

การศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินของ
Acinetobacter baumannii bacteriophage ØABP-01




วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มีนาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์


วิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน
เอนโดไลซินของ *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01”
ของ นายระพี ธรรมมีภักดิ์
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.สุกัลยา อุทัยดา)


.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)


.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันธเลิศ)


.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ)

อนุมัติ



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

30 ส.ค. 2558

ประกาศคุณูปการ

การทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์และบรรลุวัตถุประสงค์ได้ด้วยความ
กรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้
คำปรึกษา คำแนะนำ การดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์
กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ดร.สุกัลยา อุทัยดา ประธาน
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันธเลิศ กรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่ได้กรุณา
ให้คำแนะนำตลอดจนการแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่

ขอขอบคุณ ธวัชชัย กิตติ ที่ได้อนุเคราะห์แบบทดสอบไอเฟจสายพันธุ์ OABP-01 ในการทำ
วิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนทุนการศึกษา ขอขอบคุณสถาน
บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและ
ปรสิตวิทยา ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนทุนในการทำวิจัย รวมถึงครอบครัวและเพื่อนๆ ที่ให้คำแนะนำ
และกำลังใจตลอดมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มี
พระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการศึกษา
และการประยุกต์ใช้แบบทดสอบไอเฟจรวมถึงเอนไซม์จากแบคทีเรียไอเฟจ

ระพี ธรรมมีศักดิ์

ชื่อเรื่อง

การศึกษาคูณสมบัติทางอนุชีววิทยา
และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินของ

Acinetobacter baumannii bacteriophage ØABP-01

ผู้วิจัย

ระพี ธรรมมีภักดี

สถานที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์

กรรมการที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันฉเลิศ

ประเภทสารนิพนธ์

วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา,

มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2557

คำสำคัญ

multidrug resistant-*A. baumannii*, แบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะ

ต่อเชื้อ *A. baumannii*, เอนโดไลซิน

บทคัดย่อ

Multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทาง
การแพทย์ เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล และยังพบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อที่มี
แนวโน้มสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีการที่สามารถใช้ควบคุมและรักษาการติดเชื้อ MDR-AB
ซึ่งการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอฟาจในรูปแบบเฟจบำบัดเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ทั้งการ
นำอนุภาคและ lytic enzyme ของแบคทีเรียโอฟาจมาใช้ โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการแยก
แบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ ØABP-01 จากบ่อบำบัดน้ำเสีย
การศึกษารั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาคูณสมบัติทางอนุชีววิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ
ØABP-01 รวมถึงการตรวจสอบหาเอนโดไลซินและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน จาก
การศึกษา restriction analysis และสร้าง restriction mapping พบว่าจีโนมจีโนมดีเอ็นเอของ
ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิดคือ *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RV, *M*luI, *Sph*I,
*B*glII, *H*paII และ *Eco*RI เมื่อรวมขนาดของ restriction fragment ทำให้สามารถคำนวณขนาดของ
จีโนม ØABP-01 ได้ประมาณ 35 kb จากนั้นศึกษาลำดับเบสบางส่วนของจีโนม ØABP-01 โดย
การสร้าง genomic library โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส
จาก 7 โคลนพบว่า ลำดับเบสบางส่วนของจีโนม ØABP-01 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ
จีโนมแบคทีเรียโอฟาจ *Acinetobacter* phage phiAB1, *Acinetobacter* phage Abp1 และ

Acinetobacter phage AB3 เมื่อตรวจสอบยีนเอนโดไลซิน ด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบยีนเอนโดไลซินในจีโนมของ ϕ ABP-01 (*lys*ABP-01) จากนั้นนำไปโคลนและหาลำดับเบสเพื่อนำมาวิเคราะห์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า มีบริเวณ open reading frame เท่ากับ 558 bp แปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลจากการทำนาย 21.14 kDa (กรดอะมิโน 185 ตัว) และมีค่า pI เท่ากับ 9.42 ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบบริเวณอนุรักษ์คือ lysozyme like domain เพื่อศึกษาหน้าที่ของเอนโดไลซิน ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน (*Lys*ABP-01) และนำมาศึกษาคุณสมบัติ enzyme activity ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค plate lysis assay พบว่าโปรตีน *Lys*ABP-01 สามารถย่อย autoclaved cell (crude cell wall) ที่เตรียมจากเซลล์แบคทีเรีย *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 และสายพันธุ์ AB 1589 ที่ดื้อยาหลายชนิด ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการนำ *Lys*ABP-01 ไปพัฒนาเป็น therapeutic agent เพื่อใช้ควบคุมการติดเชื้อ MDR-AB



Title MOLECULAR CHARACTERIZATION AND
RECOMBINANT ENDOLYSIN PROTEIN PRODUCTION
OF ACINETOBACTER BAUMANNII BACTERIOPHAGE
ØABP-01

Author Rapee Thummeepak

Advisor Assistant Professor Sutthirat Sitthisak, Ph.D.

Co - Advisor Assistant Professor Duangkamol Kunthalert, Ph.D.

Academic paper Thesis M.S. in Microbiology, Naresuan University, 2014

Keywords Multidrug resistant-*A. baumannii*, *A. baumannii*
bacteriophage, endolysin

ABSTRACT

Multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB), a significant nosocomial pathogen, becomes a serious public health problems since the increasing evidence of resistance to effective antibiotics. An alternative method to treat or control MDR-AB is the use of bacteriophage or its lytic enzyme. Previous study *A. baumannii* bacteriophage, ØABP-01 was isolated from waste water treatment plants. In this study, we examined the molecular characteristics and produced recombinant protein endolysin of bacteriophage ØABP-01. Restriction analysis and restriction mapping of ØABP-01 DNA indicated that DNA was cut by 8 enzymes, namely *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I and *Sph*I. Average genome size by calculation of restriction fragment lengths revealed that ØABP-01 genome was estimated to be 35 kb. Genomic library was generated by *Hind*III digested fragments. Sequence analysis of 7 library clones showed partial genome sequence of ØABP-01 similarity to Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 and Acinetobacter phage AB3. PCR was used to amplify gene encoding the endolysin from ØABP-01 genome. The endolysin gene of ØABP-01 (*lys*ABP-01) was subsequently cloned and sequenced. Sequence analysis revealed an open reading

frame of 558 bp with a predicted molecular weight of 21.14 kDa (185 amino acid) and a deduced pI of 9.42. The amino acid sequence alignment demonstrated that *lysABP-01* contained conserved residues of the lysozyme like domains. Recombinant endolysin protein (LysABP-01) was produced to confirm the enzyme activity. Plate lysis assay showed that LysABP-01 can degrade autoclaved cell (crude cell wall) of *A. baumannii* reference (ATCC 19606) and MDR-AB strain (AB 1589). The results from this study can be used as a preliminary data for developing LysABP-01 as a therapeutic agent to control MDR-AB.



สารบัญ

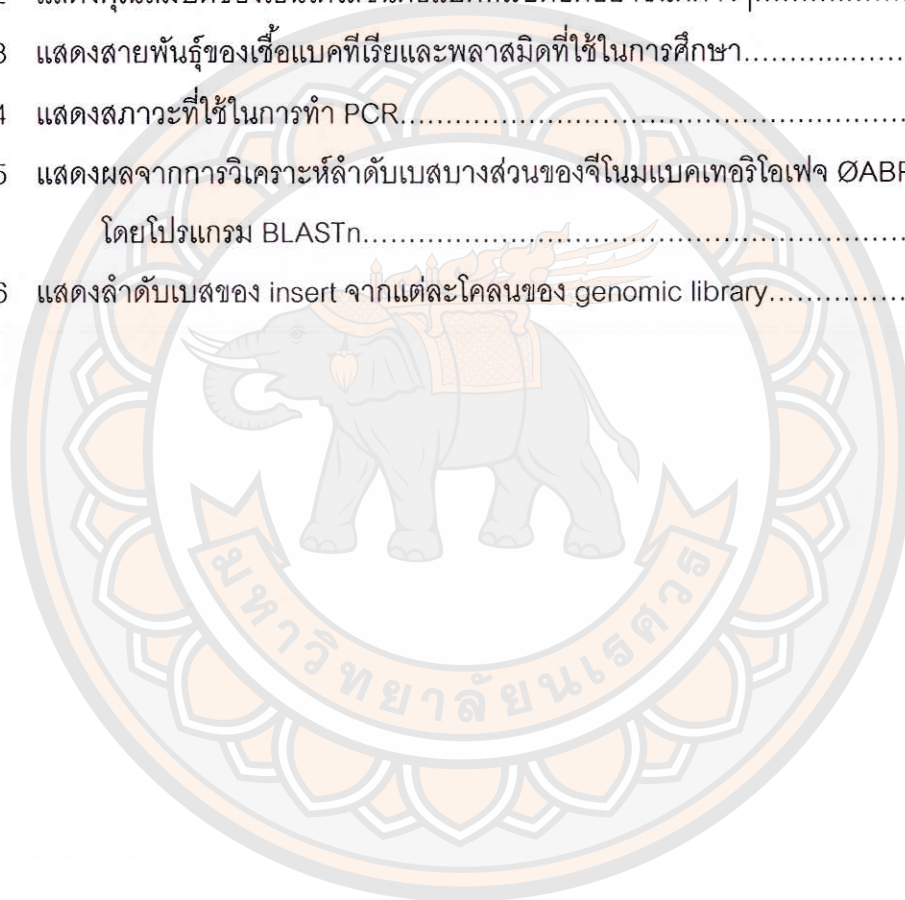
บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4
แบคทีเรียโอเฟจ.....	11
การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจและเอนโดไลซิน (endolysin) ในทาง การแพทย์.....	17
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
สายพันธุ์แบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจและสภาวะการเจริญที่ใช้ในการศึกษา...	24
การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	25
การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	26
การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	26
การศึกษา genomic library ของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	27
การตรวจหาและการวิเคราะห์ ยีนเอนโดไลซิน.....	28
การสร้างและผลิต Endolysin recombinant protein ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	30
การศึกษาคุณสมบัติของเอนโดไลซิน LysABP-01.....	33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	34
การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	34
การศึกษา genomic library ของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01.....	36
การตรวจหาและการวิเคราะห์ ยีนเอนโดไลซิน.....	40
การสร้างและผลิต Endolysin recombinant protein ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	42
การศึกษาคูณสมบัติของเอนโดไลซิน LysABP-01.....	46
5 บทสรุป.....	47
สรุปผลการวิจัย.....	47
อภิปรายผล.....	48
ข้อเสนอแนะ.....	53
บรรณานุกรม.....	54
ภาคผนวก.....	65
ประวัติผู้วิจัย.....	79

