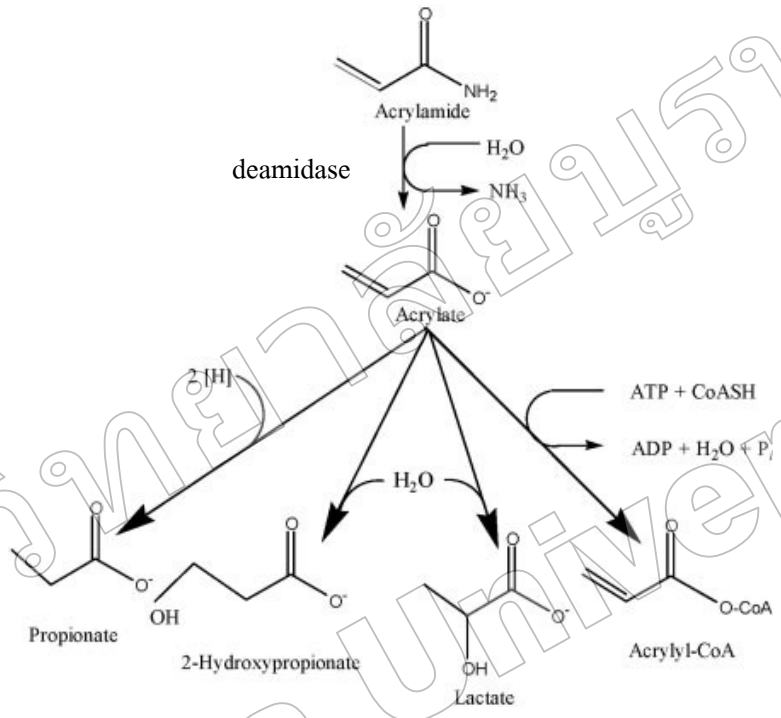
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 ผลการตรวจการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในอาหารในประเทศสวีเดน โดยสำนักงานอาหารแห่งชาติสวีเดน (Swedish National Food Administration: SNFA)

กลุ่มอาหารที่ตรวจ	ปริมาณอะคริลาไมด์ที่พบ (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)		จำนวนตัวอย่าง
	ค่ามัธยฐาน	ค่าต่ำสุด-สูงสุด	
มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ	1200	330-2300	14
มันฝรั่งชิ้นทอด	450	300-1100	9
บิสกิตและขนมปังแคร็คเกอร์	410	<30-650	14
ขนมปังกรอบ	140	<30-1900	21
ธัญพืชที่ใช้เป็นอาหารเช้า	160	<30-1400	15
ข้าวโพดแผ่นกรอบ	150	120-180	3
ขนมปังนุ่ม	50	<30-160	20
อาหารทอดอื่นๆ เช่น พิซซ่า แพนเค้ก วัฟเฟิล	40	<30-60	9

(ที่มา: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=285 สืบค้นเมื่อ 12/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-2 กลไกการสลายอะคริลาไมด์ที่มีความเป็นไปได้ทางชีวภาพ

(ที่มา: Wampler and Ensign, 2005)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548)

การจำแนกประเภทจุลินทรีย์มีการจัดลำดับอย่างเป็นระบบ ซึ่งจำเป็นจะต้องทราบลักษณะของจุลินทรีย์ก่อน โดยบอกถึงความสัมพันธ์ และความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างๆ ตามทฤษฎีวิวัฒนาการของชาร์ลส์ ดาร์วิน ซึ่งกล่าวว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะต่างๆ คล้ายกันเป็นผลเนื่องจากสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ดังนั้นการจัดสิ่งมีชีวิตเป็นหมวดหมู่ จึงแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยทั่วไปลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกชนิด ได้แก่

2.1.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)

จะทำการศึกษาจากเชื้อบริสุทธิ์ โดยการพิจารณาจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากแต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมากในระดับเป็นไมโครเมตร ในการศึกษาจึงต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ 1,000 เท่า และยังต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ให้รายละเอียดมากขึ้น อย่างไรก็ตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ไม่ได้บอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากนัก แต่อาจใช้ในการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียได้ เช่น โครงสร้างของเอนโดสปอร์ (endospore) หรือ แฟลกเจลลา (flagella)

2.1.3.2 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical composition)

เซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่แตกต่างกันมากมาย เช่น การมีลิโพพอลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งไม่สามารถพบได้ในแบคทีเรียแกรมบวก หรือในแบคทีเรียแกรมบวกที่มีกรดไทโคอิก (teichoic acid) ที่ผนังเซลล์ ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น

2.1.3.3 ลักษณะของการเลี้ยงเซลล์ (Cultural characterization)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารในการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น บางชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ บางชนิดเลี้ยงในอาหารที่มีสารอนินทรีย์เท่านั้น แต่บางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล พิริมิดีน วิตามิน และโคเอนไซม์ เป็นต้น

จุลินทรีย์ย่อมมีความต้องการสภาพแวดล้อมในการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น สภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ และก๊าซก็มีความจำเป็น เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่บางชนิดไม่จำเป็นต้องใช้ นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดยังมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีการกระจายมาก หรือตกตะกอนที่ก้นหลอด หรือเป็นฟิล์มบางๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ส่วนในอาหารแข็งจะเจริญเป็นโคโลนีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันของขนาด รูปร่างลักษณะ เนื้อ ความหนืด และสี

2.1.3.4 ลักษณะของเมแทบอลิซึม (Metabolic characterization)

เมแทบอลิซึม (metabolism) คือ ปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดกระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์ ปฏิกิริยานี้จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์บางชนิดต้องใช้พลังงานจากแสง หรือบาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชนิดใช้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ นอกจากนี้วิถีในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ก็แตกต่างกัน

2.1.3.5 ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic characterization)

สารพันธุกรรมในเซลล์จะมีลักษณะคงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อย จึงนำมาช่วยในการจำแนกจุลินทรีย์ได้โดยศึกษาจาก

- องค์ประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยคู่ของเบส คือ กวานีน (guanine, G) คู่กับไซโตซีน (cytosine, C) และ อะดีนีน (adenine, A) คู่กับไทมีน (thymine, T) ซึ่งจำนวนของเบสนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอจะคิดเป็นร้อยละของกวานีนกับไซโทซีนรวมกันที่เรียกว่า โมล% G+C (mol% G+C) ที่จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ตั้งแต่ร้อยละ 23 ถึง 75

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ในสายดีเอ็นเอ

เป็นหลักเกณฑ์ที่สำคัญที่สุดในการจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอมีความจำเพาะในจุลินทรีย์แต่ละชนิด

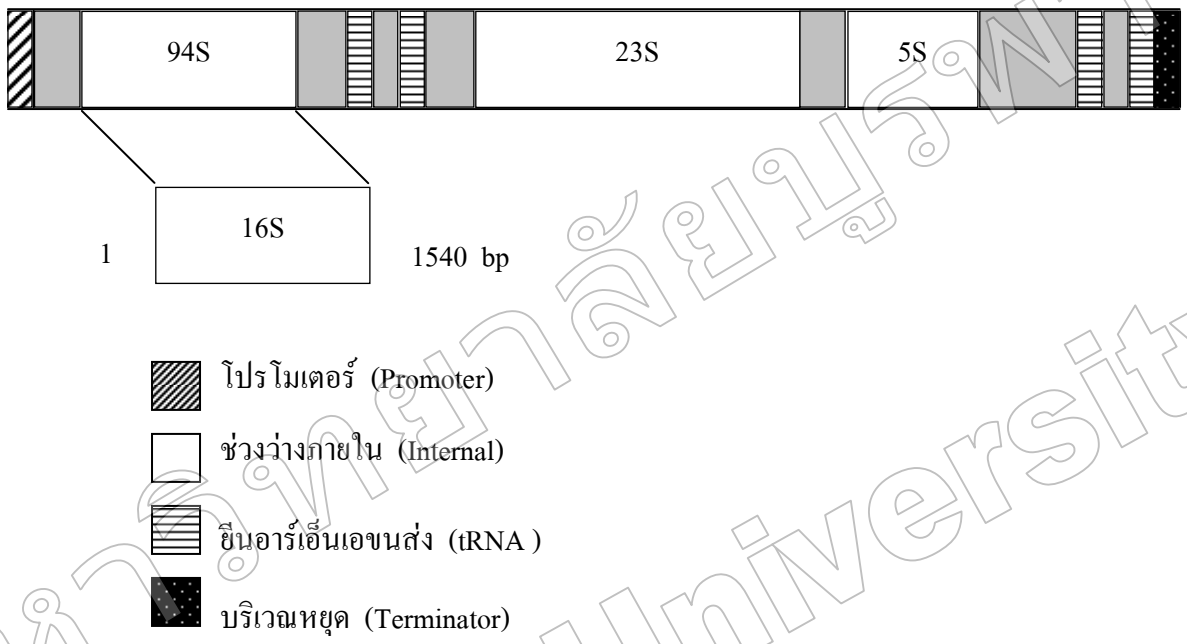
2.1.2.6 ลักษณะทางนิเวศวิทยา (Ecological characterization)

ถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์มีความสำคัญในการบอกลักษณะของจุลินทรีย์นั้นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถอยู่อย่างกระจายทั่วไปในธรรมชาติ แต่บางชนิดจะจำกัดที่อยู่ในบางบริเวณเท่านั้น

2.1.4 ชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA (http://www.thaiscience.com/lab_vol/p23/PCR-DGGE.asp สืบค้นเมื่อ 06/01/2551)

ชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA เป็นช่วงสายดีเอ็นเอที่มีรหัสสำหรับการสร้างไรโบโซมพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด เปรียบเหมือนยีนลายเซ็น (signature gene) ที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของสายดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2-3 โดยส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ยีน 16S rRNA จะมีช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสช่วงนั้นเหมือนกันในทุกแบคทีเรีย ในขณะเดียวกันยีน 16S rRNA ก็มีช่วงของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและ ช่วงที่แตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ดังนี้คือ ช่วงที่เหมือนกันจะนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) และการที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จึงสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้มาใช้ออกแบบเป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) สำหรับใช้เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียทุกชนิดได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-3 ยีน 16S rRNA มีส่วนที่เหมือนกันและส่วนที่ต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ส่วนที่เหมือนกันสามารถนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
(ดัดแปลงจาก http://www.thaiscience.com/lab_vol/p23/PCR-DGGE.asp สืบค้นเมื่อ 06/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่วนของความแตกต่างของสายดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียแต่ละชนิด สามารถนำมาใช้ตรวจสอบว่า แบคทีเรียชนิดนั้นจัดอยู่ในกลุ่มใดเมื่อเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) หรือ http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp จากประโยชน์หรือข้อได้เปรียบของยีน 16S rRNA ที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้การกำหนดความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มแบคทีเรีย การจัดจำแนกเป็นชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียสามารถศึกษาได้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีน 16S rRNA

2.1.5 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ชนิตรา ธุวจิตต์, 2548)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ ง่ายและรวดเร็วและทำได้ภายในหลอดทดลอง หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นการเลียนแบบกระบวนการทางธรรมชาติที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนการแบ่งเซลล์ คือ การจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (replication) ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาที่เกิดซ้ำๆ กัน หลายๆรอบ โดยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ใช้จะเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวด้วยความร้อน เมื่ออุณหภูมิลดลงไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบ จะเข้ามาจับที่ตำแหน่งเบสคู่สม ทำให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phophodiester bond) เติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ (3′–end) ของไพรเมอร์ ได้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ โดยในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน คือ

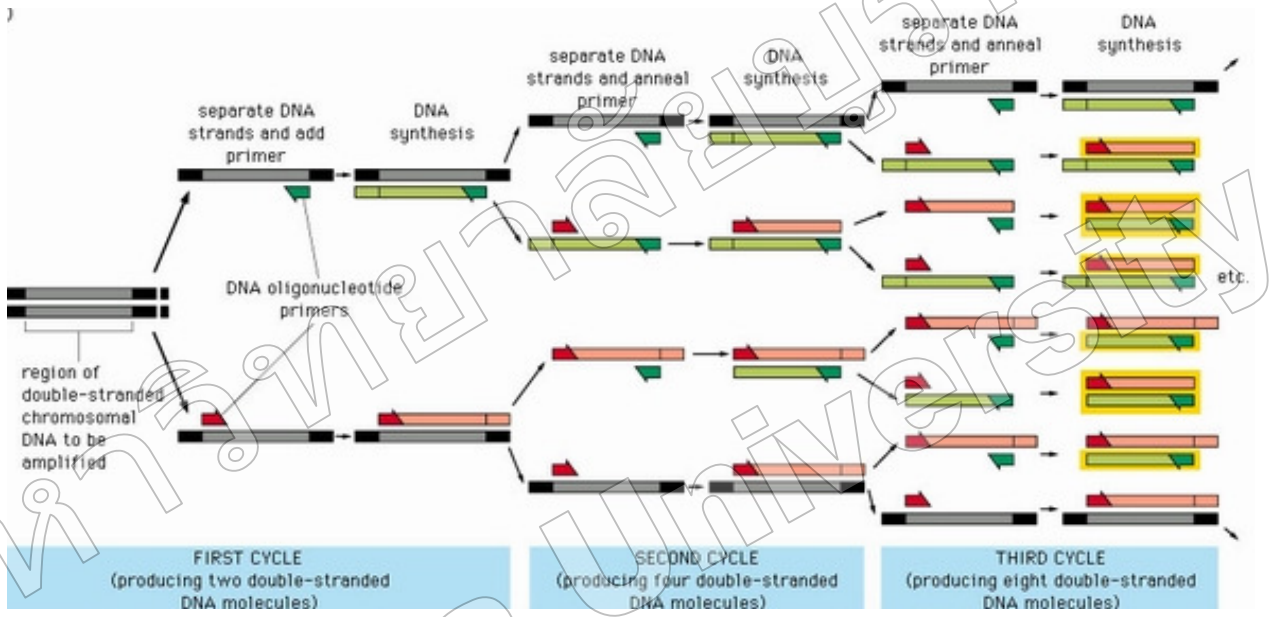
1. การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) ขั้นตอนนี้เป็นการทำลายโครงสร้างสายคู่ของดีเอ็นเอโดยใช้ความร้อนสูง นิยมทำที่อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นแม่แบบให้ไพรเมอร์เข้าจับได้ในขั้นตอนต่อไป

2. การเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing) เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้ามาจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองเส้น ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อลดอุณหภูมิของระบบลงมาที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส อาจมากหรือน้อยกว่านี้ได้ ขึ้นอยู่กับความยาวและจำนวนเบส G และ C ของไพรเมอร์ แต่เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบ และมีปริมาณที่มากกว่า จึงจับคู่กับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ก่อน โดยจะเกาะที่ตำแหน่งที่เป็นคู่สมกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ

3. การต่อสายดีเอ็นเอ (Extension) เป็นขั้นตอนการเติมนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจากปลาย 3′ ของไพรเมอร์ทั้งสองออกไป ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นในทิศ 5′ ไป 3′ หลังจากที่ปล่อยให้เอนไซม์ทำงานได้ช่วงเวลาหนึ่ง ปฏิกิริยาจะกลับไปเริ่มต้นที่ขั้นตอนแรกใหม่และทำซ้ำๆ กันไปอย่างนี้ประมาณ 30 - 40 รอบก็จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาในจำนวนที่มากพอ

จากรูปที่ 2-4 จะเห็นว่าเมื่อครบ 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายคู่ชุดใหม่จำนวน 2 คู่ ซึ่งเมื่อถูกความร้อนจากขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอในรอบถัดไป ดีเอ็นเอสายคู่สองชุดนี้จะแยกเป็นดีเอ็นเอสาย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-4 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

(ที่มา: http://www.student.chula.ac.th/~49371019/polymerase_chain_reaction.htm สืบค้นเมื่อ 09/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เดี่ยว 4 เส้น และเมื่อลดอุณหภูมิลง ไพรเมอร์ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมากจะเข้ามาจับดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทำให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเร่งปฏิกิริยาการต่อสายนิวคลีโอไทด์ จนเกิดดีเอ็นเอสายคู่ชุดใหม่จำนวน 4 คู่ เมื่อครบรอบที่ 3 จะได้ดีเอ็นเอสายคู่เท่ากับ 8 คู่ จำนวนการเพิ่มดีเอ็นเอจะเป็นแบบทวีคูณ ในปริมาณเท่ากับ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ต้องการองค์ประกอบที่สำคัญ คือ

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ มักจะอยู่ในรูปของดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งสกัดมาจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ หรืออาจเป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) ที่ได้จากการถอดรหัสจากสายอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA)

2. นิวคลีโอไทด์ในรูปดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotide triphosphate) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP, และdTTP เรียกรวมๆ ว่า dNTPs ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

3. ไพรเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ปลาย 3′ (3′–OH) ไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ มักมีขนาดประมาณ 18 ถึง 30 นิวคลีโอไทด์ และสังเคราะห์ได้โดยปฏิกิริยาเคมี

4. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งปลาย 3′–OH ของดีเอ็นเอ ด้วยการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549)

2.1.6 อิเล็กโตรโฟเรซีส (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549)

อิเล็กโตรโฟเรซีส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีประจุบนโมเลกุลในสนามไฟฟ้า โดยการเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้ามด้วยความเร็วไม่เท่ากัน กล่าวคือ โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าบวก (anode) โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าลบ (cathode)

โดยทั่วไปการทำอิเล็กโตรโฟเรซีส มักจะใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage; V) ที่คงที่ ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงจะทำให้โมเลกุลสารเคลื่อนได้เร็วกว่าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ เนื่องจากความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็นตัวกำหนดกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซีส แต่การใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปมักทำให้เกิดความร้อนสูงขึ้นด้วย ส่งผลต่อความคมชัดของแถบการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ความร้อนที่สูงขึ้นทำให้ความหนืดของบัฟเฟอร์ลดลง และความต้านทานไฟฟ้าลดลงในขณะที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ กระแสไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเป็นผลให้บัฟเฟอร์ระเหยออกจากตัวกลางได้ ซึ่งมีผลต่อการแยกทำให้ได้แถบซ้อนกัน และอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจทำให้โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกเสียสภาพธรรมชาติได้ นอกจากนี้ค่าความแรงไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ก็มีผลต่อความคมชัดของแถบโมเลกุลเช่นเดียวกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.6.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการพื้นฐานที่ว่า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก ผ่านตัวกลางคือเจล ตัวกลางที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ อะกาโรส (agarose) ที่แยกได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เป็นสายพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่ประกอบด้วย กาแล็กโตส (galactose) และอนุพันธ์ของกาแล็กโตส โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลอิสระของน้ำตาลกาแล็กโตส ทำให้สายอะกาโรสพับไขว้กันได้ เป็นสาเหตุให้อะกาโรสในสารละลายเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นรูพรุน

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ มีดังนี้ (วาสนา ศิริรังสี, 2539)

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสภาวะเดียวกันดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างต่างกัน (แม้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน) ภายใต้สภาวะเดียวกันจะเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความเร็วที่ต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเกลียว (superhelical circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) ซึ่งเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular)

3. ความเข้มข้นของเจล เจลที่มีความเข้มข้นสูง จะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่เจลที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และเมื่อความเข้มข้นของเจลคงที่ ระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลจะแปรผกผันกับจำนวนคู่นิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ

4. กระแสไฟฟ้า เป็นตัวผลักดันให้ดีเอ็นเอมีการเคลื่อนที่ ทั้งนี้ความต้านทานของตัวกลางจะแปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง ตลอดจนปริมาณประจุในบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่าความต่างศักย์ที่พอเหมาะ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นจะแปรผันตรงกับปริมาณความต่างศักย์ แต่ถ้าความต่างศักย์สูงเกินไป ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอลดลง ดังนั้นเพื่อให้แยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 2 กิโลเบสได้ดีควรใช้ความต่างศักย์ไม่เกิน 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร

5. ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์สำหรับการทำอิเล็กโตรโฟเรซีส บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ตามส่วนประกอบของประจุและความแรงไอออน เมื่อไม่มีไอออน (กรณีใส่บัฟเฟอร์ไม่ท่วมแผ่นเจล) การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นน้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่เลย แต่ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนสูง เช่นในกรณีเกิดการผิดพลาดใช้บัฟเฟอร์ 10X แทน การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นอย่างมาก ทำให้เกิดความร้อนจนกระทั่งเจลละลาย และทำลายดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสมี 2 ชนิด คือ

1. บัฟเฟอร์ TAE (Tris-acetate และ EDTA) นิยมใช้ในงานวิจัยทั่วไป แต่บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีความจุค่อนข้างต่ำ ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสเป็นเวลานานๆ เช่น ค้างคืน จะทำให้สารละลายด้านขั้วลบมีสภาวะเป็นด่าง และสารละลายด้านขั้วบวกมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งสูญเสียความเป็นบัฟเฟอร์ไป แต่สามารถแก้ไขได้ โดยใช้ระบบถ่ายเทหมุนเวียนระหว่างสารละลายทั้งสองด้านด้วยเครื่องปั๊มเพอริสตาติก (peristaltic pump) ตลอดการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

2. บัฟเฟอร์ TBE (Tris-borate และ EDTA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุบัฟเฟอร์สูง และมีกรดบอริกเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จึงเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

2.1.7 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย

ดีเอ็นเอสายผสมที่จะนำเข้าเซลล์อาศัยที่เป็นแบคทีเรียนั้น จำเป็นต้องมีดีเอ็นเอพาหะที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรีย ได้แก่ พลาสมิด เฟจ และ คอสมิด เป็นตัวนำพา (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549) ในปัจจุบันมีแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์ให้อาศัยอยู่หลายชนิดแต่ที่นิยมใช้กันมากคือ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทราบข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม และหน้าที่ของยีนต่างๆ มากที่สุด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2548) วิธีการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยทำได้หลายวิธี เช่น ทรานฟอร์มเมชั่น (transformation) เป็นวิธีการนำดีเอ็นเอสายผสมที่มีดีเอ็นเอพาหะเป็นพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยที่เป็นแบคทีเรีย โดยอาศัยขบวนการทางเคมีในการทำให้แบคทีเรียให้อาศัยอยู่ในสภาวะที่พร้อมในการรับดีเอ็นเอสายผสม เรียกสภาวะนี้ของเซลล์ให้อาศัยว่า เซลล์คอมพลีเทนต์ (competent cell) สารเคมีที่นิยมใช้ในการเตรียมแบคทีเรียให้มีสภาวะคอมพลีเทนต์ ได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) เป็นต้น แบคทีเรียที่มีสภาวะคอมพลีเทนต์นั้น ผนังเซลล์จะมีความแผ่บาง (permeable) ทำให้ดีเอ็นเอสามารถเกาะติดบริเวณแผ่บางนั้นได้ดี เมื่อนำเซลล์ให้อาศัยมาใส่รวมกับพลาสมิด และทำการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) จากอุณหภูมิต่ำ (0-5 องศาเซลเซียส) ไปสู่อุณหภูมิสูง (37-45 องศาเซลเซียส) ทำให้ดีเอ็นเอที่เกาะติดสามารถแทรกเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยได้ หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง เพื่อให้ลักษณะฟีโนไทด์บางอย่างของพลาสมิดมีการแสดงออก เช่น ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะ(กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549)

ประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียขึ้นอยู่กับ

1. ขนาดของดีเอ็นเอ ถ้าขนาดใหญ่จะมีประสิทธิภาพต่ำ
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงเป็นรูปร่างที่มีเสถียรภาพมากที่สุด และประสิทธิภาพดีที่สุด
3. ชนิดของเซลล์ให้อาศัย
4. ระยะการเจริญของแบคทีเรียให้อาศัย
5. วิธีการเตรียมเซลล์ให้อาศัยให้เป็นเซลล์คอมพลีเทนต์ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.8 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549)

เป็นการตรวจหาดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ซึ่งมีดีเอ็นเอที่ต้องการจากประชากรของเซลล์ทั้งหมด (library) สิ่งแรกในการคัดเลือกเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมคือ การคัดทิ้งเซลล์ให้อาศัยเดิมออกจากกลุ่มเซลล์ให้อาศัยที่มีดีเอ็นเอสายผสม ในขั้นตอนนี้อาศัยคุณสมบัติของเครื่องหมายคัดเลือก (selective marker) ของดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งไม่มีในเซลล์ให้อาศัย เช่น คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ หรือการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น เซลล์ให้อาศัยที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะและเพิ่มจำนวนได้จะเรียกว่า ทรานฟอร์แมนท์ (transformant) ซึ่งอาจจะมีหรือไม่มียีนที่สนใจอยู่ในดีเอ็นเอพาหะก็ได้ แต่ถ้าเซลล์ให้อาศัยนั้นได้รับดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปจะเรียกว่า รีคอมบิแนนท์ (recombinant)

การคัดเลือกเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม เป็นการคัดรีคอมบิแนนท์จากทรานฟอร์มแมนท์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกของดีเอ็นเอพาหะ แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1. การใส่แบบทำลายการทำงาน (Insertional inactivation)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ แล้วทำให้สูญเสียคุณสมบัติของเครื่องหมายคัดเลือกของดีเอ็นเอพาหะไป เช่น ดีเอ็นเอพาหะมียีนสำหรับต้านยาปฏิชีวนะเป็นเครื่องหมายคัดเลือก เมื่อทำการตัดต่อดีเอ็นเอเข้าไปตรงบริเวณยีนสำหรับต้านยาปฏิชีวนะ จะทำให้คุณสมบัตินี้เปลี่ยนไปกลายเป็นไวต่อยาปฏิชีวนะ ดีเอ็นเอพาหะที่ให้การคัดเลือกแบบนี้ เช่น pBR322 นอกจากนี้ยังมีดีเอ็นเอพาหะชนิดอื่นที่ให้การคัดเลือกแบบนี้ แต่ใช้เครื่องหมายคัดเลือกที่อาศัยคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ บีตา-กาแลกโตซิเดส (β-galactosidase) ได้แก่ พลาสมิดตระกูล pUC

การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์บีตา-กาแลกโตซิเดส ต้องใช้ดีเอ็นเอพาหะที่มีส่วนของยีน *lacZ* ในบริเวณจุดโคลน (multiple cloning sites) ยีน *lacZ* นี้จะควบคุมการสร้างเอนไซม์บีตา-กาแลกโตซิเดส ส่วนด้านปลายอะมิโน หรือ ชิ้นแอลฟา (α-fragment) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 46 โมเลกุล ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียให้อาศัยที่ใช้ถ่ายฝากยีนจะมีการดัดแปลงยีนบนโครโมโซมทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์บีตา-กาแลกโตซิเดสทั้งโมเลกุล แต่จะสร้างได้เฉพาะส่วนปลายคาร์บอกซิล หรือ ชิ้นโอเมกา (ω-fragment) ส่วนของเอนไซม์ทั้งสองส่วนนี้จะรวมกัน (α-complementation) และเกิดเป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานของบีตา-กาแลกโตซิเดส ซึ่งสามารถย่อยสารอนุพันธ์ของน้ำตาลและกาแลกโตส X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) เป็น 5, 5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo ซึ่งให้สีน้ำเงินในสภาวะที่มี IPTG (isopropyl-(β)-D-thiogalactopyranoside) เป็นตัวเหนี่ยวนำ เมื่อมีการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าในบริเวณจุดโคลน จะทำให้กรอบการแปลรหัสเปลี่ยนไป จึงไม่เกิดชิ้นแอลฟา ดังนั้นเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่จะให้โคโลนีที่มีสีขาว แต่เซลล์ที่เป็นทรานฟอร์แมนท์จะมีโคโลนีสีน้ำเงิน การคัดเลือกโดยวิธีนี้อาจเรียกว่าการคัดเลือกโคโลนีสีฟ้าขาว (blue/white colony selection)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การใส่แบบกระตุ้นการทำงาน (Insertional activation)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะในบริเวณเครื่องหมายคัดเลือก ที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมซึ่งปกติจะสร้างตัวกดดัน (repressor) ไม่ให้ยีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะสร้างผลผลิตสำหรับการดื้อยา เมื่อมีการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าไปในบริเวณควบคุมในเครื่องหมายคัดเลือก ทำให้ไม่สามารถสร้างตัวกดดันได้คุณสมบัติการไวต่อยาจะเปลี่ยนเป็นดื้อยา การคัดเลือกโดยวิธีนี้เซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมจะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มียาปฏิชีวนะชนิดนั้นได้ ส่วนเซลล์ที่มีแต่ดีเอ็นเอพาหะจะถูกคัดทิ้งไป ตัวอย่างดีเอ็นเอพาหะที่ให้การคัดเลือกแบบนี้ ได้แก่ pUN 121

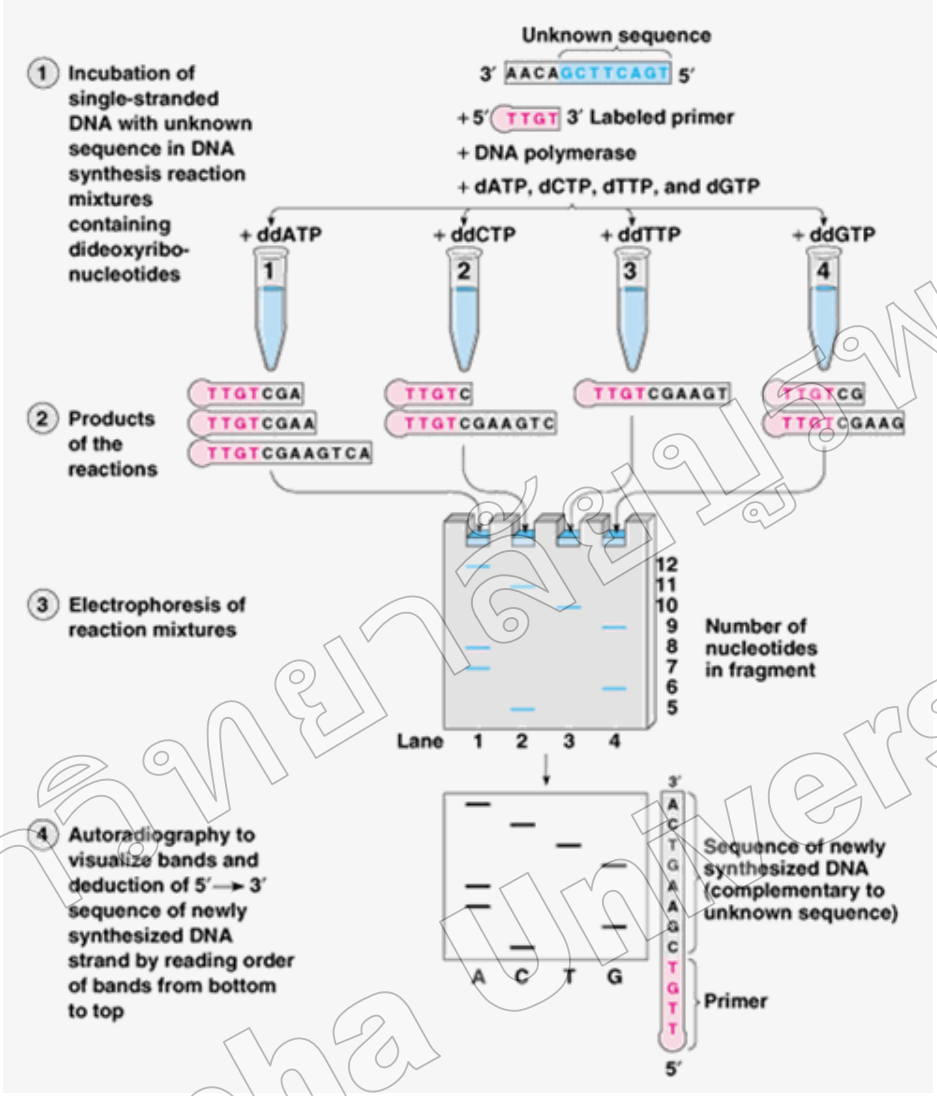
2.1.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2549)

ดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลที่เก็บข้อมูลพันธุกรรม (genetic information) ซึ่งกำหนดโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ จะทำให้ทราบโครงสร้างของยีนและเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน การทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอจะทำให้ทราบลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน ทำให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้าง และเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ขององค์ประกอบที่สำคัญในโปรตีนนั้นๆ นอกจากนี้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีประโยชน์ต่อการเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล สามารถเปรียบเทียบความใกล้ได้ รวมทั้งการจัดหมวดหมู่ของกลุ่มสิ่งมีชีวิต วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอกระทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method)

วิธีนี้อาจเรียกว่าวิธีของ Sanger หรือวิธี chain termination เป็นวิธีที่เลียนแบบการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ในการเติมดีออกซินิวคลีโอไทด์ ทั้ง 4 ชนิด คือ dGTP, dATP, dCTP และ dTTP เพื่อสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ในทิศทาง $5'$ ไป $3'$ โดยมีไพรเมอร์ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยวเป็นตัวเกาะเริ่มต้นมีดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสทำหน้าที่เป็นแม่แบบ ในปฏิกิริยาจะเติมนิวคลีโอไทด์ประเภท $2'$, $3'$ – dideoxynucleotides (ddGTP, ddATP, ddCTP และ ddTTP) ชนิดใดชนิดหนึ่งลงไปด้วย นิวคลีโอไทด์ชนิดนี้ไม่มีหมู่ $3'$-OH ดังนั้นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่จะสิ้นสุดลงตรงตำแหน่งของ ddNTP เนื่องจากทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ($3'$, $5'$phosphodiester) เพื่อเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าด้วยกัน การยุติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดขึ้นแบบสุ่มทำให้ได้สายดีเอ็นเอใหม่ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจะแยกกันได้บนอิเล็กโตรโฟเรซิสเจลอะคริลาไมด์ ดังแสดงในรูปที่ 2-5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีเอนไซม์นี้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยการใช้สารกัมมันตรังสี หรือสารปลอดกัมมันตรังสีก็ได้ ในกรณีที่ใช้สารกัมมันตรังสีจะนิยมใช้ [α-^{32}P] dATP หรือ [α-^{35}S] dATP ใส่ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อติดตามแถบดีเอ็นเอที่ติดฉลากรังสี แล้วหาตำแหน่งชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้โดยการทำออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) บนฟิล์มรังสีเอ็กซ์ (x-ray film)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยวิธีของ Sanger

(ที่มา: http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/GEP/Lecture15/Image31.gif สืบค้นเมื่อ 31/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. วิธีการใช้สารเคมี (chemical cleavage method)

วิธีนี้อาจเรียกว่าวิธีของ Maxam-Gilbert หลักการของวิธีนี้คือ การตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสด้วยปฏิกิริยาเคมี โดยสารเคมีจะทำการเปลี่ยนแปลงเบสของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอซึ่งได้ทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี [γ-^{32}P] dATP ที่ปลาย 3′ หรือ 5′ ของสายดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ปฏิกิริยาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีนี้จะทำแยกกันในหลอดทดลอง 4 หลอด คือ

หลอดที่ 1 เป็นหลอดที่ทำการเปลี่ยนแปลงที่เบสกวานีน โดยใช้ไดเมธิลซัลเฟต (dimethylsulfate; DMS) ที่ค่าพีเอช 8.0 ไปเติมหมู่เมธิล (methylation) ให้ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 (N7) ของเบสกวานีน จากนั้นสายนิวคลีโอไทด์จะแตกออก เนื่องจากมีการทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ที่ตำแหน่งของเบสกวานีนเมื่อมีไพเพอริดิน (piperidine) ในปฏิกิริยา

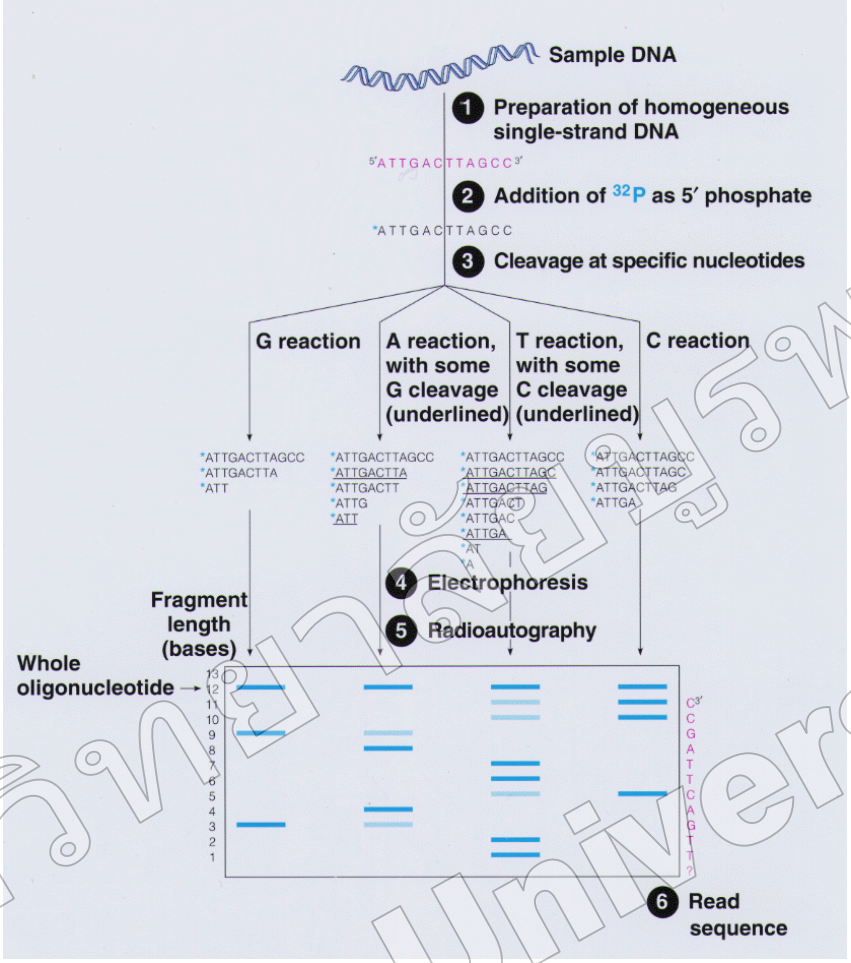
หลอดที่ 2 เป็นหลอดที่ทำการเปลี่ยนแปลงที่เบสกวานีนและอะดีนีน ที่ค่าพีเอช 2.0 สารไดเมธิลซัลเฟตจะไปเติมหมู่เมธิลให้ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 ของเบสกวานีน และไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 ของเบสอะดีนีน ทำให้สายดีเอ็นเอแตกออกที่ตำแหน่งเบสกวานีนและอะดินีน

หลอดที่ 3 เป็นหลอดที่ทำการเปลี่ยนแปลงที่เบสไซโตซีนและไทมีน โดยใช้ไฮดราซีน (hydrazine) และไพเพอริดีน สารทั้งสองจะทำให้สายนิวคลีโอไทด์ขาดออกที่ตำแหน่งเบสไซโตซีนและไทมีน

หลอดที่ 4 เป็นหลอดที่เบสไซโตซีนถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดยใช้ไฮดราซีนทำปฏิกิริยาที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1.5 ถึง 2 โมลาร์ ในสภาวะนี้จะมีการสลายเฉพาะเบสไซโตซีน

จากนั้นนำปฏิกิริยาทั้ง 4 มาวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสเจลอะคริลาไมด์ และติดตามแถบดีเอ็นเอที่ติดฉลากรังสี โดยการทำออโตเรดิโอกราฟบนฟิล์มรังสีเอ็กซ์ ดังแสดงในรูปที่ 2-6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยวิธีของ Maxam-Gilbert

(ที่มา: http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif สืบค้นเมื่อ 31/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากอดีตมีการรายงานพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มเอไมด์ได้ทั้งอะลิฟาติกและอะโรมาติก (Friedrick and Mitrenga, 1981, Grant and Wilson, 1973, Hynes and Pateman, 1970 และ Kagayama and Ohe, 1990) แต่สำหรับอะคริลาไมด์ไม่ค่อยพบมากเนื่องจากผลกระทบจากการยับยั้งโปรตีนซัลไฮดริลที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Bergmark *et al*., 1991, และ Cavins and Friedman, 1968) พบจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนซึ่งสามารถเจริญในอะคริลาไมด์ได้แก่ สายพันธุ์ *Pseudomonas, Rhodococcus* และ *Xanthomonas* (Nawaz *et al.*, 1993, Nawaz *et al*.,1994a, และ Shanker *et al*., 1990) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ประโยชน์จากอะคริลาไมด์ในการเจริญ มีการค้นพบครั้งแรกในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำและจากดิน แต่ยังไม่ได้มีการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ จนกระทั่งได้มีการทำการคัดเลือก *Pseudomonas chlororaphis* B23 จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ หลังจากนั้นได้มีการค้นพบและศึกษาคุณสมบัติในการสลายอะคริลาไมด์จากจุลินทรีย์ต่างๆ อย่างมากมาย (Cherry *et al.*, 1956, Croll *et al.*, 1974, Brown *et al.*, 1982, และ Lande *et al.*, 1979)

Nagasawa และ Yamada (1989) นำเอนไซม์บริสุทธิ์อะมิเดสจากเซลล์แบคทีเรียที่ใช้อะคริลาไมด์ในการเจริญมาล้างพิษของอะคริลาไมด์ และใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตกรดอะคริลิกในระดับปริมาณสูง ต่อมาในปี 1990 Shanker และคณะ แยก *Pseudomonas* sp. จากดินในสวนเขตร้อน ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ และต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยวิธีการเลี้ยงบำรุง (enrichment) ในอาหารที่มีอะคริลาไมด์โดยพบว่า แบคทีเรียสามารถสลายอะคริลาไมด์ได้ถึง 4 กรัมต่อลิตร เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญ โดยใช้เอนไซม์อะมิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะคริลาไมด์ ซึ่งจะทำงานได้ดีในเอไมด์สายสั้น ได้แก่ ฟอร์มาไมด์ อะซีตาไมด์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ เช่น เมทาคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์ ความสามารถของเอนไซม์จะถูกกดดันด้วยซักซิเนตในสภาวะที่มีและไม่มีไนโตรเจน

ต่อมา Nagasawa และคณะ (1993) ทำการแยก *Rhodococcus rhodocrhous* J1 ที่สามารถสลายอะคริโลไนไตล์และอะคริลาไมด์จากดิน ขณะที่ในปีเดียวกัน Nawaz และคณะ ได้ทำการแยก *Pseudomonas* sp. และ *Xanthomonas maltophilia* และใช้เซลล์ตรึงหรือเอนไซม์อะมิเดสที่ผลิตจากเชื้อเหล่านี้ในการสลายการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ จากนั้นในปี 1994 Nawaz และคณะ ทำการแยก *Rhodococcus* sp. จากดินที่มีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลง โดยใช้อะคริลาไมด์เป็นสารตั้งต้นในการเจริญและทำบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์อะมิเดสที่เร่งปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่นของอะคริลาไมด์ พบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่ 8.5 มีค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ที่ 4.0 และพบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะสูงกับอะคริลาไมด์และอะซีตาไมด์ นอกจากนี้ยังพบว่าในโมเลกุลของเอมไซม์ประกอบด้วยเหล็ก 8 โมล และแอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้โดยโลหะหนักและสารที่ขัดขวางหมู่ไทโอล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ignatov และคณะ (1996) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการหายใจสำหรับการใช้อะคริโลไนไตรท์, อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิกในน้ำเสีย พบว่า *Brevibacterium* sp. B-4987 มีกิจกรรมการหายใจสูงสำหรับการใช้อะคริลาไมด์ และ/หรือ กรดอะคริลิก โดยอะคริลาไมด์ที่ใช้มีความเข้มข้น 0.14-1.0 มิลลิโมลาร์ และในปีเดียวกัน Hirrlinger และคณะ ทำการแยก *Rhodococcus erythropolis* จากเชื้อที่สลายเอริลโพรไพโอนาไมด์ พบว่าสามารถสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียได้

ต่อมาในปี 1998 Nawaz และคณะ ทดสอบปัจจัยทางกายภาพ คือ ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์, ค่าพีเอช, อุณหภูมิ และความแตกต่างของโลหะและคีเลเตอร์ (chelator) ที่มีผลต่อกระบวนการสลายอะคริลาไมด์โดยเซลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. พบว่าที่ความเข้มข้นสูงของอะคริลาไมด์คือ 128 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และที่อุณหภูมิสูงๆสามารถสลายอะคริลาไมด์ได้เพิ่มมากขึ้น ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสมในการสลายอะคริลาไมด์ของเซลล์ตรึงคือที่พีเอช 7.0 นอกจากนี้ยังพบว่าโลหะคอปเปอร์และนิลเคิล สามารถยับยั้งการสลายอะคริลาไมด์ได้ ซึ่งบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์อะมิเดสที่เร่งปฏิกิริยาการสลายอะคริลาไมด์ประกอบด้วยหมู่ซัลไฮดริล ส่วนอัตราเร็วในการสลายเพิ่มขึ้นได้โดยการเหนี่ยวนำของเหล็ก และจะลดลงได้โดยสารพวกคีเลเตอร์ อีกทั้งเซลล์ตรึงที่เตรียมแล้วสามารถเก็บไว้ใช้งานต่อได้นานถึงสิบวัน โดยไม่มีผลกระทบต่อการสูญเสียอัตราการสลายอะคริลาไมด์แต่อย่างไร

Wang และ Lee (2001) แยกแบคทีเรียสลายไนไตรท์เป็นไนโตรเจน (denitrifying bacteria) ที่ใช้อะคริลาไมด์เป็นสารตั้งต้นในระบบบำบัดน้ำเสียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และจำแนกเป็น *Pseudomonas stutzeri* พบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียสามารถกำจัดอะคริลาไมด์ได้ในปริมาณต่ำ 440 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในสภาวะที่มีไนเตรตนั้นแบคทีเรียสามารถสลายอะคริลาไมด์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำเสียได้และยังสลายกรดอะคริลิคอีกด้วย

Wampler และ Ensign (2005) แยกและศึกษาลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ใหม่ *Rhodopseudomonas palustris* ที่สามารถเจริญในอะคริลาไมด์ภายใต้สภาวะที่มีแสง ซึ่งได้จากตัวอย่างของไหลจากโรงฆ่าวัวของประเทศยูท่า โดยวิธีการเลี้ยงบำรุงในอาหารเกลือที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 16 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงจากหลอดไฟ 60 วัตต์ จากนั้นศึกษาการสลายอะคริลาไมด์และการผลิตและการใช้อะคริเลตจากสารละลายเซลล์พักและส่วนสกัดของเซลล์ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีความดันสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) พบว่าใน *R. palustris* สายพันธุ์ Ac1 อะคริลาไมด์สามารถเกิดปฏิกิริยาดีอะมิเดชั่นอย่างรวดเร็วเป็นอะคริเลต และจะเกิดการสลายอะคริเลตต่อไป ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาที่กำหนดอัตราเร็วในการเจริญของเซลล์ และเมื่อทำการศึกษานิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของคาร์บอน 13 พบว่าสารตัวกลางที่เกิดจากการสลายของอะคริเลตคือโพรไพโอเนต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Wang และ Lee (2007) แยกแบคทีเรียที่สลายไนโตรเจนของอะคริลาไมด์จากระบบบำบัดน้ำเสียที่ได้จากโรงงานผลิตเส้นใยโพลีอะคริโลไนไตรท์ โดยมีจุดประสงค์เพื่ออธิบายผลของการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และสายพันธุ์ผสมกับโพลีอะคริโลไนไตรท์ในการกระทำกับอะคริลาไมด์จากน้ำเสีย พบว่า *Ralstonia eutropha* TDM-3 ที่แยกจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตเส้นใยโพลีอะคริโลไนไตรท์สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้สูงถึง 1446 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
2. กล้องถ่ายรูป รุ่น Powershot A530 บริษัท Canon สหพันธรัฐมาเลเซีย
3. ขวดมีฝาปิด ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
4. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 1000 บริษัท JENWAY
5. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น EC250-90 บริษัท Gibthai ประเทศไทย และรุ่น Powerpac300 บริษัท Bio-Rad สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG2002-S บริษัท MonoBioc สมาพันธรัฐสวิส
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Precisa404A สมาพันธรัฐสวิส
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น J.P.Selecta บริษัท Bio-Active ราชอาณาจักรสเปน
9. เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น KS1 บริษัท Velp sciencetifica สหพันธรัฐมาเลเซีย
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophometer) รุ่น Hewlett packaro สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันนี
11. เครื่องส่องภาพเจล รุ่น Spectroline Model TVC-312A บริษัท GUARANTEED
12. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น AMA2405 สหราชอาณาจักร
13. เครื่องเขย่าเจล รุ่น OM6 บริษัท Ratek
14. เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ Thermo Hybaid PCR รุ่น Px2
15. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น HB-1 บริษัท Bio-Active สาธารณรัฐไต้หวัน
16. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 850 มิลลิเมตร
17. จุกซิลิโคลน ขนาด 200 มิลลิเมตร บริษัท Toyobo ประเทศญี่ปุ่น
18. ชุดแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) รุ่น EC250-90 บริษัท Gibthai ประเทศไทย และรุ่น Powerpac300 บริษัท Bio-Rad สหรัฐอเมริกา
19. ช้อนตักสาร (Spatula)
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 500 บริษัท Memmert สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันนี
22. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า รุ่น innova 4230 บริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่น สหรัฐอเมริกา
23. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Clean สหรัฐอเมริกา
24. ตู้อบ (Oven) รุ่น AM003 บริษัท BINDER

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

25. ทิป ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
26. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack) และที่วางหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร
27. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (Magnetic bar)
28. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 0.1, 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร บริษัท Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น
29. พาราฟิล์ม
30. ไมโครเวฟ บริษัท Sharp ประเทศไทย
31. ไม้จิ้มฟัน
32. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
33. หลอดทดลอง ขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร
34. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
35. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
36. อุปกรณ์ผ่าตัด และปากคีบ

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเกลือต่ำ (Minimal medium)

1. Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) MW 132.14 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
2. Boric acid (H_3BO_3) MW 61.83 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
3. Calcium carbonate ($CaCO_3$) MW 100.09 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
4. Cobalt (II) sulphate ($CoSO_4.7\,H_2O$) MW 281.10 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
5. Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5\,H_2O$) MW 249.68 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
6. Ferrous sulphate ($FeSO_4.7\,H_2O$) MW 278.02 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
7. Hydrochloric acid (HCl) MW 36.46 Chemical Grade บริษัท Normapur
8. Magnesium Oxide (MgO) MW 40.30 บริษัท BDH สหราชอาณาจักร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9. Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7\,H_2O$) MW 246.48 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
10. Manganese (II) sulphate ($MnSO_4$) MW 246.48 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
11. Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) MW 136.09 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
12. di-Sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4) MW 141.96 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
13. Sulphuric acid (H_2SO_4) MW 98.08 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
14. Zinc sulphate ($ZnSO_4$) MW 287.54 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร

- ส่วนประกอบในอาหารเหลว อาหารแข็ง และอาหารเหลว 2X YT

1. Acrylamide MW 71.08 Molecular Biology Grade บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
2. Agar Bacteriology Grade บริษัท Criterion สหรัฐอเมริกา
3. Bacto-tryptone บริษัท BD สหรัฐอเมริกา
4. LB Agar บริษัท BD สหรัฐอเมริกา
5. Glucose MW 180.16 Biochemika Grade บริษัท Fluka สมาพันธรัฐสวิส
6. Nutrient Broth Chemical Grade บริษัท Himedia สาธารณรัฐอินเดีย
7. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 Foranalysis Grade บริษัท Carloerba สหพันธรัฐมาเลเซีย
8. Yeast Extract Chemical Grade บริษัท Criterion สหรัฐอเมริกา

3.2.2 สารเคมี เอนไซม์ และไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. ไพรเมอร์ (Primers)

- 16S_UniNBam (5′-GGG**GGATCC**GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3′) T_m 76 องศาเซลเซียส บริษัท Sigma-Proligo สหรัฐอเมริกา (บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI แสดงในตัวหนา)

- 16S_UniCHin (5′-CCC**AAGCTT**ACATTTCACAACACGAGCTG-3′) T_m 65 องศาเซลเซียส บริษัท Sigma-Proligo สหรัฐอเมริกา (บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII แสดงในตัวหนา)

2. dNTPmix บริษัท Takara ประเทศญี่ปุ่น
3. 25mM $MgCl_2$ บริษัท Takara ประเทศญี่ปุ่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. *Taq* DNA polymerase บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย

3.2.3 สารเคมีสำหรับการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

1. Agarose Molecular Grade บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
2. Ethidium bromide บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา
3. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) MW 372.24 Chemika Grade บริษัท Fluka สมาพันธรัฐสวิส
4. Sodium hydroxide (NaOH) MW 40.00 Proanalysis บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. Tris (hydroxymethyl)-aminomethane MW 121.14 MD Grade บริษัท usb สหรัฐอเมริกา
6. 6X loading dye บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย

3.2.4 สารเคมี เอนไซม์ และรีเอเจนต์สำหรับการโคลน

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 GEL DNA RECOVERT KIT บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
2. ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ QIAampDNA Mini Kit บริษัท QIAGEN สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันนี
3. ชุดสกัดพลาสมิด GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION KIT บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III และ *Bam*H I บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
5. เอนไซม์ RNase บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
6. เอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
7. Absolute ethanol Chemical Grade บริษัท Carloerba สาธารณรัฐฝรั่งเศส
8. Ampicillin anhydrous บริษัท Fluka สมาพันธรัฐสวิส
9. Calcium Chloride ($CaCl_2$) MW 147.02 AnalaR Grade บริษัท BDH สหราชอาณาจักร
10. IPTG; MW 238.3 Biochemical Grade บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
11. Lysozyme Biochemical Grade บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
12. Sodium dodecyl sulfate (SDS) MW 126.05 Chemical Grade บริษัท Fisher Chemical สหราชอาณาจักร
13. X-gal MW 408.63 Biochemical Grade บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. lambda DNA บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย
2. 100 bp ladder บริษัท Vivantis สหพันธรัฐมาเลเซีย

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากคลอง และแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนในจังหวัดชลบุรีใส่ในภาชนะที่ปิดมิดชิด จากนั้นปิเปตตัวอย่างน้ำปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการเลี้ยงบำรุงในอาหารเหลวเกลือต่ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ที่มีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเลี้ยงบำรุงที่ให้ผลบวกจำแนกโดยความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหารเหลวที่มีอะคริลา-ไมด์ ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารแข็งเกลือต่ำ ที่มีอะคริลาไมด์เป็นส่วนประกอบเหมือนกับในอาหารเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันทั้ง รูปร่าง สี และลักษณะโคโลนี มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวเกลือต่ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอะคริลาไมด์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีกลีเซอรอล (70%) เป็นองค์ประกอบ จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ก) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาทั้งหมดต่อไป

3.3.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA

3.3.2.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) บ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทดังนี้คือ เก็บเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์โดยเติมสารละลายไลโซไซม์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที แล้วถ่ายสารผสมลงใน QIAamp Spin Column ที่บรรจุอยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวาง QIAamp Spin Column ลงใน collection tube ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จึงย้าย QIAamp Spin Column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ทำการชะดีเอ็นเอใน QIAamp Spin Column จำนวน 2 ครั้ง โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปหาความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) และที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) วิเคราะห์ขนาดและการฉีกขาดของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA ที่ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III (λ/*Hin*d III) ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ส่องดูภาพเจลภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อจะนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.1 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 16S_UniNBam และไพรเมอร์ 16S_UniCHin ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*d III ที่ปลาย 5′ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ตำแหน่งที่ 22 ถึง 41 และตำแหน่งที่ 1066 ถึง 1085 ในชิ้นยีน 16S rRNA ของ *E. coli* ตามลำดับ (Precigou *et al*., 2004) โดยสารละลายผสมที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร) ต่อหนึ่งตัวอย่างประกอบด้วย โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละสายที่ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1X และเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) 2.5 หน่วย (เติมทีหลัง) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermo Hybaid PCR โดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้ คือ ความร้อนเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดเครื่องชั่วคราว เพื่อเติมเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ต่อมาทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ที่ประกอบด้วย ขั้นการแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การจับของไพรเมอร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และการต่อสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นสุดท้ายของการต่อสายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ได้มาทำการวิเคราะห์ขนาดโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII ดังกล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.3 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 มาทำอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตัดชิ้นเจลที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ให้มีขนาดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 GEL DNA RECOVERT KIT (Vivantis) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทดังนี้คือ หยิบชิ้นเจลที่ถูกตัดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอ แล้วเติมบัฟเฟอร์ GB เป็น 5 เท่าของปริมาณดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าเพื่อละลายเจล จนเมื่อเจลละลายหมดใส่สารละลายลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ทำการปั่นเหวี่ยง 2 ครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม Elution Buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ขนาดและปริมาณโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ดังอธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.4 การสกัดพลาสมิด pUC118

การสกัดพลาสมิดจะใช้ชุดสกัดพลาสมิด GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION KIT (Vivantis) ซึ่งมีวิธีการสกัดดังนี้คือ เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดในอาหาร 2X YT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์โดยเติมสารละลาย S1 ที่มีเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมสารละลาย S2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ NB ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วถ่ายสารละลายผสมลงคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม Eluion Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้โดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*d III ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.5 การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

3.3.2.5.1. การตัดชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และพลาสมิด pUC118 (Digestion)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากข้อ 3.3.2.3 (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม) และพลาสมิด pUC 118 (ภาคผนวก ข) (ความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัม) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Vivantis) และ *Hin*dIII (Vivantis) จำนวนอย่างละ 100 หน่วยเอนไซม์ (ภาคผนวก ค) ทำปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และพลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ด้วยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*d III ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.5.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับพลาสมิด pUC118 (Ligation)

ทำการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และพลาสมิด pUC 118 ที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.5.1 ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรรวมของสารละลายในปฏิกิริยา 30 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ความเข้มข้น 1.8 ไมโครกรัม พลาสมิด pUC 118 ความเข้มข้น 0.7ไมโครกรัม และเอนไซม์ T4 DNA ligase (Vivantis) ความเข้มข้น 400 หน่วยเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.2.5.3 การเตรียมเซลล์ให้อาศัยสำหรับการทำทรานส์ฟอร์มเมชั่น

เซลล์ให้อาศัยที่ใช้คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (*supE*44Δ*lacU*169(Φ80*lacZ*ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1) โดยเตรียมเซลล์คอมพลีเทนต์ตามวิธีดังต่อไปนี้คือ เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ปิเปตแบคทีเรียที่เจริญมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ให้อยู่ในช่วง 0.3-0.4 จากนั้นแช่เซลล์ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 xg เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีกลีเซอรอลผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 15% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจาย จากนั้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตั้งสารละลายเซลล์ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วแบ่งสารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร เก็บในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำทรานส์ฟอร์เมชั่นต่อไป

3.3.2.5.4 การทำทรานส์ฟอร์มเมชั่น และการคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม

นำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการเชื่อมที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายเซลล์คอมพลีเทนต์ที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.5.3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ถูกนำมาละลาย (thaw) บนน้ำแข็งแล้ว ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 45 นาที และย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารผสมลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ปิเปตสารละลายเซลล์มา 100 ไมโครลิตร กระจาย (spread) บนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสมมาสกัดพลาสมิดตามวิธีที่อธิบายมาแล้ว ในหัวข้อ 3.3.2.4

3.3.2.6 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.5.4 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ซึ่งเป็นเอนไซม์ในบริเวณโคลนของพลาสมิดสายผสมนี้ ทำปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังอธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.3.2.5.1 แต่ใช้พลาสมิดสายผสม ความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัม และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*d III อย่างละ 50 หน่วย ในปฏิกิริยาที่มีปริมาณทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ที่มีอยู่ในพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็น-เอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.7 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์

นำพลาสมิดสายผสมที่พบแถบของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากการตรวจสอบในหัวข้อ 3.3.2.6 มาทำการตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิดสายผสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.6 ความเข้มข้น 125 นาโนกรัมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์

16S_UniNBam และ 16S_UniCHin ที่ความเข้มข้นแต่ละสายคือ 0.8 พิโกโมล พีซีอาร์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1X และเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 2.5 หน่วย ตามสภาวะในการทำพีซีอาร์ ดังข้อ 3.3.2.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ โดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.1

3.3.2.8 การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA

3.3.2.8.1. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA

นำพลาสมิดสายผสมที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.5.4 ที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ โดยวิธีในหัวข้อ 3.3.2.6 และ 3.3.2.7 แล้ว ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI3700 sequencer (First BASE Laboratories, ประเทศมาเลเซีย) ที่ใช้ชุดอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ Big Dye 3.1 Terminator ด้วยไพรเมอร์ 16S_UniNBam (อ่านสายนำ; sense) และ 16S_UniCHin (อ่านสายคู่สม; antisense)

3.3.2.8.2. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โลก

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2.8.1 มาหาตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 16S_UniNBam และ 16S_UniCHin และบริเวณซ้อนทับ (overlap sequence) โดยใช้โปรแกรม BioEdit จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (Basic local alignment search tool;BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก (GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และจัดจำพวกนิวคลีโอไทด์ (alignment) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ CLUSTALW (http://align.genome.jp/)

3.3.3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกจัดจำพวกนิวคลีโอไทด์จากหัวข้อที่ 3.3.2.8.2 มาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยอาศัยความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างแผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) แบบ Neighbor-joining (N-J tree) โดยใช้ฐานข้อมูลออนไลน์ http://align.genome.jp

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์

จากการนำน้ำจากคลองที่เป็นน้ำไหลตลอดเวลา และแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนที่เป็นบ่อน้ำนิ่งในจังหวัดชลบุรี มาทำการคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ โดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีแหล่งคาร์บอนคือ อะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะขุ่น และเมื่อนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งเกลือต่ำที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน พบโคโลนีแบคทีเรียเจริญบนจานเพาะเลี้ยง เมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีที่มีความแตกต่างกันทั้งด้านรูปร่าง ขนาด และสี สามารถแยกโคโลนีที่แตกต่างกันได้ 3 ลักษณะ คือ ไอโซเลทที่ 1 โคโลนีมีลักษณะสีขาวใส เป็นจุดกลมขนาดเล็ก มีขอบเรียบ, ไอโซเลทที่ 2 โคโลนีมีลักษณะสีขาวขุ่น เป็นจุดกลมขนาดเล็ก มีขอบเรียบ เป็นเมือกและไอโซเลทที่ 3 โคโลนีมีลักษณะสีขาวขุ่น เป็นจุดกลมขนาดใหญ่กว่าโคโลนีของไอโซเลทที่ 2 มีขอบเรียบ เป็นเมือก สรุปดังตารางที่ 4-1

4.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) แล้วหาความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าไอโซเลทที่ 1, 2 และ 3 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอคือ 20.47, 48.47 และ 47.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีอัตราส่วนค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.79, 1.57 และ 1.65 ตามลำดับ สรุปดังตารางที่ 4-2 ผลจากการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII พบว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีขนาดมากกว่า 23 กิโลเบส และไม่พบการฉีกขาดของดีเอ็นเอ แสดงดังรูปที่ 4-1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำคลองและแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนในจังหวัดชลบุรี เมื่อเจริญในอาหารแข็งเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

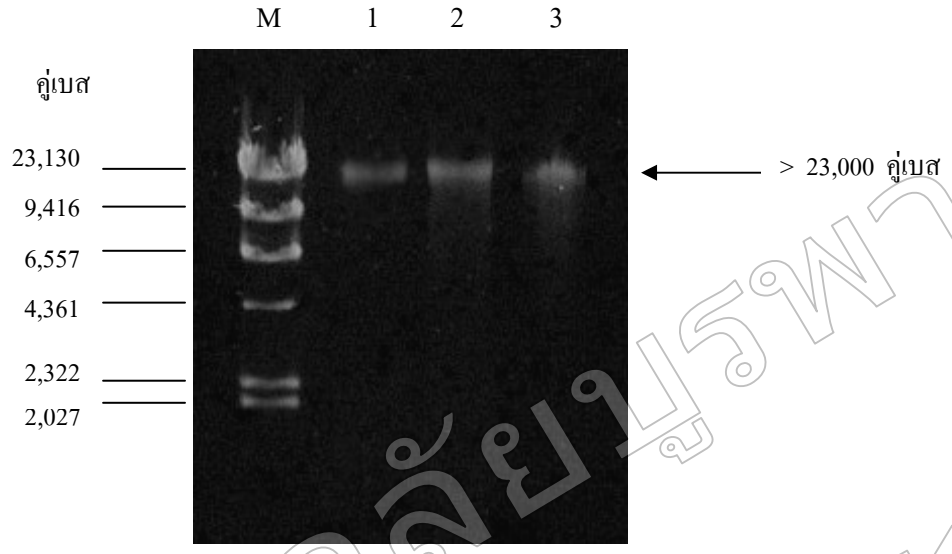
ไอโซเลทที่	ลักษณะโคโลนี	แหล่งที่พบ
1	สีขาวใส จุดกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ	น้ำคลองห้วยกระปิ และแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนสถาบันพัฒนาฝีมือแรงงาน
2	สีขาวขุ่น จุดกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ เป็นเมือกเยิ้ม	น้ำคลองห้วยกระปิ และแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนสถาบันพัฒนาฝีมือแรงงาน
3	สีขาวขุ่น จุดกลมขนาดใหญกว่าโคโลนีของไอโซเลทที่ 2 ขอบเรียบ เป็นเมือกเยิ้ม	น้ำคลองห้วยกระปิ และแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนสถาบันพัฒนาฝีมือแรงงาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร, อัตราส่วน A_{260}/A_{280} และความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท

ไอโซเลทที่	การเจือจาง (เท่า)	A_{260}	A_{260}/A_{280}	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	-	0.41	1.79	20.47
2	6	0.96	1.57	48.47
3	6	0.96	1.65	47.03

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-1 โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท หลังจากการตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

ช่องที่ 1 คือ โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

ช่องที่ 2 คือ โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

ช่องที่ 3 คือ โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

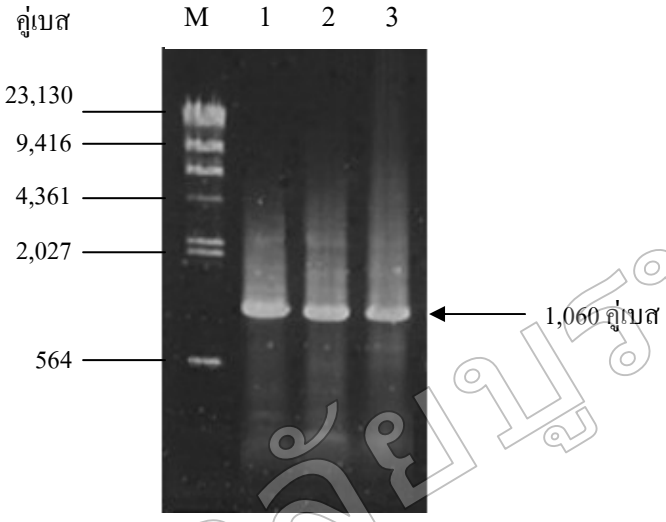
4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ทั้ง 3 ไอโซเลท มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 16S_UniNBam กับ 16S_UniCHin ดังอธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.2 เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของชิ้นยีน 16S rRNA โดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII พบแถบผลิตภัณฑ์หลักแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4-2

4.4 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ GF-1 GEL DNA RECOVERT KIT (Vivantis) และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์อีกครั้ง โดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ยังคงพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส แสดงผลดังรูปที่ 4-3

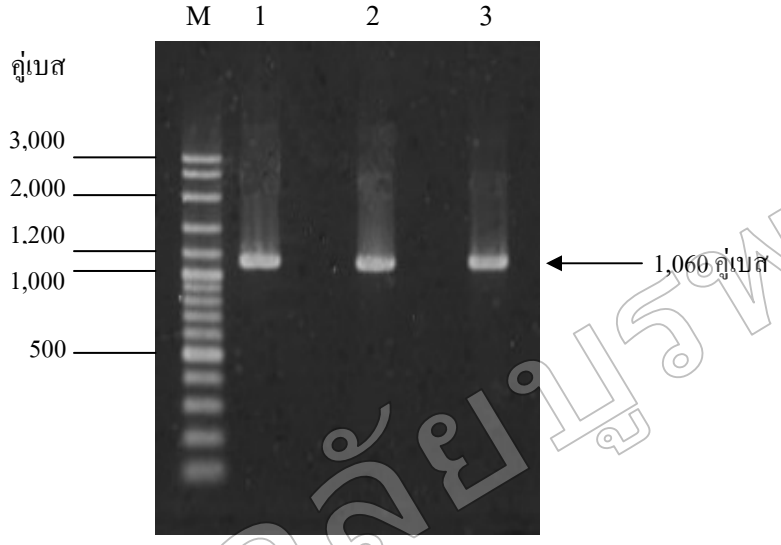
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ 16S_UniNBam กับ 16S_UniCHin หลังจากการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII
ช่องที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1
ช่องที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2
ช่องที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ช่องที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ช่องที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.5 การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

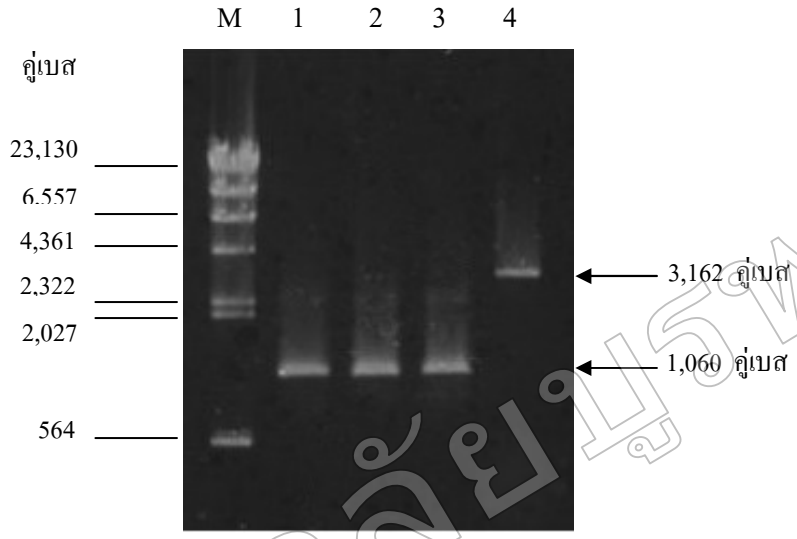
เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท และพลาสมิด pUC 118 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ดังที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.5.1 เมื่อตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ได้หลังการตัดด้วยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII พบว่าได้แถบของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส และแถบของพลาสมิดขนาดประมาณ 3,162 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4-4 จากนั้นนำดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำการเชื่อมต่อ และทรานส์ฟอร์เมชั่นเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะแอมพิซิ-ลิน, X-gal และ IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีสีฟ้าและสีขาวเจริญบนอาหารแข็ง โดยจานที่ 1 (ทรานส์ฟอร์แมนท์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1) มีจำนวน 252 และ 54 โคโลนี ตามลำดับ จานที่ 2 (ทรานส์ฟอร์แมนท์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2) มีจำนวน 135 และ 36 โคโลนี ตามลำดับ และจานที่ 3 (ทรานส์ฟอร์แมนท์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3) มีจำนวน 230 และ 51 โคโลนี ตามลำดับ

ต่อมาทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2X YT (ภาคผนวก ก) ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นส่วนประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการสกัดพลาสมิดสายผสมในเซลล์แบคทีเรียที่ได้โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION KIT (Vivantis) เมื่อตรวจสอบขนาดพลาสมิดที่สกัดได้โดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าแถบพลาสมิดสายผสมที่ได้จากทั้ง 3 ไอโซเลท มีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII ดังแสดงในรูปที่ 4-5

4.6 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำพลาสมิดสายผสมที่คาดว่าจะมีชิ้นยีน 16S rRNA (มีขนาดใหญ่ขึ้น) ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII ดังที่อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.6 เมื่อตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ โดยแถบที่ 1 เป็นแถบของพลาสมิด pUC118 ที่มีขนาดประมาณ 3,162 คู่เบส ส่วนแถบที่ 2 เป็นแถบของชิ้นยีน 16S rRNA ที่มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส (แสดงดังรูปที่ 4-6; ช่องที่ 1 2 และ 3 เป็นพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และพลาสมิด pUC 118 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII เมื่อตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