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงการศึกษาลำดับเบสของจีโนมและ lytic enzyme ของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>A. baumannii</i>	15
2 แสดงคุณสมบัติของเอนโดไลซินต่อแบคทีเรียดื้อต่อยาชนิดต่างๆ.....	22
3 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา.....	24
4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR.....	29
5 แสดงผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01 โดยโปรแกรม BLASTn.....	38
6 แสดงลำดับเบสของ insert จากแต่ละโคลนของ genomic library.....	66



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงปัจจัยก่อโรคของเชื้อ <i>A. baumannii</i>	6
2 แสดงวงจรชีวิตของแบคทีเรียโอฟาจแลมปีดาแบบ lytic cycle และ lysogenic cycle.....	13
3 แสดงโครงสร้าง cell envelope ของแบคทีเรียแกรมลบ การทำงานของ เอนโดไลซิน และจุดตัดของเอนโดไลซิน (ภาพซ้าย) โครงสร้างของผนัง เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและการทำงานของ holin-endolysin system โดย holin proteins จะแทรกตัวใน inner membrane แล้วรวมตัว เป็น oligomer เป็นผลให้เมมเบรนเกิดเป็นรูทำให้ endolysin สามารถผ่าน เข้าไปยัง peptidoglycan (ภาพขวา) แสดงโครงสร้างของ peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมลบรวมถึง <i>A. baumannii</i> โดยสามารถแบ่งชนิดของ เอนโดไลซินได้จากจุดตัดที่แตกต่างกัน 1, N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase; 2, l-alanoyl-d-glutamate endopeptidase; 3, d-glutamyl-m-DAP endopeptidase; 4, interpeptide bridge-specific endopeptidases; 5, N-acetyl- β -d-glucosaminidase; และ 6, N-acetyl- β -d-muramidase (lysozyme) and lytic transglycosylase.....	20

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า	
4	แสดงรูปแบบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction analysis): PFGE ของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทั้งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวและสองชนิด (A) และ Restriction map ของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 (B), lane1: uncut, lane2: <i>EcoRV</i> , lane3: <i>MluI</i> , lane4: <i>SphI</i> , lane5: <i>BglII</i> , lane6: <i>HpaII</i> , lane7: <i>EcoRI</i> , lane8: <i>EcoRV+EcoRI</i> , lane9: <i>EcoRV+SphI</i> , lane10: <i>EcoRV+BglII</i> , lane11: <i>EcoRV+HpaII</i> , lane12: <i>EcoRV+EcoRI</i> , lane13: <i>MluI+SphI</i> , lane14: <i>MluI+BglII</i> , lane15: <i>MluI+HpaII</i> , lane16: <i>MluI+EcoRI</i> , lane17: <i>SphI+BglII</i> , lane18: <i>SphI+HpaII</i> , lane19: <i>SphI+EcoRI</i> , lane20: <i>BglII+HpaII</i> , lane21: <i>BglII+EcoRI</i> , lane22: <i>HpaII+EcoRI</i> , laneM1: λ <i>HindIII</i> marker (vivantis) และ laneM2: λ <i>PstI</i> marker (vivantis).....	35
5	แสดงผลการตรวจสอบหาโคลนที่มีชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยตัดพลาสมิดด้วย เอนไซม์ <i>HindIII</i> และแยกดีเอ็นเอด้วย 1 % agarose gel electrophoresis, laneM: VC 1 kb (Vivantis), lane1: pBluescript, lane2: plasmidClone4, lane3: plasmidClone5, lane4: plasmidClone6, lane5: plasmidClone8, lane6: plasmidClone9, lane7: plasmidClone10 และ lane8: plasmidClone13.....	36
6	แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินในจีโนมิกดีเอ็นเอของ แบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, laneM: 100 bp leader (Vivantis), lane1: Negative control (น้ำกลั่น) และ lane2: PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมิก ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 เป็นแม่แบบ.....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า	
7	แสดงผลของการวิเคราะห์ยีนเอนโดไลซิน (<i>lysABP-01</i>) ของแบคทีเรียโอเฟจ <i>ØABP-01</i> , ลำดับเบส ORF ของยีน <i>lysABP-01</i> รวมถึง start codon และ stop codon (ขีดเส้นใต้) จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม ORF Finder (A), และลำดับกรดอะมิโน (hypothetical peptide sequence) ของเอนโดไลซิน จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม ExPASy-Compute pI/Mw tool (B).....	41
8	แสดงผลการคัดเลือกโคลนแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของโปรตีน <i>LysABP-01</i> โดยใช้ 12 % SDS-PAGE, laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone1 ที่ ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone1 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane3: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone2 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ ด้วย IPTG (uninduced), lane4: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone2 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane5: <i>E. coli</i> BL21 ที่ มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone3 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced) และ lane6: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> clone3 หลังการ เหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced).....	43
9	แสดงผลการผลิตและวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์ <i>LysABP-01</i> โดยใช้ 12 % SDS- PAGE, laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2: <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pRSETa- <i>lysABP-01</i> ที่ถูก เหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane3: ส่วนที่เป็นของเหลวจากการทำให้ เซลล์แตก (soluble fraction) และ lane4: <i>LysABP-01</i> ที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์โดยวิธี nickel-affinity chromatography.....	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ

หน้า

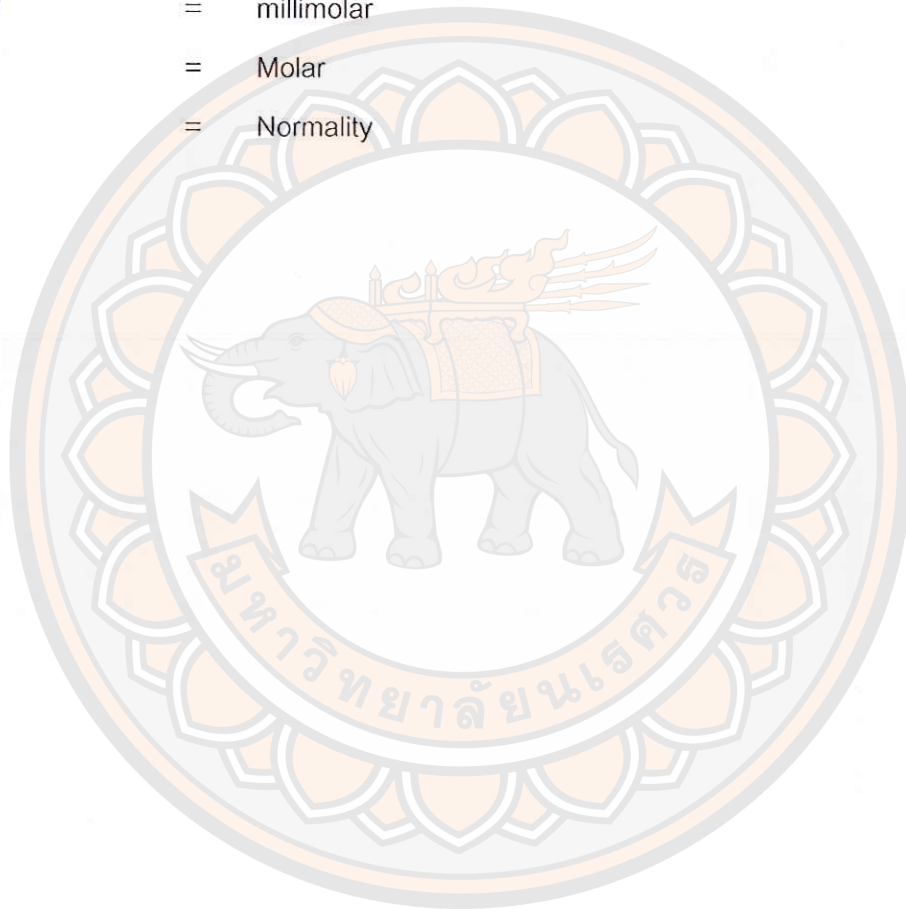
- 10 แสดงผลการวิเคราะห์และตรวจสอบ 6xHistidine-tag ของโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01, การแยกโปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (A) และการตรวจสอบ 6xHistidine-tag โดยการย้อมด้วย Pierce 6xHis Protein Tag Stain Reagent Set (Thermo scientific, USA) (B), laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2 *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), และ lane3: LysABP-01 ที่ผ่านการ refolding และทำให้เข้มข้น..... 45
- 11 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค plate lysis assay โดยนำ egg white lysozyme (EWL) เข้มข้น 10 μ M, โปรตีน LysABP-01 เข้มข้น 10 μ M, PBS และ storage buffer อย่างละ 10 μ l มาทดสอบบน autoclaved cell ที่เตรียมมาจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ ATCC 19606 และ AB 1589..... 46