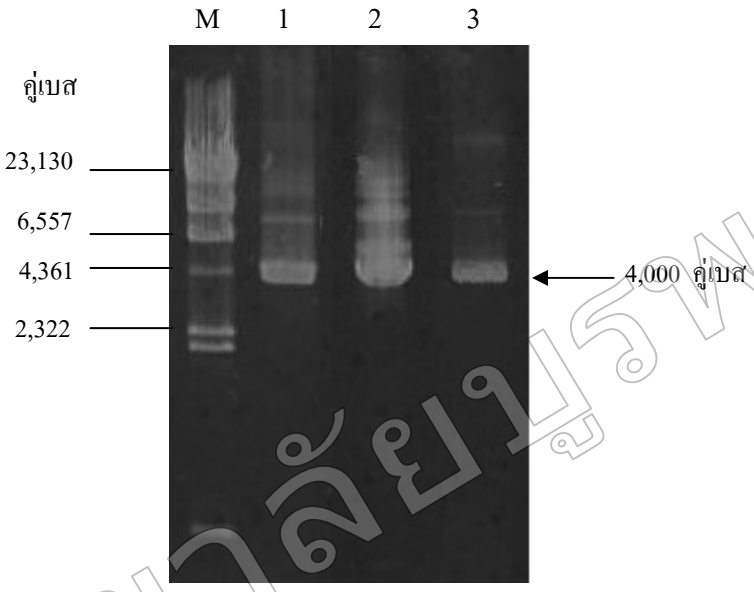
ช่องที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

ช่องที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

ช่องที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

ช่องที่ 4 คือ พลาสมิด pUC 118 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-5 พลาสมิดสายผสมที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มปฏิกิริยาเชื่อมผสมของ pUC118 และชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

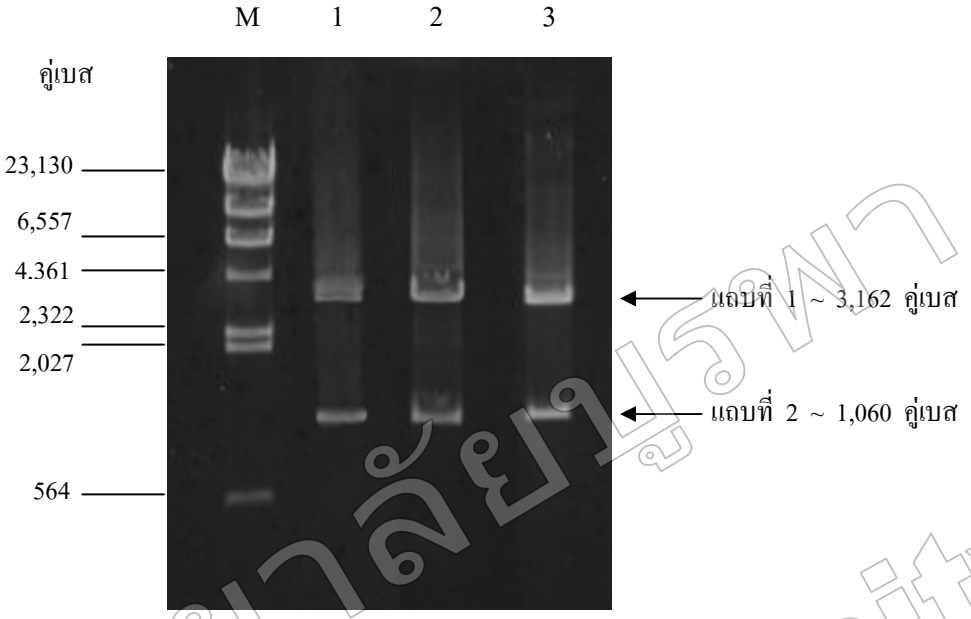
ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

ช่องที่ 1 คือ พลาสมิดสายผสมของปฏิกิริยาเชื่อม pUC118 กับชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

ช่องที่ 2 คือ พลาสมิดสายผสมของปฏิกิริยาเชื่อม pUC118 กับชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

ช่องที่ 3 คือ พลาสมิดสายผสมของปฏิกิริยาเชื่อม pUC118 กับชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-6 ผลการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI กับ *Hin*dIII ตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

ช่องที่ 1 คือ แถบพลาสมิด pUC118 กับชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากการตัดพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

ช่องที่ 2 คือ แถบพลาสมิด pUC118 กับชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากการตัดพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

ช่องที่ 3 คือ แถบพลาสมิด pUC118 กับชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากการตัดพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

แถบที่ 1 คือ พลาสมิด pUC118

แถบที่ 2 คือ ชิ้นยีน 16S rRNA

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.7 การตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อยืนยันผลการโคลน ดังวิธีที่อธิบายในหัวข้อ 3.3.2.7 พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4-7 ซึ่งเท่ากับขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้แสดงในรูปที่ 4-2

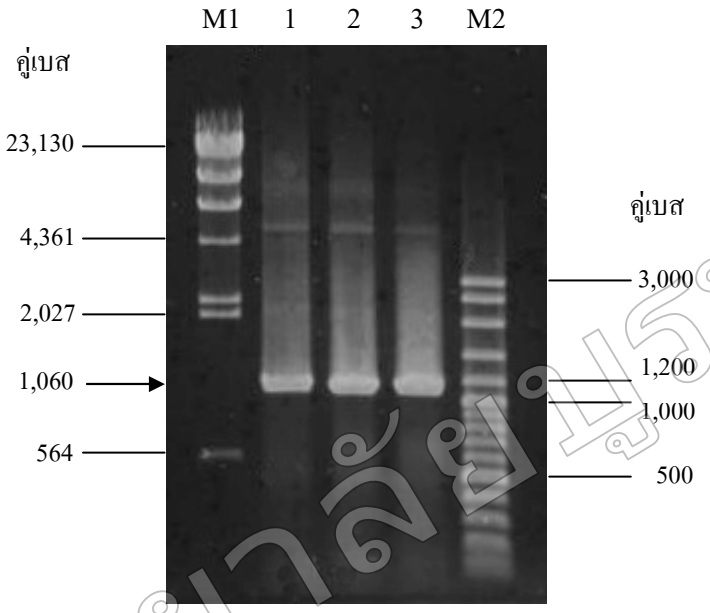
4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โลก

เมื่อนำพลาสมิดสายผสมไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ดังที่อธิบายในหัวข้อ 3.3.2.8 ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1, 2 และ 3 ขนาด 1029, 1008 และ 1010 คู่เบส ตามลำดับ สรุปลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในรูปที่ 4-8 ถึง 4-10 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอ-ไทด์โลก พบว่าไอโซเลทที่ 1 มีความเหมือนสูงสุดกับ *Enterococcus faecalis* (เลข Accession AB362602) 99% ไอโซเลทที่ 2 มีความเหมือนสูงสุดกับ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ AU45 (เลข Accession EF032681) 99% และไอโซเลทที่ 3 มีความเหมือนสูงสุดกับ *Klebsiella pneumoniae* (เลข Accession AF511429) 99% (ภาคผนวก ง-ช)

4.9 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาจัดจำพวก และวาดแผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการดังอธิบายในหัวข้อ 3.3.2.8.2 และ 3.3.2.8.3 พบว่าไอโซเลทที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียสกุล *Enterococcus faecalis* ขณะที่ไอโซเลทที่ 2 และ 3 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียสกุล *Klebsiella pneumoniae* แสดงในรูปที่ 4-11 ถึง 4-13

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้พลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

ช่องที่ 1 คือ แถบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคือพลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

ช่องที่ 2 คือ แถบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคือพลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

ช่องที่ 3 คือ แถบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นยีน 16S rRNA เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคือพลาสมิดสายผสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

ช่อง M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

```
   1  CGCATATAATGCAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAG    60
  61  GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG   120
 121  GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCT   180
 181  TTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC   240
 241  ACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA   300
 301  CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGA   360
 361  CCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAA   420
 421  GAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTA   480
 481  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC   540
 541  GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA   600
 601  GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGC   660
 661  GGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA   720
 721  CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG   780
 781  CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGC   840
 841  ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG   900
 901  GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGGGTTTAATTTGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGG   960
 961  TCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAAAAAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGG  1020
1021  GGGTGCATG
```

รูปที่ 4-8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

```
   1  CCTAACACCTGCAAGTCGAGCGGTAGCCCAGAGAGCTTGCTTTCGGGTGACGAGCGGCGG   60
  61  ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG  120
 121  CTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA  180
 181  TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  240
 241  GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  300
 301  AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGTAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  360
 361  TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  420
 421  ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  480
 481  GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  540
 541  TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA  600
 601  GGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  660
 661  TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  720
 721  GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTT  780
 781  GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  840
 841  AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  900
 901  ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTT  960
 961  TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGTGCTGCATG
```

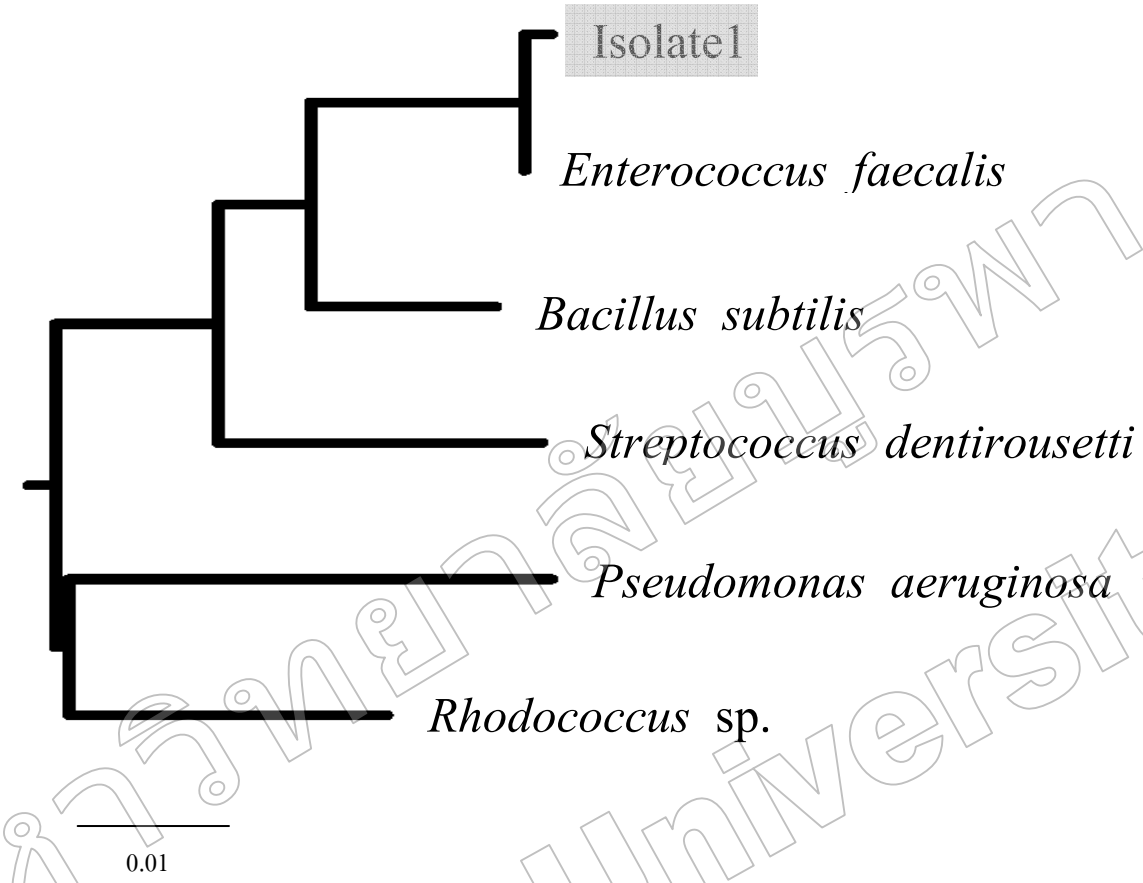
รูปที่ 4-9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

```
   1 CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCCCAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGGGG    60
  61 ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG   120
 121 CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA   180
 181 TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA   240
 241 GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG   300
 301 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG   360
 361 TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA   420
 421 ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAACAGCCGC   480
 481 GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG   540
 541 TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA   600
 601 GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC   660
 661 TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA   720
 721 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTT   780
 781 GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG   840
 841 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC   900
 901 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCACAGAACTT   960
 961 TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGG
```

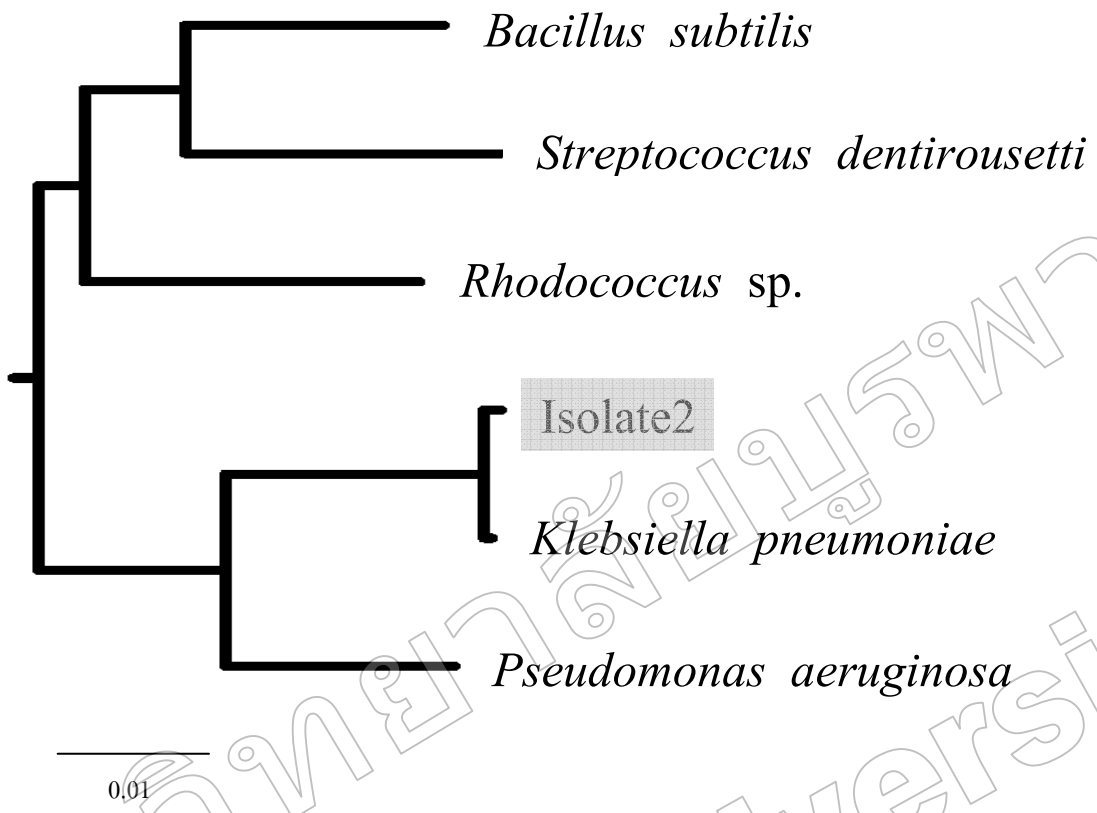
รูปที่ 4-10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



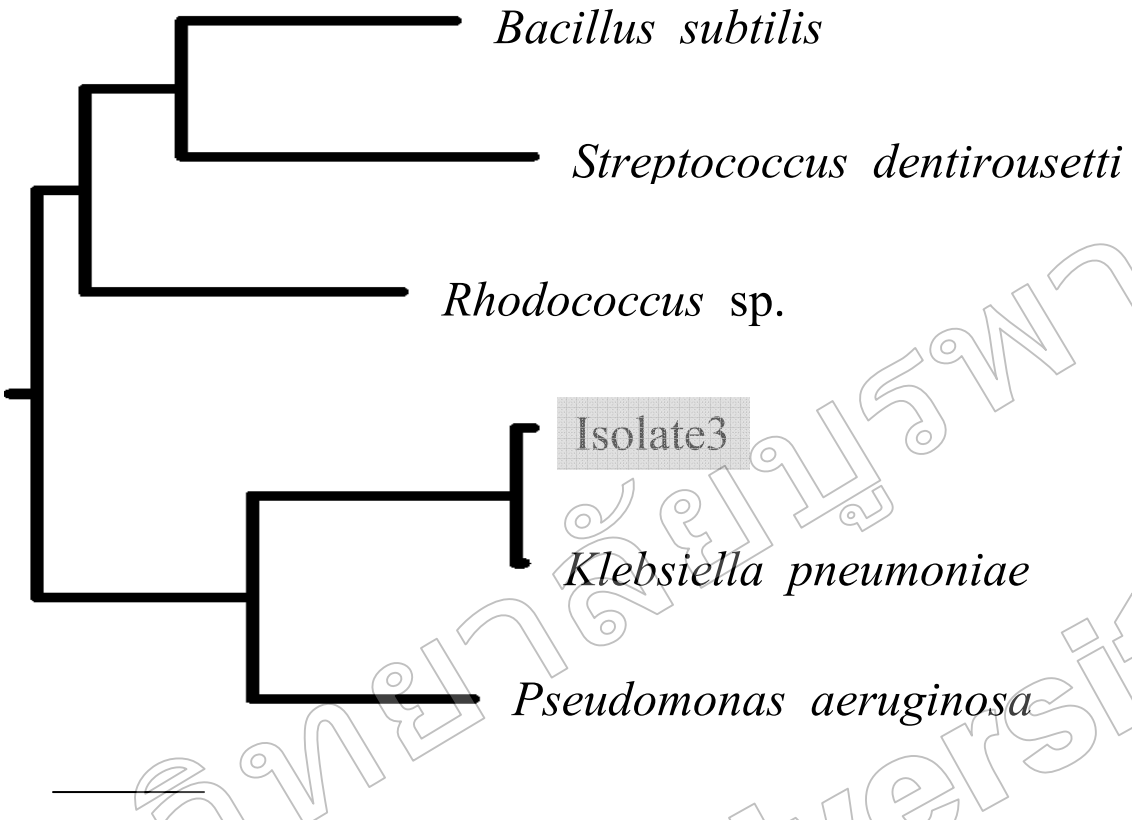
รูปที่ 4-11 แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้ และแถบเส้นแสดงถึงความแตกต่าง 0.01 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยปฏิบัติการจำลอง 100 bootstrap

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-12 แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้ และแถบเส้นแสดงถึงความแตกต่าง 0.01 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยปฏิบัติการจำลอง 100 bootstrap

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-13 แผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้ และแถบเส้นแสดงถึงความแตกต่าง 0.01 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยปฏิบัติการจำลอง 100 bootstrap

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

อะคริลาไมด์เป็นสารโมเลกุลเดียวที่มีพิษต่อระบบประสาท และมีแนวโน้มที่เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Segerback *et al*., 1995 และ Tareke *et al*., 2000) อย่างไรก็ตามมีการใช้อะคริลาไมด์อย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในธรรมชาติ (Cherry *et al*., 1956 และ Prasad, 1982) และจากรายงานพบการก่อตัวของอะคริลาไมด์ในอาหารจำพวกแป้งที่ได้จากพืชภายหลังผ่านกระบวนการปรุงแต่งที่ต้องการอุณหภูมิสูง เช่น การทอดหรือการอบ โดยเชื่อว่าอะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลล์ลาด (Tareke *et al*., 2000 และ Tareke *et al*., 2002) จากคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ของอะคริลาไมด์ (SUBSTANCE PROFILES, 1991) ทำให้เมื่อถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจึงเกิดการปนเปื้อนในรูปของสารละลายอย่างแพร่หลาย ได้เคยมีรายงานวิจัยพบการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ และในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมและที่สำคัญ คือ สามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้จากแหล่งน้ำดังกล่าว (Shanker *et. al*., 1990 และ lgnatov *et. Al.,* 1996) ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างน้ำจากคลองและแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนในบริเวณที่มีคราบน้ำมันมาทำการเลี้ยงบำรุงในอาหารเหลวที่มีอะคริลาไมด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบอาหารเหลวมีลักษณะขุ่น แสดงถึงมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน และแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญ โดยอะคริลาไมด์ที่ใช้มีปริมาณที่เหมาะสมเนื่องจากไม่ไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อนำเชื้อเจริญที่ได้มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีอะคริลาไมด์เป็นส่วนประกอบเหมือนในอาหารเหลว พบโคโลนีแบคทีเรียเจริญบนจานเพาะเลี้ยงที่มีลักษณะแตกต่างกันเพียง 3 ชนิดคือ ไอโซเลทที่ 1 ซึ่งเป็นโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวใส เป็นจุดกลมขนาดเล็ก และมีขอบเรียบ, ไอโซเลทที่ 2 ซึ่งเป็นโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวขุ่น เป็นจุดกลมขนาดเล็ก มีขอบเรียบ และเป็นเมือกเยิ้ม และไอโซเลทที่ 3 ซึ่งเป็นโคโลนีมีลักษณะสีขาวขุ่น เป็นจุดกลมขนาดใหญ่กว่าโคโลนีของไอโซเลทที่ 2 มีขอบเรียบ และเป็นเมือกเยิ้ม ผลการทดลองที่ได้ยืนยันการตรวจพบแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการสลายอะคริลาไมด์ในสิ่งแวดล้อม แม้ว่าจะไม่พบความหลากหลายของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ในแหล่งน้ำทิ้งชุมชนดังกล่าวมากนัก และสังเกตพบว่าโคโลนีของไอโซเลทที่ 2 กับ 3 มีลักษณะที่มีความคล้ายคลึงกันมาก

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และการทำอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส พบว่าปริมาณโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากทั้ง 3 ไอ-โซเลท มีปริมาณและคุณภาพในระดับที่ดี และไม่พบการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ แสดงถึงคุณภาพที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เพียงพอของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุลต่อไป และเมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ในชิ้นยีน 16S rRNA ของ *E. coli* ดังกล่าวมาแล้วในบทที่ 3 (Precigou *et al*., 2004) พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส ตามช่วงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ดังที่คาดไว้ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 สายมีเบสคู่สมที่มีความอนุรักษ์มากกับดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียและ สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไปได้ เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาผ่านการทำบริสุทธิ์, ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมเข้าชิ้นยีน *lacZ* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์บีต้า-กาแลกโตซิเดสของพลาสมิด pUC118 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน เมื่อทำการทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่บนอาหารที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG เมื่อนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส พบแถบพลาสมิดมีขนาดสูงขึ้น แสดงถึงความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทอยู่

จากการตรวจสอบการมีชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ โดยแถบที่ 1 เป็นแถบของพลาสมิดที่มีขนาด 3,162 คู่เบส ส่วนแถบที่ 2 เป็นแถบของชิ้นยีน 16S rRNA ที่มีขนาด 1,060 คู่เบส และเมื่อนำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อยืนยันผลการโคลน พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 1,060 คู่เบส เท่ากับขนาดที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เริ่มต้น แสดงให้เห็นถึงการมีชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้ และเมื่อนำพลาสมิดสายผสมที่ได้รับการยืนยันว่ามีชิ้นยีน 16S rRNA ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโลกและวิเคราะห์วงค์วานวิวัฒนาการ เพื่อจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าไอโซเลทที่ 1 มีความเหมือนสูงสุด 99% กับ *Enterococcus faecalis* (เลข Accession AB362602) ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบคทีเรียในสกุลนี้ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีมีสีขาวใส รูปร่างกลม ขนาดเล็ก และมีขอบเรียบ (Jacobs *et. al.*, 1978, Moellering and Krogstad, 1979 และ Uttley *et. al.,*1988) ให้ผลที่สอดคล้องกับลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่คัดเลือกได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่คัดเลือกได้จัดอยู่ในสกุล *Enterococcus faecalis* สำหรับไอโซเลทที่ 2 และไอโซเลทที่ 3 มีความเหมือนสูงสุด 99% กับ *Klebsiella pneumoniae* เลข Accession EF032681 และ เลข Accession AF511429 ตามลำดับ ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีมีสีขาวขุ่นถึงสีเหลืองอ่อน ขนาดใหญ่ มีลักษณะเมือกเยิ้ม (Chen *et. al.*, 2007 และ Prescott, 2007) พบว่ามี

ความคล้ายคลึงบางส่วนกับแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 และ 3 ที่คัดเลือกได้ จึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอ-โซเลทที่ 2 และ 3 จัดอยู่ในสกุล *Klebsiella pneumoniae* แม้ว่าไอโซเลทที่ 2 กับ 3 จะไม่พบความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของลักษณะโคโลนีหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่จากการศึกษาลักษณะเฉพาะบางส่วน เช่น การเจริญในอาหารที่มีความแตกต่างของค่าพีเอชพบว่าไอโซเลทที่ 2 เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 4 ในขณะที่ไอโซเลทที่ 3 เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7 และการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นหลากหลายของอะคริลาไมด์พบว่าทั้งไอโซเลทที่ 2 และ 3 เจริญได้ดีที่สุดในอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ชัชวาลย์ นาชัยโชติ, 2550) จึงดูเหมือนจะสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 กับ 3 อาจเป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกันคือสกุล *Klebsiella pneumoniae* แต่จัดอยู่ในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอะคริลาไมด์ได้บางสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Xanthomonas* และเมื่อเร็วๆนี้ได้ทำการแยก *Rhodopseudomonas palustris* จากน้ำทิ้ง ซึ่งในตัวอย่างทั้งหมดนี้เมแทบอลิซึมของอะคริลาไมด์จะมีปฏิกิริยาเริ่มต้นที่เกี่ยวข้องคือ ปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่นสลายอะคริลาไมด์เพื่อผลิตอะคริเลต (Wampler and Ensign, 2005) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปถึงประสิทธิภาพในการสลายอะคริลาไมด์ รวมทั้งหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาดีอะมิเดชั่น คือยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ดีอะมิเดสที่สามารถสลายอะคริลาไมด์เป็นอะคริเลต เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมต่อไป แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคกล่าวคือ แบคทีเรียสกุล *Enterococcus* อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ หรือพบในสิ่งแวดล้อมมากกว่า 10 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ที่มักก่อให้เกิดโรคในคน เช่น โรคภาวะเยื่อบุหัวใจอักเสบ (infective endocarditis), การติดเชื้อที่ระบบปัสสาวะ รวมไปถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Jacobs *et. al.*, 1978, Moellering and Krogstad, 1979 และ Uttley *et. al.,*1988) ขณะที่แบคทีเรียสกุล *Klebsiella* พบได้ในสิ่งแวดล้อม และระบบทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งระบบทางเดินหายใจ หรือการติดเชื้อที่บาดแผลที่ทำให้เกิดโรคปอดบวม และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Chen *et. al.*, 2007 และ Prescott, 2007) ดังนั้นถึงแม้ยังไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้ก็ตาม ก็เป็นการเสี่ยงที่จะนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งสองสายพันธุ์นี้มาใช้ในการศึกษาต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2 สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี โดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งเดียวของคาร์บอนและไนโตรเจน พบแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 3 ไอโซเลท เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส หลังจากโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แล้วสกัดพลาสมิดสายผสม ทำการตรวจสอบชิ้นยีน 16S rRNA ในพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII พบแถบพลาสมิดขนาดประมาณ 3,162 คู่เบสกับแถบของชิ้นยีน 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส เมื่อยืนยันผลการตรวจสอบอีกครั้งโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมที่เตรียมได้โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1,060 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดที่พบจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเมื่อนำพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โลกสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่คัดแยกได้ดังนี้ แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 จัดอยู่ในสกุล *Enterococcus faecalis* ขณะที่แบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 และไอโซเลทที่ 3 จัดอยู่ในสกุล *Klebsiella pneumoniae*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ โดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งจำแนกโคโลนีที่เจริญบนอาหารอะคริลาไมด์ได้โดยการพิจารณาความแตกต่างจากรูปร่าง ขนาด สี และลักษณะขอบของโคโลนี ซึ่งอาจจะทำให้แยกความแตกต่างได้ไม่ดีเท่าที่ควร เพราะโคโลนีบางชนิดมีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นเพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น การย้อมสีแกรม การย้อมสปอร์ สังเกตการเคลื่อนที่ ศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ เพื่อช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ร่วมกับการจำแนกสายพันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ได้ทำการศึกษาในโครงงานวิจัยฉบับนี้ รวมทั้งควรศึกษาความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยใช้เทคนิคที่มีศักยภาพ เช่น โครมาโทรกราฟีความดันสูง เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้จริง เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค จึงไม่ควรนำมาศึกษาต่อไปและไม่ควรนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอกสารอ้างอิง

กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2549). *เอกสารประกอบการสอน Principles of genetic engineering*. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชัชวาลย์ นาชัยโชติ. (2550). *การศึกษาคุณลักษณะบางส่วนของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่ได้จากแหล่งน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี*. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชนิตรา ธุวจิตต์. (2548). *เทคโนโลยีทางชีววิทยาโมเลกุล*. ใน ตำราชีวเคมี. เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์ และคณะ. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. 531 หน้า.

นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2548). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วาสนา ศิริรังสี. (2539). *Gel electrophoresis*. ใน วิทยาการทันสมัยในการตรวจสอบวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์. 476 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2548). *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 หน้า.

ศิริพร สิทธิประณีต. (2531). *พันธุวิศวกรรม:ปฏิบัติการเบื้องต้น*. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: ส.วิชาญการพิมพ์. 206 หน้า.

Bergmark, E., C. J. Calleman, and L. G. Costa. (1991). Formation of hemoglobulin in adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm*. 111: 352–363.

Brown, L., M. M. Rhead, D. Hill and K. C. C. Bancroft. (1982). Rapid screening technique utilizing high-performance liquid chromatography for assessing acrylamide contamination in effluents. *Analyst.* 107: 749-754.

Cavins, J. F., and M. Friedman. (1968). Specific modification of sulfhydryl groups with β-unsaturated compounds. *J. Biol. Chem*. 243: 3357-3360.

Chen C.Y., C.M. Kao, and S.C. Chen. (2007) Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere*. 10: 1-7.

Cherry, A. B., A. F. Gabaccia, and H. W. Senn. (1956). The assimilation behavior of certain toxic organic compounds in natural waters. *Sewage Ind. Waste*. 28: 1137.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Croll, B. T., G. H. Arkell, and R. P. J. Hodge. (1974). Residues of acrylamide in water. *Water Ras*. 8: 989-993.

Friedrick, G.C., and G. Mitrenga. (1981). Utilization of aliphatic amides and formation of two different amidases by *Alcaligenes eutrophus. J. Gen. Microbiol*. 125: 367-374.

Gökmen V. and Ş. Z. Hamide. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*. 103 : 196-203.

Grant, D. J. W., and J. Wilson. (1973). Degradation and hydrolysis of amides dy *Corynebacterium pseudodiptheriticum* NCIB 10803. *Microbios*. 8: 15-22.

Hirrlinger, B., A. Stolz, and H. J. Knackmuss. (1996). Purification and properties of an amidase from *Rhodococcus erythropolis* MP50 which enantioselectively hydrolyzes 2-arylpropionamides. *J. Bacteriol*. 178: 3501-3507.

Hynes, M. J., and J.A. Pateman. (1970). The use of amides as nitrogen source by *Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol*. 63: 317-324.

Ignatov O.V., S.M. Rogatcheva , O.V. Vasileva , and V.V. Ignatov. (1996). Selective determination of acrylonitrile, acrylamide and acrylic acid in waste waters using microbial cells. *Resources, Conservation and Recyclin*. 18: 69-78.

Jacobs M. R., H. J. Koornhof, R. M. and Robins-Browne. (1978). Emergence of multiply resistance in enterococci. *N Engl J Med*. 299: 735-40.

Kagayama, T., and T. Ohe. (1990). Purification and properties of an aromatic amidase from *Pseudomonas* sp. GDI211. *Agric. Biol. Chem*. 54: 2565-2571.

Lande, S. S., S. J. Bosch, and P. H. Howard. (1979). Degradation and leaching of acrylamide in soil. *J. Environ Qual*. 8: 133-137.

Moellering R. C. Jr. and D. J. Krogstad. (1979). Antibiotic resistance in enterococci. In: Schlessinger D, 2ed. *Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 293-298.

Mottram, D. S., B. L. Wedzicha, and A. T. Dodson. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*. 419: 448–449

Nagasawa T., H. Shimizu, and H. Yamada. (1993). The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 40: 189–195.

Nagasawa, T., and H. Yamada. (1989). Microbial transformation of nitriles. *Trends Biotechnol*. 7: 153-158.

Bursa Uludağ University

Nawaz, M. S., S. M. Billedeau, and C. E. Cerniglia. (1998). Influence of selected physical parameters on the biodegradation of acrylamide by immobilized cells of *Rhodococcus* sp. *Biodegradation* 9: 381–387.

Nawaz, M. S., W. Franklin, and C. E. Cerniglia. (1993). Degradation of acrylamide by immobilized cells of a *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas maltophilia*. *Can. J. Microbiol*. 39: 207–212.

Nawaz M. S., W. Franklin, and C. E. Cerniglia. (1994a) Degradation of aliphatic amide mixture by immobilized and non immobilized cells of *Pseudomonas* sp. *Environ. Sci. Technol*. 28: 1106–1109.

Nawaz, M. S., A. A. Khan, J. E. Seng, J. E. Leakey, P. H. Siitonen, and C. E. Cerniglia. (1994b). Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol*. 60: 3343–3348.

Prasad, D.Y. (1982). Polyacrylamide as a coagulant aid in water treatment. *Chem Age India*. 34: 387-391.

Precigou S., M. Wieser1, P. Pommares, P. Goulas1, and R. Duran. (2004). *Rhodococcus pyridinovorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. *Biotechnology Letters*. 26: 1379-1384.

Prescott J. (2007). Letter to the Editor. *Veterinary Microbiology*. 125: 1.

Segerback, D., C. J. Calleman, J. L. Schreoder, L. G. Costa, and E. M. Faustman. (1995). Formation of *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [^{14}C]acrylamide. *Carcinogenesis* 16: 1161-1165.

Shanker, R., C. Ramakrishna, and P. K. Seth. (1990). Microbial degradation of acrylamide monomer. *Arch. Microbiol*. 154: 192–198.

Stadler, R. H., I. Blank, N. Varga, F. Robert, J. Hau, P. A. Guy, M. Robert, and S. Riediker. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 419: 449–450.

SUBSTANCE PROFILES. (1991). Acrylamide. *Sixth Annual Report on Carcinogens.* 1-3.

Svesson, K., L. Abramsson, W. Becker, A. Glymm, K.-E. Hellenas, Y. Lind, and R. J. Rosen. (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem. Toxicol*. 41: 1581–1586.

Tareke, E., P. Rydberg, S. Eriksson, and M. Tornqvist. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem*. 50: 4998–5006.

Tareke, E., P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, and M. Tornqvist. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol*. 13: 517–522.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tilson, H. A., and P. A. Cabe. (1979). The effects of acrylamide given acutely or in repeated doses on fore- and hindlimb functions of rats. *Toxicol. Appl. Pharm*. 47: 253–260.

Uttley A. H. C., C. H. Collins, and J. Naidoo. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*:1: 57-58.

Wampler, D. A., and S. A. Ensign. (2005). Photoheterotrophic metabolism of acrylamide by a newly isolated strain of *Rhodopseudomonas palustris. Appl. Environ. Microbiol*. 71: 5850-5857.

Wang, C., and C. Lee. (2001). Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolated from acrylonitrile-butadiene-styrene resin manufactured wastewater treatment system. *Chemosphere* 44: 1047–1053.

Wang, C., and C. Lee. (2007). Isolation of the acrylamide denitrifying bacteria from a wastewater treatment system manufactured with polyacrylonitrile fiber. *Curr Microbiol*. 55: 339-343.

Zabaznaya, E. V., S. V. Kozulin, and S. P. Voronin. (1998). Selection of strains transforming acrylonitrile and acrylamide into acrylic acid. *Appl. Biochem. Microbiol*. 34: 341–345.

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://gillnet.lab.nig.ac.jp/~cvector/map/pUC118.gif สืบค้นเมื่อ 12/01/2551

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=285 สืบค้นเมื่อ 12/01/2551

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/GEP/Lecture15/Image31.gif สืบค้นเมื่อ 31/01/2551

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif สืบค้นเมื่อ 31/01/2551

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.stami.no/IPS?module=Articles;action=Artic... สืบค้นเมื่อ 28/08/2550

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.student.chula.ac.th/~49371019/polymerase_chain_reaction.htm สืบค้นเมื่อ 09/01/2551

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.thaiscience.com/lab_vol/p23/PCR-DGGE.asp สืบค้นเมื่อ 06/01/2551

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. Nutrient broth (NB)

Nutrient	0.65	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient agar (NA)

Nutrient	1.3	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร

3. Stock 20% Acrylamide

Acrylamide	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ทั้งขวด แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. Stock solution สำหรับเตรียม Minimal medium

10X

KH_2PO_4	1.7	กรัม
Na_2HPO_4	9.8	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

100X

$MgSO_4.7\ H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4.7\ H_2O$	0.025	กรัม
H_2SO_4	2.5	ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส

1000X

MgO	0.54	กรัม
$CaCO_3$	0.1	กรัม
$FeSO_4.7\ H_2O$	0.22	กรัม
$ZnSO_4.7\ H_2O$	0.07	กรัม
$MnSO_4.5\ H_2O$	0.06	กรัม
$CuSO_4.5\ H_2O$	0.012	กรัม
$CoSO_4.7\ H_2O$	0.014	กรัม
H_3BO_3	0.003	กรัม
HCl	2.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส

5. Luria-Bertani broth (LB broth)

Bacto-Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Luria-Bertani agar (LB agar) + 50 μg/ml Ampicillin

Agar	3.5	กรัม
LB broth	100	มิลลิลิตร

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิขวดลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 50 μl ของ Ampicillin (0.1 g/ml)

7. อาหารเหลว Minimal medium + 0.5% Acrylamide

10X	5	มิลลิลิตร
Yeast extract	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	44	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแต่ละหลอดเติม

100X	50	ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1000X	5	ไมโครลิตร
20% Acrylamide	125	ไมโครลิตร

8. อาหารแข็ง Minimal medium + 0.5% Acrylamide

10X	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	87.5	มิลลิลิตร
Agar	2	กรัม

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิขวดลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม

100X	1	มิลลิลิตร
1000X	100	ไมโครลิตร
20% Acrylamide	2.5	มิลลิลิตร

9. 2X YT medium

Bacto-Tryptone	8	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. Ampicillin (0.1 g/ml)

Ampicillin	0.1	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	1	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	18.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าพีเอชของสารละลายเป็น 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. 5X TBE buffer (pH 8.0)

Tris base	60.5	กรัม
Boric acid	25.6	กรัม
0.5 M EDTA	20	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

13. 20% SDS

SDS	2	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	10	มิลลิลิตร

14. 1M Tris-HCl (pH 8.0)

Tris base	1.25	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าพีเอชของสารละลายเป็น 8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. TE buffer

1M Tris-HCl	100	ไมโครลิตร
0.5 M EDTA	10	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

16. X-gal (50 mg/ml)

X-gal	0.5	กรัม
N,N-dimethylformamide	1	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

17. 0.1M IPTG

IPTG	0.072	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	3	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

18. ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII

λ DNA	167	ไมโครลิตร
*Hin*dIII	5	ไมโครลิตร
10X *Hin*dIII buffer	50	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	278	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ตรวจสอบรูปแบบของแถบโดยอิเล็กโตรโฟเรซีสเจลอะกาโรส เติม 500 ไมโครลิตร phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสข้างบนมาเติม 100 ไมโครลิตร 6X loading dye เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

19. Stock glycerol

เชื้อแบคทีเรีย	300	ไมโครลิตร
Glycerol	700	ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวประมาณ 3 วินาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

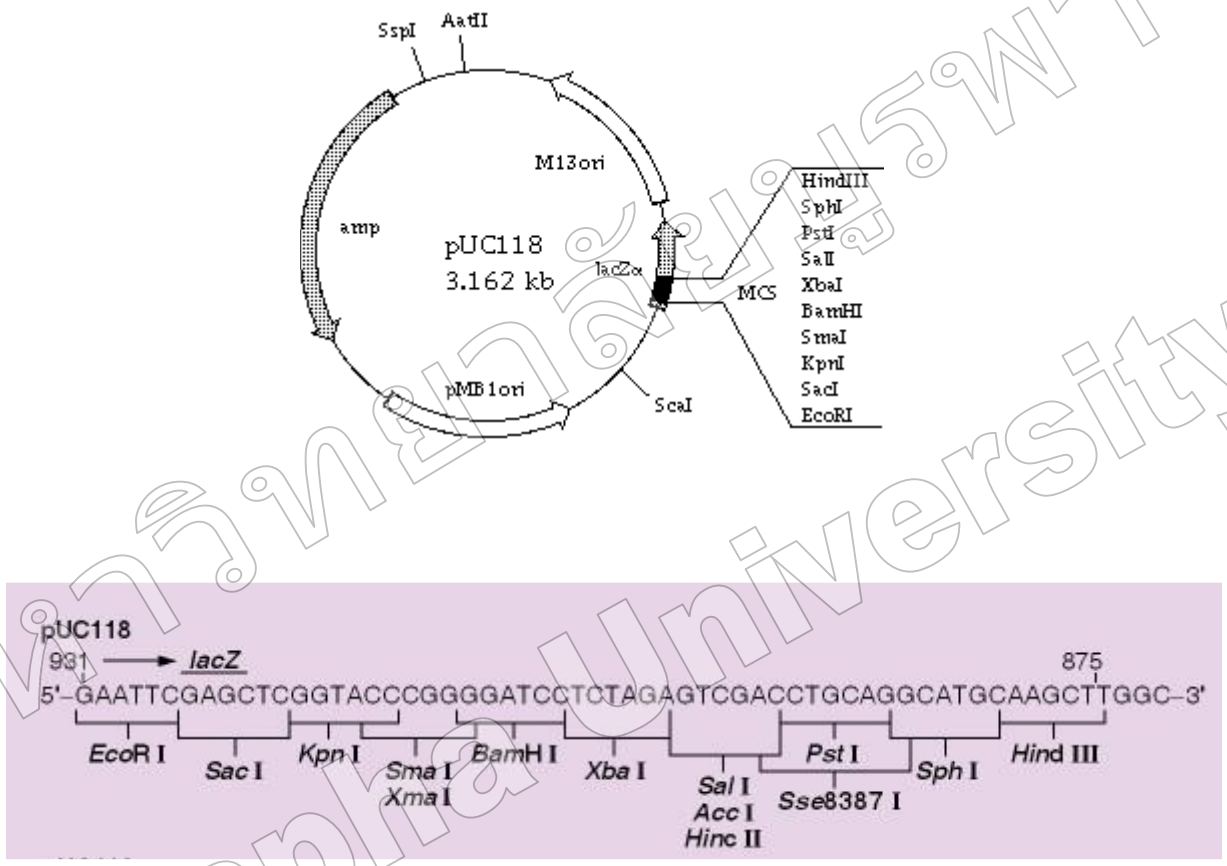
20. Ethidium bromide

Ethydium bromide	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

พลาสมิด pUC118 แสดงบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะในยีน *lacZ* ซึ่งใช้เป็นจุดโคลน



(ที่มา : http://gillnet.lab.nig.ac.jp/~cvector/map/pUC118.gif สืบค้นเมื่อ 12/01/2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค
วิธีการคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ซึ่งวัดได้ 1 หน่วย มีความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้าไอโซเลทที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร คือ 0.40935 จะมีความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ

50 x 0.40935 = 20.4675 x จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง (ถ้ามี)

เพราะฉะนั้นโครโมโซมอลดีเอ็นของสายพันธุ์ที่ 1 มีความเข้มข้นเท่ากับ 20.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

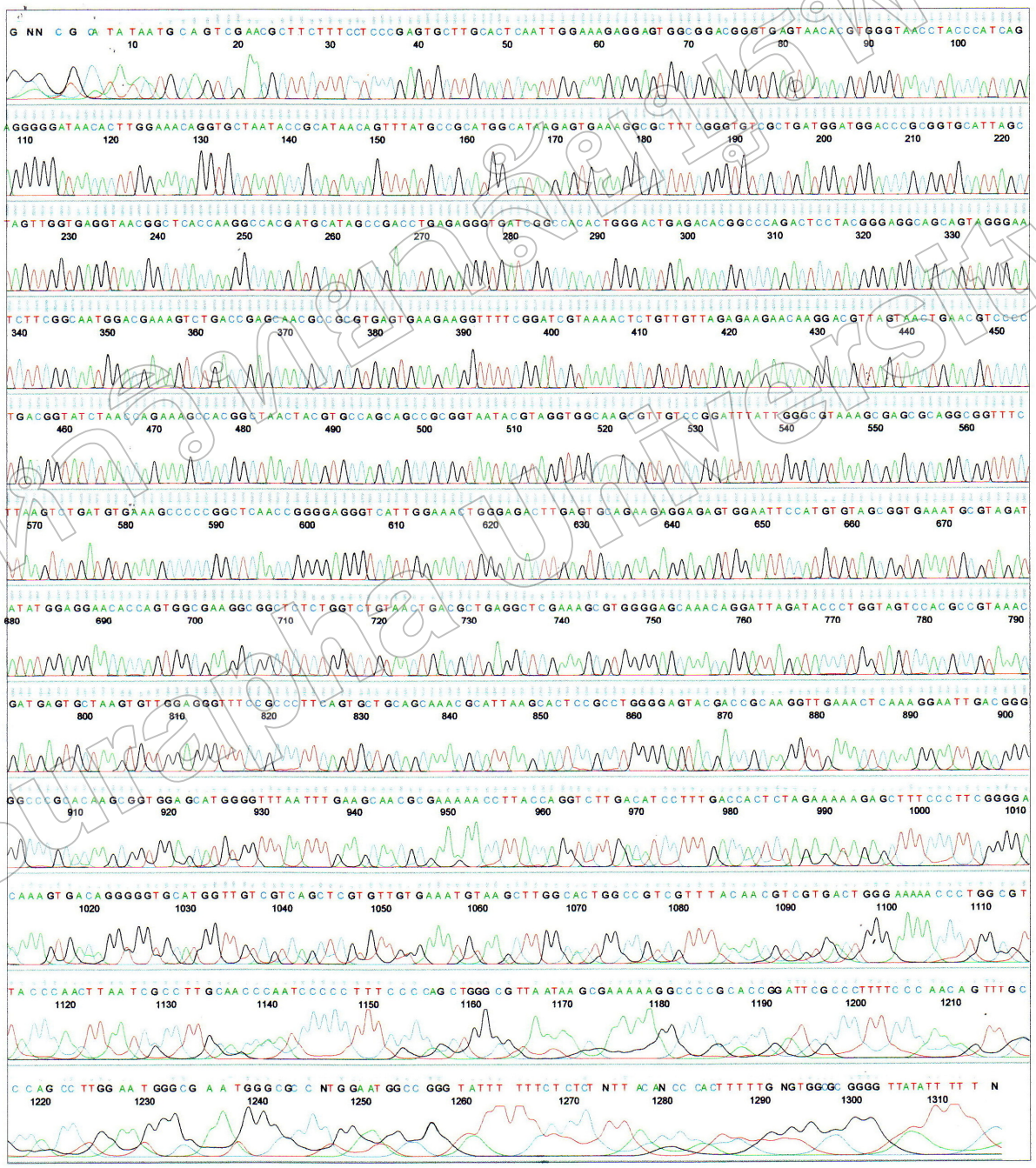
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ง

รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing profile)

Sample Name: 106419_K1_Primer_-_sense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.8114
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1389, C = 1639, G = 2219, T = 1596
Lane/Cap#: 42
Matrix: n/a
Direction: Native