อักษรย่อ

MDR-AB	=	Multidrug-resistant <i>A. baumannii</i>
PDR-AB	=	Pandrug-resistant <i>A. baumannii</i>
MOI	=	Multiplicity of infection
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
dsDNA	=	double-stranded DNA
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
PEG8000	=	Polyethylene glycol 8000
NaCl	=	Sodium chloride
MgSO ₄	=	Magnesium sulfate
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
TBE	=	Tris-borate-EDTA
TEMED	=	Tetramethylethylenediamine
PBS	=	Phosphate buffer saline
CFU	=	colony forming unit
PFU	=	plaque forming unit
Kb	=	kilo base
kDa	=	kilo Dalton
g	=	gram
mg	=	milligram
µg	=	microgram
L	=	liter
ml	=	millimeter

อักษรย่อ (ต่อ)

μl	=	Microliter
μm	=	Micrometer
nm	=	nanometer
pH	=	power of hydrogen ion concentration
mM	=	millimolar
M	=	Molar
N	=	Normality



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมหลากหลาย โดยมีการปนเปื้อนในอุปกรณ์ทางการแพทย์ และสามารถแพร่จากบุคคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วยได้ ทั้งยังสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง กระแสเลือด และทางเดินปัสสาวะ (Seifert, et al., 1995, pp. 340-349; Fournier, et al., 2006, pp. 692-699) โดยสามารถพบการก่อโรคได้ทั้งในชุมชนและในเขตโรงพยาบาล ที่สำคัญคือเชื้อมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB)) ซึ่งพบการระบาดทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี การติดเชื้อ MDR-AB จึงเป็นปัญหาในการรักษา และทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียชีวิตในอัตราสูง

แบคทีเรียโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีการติดเชื้อและเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียอย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อเข้าสู่ช่วงสุดท้ายของวงจรการเพิ่มจำนวน แบคทีเรียโอเฟจจะสร้างโปรตีนเอนโดไลซินขึ้นมา ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของโฮสต์ทำให้เซลล์ตาย แล้วปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ (Kutter, Raya and Carlson, 2004, pp. 165-222) ด้วยความจำเพาะของแบคทีเรียโอเฟจต่อแบคทีเรีย และประสิทธิภาพในการทำลายที่ดี (Parisien, et al., 2007, pp. 1-13) จึงมีการเลือกใช้แบคทีเรียโอเฟจ เพื่อควบคุมและรักษาการติดเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant bacteria: MDR-bacteria) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนโดไลซินจากแบคทีเรียโอเฟจมาประยุกต์ใช้ โดยอาศัยเทคนิคการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินเพื่อใช้เป็น therapeutic agents นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าในกรณีเชื้อแกรมบวก สามารถใช้เอนโดไลซินทำลายจากภายนอกเซลล์ได้ ส่วนเชื้อแกรมลบจะมี outer membrane เป็นโครงสร้างที่ป้องกันไม่ให้เอนโดไลซินเข้าไปทำลาย เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีการลอกเอาเมมเบรนชั้นนอกออกไป พบว่าเอนโดไลซินสามารถทำลาย peptidoglycan ได้ แสดงให้เห็นว่านอกจากเอนโดไลซินจะสามารถทำให้เซลล์แตกจากภายในเซลล์ (endolysis) แล้วยังมีคุณสมบัติทำให้เซลล์แตกจากภายนอกได้ด้วย (exolysis) และที่สำคัญยังไม่มีการศึกษาที่รายงานว่า เชื้อมีการดื้อต่อเอนโดไลซิน อันเนื่องจากความจำเพาะของเอนโดไลซินในการ recognize

บริเวณเป้าหมาย (target) และส่วนมาก target จะเป็นบริเวณที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของตัวเชื้อ เป็นผลให้ไม่พบการติดต่อเอนโดไลซิน จึงมีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อควบคุมและรักษาการติดเชื้อที่มีการติดต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด รวมถึงการติดเชื้อ MDR-AB

แบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* (*A. baumannii* bacteriophage: ABP) ได้มีแยกและศึกษาคุณสมบัติของ ABP ในประเทศไต้หวัน (Lin, et al., 2010, pp. 308-314) โดยเมื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน แล้วนำไปทดสอบกับ MDR-AB พบว่าสามารถเกิด lytic activity และยังสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้อีกด้วย (antimicrobial activity) (Lai, et al., 2011, pp. 529-539) แต่เนื่องจากแบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะต่อ *A. baumannii* เพียงบางสายพันธุ์ ทำให้ไม่มีความหลากหลายในการทำลายเชื้อ คือมีคุณสมบัติในการติดเชื้อ *A. baumannii* แคบ ประกอบกับความแตกต่างของสายพันธุ์ *A. baumannii* ที่มีการระบาดในแต่ละพื้นที่ จึงจำเป็นต้องมีการแยกและศึกษาคุณสมบัติ ABP ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* ในแต่ละพื้นที่ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยา และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ ABP โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะถูกแปรรหัสไปเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายโฮสต์ เซลล์ และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการนำ ABP ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

การระบาดที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีของเชื้อ MDR-AB และคุณสมบัติที่โดดเด่นของเอนโดไลซินในการทำลายเซลล์โฮสต์ได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพ ทั้งยังสามารถทำลายเซลล์ได้จากภายนอก ทำให้แบคทีริโอเฟจและเอนโดไลซินเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมการติดเชื้อ MDR-AB โดยการศึกษาที่ผ่านมา มีการแยกแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* จากบ่อน้ำเสียในประเทศไทย และศึกษาลักษณะของแบคทีริโอเฟจ พบว่าแบคทีริโอเฟจสายพันธุ์ ØABP-01 มีโครงสร้างส่วนหัวเป็นทรงหกเหลี่ยม (icosahedral head) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 nm มีหางสั้น (short tail) ขนาด 9 nm และมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จึงจัดอยู่ในวงศ์ *Podoviridae* และที่สำคัญ ØABP-01 มีคุณสมบัติในการติดเชื้อ *A. baumannii* กว้างและมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียโฮสต์ได้ดี (Kitti, et al., 2014, pp. 383-388) จึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการรักษาและควบคุมการติดเชื้อ MDR-AB ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาของแบคทีริโอเฟจสายพันธุ์ ØABP-01 และสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน เพื่อนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่อเซลล์แบคทีเรีย MDR-AB เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนานำเอนโดไลซินไปใช้เป็น therapeutic agents ทั้งการใช้เอนโดไลซินอย่างเดียวและการใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ อีกต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาโดยการสร้าง restriction map และสร้าง genomic library เพื่อศึกษาลำดับเบสบางส่วนในจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01
2. เพื่อตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินในแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)
3. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 และนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่อเซลล์แบคทีเรีย MDR-AB

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยาของแบคทีเรียโอเฟจสายพันธุ์ ϕ ABP-01 โดยการสร้าง restriction map และสร้าง genomic library เพื่อหาลำดับเบสบางส่วนของจีโนม ϕ ABP-01 และสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน แล้วทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่อเซลล์แบคทีเรีย MDR-AB

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Acinetobacter baumannii

1. จุลชีววิทยา

แบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลมท่อน (coccobacilli) มีการเจริญเติบโตแบบอาศัยออกซิเจน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) ให้ผลลบจากการทดสอบ oxidase และให้ผลลบจากการทดสอบ catalase ไม่สามารถหมักน้ำตาล (non-fermentation) และไม่พบการสร้างสปอร์ ซึ่งแบคทีเรียในจีนัสนี้มีอยู่ด้วยกันหลายสปีชีส์ ส่วนที่พบได้บ่อยที่สุดจากการแยกเชื้อในสิ่งส่งตรวจคือ *A. baumannii* รองลงมาคือ *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter haemolyticus* และ *Acinetobacter johnsonii* (Tjernberg and Ursing, 1989, pp. 595-605) โดยปกติเราสามารถพบ *A. baumannii* ในร่างกายมนุษย์ เช่น ผิวหนัง คอหอย เสมหะ สารคัดหลั่งจากช่องคลอด โดยเชื้อมักจะฉวยโอกาสก่อโรคกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมถึงผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นเวลานานในโรงพยาบาล (Maragakis, et al., 2004, pp. 3006–3011; Rodriguez-Bano, et al., 2009, pp. 715-722)