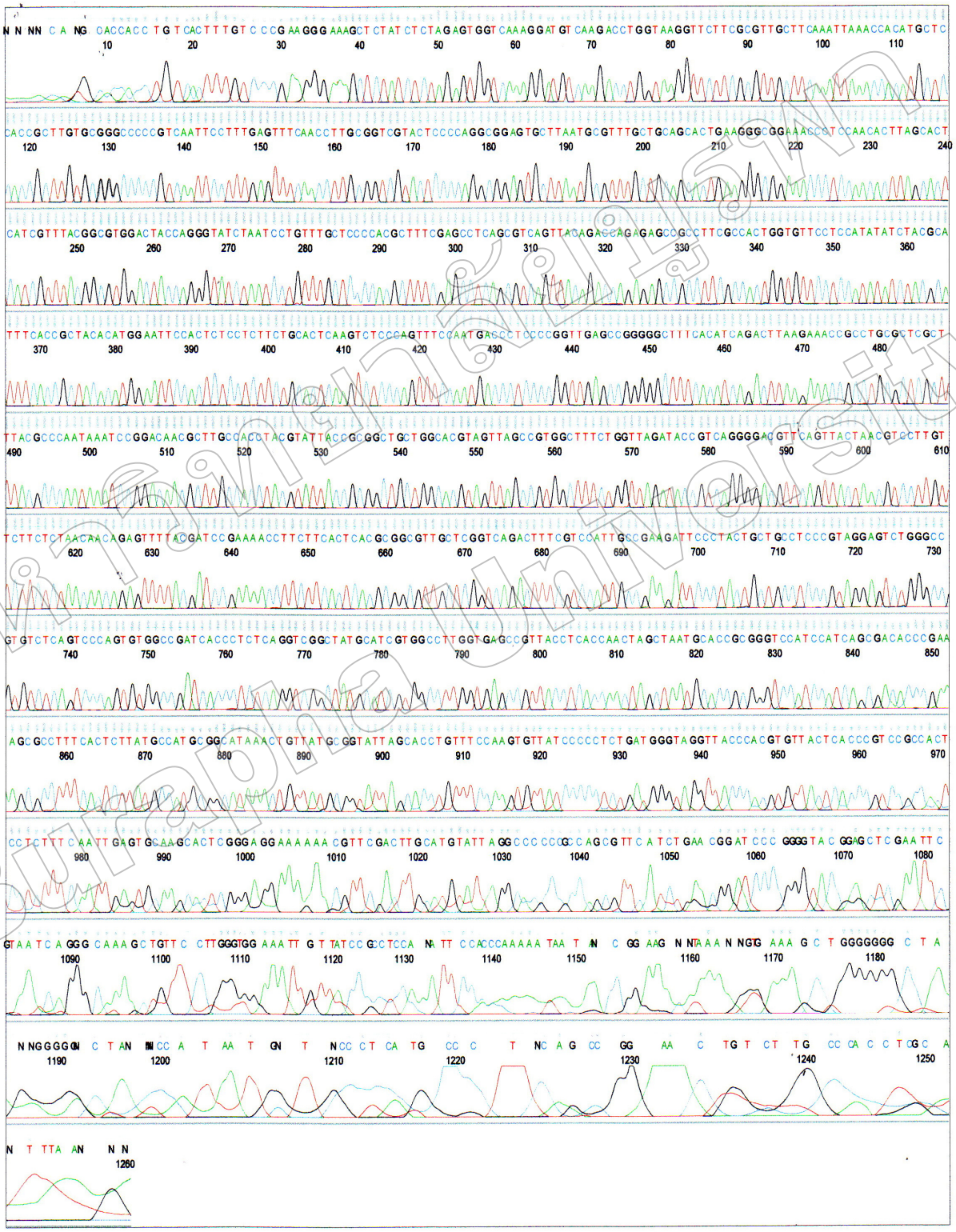


K1 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniNBam เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sample Name: 106632_K2_Primer_-_antisense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.6347
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 294, C = 427, G = 404, T = 409
Lane/Cap#: 17
Matrix: n/a
Direction: Native

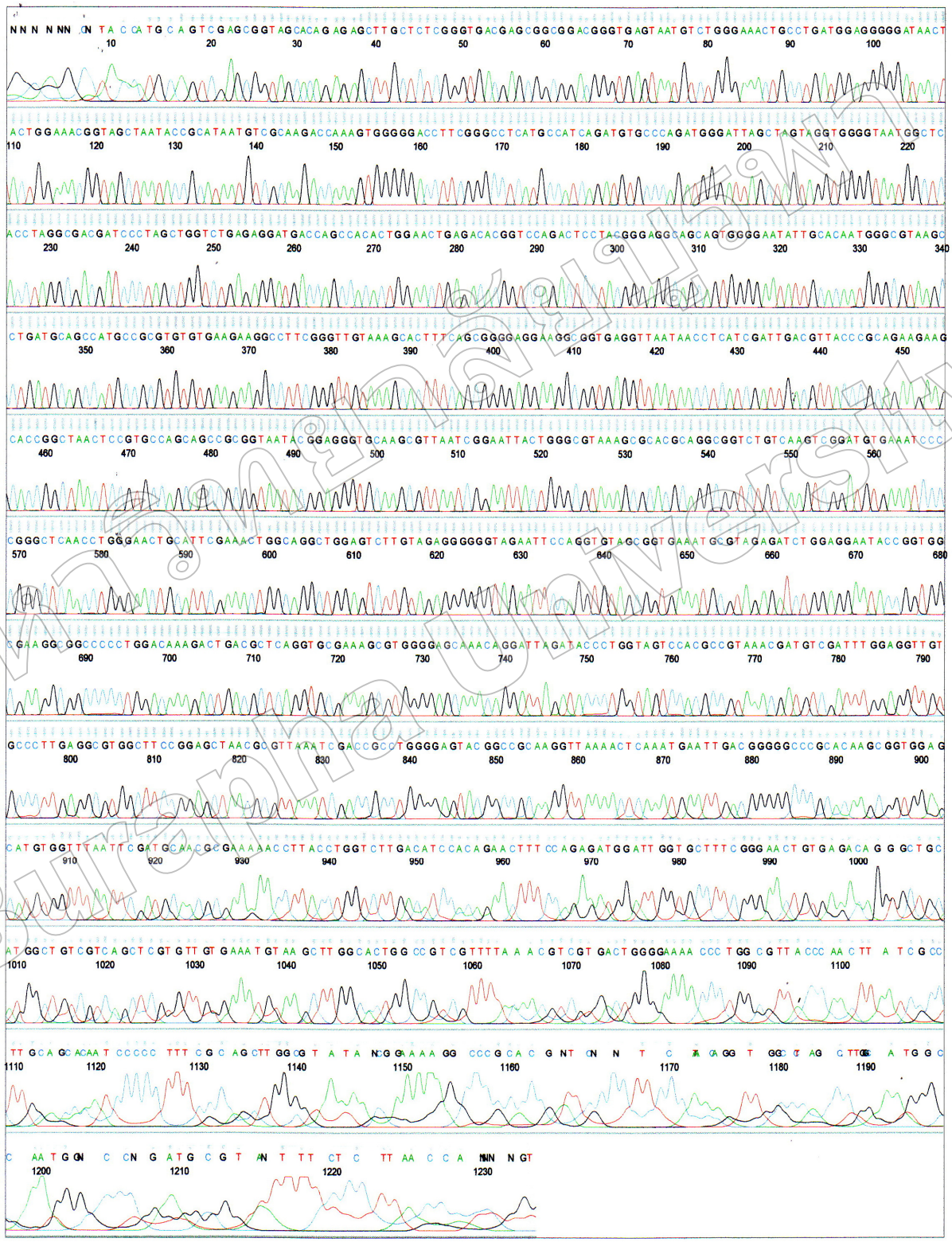


K2 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniCHin เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sample Name: 106421_K3_Primer_-_sense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.0331
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1330, C = 1624, G = 2166, T = 1528
Lane/Cap#: 48
Matrix: n/a
Direction: Native

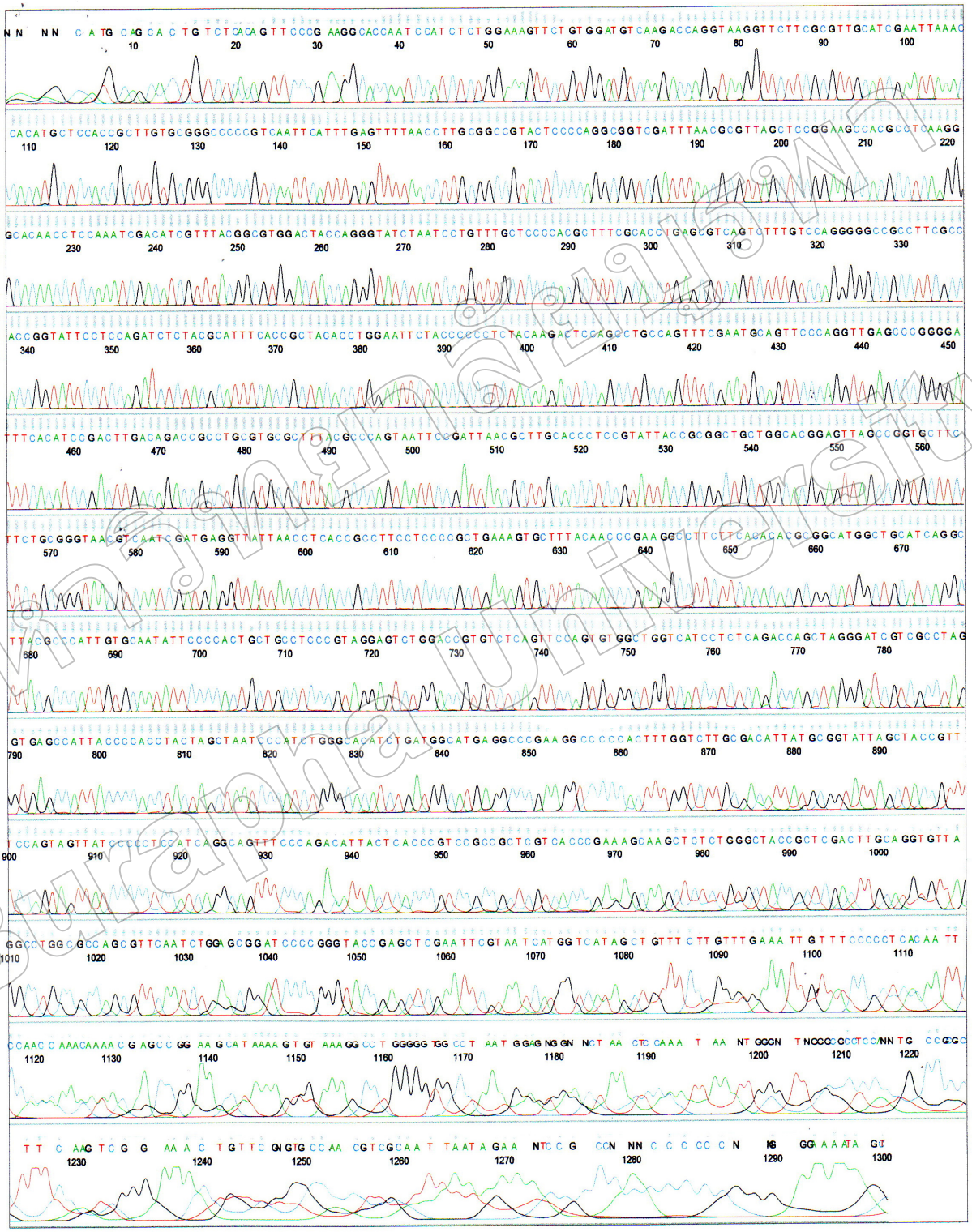


K3 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniNBam เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sample Name: 106633_K4_Primer_-_antisense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.7694
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1376, C = 2069, G = 1883, T = 1783
Lane/Cap#: 32
Matrix: n/a
Direction: Native

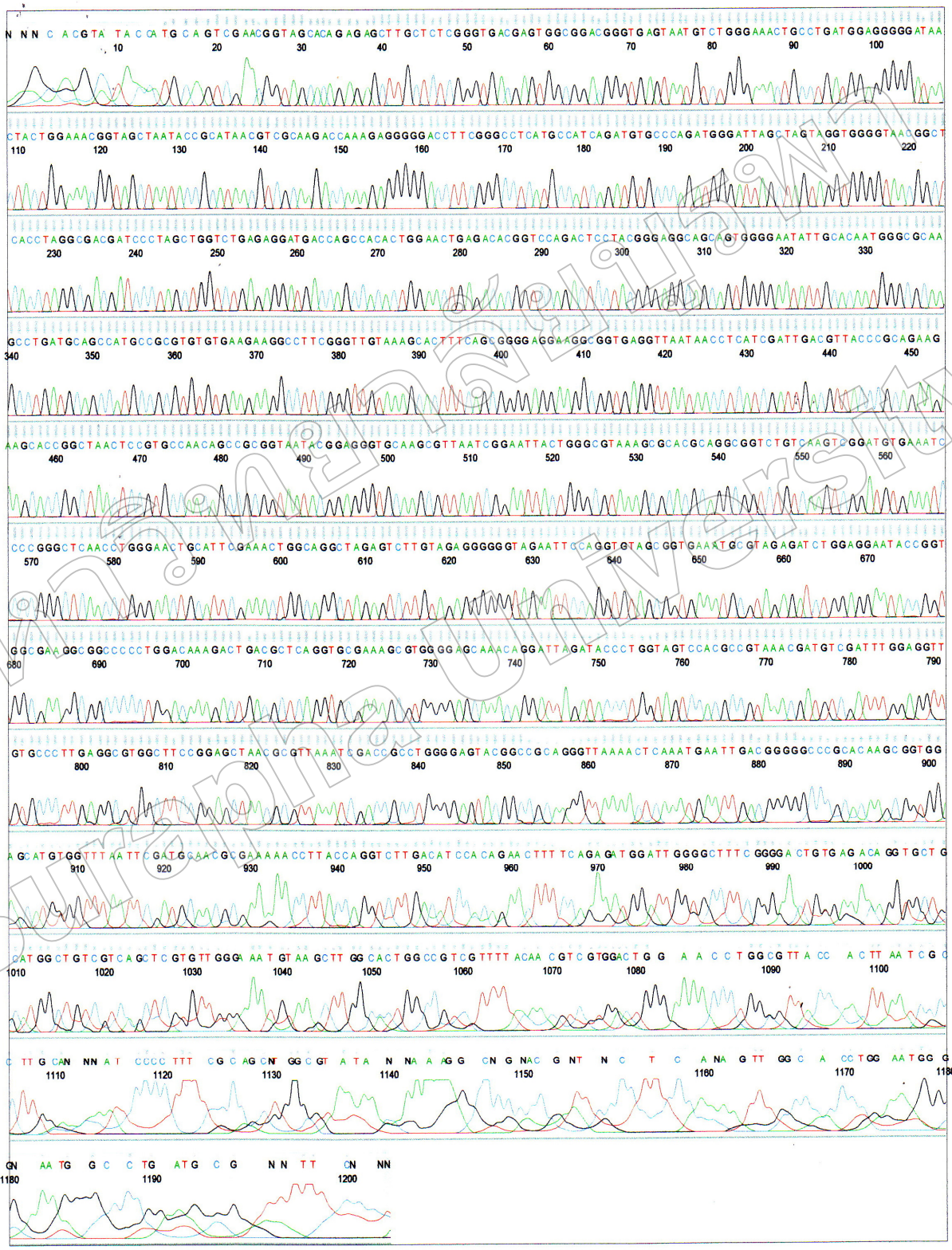


K4 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniCHin เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sample Name: 106423_K5_Primer_-_sense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.1844
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 982, C = 1141, G = 1543, T = 1019
Lane/Cap#: 46
Matrix: n/a
Direction: Native

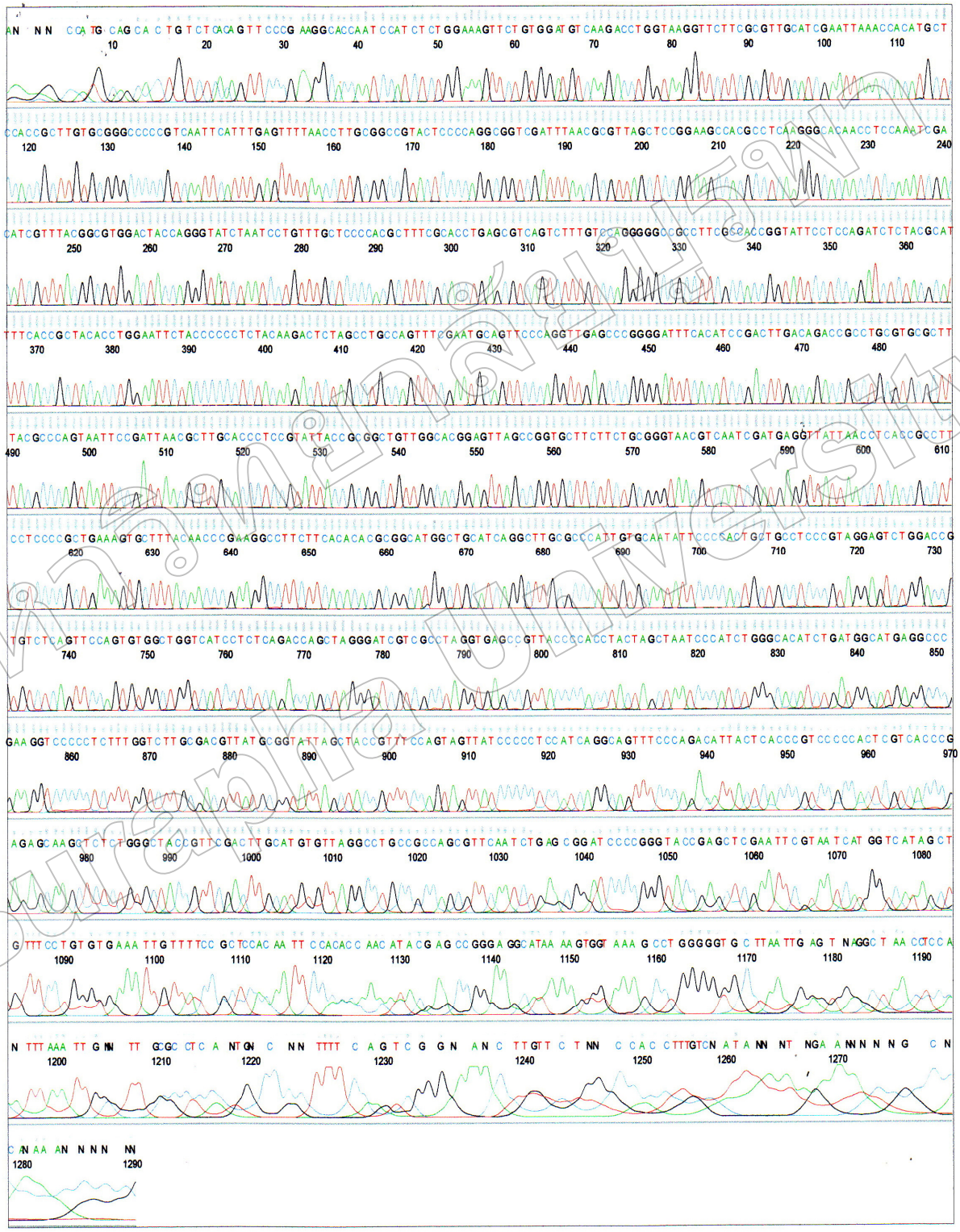


K5 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniNBam เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sample Name: 106634_K6_Primer_-_antisense
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.6859
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1338, C = 2166, G = 1881, T = 1873
Lane/Cap#: 31
Matrix: n/a
Direction: Native

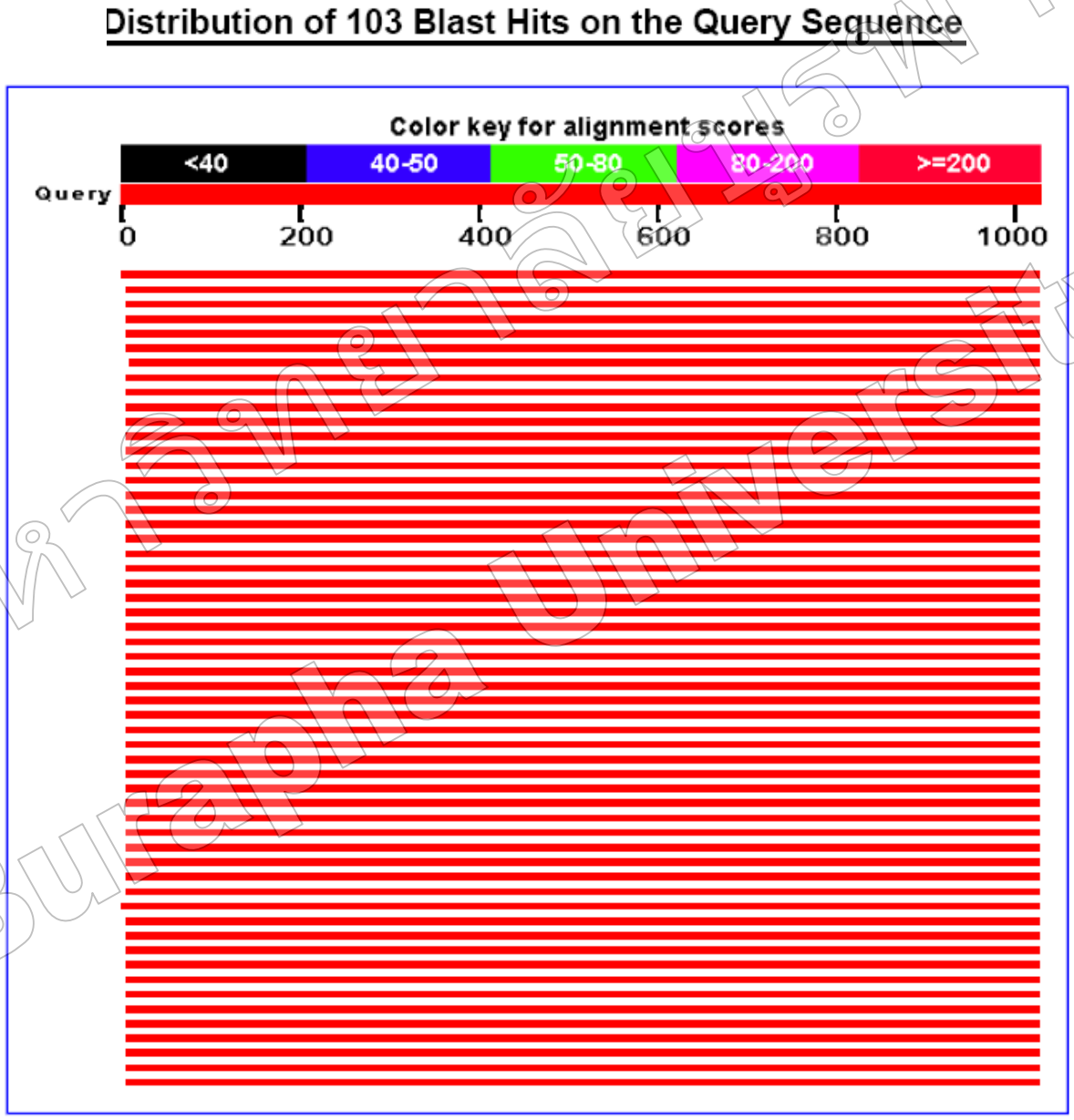


K6 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 เมื่อใช้ไพรเมอร์ 16S_UniCHin เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก จ
ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

DQ321639.1	Bacterium spbL1type3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1815	1815	99%	0.0	99%
AB291625.1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: ca	1808	1808	99%	0.0	99%
AB362602.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0113	1808	1808	99%	0.0	99%
AB362600.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0111	1808	1808	99%	0.0	99%
AB362592.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0103	1808	1808	99%	0.0	99%
AB244434.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A19-2	1808	1808	99%	0.0	99%
AB292313.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: N1-33	1808	1808	98%	0.0	99%
EF653454.1	Enterococcus faecalis strain 47/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AM697463.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001D078	1808	1808	99%	0.0	99%
AM697450.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001D065	1808	1808	99%	0.0	99%
EF510442.1	Uncultured bacterium clone P2D1-740 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
EF510402.1	Uncultured bacterium clone P2D1-555 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
EF510392.1	Uncultured bacterium clone P2D1-749 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
EF096516.1	Uncultured bacterium clone obob2_aaa04b09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ819319.1	Uncultured bacterium clone aab28d06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ818638.1	Uncultured bacterium clone aaa47b11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ818560.1	Uncultured bacterium clone aaa44e09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ818539.1	Uncultured bacterium clone aaa43h08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ818367.1	Uncultured bacterium clone aaa37c12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ818121.1	Uncultured bacterium clone aaa53d09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ817930.1	Uncultured bacterium clone aaa50g08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ817916.1	Uncultured bacterium clone aaa50f05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ817813.1	Uncultured bacterium clone aaa49b04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ462332.1	Enterococcus sp. T1-2006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ411814.1	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
DQ239694.1	Enterococcus faecalis strain D3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

AY850358.1	Enterococcus faecalis strain SFL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY692453.1	Enterococcus faecalis strain SL5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY395018.1	Enterococcus faecalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AB036835.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, complete sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY830406.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY830404.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY830402.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AY830398.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AF515223.1	Enterococcus faecalis strain RO90 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AB154827.1	Enterococcus faecalis gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
AJ420803.1	Enterococcus faecalis 16S rRNA gene, strain CECT481T	1808	1808	99%	0.0	99%
AE016830.1	Enterococcus faecalis V583, complete genome	1808	7229	99%	0.0	99%
AF039902.1	Enterococcus faecalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	99%	0.0	99%
Y18293.1	Enterococcus faecalis 16S rRNA gene	1808	1808	99%	0.0	99%
AB098122.1	Enterococcus faecalis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1806	1806	99%	0.0	99%
AY550919.1	Enterococcus faecalis isolate C13115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1806	1806	99%	0.0	99%
AB362599.1	Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0110	1804	1804	99%	0.0	99%
EF608536.1	Uncultured bacterium clone PCD-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AM697539.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0002D050	1804	1804	99%	0.0	99%
AM697381.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0002C078	1804	1804	99%	0.0	99%
AM697172.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C013	1804	1804	99%	0.0	99%
EF510423.1	Uncultured bacterium clone P2D1-543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF510380.1	Uncultured bacterium clone P2D1-758 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF510357.1	Uncultured bacterium clone P2D1-682 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF510355.1	Uncultured bacterium clone P2D1-743 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF509508.1	Uncultured bacterium clone P7D82-658 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF096454.1	Uncultured bacterium clone obob2_aaa03a12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

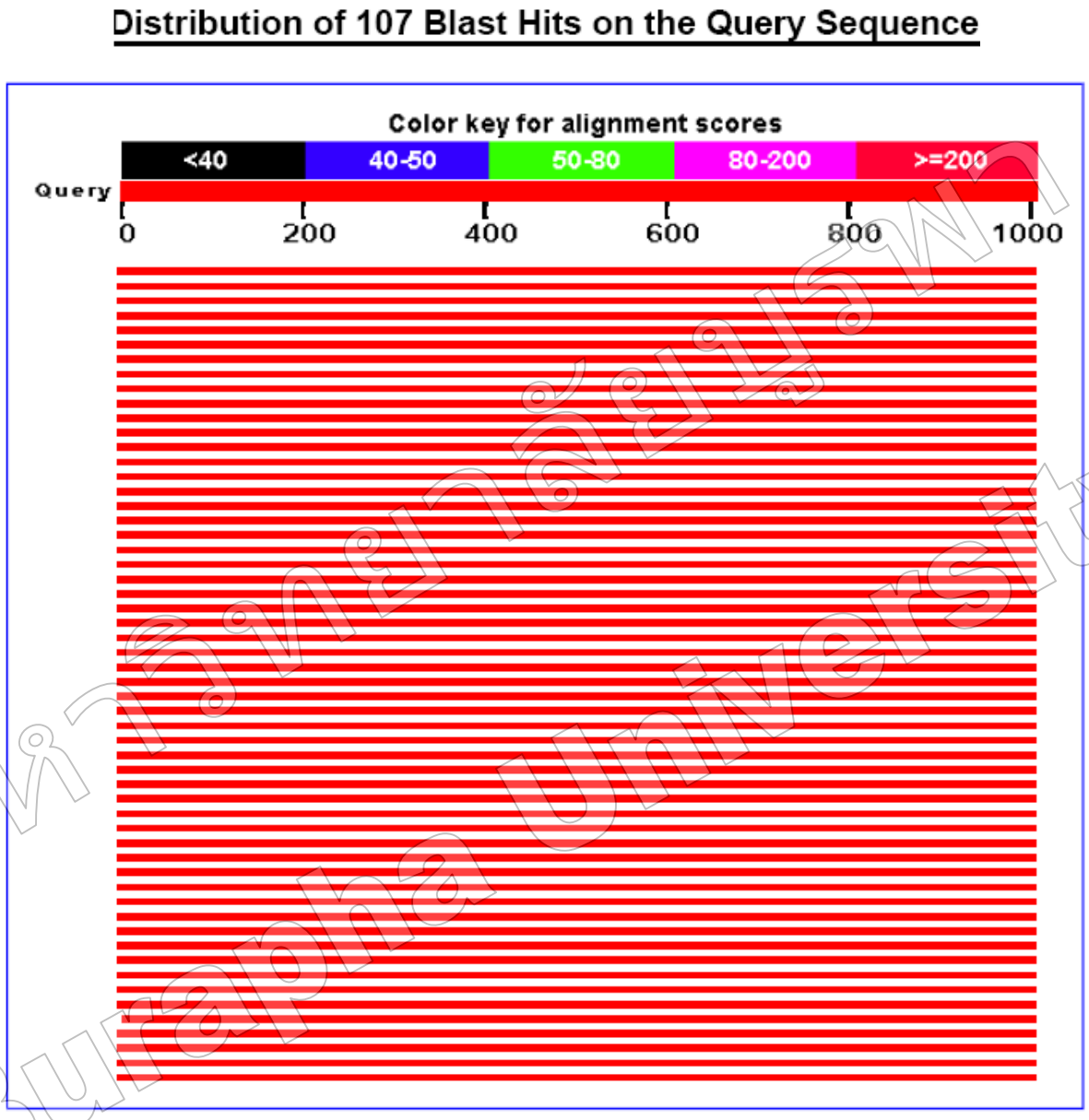
EF096358.1	Uncultured bacterium clone obob2_aaa01e08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
EF071403.1	Uncultured Firmicutes bacterium clone M0027_118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818707.1	Uncultured bacterium clone aaa48h10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818666.1	Uncultured bacterium clone aaa47g10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818608.1	Uncultured bacterium clone aaa46c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818504.1	Uncultured bacterium clone aaa42f08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818487.1	Uncultured bacterium clone aaa42b04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818448.1	Uncultured bacterium clone aaa40f12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818339.1	Uncultured bacterium clone aaa56f11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818292.1	Uncultured bacterium clone aaa56a10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818157.1	Uncultured bacterium clone aaa54a09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818046.1	Uncultured bacterium clone aaa52d03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ817871.1	Uncultured bacterium clone aaa50a03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ817854.1	Uncultured bacterium clone aaa49f09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ817841.1	Uncultured bacterium clone aaa49e05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AF076027.1	Enterococcus faecalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AF477496.1	Enterococcus faecalis strain PL9003 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AF447490.1	Enterococcus faecalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY830408.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY830407.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY830405.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY830403.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY830400.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY959120.1	Uncultured bacterium clone rRNA347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AY958990.1	Uncultured bacterium clone rRNA217 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ337520.1	Enterococcus sp. BBDP31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
AF070224.1	Enterococcus faecalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

AJ276460.1	Enterococcus faecalis partial 16S rRNA gene, strain P7812	1804	1804	99%	0.0	99%
AM157433.1	Enterococcus faecalis 16S rRNA gene, clone 7C4	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ295036.1	Enterococcus faecalis strain PFK3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ295035.1	Lactobacillus plantarum strain PFK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1804	1804	99%	0.0	99%
DQ818486.1	Uncultured bacterium clone aaa42a12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1802	1802	99%	0.0	99%
DQ983196.1	Enterococcus faecalis strain ABPL 007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%
DQ818297.1	Uncultured bacterium clone aaa56b03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%
EU289108.1	Uncultured Enterococcus sp. clone 8837-D0-A-2C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
EF604216.1	Uncultured bacterium clone 16saw14-01e01.w2k926r 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
EF510491.1	Uncultured bacterium clone P2D1-531 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
EF510416.1	Uncultured bacterium clone P2D1-736 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
EF096420.1	Uncultured bacterium clone obob2_aaa02e11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ819081.1	Uncultured bacterium clone aab25f05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ818677.1	Uncultured bacterium clone aaa48b05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ818577.1	Uncultured bacterium clone aaa45d06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ818571.1	Uncultured bacterium clone aaa45b10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ818366.1	Uncultured bacterium clone aaa37c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
DQ818309.1	Uncultured bacterium clone aaa56c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
AY959028.1	Uncultured bacterium clone rRNA255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%
AY942558.1	Enterococcus faecalis strain ChDC YE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

EF509952.1	Uncultured bacterium clone P4D7-472 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF509913.1	Uncultured bacterium clone P4D7-672 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF509910.1	Uncultured bacterium clone P4D7-595 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF509859.1	Uncultured bacterium clone P4D7-474 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF509823.1	Uncultured bacterium clone P4D7-404 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF509792.1	Uncultured bacterium clone P4D7-433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
EF403627.1	Uncultured bacterium clone SJTU_A2_04_52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	1781	1.408e+04	100%	0.0	99%
EF509961.1	Uncultured bacterium clone P4D7-465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509960.1	Uncultured bacterium clone P4D7-471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509959.1	Uncultured bacterium clone P4D7-456 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509943.1	Uncultured bacterium clone P4D7-425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509929.1	Uncultured bacterium clone P4D7-637 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509904.1	Uncultured bacterium clone P4D7-442 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509898.1	Uncultured bacterium clone P4D7-577 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509882.1	Uncultured bacterium clone P4D7-591 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509829.1	Uncultured bacterium clone P4D7-664 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509806.1	Uncultured bacterium clone P4D7-640 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509799.1	Uncultured bacterium clone P4D7-602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

EF509796.1	Uncultured bacterium clone P4D7-624 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF402184.1	Uncultured bacterium clone SJTU_B_04_67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF121343.1	Uncultured bacterium isolate RFLP pattern 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF032681.1	Klebsiella pneumoniae strain AU45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
AF511429.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	1779	100%	0.0	99%
Y17656.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene, strain ATCC13883T, partial	1777	1777	100%	0.0	99%
AB004753.1	Klebsiella pneumoniae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
EU048272.1	Klebsiella pneumoniae strain MG09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
EF509870.1	Uncultured bacterium clone P4D7-448 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
EF509862.1	Uncultured bacterium clone P4D7-594 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
EF509831.1	Uncultured bacterium clone P4D7-593 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
EF509812.1	Uncultured bacterium clone P4D7-661 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
AF076033.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	99%
X93214.1	K.pneumoniae 16S rRNA gene	1774	1774	100%	0.0	98%
EU360791.1	Klebsiella pneumoniae strain ECU-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EU360792.1	Klebsiella pneumoniae strain ECU-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
AY540111.1	Klebsiella sp. HE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EU231611.1	Klebsiella pneumoniae strain TCCC11046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
AB244431.1	Klebsiella sp. A18-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A18-1	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509957.1	Uncultured bacterium clone P4D7-646 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509940.1	Uncultured bacterium clone P4D7-410 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509928.1	Uncultured bacterium clone P4D7-606 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509920.1	Uncultured bacterium clone P4D7-426 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

EF509896.1	Uncultured bacterium clone P4D7-589 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509818.1	Uncultured bacterium clone P4D7-582 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
EF509809.1	Uncultured bacterium clone P4D7-621 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
DQ470487.1	Klebsiella pneumoniae strain NKU238 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
DQ470486.1	Klebsiella pneumoniae strain Kpne050830 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
DQ470485.1	Klebsiella pneumoniae strain CPK981 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
DQ113706.1	Uncultured bacterium clone I2-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	99%
Y17669.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene, strain Klebs919, partial	1772	1772	100%	0.0	98%
X87276.1	K.pneumoniae 16S rRNA gene	1770	1770	100%	0.0	99%
EF522822.1	Klebsiella sp. 093101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	99%	0.0	99%
AF228918.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
AJ233420.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene (strain DSM 30104)	1768	1768	100%	0.0	98%
EU333881.1	Klebsiella granulomatis strain K22-14 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
DQ520801.1	Enterobacteriaceae bacterium NR58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
DQ804224.1	Uncultured bacterium clone RL187_aah70e07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
AM184253.1	Klebsiella pneumoniae partial 16S rRNA gene, strain WAB1912	1766	1766	100%	0.0	98%
AY552753.1	Klebsiella pneumoniae isolate YNUCC0237 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	99%	0.0	98%
AF130981.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
AB114634.1	Klebsiella sp. P2 gene for 16S rRNA	1766	1766	100%	0.0	98%
U32868.1	Klebsiella sp. strain zlmy 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
U31076.1	Klebsiella sp. strain zmvsy 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1766	1766	100%	0.0	98%
AF228919.1	Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	98%
EF510907.1	Uncultured bacterium clone P6D23-687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

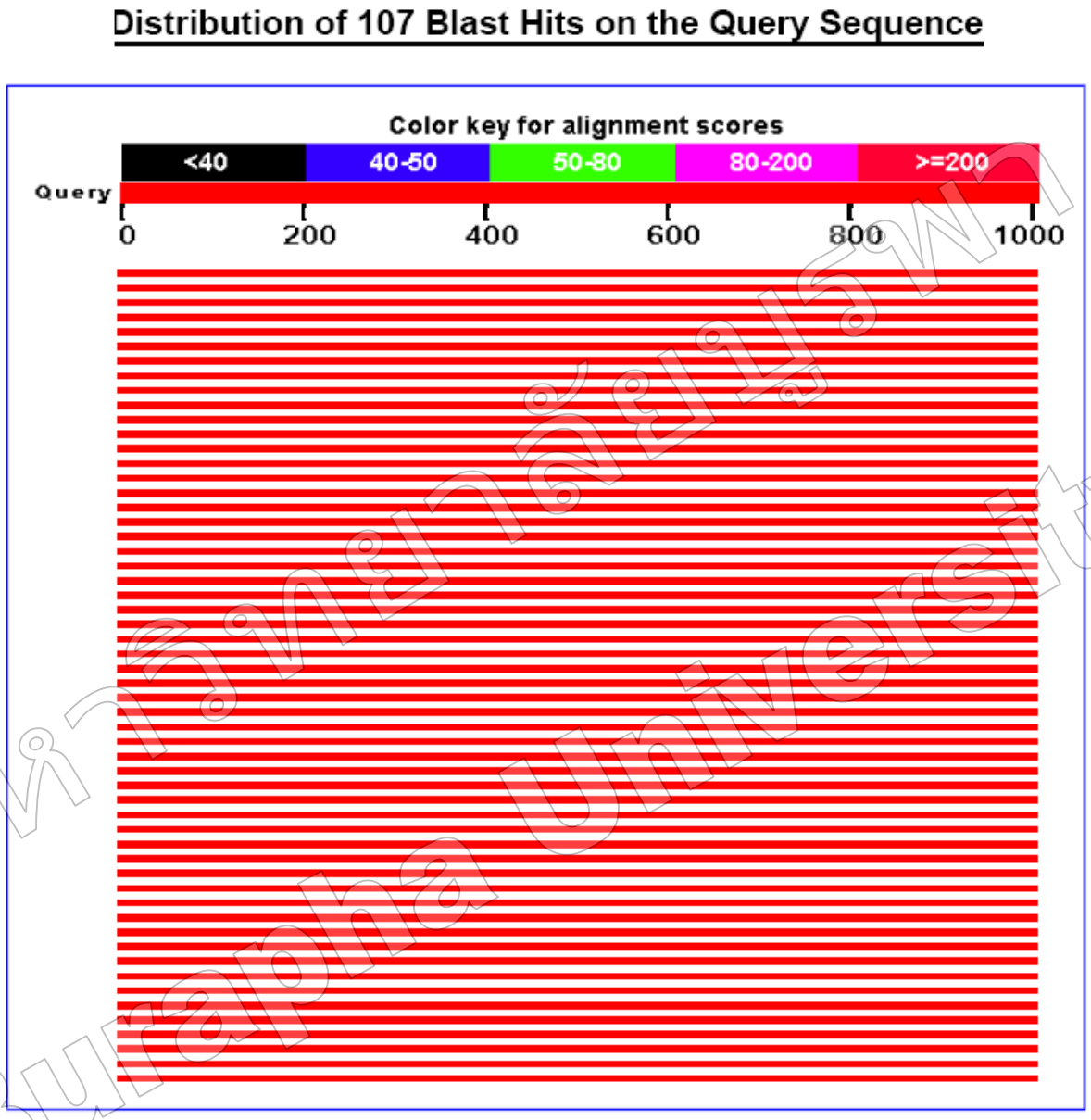
EF509972.1	Uncultured bacterium clone P4D7-578 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509950.1	Uncultured bacterium clone P4D7-625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509936.1	Uncultured bacterium clone P4D7-394 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509932.1	Uncultured bacterium clone P4D7-401 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509927.1	Uncultured bacterium clone P4D7-453 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509919.1	Uncultured bacterium clone P4D7-430 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509917.1	Uncultured bacterium clone P4D7-603 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509914.1	Uncultured bacterium clone P4D7-397 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509903.1	Uncultured bacterium clone P4D7-452 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509890.1	Uncultured bacterium clone P4D7-400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509884.1	Uncultured bacterium clone P4D7-592 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509874.1	Uncultured bacterium clone P4D7-616 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509861.1	Uncultured bacterium clone P4D7-420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509852.1	Uncultured bacterium clone P4D7-473 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509849.1	Uncultured bacterium clone P4D7-413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509846.1	Uncultured bacterium clone P4D7-585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509819.1	Uncultured bacterium clone P4D7-623 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509811.1	Uncultured bacterium clone P4D7-648 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509786.1	Uncultured bacterium clone P4D7-584 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509013.1	Uncultured bacterium clone P3D5-483 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

AB114637.1	Klebsiella sp. PN2 gene for 16S rRNA	1763	1763	100%	0.0	98%
U31075.1	Klebsiella sp. strain zmmo 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EU352755.1	Klebsiella pneumoniae strain NK 2.bp-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1761	1761	100%	0.0	98%
AY660026.2	Xenorhabdus poinarii 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1761	1761	99%	0.0	98%
AJ783916.1	Klebsiella variicola partial 16S rRNA gene	1761	1761	99%	0.0	99%
EF551363.1	Raoultella planticola strain Rs-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	100%	0.0	98%
AY335553.1	Klebsiella sp. HK 34-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	100%	0.0	98%
AY918487.1	Klebsiella sp. 8.1T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	99%	0.0	99%
Y17668.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene, strain Klebs313, partial	1759	1759	100%	0.0	98%
EU360793.1	Klebsiella pneumoniae strain ECU-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%
EF510991.1	Uncultured bacterium clone P6D23-693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%
EF509949.1	Uncultured bacterium clone P4D7-610 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%
EF509948.1	Uncultured bacterium clone P4D7-590 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%
EF509942.1	Uncultured bacterium clone P4D7-597 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%
EF509937.1	Uncultured bacterium clone P4D7-656 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1757	1757	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	1790	1.412e+04	100%	0.0	99%
AF511429.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1788	1788	100%	0.0	99%
EF509952.1	Uncultured bacterium clone P4D7-472 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF509913.1	Uncultured bacterium clone P4D7-672 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF509910.1	Uncultured bacterium clone P4D7-595 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF509859.1	Uncultured bacterium clone P4D7-474 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF509823.1	Uncultured bacterium clone P4D7-404 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF509792.1	Uncultured bacterium clone P4D7-433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
EF403627.1	Uncultured bacterium clone SJTU_A2_04_52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1786	1786	100%	0.0	99%
X93214.1	K.pneumoniae 16S rRNA gene	1783	1783	100%	0.0	98%
Y17656.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene, strain ATCC13883T, partial	1783	1783	100%	0.0	99%
AB004753.1	Klebsiella pneumoniae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1783	1783	100%	0.0	99%
EU360791.1	Klebsiella pneumoniae strain ECU-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EU360792.1	Klebsiella pneumoniae strain ECU-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
AY540111.1	Klebsiella sp. HE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EU231611.1	Klebsiella pneumoniae strain TCCC11046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
AB244431.1	Klebsiella sp. A18-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A18-1	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509961.1	Uncultured bacterium clone P4D7-465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509960.1	Uncultured bacterium clone P4D7-471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509959.1	Uncultured bacterium clone P4D7-456 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509943.1	Uncultured bacterium clone P4D7-425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

EF509929.1	Uncultured bacterium clone P4D7-637 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509904.1	Uncultured bacterium clone P4D7-442 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509898.1	Uncultured bacterium clone P4D7-577 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509882.1	Uncultured bacterium clone P4D7-591 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509829.1	Uncultured bacterium clone P4D7-664 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509806.1	Uncultured bacterium clone P4D7-640 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509799.1	Uncultured bacterium clone P4D7-602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF509796.1	Uncultured bacterium clone P4D7-624 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
DQ470487.1	Klebsiella pneumoniae strain NKU238 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
DQ470486.1	Klebsiella pneumoniae strain Kpne050830 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
DQ470485.1	Klebsiella pneumoniae strain CPK981 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF402184.1	Uncultured bacterium clone SJTU_B_04_67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF121343.1	Uncultured bacterium isolate RFLP pattern 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
EF032681.1	Klebsiella pneumoniae strain AU45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	100%	0.0	99%
X87276.1	K.pneumoniae 16S rRNA gene	1779	1779	100%	0.0	99%
EU048272.1	Klebsiella pneumoniae strain MG09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
DQ520801.1	Enterobacteriaceae bacterium NR58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
EF509870.1	Uncultured bacterium clone P4D7-448 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
EF509862.1	Uncultured bacterium clone P4D7-594 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
EF509831.1	Uncultured bacterium clone P4D7-593 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
EF509812.1	Uncultured bacterium clone P4D7-661 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

AF076033.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
AY552753.1	Klebsiella pneumoniae isolate YNUCC0237 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	99%	0.0	99%
AF130981.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
AB114634.1	Klebsiella sp. P2 gene for 16S rRNA	1777	1777	100%	0.0	99%
AF228918.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	98%
U32868.1	Klebsiella sp. strain zlmy 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
U31076.1	Klebsiella sp. strain zmvsy 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1777	1777	100%	0.0	99%
Y17669.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene, strain Klebs919, partial	1777	1777	100%	0.0	98%
AF228919.1	Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	100%	0.0	98%
AB114637.1	Klebsiella sp. PN2 gene for 16S rRNA	1774	1774	100%	0.0	99%
EF509957.1	Uncultured bacterium clone P4D7-646 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509940.1	Uncultured bacterium clone P4D7-410 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509932.1	Uncultured bacterium clone P4D7-401 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509928.1	Uncultured bacterium clone P4D7-606 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509920.1	Uncultured bacterium clone P4D7-426 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509914.1	Uncultured bacterium clone P4D7-397 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509896.1	Uncultured bacterium clone P4D7-589 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509818.1	Uncultured bacterium clone P4D7-582 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF509809.1	Uncultured bacterium clone P4D7-621 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
AY660026.2	Xenorhabdus poinarii 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1772	1772	99%	0.0	99%
U31075.1	Klebsiella sp. strain zmmo 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1772	1772	100%	0.0	98%
EF522822.1	Klebsiella sp. 093101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1770	1770	99%	0.0	99%
AJ783916.1	Klebsiella variicola partial 16S rRNA gene	1770	1770	99%	0.0	99%
AF228920.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1770	1770	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

EU333881.1	Klebsiella granulomatis strain K22-14 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509948.1	Uncultured bacterium clone P4D7-590 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509931.1	Uncultured bacterium clone P4D7-419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509926.1	Uncultured bacterium clone P4D7-414 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509925.1	Uncultured bacterium clone P4D7-614 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509906.1	Uncultured bacterium clone P4D7-449 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509894.1	Uncultured bacterium clone P4D7-641 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509886.1	Uncultured bacterium clone P4D7-671 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509885.1	Uncultured bacterium clone P4D7-392 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509878.1	Uncultured bacterium clone P4D7-438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509835.1	Uncultured bacterium clone P4D7-613 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509826.1	Uncultured bacterium clone P4D7-645 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509817.1	Uncultured bacterium clone P4D7-428 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509815.1	Uncultured bacterium clone P4D7-600 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509803.1	Uncultured bacterium clone P4D7-388 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509795.1	Uncultured bacterium clone P4D7-579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509789.1	Uncultured bacterium clone P4D7-440 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
EF509788.1	Uncultured bacterium clone P4D7-627 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
DQ804224.1	Uncultured bacterium clone RL187_aah70e07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
AM184253.1	Klebsiella pneumoniae partial 16S rRNA gene, strain WAB1912	1768	1768	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

AY335553.1	Klebsiella sp. HK 34-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	100%	0.0	98%
AJ233420.1	Klebsiella pneumoniae 16S rRNA gene (strain DSM 30104)	1768	1768	100%	0.0	98%
AY918487.1	Klebsiella sp. 8.1T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1768	1768	99%	0.0	99%
AF221602.1	Klebsiella sp. KGA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	98%
AY963633.1	Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	99%	0.0	99%
EF510907.1	Uncultured bacterium clone P6D23-687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509972.1	Uncultured bacterium clone P4D7-578 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509956.1	Uncultured bacterium clone P4D7-611 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509951.1	Uncultured bacterium clone P4D7-466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509950.1	Uncultured bacterium clone P4D7-625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509947.1	Uncultured bacterium clone P4D7-467 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509936.1	Uncultured bacterium clone P4D7-394 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509927.1	Uncultured bacterium clone P4D7-453 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%
EF509919.1	Uncultured bacterium clone P4D7-430 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1763	1763	100%	0.0	98%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ฉ

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของไอโซเลทที่ 1

```
>dbj|AB362602.1|  Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strai
NRIC 0113
Length=1555
 Score = 1808 bits (2004),  Expect = 0.0
 Identities = 1015/1022 (99%), Gaps = 1/1022 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  9     ATGCA-GTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGC  67
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  49    ATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGC  108

Query  68    GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAG  127
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109   GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAG  168

Query  128   GTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT  187
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169   GTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT  228

Query  188   GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG  247
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229   GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG  288

Query  248   CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  307
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289   CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  348

Query  308   GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA  367
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349   GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA  408

Query  368   ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  427
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  409   ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  468

Query  428   GACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT  487
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  469   GACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT  528

Query  488   GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC  547
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  529   GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC  588

Query  548   GAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT  607
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  589   GAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT  648

Query  608   TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA  667
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  649   TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA  708

Query  668   TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGC  727
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  709   TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGC  768
```