2. ระบาดวิทยา

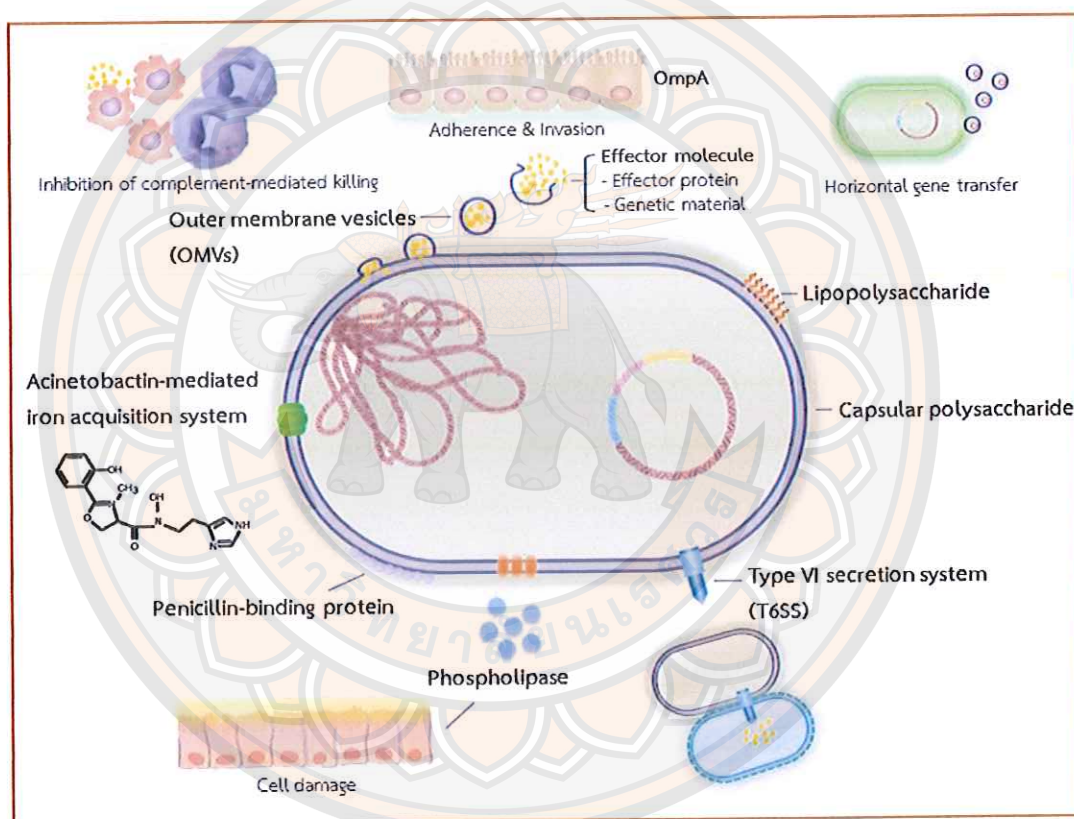
สมาคมโรคติดเชื้อแห่งสหรัฐอเมริกา (Infectious Diseases Society of America) จัดให้เชื้อ *A. baumannii* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียกลุ่ม "ESKAPE" pathogen ซึ่งประกอบไปด้วย *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacter* species (Boucher, et al., 2009, pp. 1-12) เนื่องจากมีความสำคัญในการก่อโรคในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และพบการระบาดที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และที่สำคัญคือเชื้อมีความสามารถในการดื้อยาได้หลายชนิด multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB) ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกามีการรายงานว่าสามารถแยกเชื้อ *A. baumannii* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจากหอผู้ป่วยหนัก มากถึงร้อยละ 85 (Souli, et al., 2008, pp. 1-11) ส่วนการรายงานขององค์กร Center for Disease Control and Prevention (CDC) พบว่าการติดเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นลำดับที่สอง รองจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยพบร้อยละ 43.4 ในผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในหอผู้ป่วย

วิกฤติ (Wisplinghoff, et al., 2004, pp. 309-317) ในประเทศอเมริกามีโรงพยาบาลมากกว่า 300 แห่งที่พบว่าอัตราการดื้อต่อยา carbapenem ของ *A. baumannii* สูงขึ้น ในช่วงปี ค.ศ. 1995-2004 เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 9 เป็นร้อยละ 40 (Carey, et al., 2006) และยังพบว่ามี การดื้อต่อยา carbapenem ของ *A. baumannii* เกิดขึ้นในหลายๆ ประเทศทั่วโลก เนื่องจากยา carbapenem เป็นยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อกว้าง มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* เมื่อพบอัตราการดื้อยาที่สูงขึ้น เป็นสาเหตุให้แพทย์ต้องนำยากลุ่มอื่นมาใช้ เช่น colistin ซึ่งมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์ โดยอันตรายต่อระบบประสาทและไต (Falagas and Kasiakou, 2005, pp. 1333-1341)

ในประเทศแถบเอเชียมีการรายงานการระบาดของ MDR-AB และการศึกษาพบว่า มีแนวโน้มการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Ho, et al., 2010, pp. 469-471) โดยในปี ค.ศ. 2010 พบการระบาดครั้งใหญ่ในโรงพยาบาล Teikyo University Hospital ประเทศญี่ปุ่น มีผู้ป่วยติดเชื้อ MDR-AB จำนวน 53 รายและพบว่ามี 9 รายที่เสียชีวิต ส่วนในประเทศไทยก็มีรายงานการระบาดของเชื้อ *A. baumannii* เช่นกัน การรายงานจากการติดตามเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมานานกว่า 10 ปีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่มีการดื้อยาด้านจุลชีพสูงขึ้นต้องเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด ประกอบกับการรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขพบว่า เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 เป็นร้อยละ 63 (ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2553) และดื้อยา cefoperazone/sulbactam จากร้อยละ 3 เพิ่มเป็นร้อยละ 44 โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ปี พ.ศ. 2545 พบร้อยละ 57 ส่วนโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในปี พ.ศ. 2546 พบว่าร้อยละ 46 ของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยมีการดื้อยาด้านจุลชีพทุกชนิดที่ใช้ในการรักษา ยกเว้น colistin (pandrug-resistant *A. baumannii* (PDR-AB)) (Chaiwarith, et al., 2005, pp. 1-8; Keerasuntonpong, et al., 2006, pp. 951-954)

3. ปัจจัยการก่อโรคและพยาธิกำเนิด

การก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* และความรุนแรงของโรค ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ทั้งตัวมนุษย์และตัวเชื้อ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานานและผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และปัจจัยก่อโรค (virulence factors) จากตัวเชื้อ รวมถึงเชื้อสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป ทั้งสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล และสามารถทนได้ในอุณหภูมิสูงถึง 44 องศาเซลเซียส โดย virulence factors ที่สำคัญๆ แสดงดังในภาพ 1



ภาพ 1 แสดงปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii*

ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญได้แก่

3.1 Outer membrane vesicles (OMVs) เป็นถุงที่เชื้อสร้างจากโครงสร้างห่อหุ้มเซลล์ส่วน outer membrane โดยข้างในถุงจะมีการบรรจุสารมหโมเลกุล เช่น OmpA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protease และ hemolysin เป็นกลไกที่เชื้อใช้ป้องกันการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์ นอกจากนี้ในถุงดังกล่าวยังมีการบรรจุสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการส่งต่อยีนต่างๆ ไป

ยังเซลล์แบคทีเรีย (horizontal gene transfer) (Ellis and Kuehn, 2010, pp. 81-94) การศึกษาของ Choi, et al. (2005, pp. 1127–1138) พบว่า OmpA ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ใน laryngeal epithelial cell ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมนุษย์โดยที่ OmpA สามารถเคลื่อนเข้าไปในไมโทคอนเดรีย กระตุ้นให้มีการหลั่ง cytochrome c และ apoptosis inducing factor แล้วเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ไลน์ จึงสรุปได้ว่า OmpA สามารถทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณทางเดินหายใจในระหว่างการติดเชื้อ นอกจากนี้แล้วยังมีการทดลองในหนู mice ที่ถูกติดเชื้อด้วย *A. baumannii* wild type และสายพันธุ์ที่เป็น *ompA*-mutant พบว่า ในหนูที่ถูกติดเชื้อด้วยสายพันธุ์ wild type เกิดโรคปอดบวมได้สูงกว่า ในหนูที่ถูกติดเชื้อด้วยสายพันธุ์ *ompA*-mutant เนื่องจากว่า OmpA มีส่วนช่วยให้เกิดการเกาะติด (adherence) การรุกราน (invasion) ของเชื้อใน epithelial cell ส่งเสริมให้เชื้อสามารถกระจายได้และก่อโรคปอดบวมตามมา (Choi, et al., 2008) นอกจากนี้เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่สร้าง OmpA ยังสามารถทนและเจริญได้ในซีรัมของมนุษย์ เนื่องจากว่า OmpA เกิดปฏิสัมพันธ์กับตัวยับยั้งในระบบ alternative complement pathway ทำให้ไม่เกิดการกระบวนทำลายแบคทีเรียแบบอาศัยคอมพลีเมนต์ (complement-mediated killing) (Kim, et al., 2009, pp. 224-231)