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

```
Query  728   TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  787
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  769   TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  828

Query  788   CGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGC  847
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  829   CGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGC  888

Query  848   ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  907
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  889   ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  948

Query  908   CAAGCGGTGGAGCATGGGGTTTAATTTGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGAC  967
             |||||||||||||||| ||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  949   CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  1008

Query  968   ATCCTTTGACCACTCTAGAAAAAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGGGGTGCA  1027
             |||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  1009  ATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA  1068

Query  1028  TG  1029
             ||
Sbjct  1069  TG  1070
```

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของไอโซเลทที่ 2

```
>gb|EF032681.1|  Klebsiella pneumoniae strain AU45 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1503

 Score = 1781 bits (1974),  Expect = 0.0
 Identities = 1001/1009 (99%), Gaps = 1/1009 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     CCTAACACCTGCAAGTCGAGCGGTAGCCCAGAGAGCTTGCTTTCGGGTGACGAGCGGCGG  60
             |||||||| |||||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  40    CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGG  99

Query  61    ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100   ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG  159

Query  121   CTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160   CTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA  219

Query  181   TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  240
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220   TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  279

Query  241   GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280   GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  339

Query  301   AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGTAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  360
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340   AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  399

Query  361   TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  400   TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  459

Query  421   ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  460   GCCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  519

Query  481   GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  520   GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  579

Query  541   TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  580   TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA  639

Query  601   GGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  660
             |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  640   GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  699

Query  661   TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  700   TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  759

Query  721   GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  760   GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTT  819

Query  781   GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  820   GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  879
```

```
Query  841   AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  880   AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  939

Query  901   ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTT  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  940   ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTT  999

Query  961   TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACA-GTGCTGCATG  1008
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  1000  TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATG  1048
```

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของไอโซเลทที่ 3

```
>gb|AF511429.1|  Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1451

 Score = 1788 bits (1982),  Expect = 0.0
 Identities = 1002/1010 (99%), Gaps = 0/1010 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCCCAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGGGG  60
             |||||||||||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  18    CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGG  77

Query  61    ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  78    ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG  137

Query  121   CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA  180
             |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  138   CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGA  197

Query  181   TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  198   TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  257

Query  241   GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  258   GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  317

Query  301   AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  360
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  318   AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  377

Query  361   TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  378   TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  437

Query  421   ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAACAGCCGC  480
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  438   ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  497

Query  481   GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  498   GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  557

Query  541   TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  558   TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCA  617

Query  601   GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  618   GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  677

Query  661   TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  678   TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  737

Query  721   GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTT  780
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  738   GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCYGTAAACGATGTCGATTT  797

Query  781   GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  798   GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  857
```

```
Query  841   AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  858   AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  917

Query  901   ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCACAGAACTT  960
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  918   ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTT  977

Query  961   TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGG  1010
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  978   TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGG  1027
```

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ช
การจัดจำพวกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA

การจัดจำพวกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


Isolate1        ------------------------------------------------CGCATATAATGCA-
E.f             ------------------------------------------------------ATGCAA
B.s             -------------------------------------------------------------A
S.d             ------TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAA
P.a             CAATTGTCGAGTTGCTGGATTAGTGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGTCAG
R.sp            ------------------------------------------------------------


Isolate1        GTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACT-CAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACG
E.f             GTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACT-CAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACG
B.s             GTCGAGCGGA-----CAGATGGGAGCTTGCTCC-CTGATGTTA------GCGGCGGACG
S.d             GTGGAACGCAT-TAATATCACCGGAGCTTGCTCCACCGCTATTAA--TGAGTCGCGAACG
P.a             GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACG
R.sp            ------------------------------------------------------------


Isolate1        GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCT
E.f             GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCT
B.s             GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT
S.d             GGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCT
P.a             GGTGAGTAATGCCTAGG-AATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCT
R.sp            ------TAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCT
                      ***  * * **  * ** **    *    *******     ******     **


Isolate1        AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGC
E.f             AATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGC
B.s             AATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCAC
S.d             AATACCGCATAAAAAACTCTAACACATGTTAGAGATTTGAAAGATACCATTG--TATCAC
P.a             AATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAG-TGGGGGATCTTCGGACC--------TCACGC
R.sp            AATACCGGATATGACYTCMKGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGATT--------TATCGG
                ******* **               * *             *           *  *


Isolate1        TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG
E.f             TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG
B.s             TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
S.d             TATCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAGCGGCCTACCAAGGCAACG
P.a             TATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
R.sp            TGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG
                *    ****  **   *    ** **** ******  ****  ***  ******** ***
```

Isolate1 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้, *E.f* คือ *Enterococcus faecalis*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R*.sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
Isolate1        ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
E.f             ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
B.s             ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
S.d             ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
P.a             ATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTC
R.sp            ACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
                *    ** * *  ******** *** * * ******** ************ ********

Isolate1        CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC
E.f             CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC
B.s             CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
S.d             CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC
P.a             CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC
R.sp            CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCC
                ***************** ****** **   ***** ****** ****   *** * ***

Isolate1        GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGT
E.f             GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGT
B.s             GCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCG
S.d             GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAGCGGAAGAACGAGTGTAA
P.a             GCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA-GGGCAGTA
R.sp            GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-GCGCAAG-
                ***** * ** ** **  ***** * ***** * ** *       ** ***   *

Isolate1        TAGTAACTGAACG-TCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
E.f             TAGTAACTGAACG-TCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
B.s             TTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
S.d             GAGTGGAAAGTTTACACAGTGACGGTACGCTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCA
P.a             AGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCA
R.sp            -------------------TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA
                                   ***** **       *  ***   ********* *******

Isolate1        GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
E.f             GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
B.s             GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC
S.d             GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGC
P.a             GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGC
R.sp            GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTC
                ****************** ***   * ******   **** *** ********** *  *

Isolate1        GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
E.f             GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
B.s             GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
S.d             GCAGGCGGTTTAGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAACCAATGTATG-CTTTGGA
P.a             GTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAA
R.sp            GTAGGCGGTTTGTCSCGTCCTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGA
                * *** ****      **     ** ***  *    *******    *     *     *

Isolate1        AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
E.f             AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
B.s             AACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
S.d             AACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
P.a             AACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCG
R.sp            TACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
                 **       ** **** * * ** **    ******* *  ******************
```

Isolate1 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้, *E.f* คือ *Enterococcus faecalis*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
Isolate1        TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG
E.f             TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG
B.s             TAGAGATGTGGAGGACCACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG
S.d             TAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTCACTGACGCTGAG
P.a             TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG
R.sp            CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAG
                 *** **  * **** **** ******** ***     **** * *  ****** *****

Isolate1        GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
E.f             GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
B.s             GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
S.d             GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
P.a             GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
R.sp            GAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT
                *  ************ *** ********************************** *

Isolate1        GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC
E.f             GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC
B.s             GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
S.d             GAGTGCTAGGTGTTAGGTCCTTTCCGGGACTTAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTC
P.a             GTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGA-GATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGAC
R.sp            GGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCC
                *    ***    **  *     *         *  ***  * *** *****  ****   *

Isolate1        CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
E.f             CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
B.s             CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
S.d             CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
P.a             CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
R.sp            CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
                **************  ******  * ******** **********************

Isolate1        CGGTGGAGCATGGGGTTTAATTTGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
E.f             CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
B.s             CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
S.d             CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
P.a             CGGTGGAGCATGTGGTTTA-TTCGAAGCA-CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATG-
R.sp            CGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATAT
                *** ******** ** *** ** ** *** ****** ********* **  *******

Isolate1        TT-TGACCACTCTAGAAAAAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGGGGTGCATG-
E.f             TT-TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATG-
B.s             TC-TGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
S.d             CGATGCCCGCTCTAGAGATAGAGTTTTACTTTTTGTACATCGGAGACAGGTGGTGCATGG
P.a             -CTGAAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGA-CCAGGTGCTGCATGG
R.sp            ACCGGAAAGCTGCAGAGATG--TGGCCCCCCTTGTGGTCGGTAT-ACAGGTGGTGCATGG
                            *** *          *  *              **** * ******

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             TTGTCGTCAACTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
S.d             TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
P.a             CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTGTC
R.sp            CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAT
```

Isolate1 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดเลือกได้, *E.f* คือ *Enterococcus faecalis*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             TCTTAGTTGCCAGCATTCA--GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
S.d             TGTTAGTTGCCATCATTGA--GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAG
P.a             CTTA-GTTACCAGCACCTC--GGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
R.sp            CTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
S.d             GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
P.a             GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTAC
R.sp            GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTAC

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             AATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT
S.d             AATGGTTGGTACAACGAGTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAAGCCAATCT
P.a             AATGGTCGGTACAAAGGG-TGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCG
R.sp            AATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCT

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             CAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
S.d             CAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
P.a             TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAA
R.sp            CAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             TCAG-CATGCCGCGG-GAATACGTCCCGGCCTGCCCC----------------------
S.d             TCAG-CACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
P.a             TCAG-AATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
R.sp            TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA--------

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             ------------------------------------------------------------
S.d             GAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGAGGTAACCATATAGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGG
P.a             GAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACC-ACGGAGTG
R.sp            ------------------------------------------------------------

Isolate1        ------------------------------------------------------------
E.f             ------------------------------------------------------------
B.s             ------------------------------------------------------------
S.d             ACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
P.a             ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCA----------------------
R.sp            ------------------------------------------------------------
```

Isolate1 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้, *E.f* คือ *Enterococcus faecalis*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การจัดจำพวกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


B.s             ------------------------------------------------------------
S.d             ----------------------TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGT
R.sp            ------------------------------------------------------------
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CAATTGTCGAGTTGCTGGATTAGTGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGTCAG


B.s             --------------AGTCGAGCGGACAGATG-----GGAGCTTGCTCC-CTGATGTTAGC
S.d             GCCTAATACATGCAAGTGGAACGCATTAATATCACCGGAGCTTGCTCCACCGCTATTAAT
R.sp            ------------------------------------------------------------
Isolate2        -CCTAACACCTGCAAGTCGAGCGGTAGCCCAG----AGAGCTTGCTTTCGGGTGACGAGC
K.p             -CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAG----AGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGC
P.a             GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG--ATGAAG----GGAGCTTGCTCCTGGAT--TCAGC


B.s             G----GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
S.d             GAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGATAGCGGGGGATAACTATTG
R.sp            ----------------TAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGG
Isolate2        G----GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG-AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG
K.p             G----GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG-AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG
P.a             G----GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG-AATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCG
                             ***    * **  * *****          *******     *

B.s             GAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC
S.d             GAAACGATAGCTAATACCGCATAAAAAACTCTAACACATGTTAGAGATTTGAAAGATACC
R.sp            GAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACYTCMKGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGATT--
Isolate2        GAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCC---
K.p             GAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCC---
P.a             GAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACC---
                *****    ********* **               * *

B.s             TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
S.d             ATTG--TATCACTATCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAGCGGCCT
R.sp            -----TATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCT
Isolate2        ------TCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTC
K.p             ------TCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTC
P.a             ------TCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCT
                      *          ****  **        ** **** ** ***  ****  ***

B.s             ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
S.d             ACCAAGGCAACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
R.sp            ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
Isolate2        ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACA
K.p             ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACA
P.a             ACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACA
                *** **** ****    ** * *  ******** *** * * ******** *********
```

Isolate2 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
B.s             CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
S.d             CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGA
R.sp            CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA
Isolate2        CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGTAAGCCTGA
K.p             CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
P.a             CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA
                *** ********************** ****** **   ****** ** *** ****

B.s             CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
S.d             CCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAGCGGAA
R.sp            TGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAC
Isolate2        TGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAG
K.p             TGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAG
P.a             TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG
                   *** * ******** * ** ** **  ***** * ***** * ** *      ***

B.s             GAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
S.d             GAACGAGTGTAAGAGTGGAAAGTTTACACAGTGACGGTACGCTACCAGAAAGGGACGGCT
R.sp            GA---AGCGCAAG----------------TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCT
Isolate2        GAA-GGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
K.p             GAA-GGCGGTGAGGTTAATAGCCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
P.a             GAA-GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCT
                **                          ***** ***      *  ***   *****

B.s             AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
S.d             AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
R.sp            AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGG
Isolate2        AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
K.p             AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
P.a             AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
                **** ************************ **   * ******   **** *** ****

B.s             CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG
S.d             CGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTTAGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAACCAATG
R.sp            CGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTCSCGTCCTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTG
Isolate2        CGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
K.p             CGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
P.a             CGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
                ******* *  ** *** ***       **     ** ***  *    *******    *

B.s             AGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG
S.d             TATG-CTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAG
R.sp            GCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAG
Isolate2        AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
K.p             AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
P.a             AACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAG
                     *     * **       ** ****   * ** **    * ***** *  ******

B.s             CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGACCACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
S.d             CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTC
R.sp            CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTA
Isolate2        CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
K.p             CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
P.a             CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT
                ************ *** **  * ****  *** ******** ***     **** *
```

Isolate2 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
B.s             ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
S.d             ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
R.sp            ACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
Isolate2        ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
K.p             ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
P.a             ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
                ****** ** ***  ************ *** **************************

B.s             GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
S.d             GCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGTCCTTTCCGGGACTTAGTGCCGCAGCTAACG
R.sp            GCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACG
Isolate2        GCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
K.p             GCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
P.a             GCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTT-GAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACG
                ********** **     *    *   *      *    *   * ********

B.s             CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
S.d             CAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
R.sp            CATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG
Isolate2        CGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGG
K.p             CGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGG
P.a             CGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGG
                *  ***    ***************  ******  * ********* **********

B.s             GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
S.d             GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
R.sp            GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
Isolate2        GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
K.p             GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
P.a             GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA-TTCGAAGCA-CGCGAAGAACCTTACCTG
                ************** ********** *** ***** *** *************** *

B.s             GTCTTGACATCCTC-TGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
S.d             GTCTTGACATCCCGATGCCCGCTCTAGAGATAGAGTTTTACTTTTTGTACATCGGAGACA
R.sp            GGTTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCCTT---GTGGTCGGTATACA
Isolate2        GTCTTGACATCCAC-AGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACA
K.p             GTCTTGACATCCAC-AGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACA
P.a             GCCTTGACATGC-T-GAAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT-CAGACCA
                *  *******               ******         * *   *           **

B.s             GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAACTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
S.d             GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
R.sp            GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
Isolate2        G-TGCTGCATG----------------------------------------------------
K.p             GGTGCTGCATG----------------------------------------------------
P.a             GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAG
                * ** ******

B.s             CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCA--TTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
S.d             CGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA--TTGAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGT
R.sp            CGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGG
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CGCAACCC-TGTCCTTAGTTACCAGCA--CCTCGGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT
```

Isolate2 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

(ต่อ)

```
B.s             GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
S.d             AATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
R.sp            GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTT
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTA

B.s             CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCA
S.d             CACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCT
R.sp            CACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCT
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGT-GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCA

B.s             CAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
S.d             GAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCT
R.sp            TAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCT
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             TAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCT

B.s             AGTAATCGCGGATCAGCA-TGCCGCGG-GAATACGTCCC--GGCCTGCCCC----------
S.d             AGTAATCGCGGATCAGCA-CGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
R.sp            AGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             AGTAATCGTGAATCAGAA-TGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

B.s             ------------------------------------------------------------
S.d             GTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGAGGTAACCATATAGGAGCCAGCC
R.sp            GTCA--------------------------------------------------------
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             GTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTT

B.s             ------------------------------------------------------------
S.d             GCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTG
R.sp            ------------------------------------------------------------
Isolate2        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             ACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCA--------------

B.s             ------------
S.d             CGGCTGGATCAC
R.sp            ------------
Isolate2        ------------
K.p             ------------
P.a             ------------
```

Isolate2 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 2 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การจัดจำพวกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


B.s             ------------------------------------------------------------
R.sp            ------------------------------------------------------------
S.d             -------------TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATA
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CAATTGTCGAGTTGCTGGATTAGTGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGTCAG


B.s             ----------------AGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
R.sp            ------------------------------------------------------------
S.d             CATGCAAGTGGAACGCATTAATATCACCGGAGCTTGCTCCACCGCTATTAATGAGTCGCG
Isolate3        -CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCCCAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGGG
K.p             -CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCG
P.a             GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG--ATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGAT--TCAGCGGCG

B.s             GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
R.sp            ---------TAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGG
S.d             AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT
Isolate3        GACGGGTGAGTAATGTCTGGG-AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
K.p             GACGGGTGAGTAATGTCTGGG-AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
P.a             GACGGGTGAGTAATGCCTAGG-AATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGG
                         ***    * **  * *****           *******     ******

B.s             GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
R.sp            GTCTAATACCGGATATGACYTCMKGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGAT--------TTA
S.d             AGCTAATACCGCATAAAAAACTCTAACACATGTTAGAGATTTGAAAGATACCATTG--TA
Isolate3        AGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC---------TC
K.p             AGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCC---------TC
P.a             CGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACC---------TC
                  ********* **             * *                          *

B.s             CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
R.sp            TCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
S.d             TCACTATCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAGCGGCCTACCAAGGC
Isolate3        ATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGC
K.p             ATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGC
P.a             ACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
                         ****  **        ** **** ** ***  ****  ***  *** ****

B.s             AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
R.sp            GACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
S.d             AACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Isolate3        GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAG
K.p             GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAG
P.a             GACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAG
                 ****    ** * *  ******** *** * * ******** ************ ****
```

Isolate3 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
B.s             ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
R.sp            ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
S.d             ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA
Isolate3        ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA
K.p             ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA
P.a             ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA
                ******************** ****** **   ****** ** *** ****   *** *

B.s             CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
R.sp            CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-----
S.d             CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAGCGGAAGAACGAGT
Isolate3        TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAA-GGCG
K.p             TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAA-GGCG
P.a             TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA-GGGC
                 ******** * ** ** **  ***** * ***** * ** *      *** ***

B.s             ACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
R.sp            ---GCGCAAGT------------GACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
S.d             GTAAGAGTGGAAAGTTTACACAGTGACGGTACGCTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGT
Isolate3        GTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
K.p             GTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
P.a             AGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT
                                    **** ***      *  ***   ********* ***

B.s             GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
R.sp            GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGA
S.d             GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGG
Isolate3        GCCAACAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
K.p             GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
P.a             GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
                **** ***************** ***   * ******   **** *** ***********

B.s             GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
R.sp            GTTCGTAGGCGGTTTGTCSCGTCCTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAG
S.d             GAGCGCAGGCGGTTTAGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAACCAATG-TATGCTT
Isolate3        GCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
K.p             GCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
P.a             GCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
                *  ** *** ***       **     ** ***  *    *******    *     *

B.s             TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
R.sp            GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
S.d             TGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA
Isolate3        TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA
K.p             TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA
P.a             CCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAA
                   * **       ** ****   * ** **    * ***** *  **************

B.s             TGCGTAGAGATGTGGAGGACCACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGC
R.sp            TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGC
S.d             TGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTCACTGACGC
Isolate3        TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
K.p             TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
P.a             TGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACAC
                **** *** **  * ****  *** ******** ***     **** *    ****** *
```

Isolate3 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

(ต่อ)

```
B.s             TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
R.sp            TGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
S.d             TGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
Isolate3        TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
K.p             TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCYGTAAA
P.a             TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
                * ***  ************ *** ****************************** *****

B.s             CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
R.sp            CGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGC
S.d             CGATGAGTGCTAGGTGTTAGGTCCTTTCCGGGACTTAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGC
Isolate3        CGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAAT
K.p             CGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAAT
P.a             CGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTT-GAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGT
                ** **     *    *   *     *          *   *   * *********  ***

B.s             ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
R.sp            GCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
S.d             ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
Isolate3        CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
K.p             CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
P.a             CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
                   ***************  ******  * ********* ***********************

B.s             CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
R.sp            CAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGAC
S.d             CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
Isolate3        CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
K.p             CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGAC
P.a             CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA-TTCGAAGCA-CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGAC
                ******* *********** *** ***** *** ***************** **  *****

B.s             ATCC-TCTGACAATCCTAGAGATAG-GACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTG
R.sp            ATAT-ACCGGAAAGC-TGCAGAGAT-GTGGCCCCCCTTGTGGTCGGTAT-ACAGGTGGTG
S.d             ATCCCGATGCCCGCTCTAGAGATAGAGTTTTACTTTTTGTACATCGGAG-ACAGGTGGTG
Isolate3        ATCC-ACAGAACTTTCCAGAGATGG-ATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTG
K.p             ATCC-ACAGAACTTTCCAGAGATGG-ATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTG
P.a             ATGC--TGAAACTTTCCAGAGATGG-ATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGAC-CAGGTGCTG
                **                ***           * *           ****** **

B.s             CATGGTTGTCGTCAACTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
R.sp            CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
S.d             CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
Isolate3        CATGG-----------------------------------------------------------
K.p             CATGG-----------------------------------------------------------
P.a             CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACC
                *****

B.s             CTTGATCTTAGTTGCCAGCA--TTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
R.sp            CCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACT
S.d             CTTATTGTTAGTTGCCATCA--TTGAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAC
Isolate3        -----------------------------------------------------------
K.p             -----------------------------------------------------------
P.a             C-TGTCCTTAGTTACCAGCA--CCTCGGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
```

Isolate3 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ต่อ)

```
B.s             CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
R.sp            CGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACAT
S.d             CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGT

B.s             GCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCT
R.sp            GCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCT
S.d             GCTACAATGGTTGGTACAACGAGTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAAGCC
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             GCTACAATGGTCGGTACAAAGGGT-GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACC

B.s             GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
R.sp            GGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATC
S.d             AATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC

B.s             GCGGATCAGCA-TGCCGCGG-GAATACGTCCC--GGCCTGCCCC----------------
R.sp            GCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA---
S.d             GCGGATCAGCA-CGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             GTGAATCAGAA-TGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

B.s             ------------------------------------------------------------
R.sp            ------------------------------------------------------------
S.d             CACGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGAGGTAACCATATAGGAGCCAGCCGCCTAAG
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             CATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGG

B.s             ------------------------------------------------------------
R.sp            ------------------------------------------------------------
S.d             GTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG
Isolate3        ------------------------------------------------------------
K.p             ------------------------------------------------------------
P.a             AGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCA--------------------

B.s             -----
R.sp            -----
S.d             ATCAC
Isolate3        -----
K.p             -----
P.a             -----
```

Isolate3 คือ แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ไอโซเลทที่ 3 ที่คัดแยกได้, *K.p* คือ *Klebsiella pneumoniae*, *B.s* คือ *Bacillus subtilis*, *P.a* คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.d* คือ *Streptococcus dentirousetti* และ *R.*sp. คือ *Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของนิสิต

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอุทุมพร ธัญญเจริญ
วันเดือนปีเกิด	21 พฤษภาคม 2528
ประวัติการศึกษา	ระดับประถมศึกษาปีที่ 1 ถึง 2 โรงเรียนเทศบาล 5 พหลโยธินราฯ มินทรภักดี จังหวัดราชบุรี
	ระดับประถมศึกษาปีที่ 3 ถึง 6 โรงเรียนเทศบาล 7 วัดแก่งขนุน จังหวัดสระบุรี
	ระดับมัธยมศึกษาปีที่ 1 ถึง 2 โรงเรียนปากเพรียววิทยาคม จังหวัดสระบุรี
	ระดับมัธยมศึกษาปีที่ 2 ถึง 6 โรงเรียนชลกันยานุกูล จ.ชลบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	145 ม. 1 ถนนสุขุมวิท ต. หนองไม้แดง อ. เมือง จังหวัดชลบุรี
โทรศัพท์	089-6007034
อีเมล์	kung_jung007@hotmail.com
กิจกรรมระหว่างการศึกษา	1. ประธานนิสิตภาควิชาชีวเคมี ปีการศึกษา 2549
	2. ได้รับเกียรติบัตรบำเพ็ญประโยชน์แก่ภาควิชาชีวเคมี ประจำปีการศึกษา 2548
	3. ฝึกปฏิบัติงานที่สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
	4. นิสิตผู้รับผิดชอบโครงการทำบุญภาควิชาชีวเคมี และเลี้ยงส่งพี่ปี 4 ประจำปีการศึกษา 2549
	5. นิสิตผู้รับผิดชอบโครงการการประยุกต์ใช้ Proteomics เพื่อการศึกษาทางชีวเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University