3.2 Lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อ *A. baumannii* ประกอบไปด้วยส่วน Lipid A, carbohydrate core และ O-antigen ความสำคัญของ LPS มีการศึกษาโดยการสร้าง *lpsB* glycotransferase-mutant strain ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้าง LPS ในส่วนของ Lipid A ได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไปเลี้ยงในซีรัมของมนุษย์ พบว่าเชื้อมีอัตราการอยู่รอดต่ำเมื่อเทียบกับ wild type (Luke, et al., 2010, pp. 2017-2023) แสดงให้เห็นว่า LPS มีส่วนสำคัญในการเกิด serum resistant ทำให้เชื้อทนและเจริญได้ใน human serum

3.3 Capsular polysaccharides (CPS) การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าเมื่อหนู rat ถูกติดเชื้อบริเวณ soft tissue ด้วย *A. baumannii* สายพันธุ์ capsule K1-deficient strain (สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลแบบผิดปกติ) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง หนู rat ก็สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้สมบูรณ์ ในขณะที่สายพันธุ์ wild type ยังสามารถเจริญอยู่ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า CPS มีความสำคัญในการช่วยปกป้อง *A. baumannii* จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Russo, et al., 2010, pp. 3993-4000)

3.4 Phospholipase จัดเป็น lipolytic enzyme ซึ่งเชื้อแกรมลบหลายชนิดสามารถสร้างได้ รวมถึง *A. baumannii* โดยแบคทีเรียจะใช้ phospholipase ในการย่อย phospholipid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนของเซลล์โฮสต์ โดยเฉพาะการย่อย phospholipid ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนใน mucosal barriers เป็นผลให้เชื้อสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ โดยมีการศึกษาใน *A. baumannii* สายพันธุ์ Phospholipase D gene-mutant พบว่าเชื้อมีความสามารถในการรุกราน epithelial cell ได้ลดลง (Jacobs, et al., 2010, pp. 1952-1962) และยังมีการศึกษาในหนู mice ที่เป็นโรคปอดบวม พบว่าในเชื้อสายพันธุ์ที่สร้าง Phospholipase D สามารถกระจายมายังบริเวณหัวใจและตับได้ หลังจากการติดเชื้อ 48 ชั่วโมง

3.5 Penicillin-binding proteins (PBPs) มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถคงรูปร่างอยู่ได้ การศึกษาใน *A. baumannii* สายพันธุ์ *pbpG*-mutant (*pbpG* แปลรหัสได้เป็น low molecular-weight PBP7/8) เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปเลี้ยงในซีรัมของมนุษย์ พบว่ามีการเจริญที่ลดลง (Russo, et al., 2009, pp. 513-521) แสดงให้เห็นว่า PBP7/8 มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ คงสภาพเซลล์ และการต้านทานต่อซีรัม

3.6 Type VI secretion system (T6SS) มีลักษณะโครงสร้างแบบ needle-like structure ซึ่งแบคทีเรียใช้ในการหลั่งสารโมเลกุลออกนอกเซลล์ เพื่อเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์มนุษย์หรือเซลล์แบคทีเรียด้วยกัน การเปรียบเทียบโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนใน T6SS พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของหางแบคทีเรียโอเฟจ (Leiman, et al., 2009, pp. 4154-4159) กล่าวคือ เป็นโครงสร้างที่ไม่ได้มีบรรพบุรุษร่วมกัน แต่มีวิวัฒนาการและทำหน้าที่คล้ายคลึงกัน (analogous) โดยแบคทีเรียโอเฟจจะใช้ส่วนหางในการเจาะเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ ส่วนแบคทีเรียจะใช้ T6SS ในการหลั่งสารโมเลกุลออกนอกเซลล์ เช่นในกรณีแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* (Russell, et al., 2011, pp. 343-347) ใช้ T6SS หลั่ง effector molecules หลายชนิดทั้งที่เป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์และเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดอื่น ส่วน *A. baumannii* มีการรายงานสายพันธุ์ *A. baumannii* M2 (wild type) ก็มี T6SS เมื่อนำไปบ่มร่วมกับเชื้อ *E. coli* พบว่าจำนวนเซลล์ของ *E. coli* ลดลง ในขณะที่การบ่มร่วมของ T6SS-deficient strain กับ *E. coli* จำนวนเซลล์ *E. coli* ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อบ่ม wild type กับ *E. coli* โดยใช้เมมเบรนกัน พบว่าจำนวนเซลล์ *E. coli*

กลับไม่เปลี่ยนแปลง จึงสามารถสรุปได้ว่า *A. baumannii* ใช้ T6SS ในการทำลายเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นและต้องมีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างเซลล์แบคทีเรีย (Carruthers, et al., 2013)

3.7 Acinetobactin จัดเป็นสารพวก siderophore ซึ่งเชื้อ *A. baumannii* มีการสร้างขึ้นเพื่อดึงเหล็กเข้ามาใช้ในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญได้ในกระแสเลือดระหว่างการติดเชื้อ การศึกษาของ Gaddy, et al. (2012, pp. 1015-1024) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ ATCC 19606 สามารถทนและเจริญได้ ทั้งใน lung epithelial cell, *Galleria mellonella* caterpillars และในหนู mice โดยเชื้อสามารถดึงเอาเหล็กมาใช้ในเซลล์โดยอาศัย acinetobactin นอกจากนี้ยังทำให้บริเวณที่เชื้อเจริญเกิดความเสียหายและเกิดการตายของเซลล์

4. กลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ

แบคทีเรีย *A. baumannii* มีการปรับตัวทำให้ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลไก โดย *A. baumannii* บางสายพันธุ์อาจมีกลไกการดื้อยามากกว่าหนึ่งกลไก จึงทำให้เชื้อมีการพัฒนาและดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (MDR-AB) กลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ได้แก่

การสร้างเอนไซม์ทำลายยาต้านจุลชีพ (inactivating enzymes) ของเชื้อ *A. baumannii* ส่วนมากพบว่าเป็นกลไกการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β -lactams โดยการสร้างเอนไซม์จำพวก serine protease (β -lactamase) ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีตำแหน่งออกฤทธิ์เป็นกรดอะมิโน serine และหมู่ไฮดรอกซิลของ serine จะทำปฏิกิริยากับวงแหวน β -lactam ring ทำให้วงแหวนแตก เป็นผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ตัวอย่างของเอนไซม์ β -lactamase เช่น Amp-C β -lactamase, OXA-type carbapenemases และ metallo- β -lactamase เป็นต้น (Gordon and Wareham, 2010, pp. 219-226)

การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *A. baumannii* ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม β -lactams ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงเนื่องจากยามีคุณสมบัติเป็นสารละลายน้ำ (hydrophilic) แต่เซลล์เมมเบรนมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) จึงจำเป็นต้องมีช่องทางให้ยาเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เรียกว่า porin โดยเชื้อปรับตัวโดยลดการสร้างโปรตีน porin ส่งผลให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง จึงเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพตามมา (Bonomo and Szabo, 2006, pp. 49-56)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยา เชื้อ *A. baumannii* ใช้กลไกดังกล่าวในยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactams, Fluoroquinolones และ Polymyxins เป็นต้น (McConnell, et al., 2012, pp. 130-155) โดยปกติเชื้อจะมีการสร้าง penicillin binding protein (PBP) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และเป็นเป้าหมายของยาต้านจุลชีพ เชื้อจึงมีการ

เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP เป็นชนิดใหม่ เช่น PBP2 ยาจึ่งไม่สามารถจับได้ เป็นผลให้ไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อได้ (Gehrlein, et al., 1991, pp. 405-412)

การขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pumps) อาศัยกลุ่มโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ เพื่อลดระดับยาภายในเซลล์ ความสำคัญของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น efflux pump คือ สามารถขับยาออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด เช่น โปรตีน AdeABC สามารถขับยาหลายกลุ่ม เช่น β -lactams, Fluoroquinolones, Aminoglycosides, Tetracyclines และ Glycylcyclines เป็นต้น (McConnell, et al., 2012, pp. 130-155)

5. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและการรักษา

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อ และระบุชนิดของเชื้อไม่ว่าจะเป็นระดับจีโนมหรือสปีชีส์ เพื่อนำไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ และใช้เป็นข้อมูลให้แพทย์ดำเนินการรักษาที่ถูกต้องทันที่ เพราะฉะนั้นการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจต้องอาศัยอาหาร selective media เพื่อควบคุมเชื้อชนิดอื่น แต่ให้เชื้อในจีโนม *Acinetobacter* สามารถเจริญได้ เช่น Herellae agar และ Leed *Acinetobacter baumannii* media (LAM) โดย *Acinetobacter* ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างกลมท่อน (coccobacillus) เมื่อเจริญอยู่ในช่วง stationary แต่จะมีรูปร่างแบบท่อน (rod) ในช่วง log ให้ผลลบเมื่อทดสอบ oxidase และ indole ให้บวกเมื่อทดสอบ catalase (Bouvet and Grimont, 1986, pp. 228-240) นอกจากนี้อาจใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น การระบุและหาลำดับเบสของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) โดยการสกัดจีโนมิกเอ็นเอจากเชื้อที่แยกได้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่เป็น rDNA โดยอาศัยความจำเพาะของไพรเมอร์ และหาลำดับเบสเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เช่น GenBank เพื่อใช้ระบุสปีชีส์ (Misbah, et al., 2005, pp. 461-464)

การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ยังคงใช้ยาปฏิชีวนะเป็นหลัก แต่ในปัจจุบันมีความยุ่งยากจากอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นของ MDR-AB มีการดื้อยาหลายชนิด จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงความครอบคลุมในการรักษา โดยการรักษาอาจมีทั้งการให้ยาตัวเดียว หรือยาผสมที่เสริมฤทธิ์กัน เช่นการใช้ยากลับ carbapenems (imipenem และ meropenem) ซึ่งเป็นยากลับ β -lactams ที่มีฤทธิ์ครอบคลุมทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่ในปัจจุบันพบมีการรายงานว่าเชื้อ *A. baumannii* มีการดื้อยา carbapenem เพิ่มมากขึ้น (Maragakis and Perl, 2008, pp. 1254-1263) ส่วนการใช้ยาตัวเดียวชนิดอื่นๆ เช่น Tigecycline, Aminoglycosides และ Polymyxin โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา colistin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Polymyxin ถึงแม้จะมีผลข้างเคียงต่อร่างกายมนุษย์ แต่จำเป็นต้องนำกลับมาใช้เนื่องจากอุบัติการณ์ของ MDR-AB ที่สูงขึ้น นอกจากนั้นยังมีการใช้ยา sulbactam ซึ่งมี

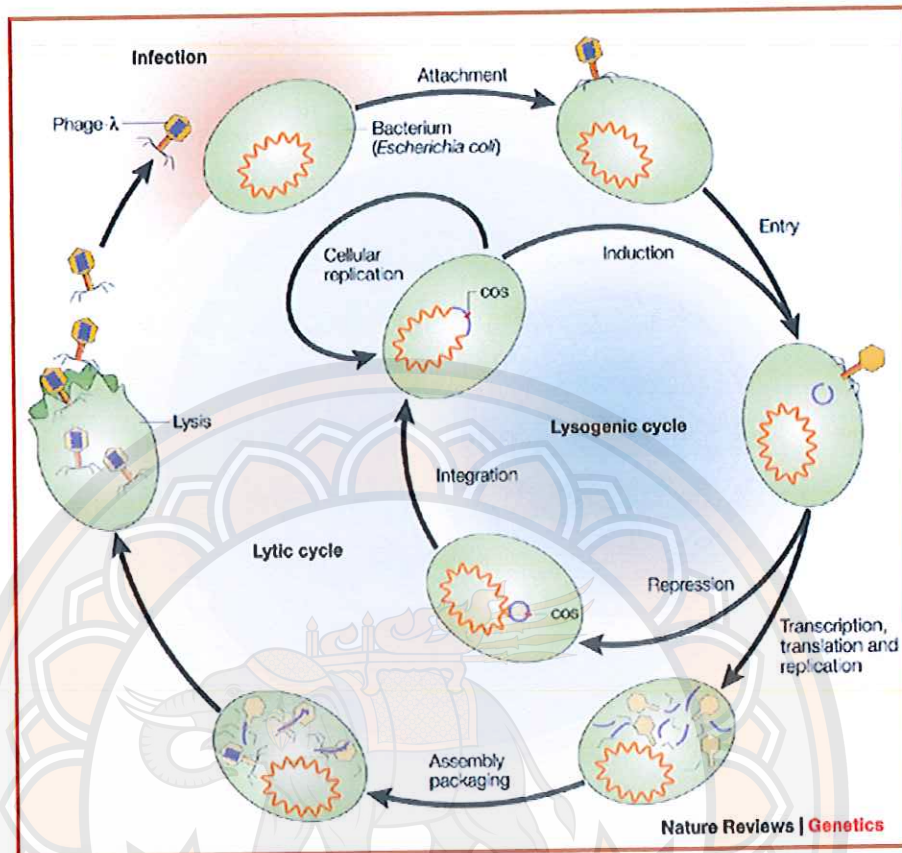
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้น (β -lactamase) จึงมีการนำใช้เสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่ม β -lactams เช่น ampicillin/sulbactam และ cefoperazone/sulbactam แต่ก็มีรายงานของ Brauers, et al. (2005, pp. 24-30) ว่า sulbactam ไม่ได้มีผลในการเสริมฤทธิ์

แบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเรียกสั้นๆว่า เฟจ (phage) จัดเป็นไวรัสชนิดหนึ่ง เป็นอนุภาคที่จำเป็นต้องมีการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย (obligate intracellular parasites) หรืออาจเรียกได้ว่าแบคทีริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย (Guttman, Raya and Kutter, 2004, pp. 29-46) เนื่องจากโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจประกอบไปด้วย สารพันธุกรรม และส่วนโปรตีนแคปซิด (capsid) ที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม ไม่มีเซลล์เมมเบรนรวมถึงอวัยวะอื่นๆ จึงไม่จัดเป็นเซลล์ แต่เรียกว่า อนุภาค (พิโลพันธ์ พันธุ์ฉนวนะ, 2540, หน้า 27.1-27.13) แบคทีริโอเฟจจะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียโฮสต์ โดยอาจจะจำเพาะในระดับสปีชีส์ หรืออาจจะจำเพาะในระดับสายพันธุ์ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการรับรู้ระหว่าง attachment site ของแบคทีริโอเฟจ และ receptor site บนผิวของแบคทีเรีย เช่น โปรตีนที่ผิวเซลล์ เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) หรือ กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นต้น (Rakhuba, et al., 2010, pp. 145-155)

อนุภาคของแบคทีริโอเฟจที่มีองค์ประกอบครบสมบูรณ์เรียกว่า ไวรัสออน (virion) ซึ่งประกอบไปด้วยสารพันธุกรรมเป็นกรดนิวคลีอิก ชนิดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ เช่น double-stranded DNA (dsDNA), single-stranded DNA (ssDNA), double-stranded RNA (dsRNA) หรือ single-stranded RNA (ssRNA) โดยเป็นแบบใดแบบหนึ่ง ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และเป็นวงกลม (circular) (พิโลพันธ์ พันธุ์ฉนวนะ, 2540, หน้า 27.1-27.13; Ackermann, 2004, pp. 68-81) ส่วนโครงสร้างโปรตีนแคปซิด จะประกอบไปด้วยแคปโซเมอร์หลายหน่วยรวมกันเป็นโครงสร้างแคปซิด เพื่อห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก ป้องกันการทำลายจากรังสี สารเคมี และอุณหภูมิ เป็นต้น ส่วนโครงสร้างเพิ่มเติมที่พบได้ในแบคทีริโอเฟจบางชนิดคือ envelope การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจ อนุภาคจะมีรูปร่างแตกต่างกันไป เช่น hexagonal, filamentous หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบไปด้วยส่วนหัวและหาง การจัดจำแนกในแต่ละวงศ์ นั้นอาศัยการแบ่งตามชนิดของกรดนิวคลีอิก และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Ackermann, 2001, pp. 843-857)

วงจรการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ วงจรแบบไลติก (lytic cycle) และไลโซจีนิก (lysogenic cycle) โดยจะเรียกแบคทีริโอเฟจที่มีวงจรแบบไลติกว่า lytic phage หรือ virulence phage ซึ่งหมายถึงแบคทีริโอเฟจที่เพิ่มประชากรลูกหลานแล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกเพื่อปล่อยอนุภาคลูกหลานออกมา วงจรแบบไลติกประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังในภาพ 2 แบคทีริโอเฟจแลมปีดาเริ่มต้นวงจรโดยการที่อนุภาคจะเกาะติดกับผิวเซลล์ของแบคทีเรีย (attachment) โดยอาศัยความจำเพาะระหว่าง attachment site และ receptor site จากนั้นเกิดการส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าไปในเซลล์ (entry) ของแบคทีเรีย แล้วเกิดการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ (biosynthesis) โดยในช่วงแรกจะมีการลอกรหัสได้เป็น early mRNA โดยใช้ RNA polymerase ของโฮสต์ เพื่อแปลรหัสไปเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น DNA polymerase จากนั้นจะใช้เอนไซม์ดังกล่าว ในการเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอของแบคทีริโอเฟจ สุดท้ายจะเกิดการลอกรหัสได้เป็น late mRNA ซึ่งเป็น mRNA ที่จะถูกแปลรหัสให้ได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง เช่น โปรตีนแคปซิด ส่วนหาง รวมทั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต้องใช้ในการประกอบอนุภาค (พีไลพันธ์ พันธุ์ฉนวนะ, 2540, หน้า 27.1-27.13; Guttman, Raya and Kutter, 2004, pp. 29-46) เมื่อประกอบอนุภาค (assembly) สมบูรณ์แล้ว ขั้นตอนสุดท้ายคือการปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ ซึ่งจะต้องมีการทำลายเซลล์โฮสต์ โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิดคือ เอนไซม์โฮลิน (holin) และเอนไซม์เอนโดไลซิน (endolysin) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันเป็นระบบ holin-endolysin system จากการที่ holin monomer มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เช่นเดียวกับเซลล์เมมเบรน (Wang, et al., 2000, pp. 799-825; Loessner, 2005, pp. 480-487) จึงสามารถแทรกตัวไปในเซลล์เมมเบรนแล้วประกอบเป็น holin oligomer เกิดเป็นรู ทำให้ endolysin สามารถผ่านรูดังกล่าวได้ แล้วมาย่อย peptidoglycan ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และสามารถปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ได้ แต่ในกรณีแบคทีริโอเฟจที่มีจีโนมขนาดเล็ก เช่น Phages Q β และ phage ϕ X174 (Bernhardt, et al., 2001, pp. 2326-2329; Bernhardt, Struck and Young, 2001, pp. 6093-6097) ไม่ได้ใช้เอนโดไลซินในการทำลายเซลล์ แต่จะสร้าง single protein เพื่อไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ peptidoglycan โดยไปยับยั้ง MraY หรือ MurA ซึ่งเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียใช้ในกระบวนการสังเคราะห์และประกอบ peptidoglycan เป็นผลให้เซลล์มีโครงสร้าง peptidoglycan ที่ไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถรักษาสภาพเซลล์ทำให้เกิดเซลล์แตก



ภาพ 2 แสดงวงจรการเพิ่มจำนวน ของแบคทีริโอเฟจแลมบีดาแบบ lytic cycle และ lysogenic cycle

ที่มา: Allan, 2003

แบคทีริโอเฟจที่มีวงจรการเพิ่มจำนวน แบบไลโซจินิก เรียกว่า lysogenic phage หรือ temperate phage ซึ่งหมายถึงแบคทีริโอเฟจที่มีการติดเชื้อในแบคทีเรีย แล้วนำจีโนมไปสอดแทรกเข้ากับจีโนมของแบคทีเรีย แต่ไม่มีการสร้างและประกอบอนุภาคลูกหลาน ซึ่งกระบวนการสอดแทรกจีโนมดังกล่าว เรียกว่า genetic recombination และเรียกจีโนมของแบคทีริโอเฟจในช่วงนี้ว่า prophage ซึ่งกลายเป็นส่วนหนึ่งของจีโนมแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ prophage ก็จะถูกเพิ่มจำนวนตามไปด้วย เซลล์แบคทีเรียที่แบ่งตัวใหม่ก็จะมีส่วนของ prophage แฝงอยู่ในจีโนม เรียกกระบวนการนี้ว่า lysogenization เรียกแบคทีเรียที่มี prophage ว่า lysogen ซึ่งการแฝงของ prophage เป็นเสมือน mobile genetic element สามารถทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีริโอเฟจกับแบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจบางชนิดสามารถ

เปลี่ยนวงจรการเพิ่มจำนวนได้ เช่น Mu phage หรือ lambda phage เมื่อถูกกระตุ้นด้วยด้วยปัจจัยบางอย่าง เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต หรือความร้อน ทำให้กลับเข้าสู่วงจรแบบไลติกได้ (Hanlon, 2007, pp. 118-128)

มีการแยกและศึกษาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ตามรายงานการศึกษาในหนู mice ที่ถูกติดเชื้อ *A. baumannii* เมื่อทำการเติมแบคทีเรียโอเฟจลงไป พบว่าหนูทดลองที่ได้รับแบคทีเรียโอเฟจสามารถมีชีวิตรอด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูทดลอง ที่ไม่ได้รับแบคทีเรียโอเฟจ (Soothill, 1992, pp. 258-261) แต่ในปัจจุบันมีการระบาดและพัฒนาการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นของเชื้อ *A. baumannii* จึงมีการใช้เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ MDR-AB เป็นโฮสต์ในการแยกแบคทีเรียโอเฟจ ส่วนการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในรูปแบบเพจบำบัด ไม่ใช่เพียงแค่การนำอนุภาคไปใช้รักษาการติดเชื้อ แต่ยังมีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน ซึ่งจัดเป็นหนึ่งใน lytic enzyme ที่แบคทีเรียโอเฟจใช้ในการทำลายเซลล์โฮสต์ มาใช้เป็น therapeutic agents เพราะฉะนั้นในปัจจุบัน จึงมีการศึกษาคูณสมบัติทางอณูชีววิทยา การหาลำดับเบสของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ เพื่อค้นหาชิ้นที่จะแปลรหัสไปเป็น lytic enzyme โดยมีทั้งการหาลำดับเบสทั้งจีโนมหรือหาลำดับเบสบางส่วนของจีโนมโดยการทำ genomic library ดังแสดงในตาราง 1 ซึ่งมีการศึกษาลำดับเบสและเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูล NCBI genome database (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/)

ตาราง 1 แสดงการศึกษาลำดับเบสของจีโนมและ lytic enzyme ของแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii*

Phage name (family)	Genome sizes (kb) (accession no.)	Lytic enzyme (locus tag or accession no.)	Reference
vB_AbaM-IME-AB2 (<i>Myoviridae</i>)	43.665 (whole genome sequence) (JX976549)	- putative lysozyme family protein (513 bp: AB2_68) - putative tail-fiber/ lysozyme protein (2049 bp: AB2_81)	(Peng, et al., 2014)
133 (<i>Myoviridae</i>)	159.801 (whole genome sequence) (HM114315)	- putative endolysin (522 bp: Acj133p210) - gp5 baseplate hub subunit and tail lysozyme (1755 bp: Acj133p154)	(Petrov, et al., 2010)
ØAB1 (<i>Podoviridae</i>)	41.526 (whole genome sequence) (HQ186308)	- putative endolysin (558 bp: phiAB1_gp43)	(Chang, et al., 2011, pp. 249–255)
vB_AbaP_Acibel007 (<i>Podoviridae</i>)	42.654 (whole genome sequence) (NC_025457)	- putative endolysin (585 bp: vB_AbaP_Acibel007_48)	(Merabishvili, et al., 2014)

ตาราง 1 (ต่อ)

Phage name (family)	Genome sizes (kb) (accession no.)	Lytic enzyme (locus_tag or accession no.)	Reference
Abp1 (<i>Podoviridae</i>)	42.185 (whole genome sequence) (JX658790)	- EF hand domain protein (558 bp: Abp1_0050)	(Huang, et al., 2013, pp. 535-543)
ØAB2 (<i>Podoviridae</i>)	40 (PFGE)	- endolysin (<i>lysAB2</i>) (558 bp: HM755898.1)	(Lin, et al., 2010, pp. 308-314)
BØ-B1251 (<i>Podoviridae</i>)	45.364 (whole genome sequence) (JX403940)	- hypothetical protein (546 bp: BPABA456_00510)	(Jeon, et al., 2012, pp. 12437-12438)

การประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจและเอนโดไลซิน (endolysin) ในทางการแพทย์

1. การประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจในด้านต่างๆ

ปัจจุบันมีการนำแบคทีริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งการนำเอาอนุภาคแบคทีริโอเฟจมาใช้หรือการนำเอาโปรตีนบางชนิดจากแบคทีริโอเฟจมาใช้ โดยอาศัยเทคนิคการสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เช่น งานทางด้านพันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรมการเกษตรและอาหาร เทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงทางการแพทย์

1.1 Genetic engineering เป็นการนำเอาแบคทีริโอเฟจมาเป็นเครื่องมือในการตัดต่อยีน กล่าวคือใช้แบคทีริโอเฟจเป็นยีนพาหะ (gene vector) ในการนำยีนที่เราสนใจเข้าไปสอดแทรกในจีโนมของแบคทีเรียโฮสต์ ตัวอย่างเช่น การใช้ λ phage เป็นยีนพาหะ โดยตัดต่อยีนที่สนใจเข้าไปใน λ DNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 49 กิโลเบส (recombination DNA) เนื่องจาก λ phage มีวงจรการเพิ่มจำนวน แบบไลโซจีนิค เมื่อมีการติดเชื้อ *E. coli* ก็จะมีการนำ recombination DNA สอดแทรกเข้าไปในจีโนมของ *E. coli* (พิไลพันธ์ พันธุ์ฉมนะ, 2540, หน้า 27.1-27.13)

1.2 Phage typing จากความจำเพาะระหว่าง attachment site ของเฟจและ receptor site ที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สามารถใช้แบคทีริโอเฟจในการจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวในการถูกติดเชื้อด้วยแบคทีริโอเฟจ โดยมักใช้แบคทีริโอเฟจหลายๆ ชนิดรวมกันเป็นชุด (phage cocktail) ในงานระบาดวิทยา มีการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อสืบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาด เช่น เมื่อมีการระบาดของเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่ก่อโรคอหิวาตกโรคจากสองพื้นที่ สามารถตรวจสอบได้ว่า เชื้อที่ระบาดมาจากแหล่งเดียวกันหรือไม่ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากสองพื้นที่มาทดสอบความไวต่อชุดของแบคทีริโอเฟจ หากเชื้อจากสองพื้นที่มีความไวต่อชุดของแบคทีริโอเฟจเหมือนกัน แสดงว่าการระบาดน่าจะเกิดจากแหล่งเดียวกัน จากการศึกษาการใช้แบคทีริโอเฟจในการจัดจำแนก Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และ *Campylobacter* พบว่าสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการติดตามการระบาดในอาหาร (Hagens and Loessner, 2007, pp. 513-519)

1.3 Biocontrol เป็นการควบคุมและลดจำนวนแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนในอาหาร หรือพื้นผิวของวัสดุชนิดต่างๆ โดยใช้อนุภาคแบคทีริโอเฟจหรือเอนโดไลซินบริสุทธิ์ซึ่งเป็นเอนไซม์จากแบคทีริโอเฟจ เช่น การควบคุมแบคทีเรีย *Campylobacter* ในเนื้อไก่สด (Wagenaar, et al., 2005, pp. 275-283) และ *Listeria monocytogenes* ในอาหารสด หรือลดแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Bigot, et al., 2011, pp. 1448-1452) ในด้านการเกษตรมีการนำ

แบคทีเรียโอเฟจไปใช้ช่วยลดแบคทีเรียก่อโรคหลายอย่างเช่น *Campylobacter jejuni*, *E. coli* และ *Salmonella* spp. นอกจากนี้ในฟาร์มสัตว์ยังใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโอเฟจ ควบคุมแบคทีเรีย *Lactococcus* และ *Vibrio* ในฟาร์มเลี้ยงปลา (Mahony, et al., 2011, pp. 157-163)

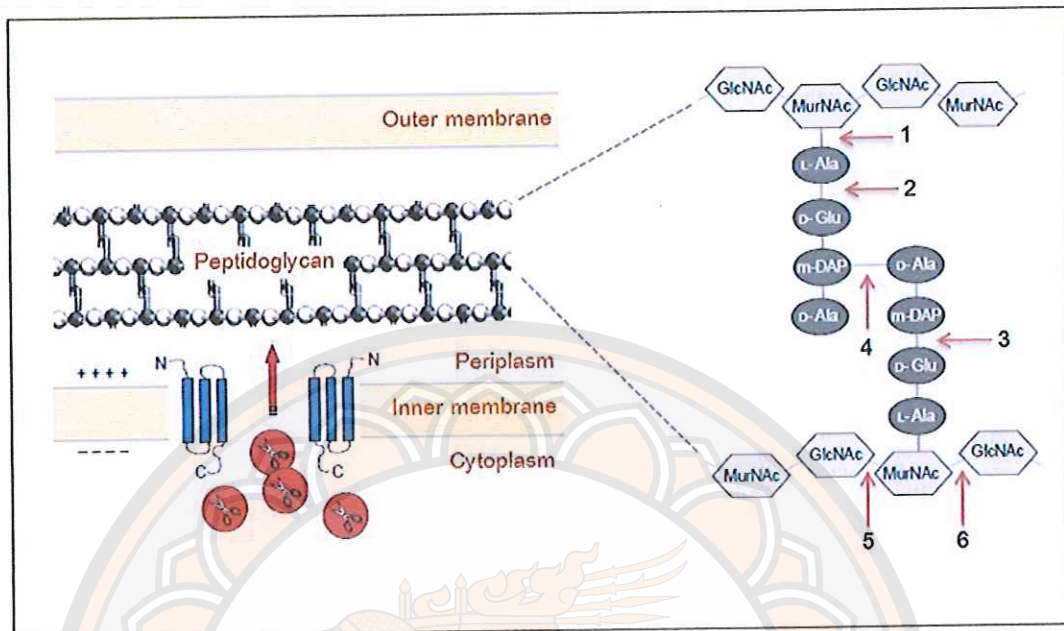
1.4 Phage therapy หรือไวรัสบำบัด คือการนำเอาอนุภาคแบคทีเรียโอเฟจมาใช้ในการรักษา โดยในปี ค.ศ. 1921 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Richard Bruynonge และ Joseph Matsin เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ใช้แบคทีเรียโอเฟจเพื่อลดการติดเชื้อ *Staphylococcus* ที่เป็นปัญหาในติดเชื้อหลังการผ่าตัด โดยการฉีดแบคทีเรียโอเฟจบนผิวหนังรอบๆ บริเวณแผลที่ติดเชื้อหลังจากการผ่าตัด ผลที่เกิดขึ้นพบว่าแบคทีเรียโอเฟจสามารถลดการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นจุดเริ่มต้นให้นักวิทยาศาสตร์หลายๆ กลุ่มศึกษาแบคทีเรียโอเฟจเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (Phumkhom, 2009, pp. 94-103) เมื่อมีการค้นพบยาต้านจุลชีพในปี ค.ศ.1941 จึงทำให้ความสนใจในการศึกษาแบคทีเรียโอเฟจลดลง หลังจากนั้น เมื่อมีอัตราการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้แบคทีเรียโอเฟจกลับมาได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า phage therapy มีศักยภาพในการกำจัดแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด

2. การประยุกต์ใช้เอนโดไลซิน (endolysin) ในทางการแพทย์

เอนไซม์ที่สามารถย่อยและทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (peptidoglycan) เรียกรวมๆว่า peptidoglycan hydrolase, murine hydrolase หรือ muralytic enzyme ตัวอย่างเช่น lysozyme หรือเอนไซม์ autolysin ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อใช้สลายผนังเซลล์บางส่วนเพื่อสังเคราะห์สาย peptidoglycan ขึ้นมาใหม่ (wall turnover) รวมถึงเอนโดไลซิน (endolysin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียโอเฟจสร้างขึ้นมาในช่วงสุดท้ายของวงจรการเพิ่มจำนวน ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของโฮสต์ เพื่อปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ จึงสามารถเรียกเอนโดไลซินว่า phage lysin หรือ phage-encoded peptidoglycan hydrolase และเนื่องจากว่าแบคทีเรียโอเฟจใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการทำให้เซลล์แตกจากด้านในเซลล์ จึงเรียกว่า endolysin

แบคทีเรียโอเฟจที่มีหาง (tailed phage) โดยส่วนมากจะใช้ระบบ holin-endolysin system โดย holin monomer มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เช่นเดียวกับเซลล์เมมเบรน (Wang, et al., 2000, pp. 799-825; Loessner, 2005, pp. 480-487) จึงสามารถแทรกตัวไปในเซลล์เมมเบรนแล้วประกอบเป็น holin oligomer เกิดเป็นรู endolysin จึงสามารถผ่านรูดังกล่าวได้ แล้วมาย่อย peptidoglycan ทำให้เซลล์ไม่สามารถรักษาแรงดันออสโมติกภายในได้ (internal osmotic pressure) เป็นผลให้เซลล์แตก (hypotonic cell lysis) และตายในที่สุด จากโครงสร้าง

เอนโดไลซินโดยส่วนมากจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น enzyme catalytic domain ทางด้านปลาย N และ cell wall binding domain ทางด้านปลาย C จึงทำให้มีความจำเพาะต่อ substrate (peptidoglycan) ซึ่งส่วนที่เป็น enzyme catalytic domain จะทำหน้าที่ตัดพันธะที่เชื่อมโยงโครงสร้าง peptidoglycan ดังในภาพ 3 จะเห็นได้ว่าเอนโดไลซินแต่ละชนิดมีจุดตัดบน peptidoglycan ที่แตกต่างกัน ทำให้แบ่งได้ออกเป็น 6 กลุ่ม ในกรณีของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* มีการศึกษาของ Lin, et al. (2010, pp. 308-314) ซึ่งแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ AB2 พบว่า ϕ AB2 จัดอยู่ในวงศ์ *Podoviridae* และจำเพาะต่อ *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC17978 โดยตรวจพบเอนโดไลซินและให้ชื่อว่า ϕ AB2 endolysin gene (*LysAB2*) ซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโน 185 กรดอะมิโน โดยมีส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์กับ lysozyme super family หรือจัดอยู่ในกลุ่มที่ 6 ตามภาพ 3 ซึ่งจะตัดพันธะ β -1,4-glycosidic ระหว่างน้ำตาล *N*-acetyl muramic acid และ *N*-acetyl glucosamine และได้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน endolysin (*LysAB2*) เพื่อนำไปทดลองในการทำลายแบคทีเรียพบว่าสามารถทำลายผนังเซลล์ของ *A. baumannii* และ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้ *LysAB2* ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 20 - 40 องศาเซลเซียส และ มีความเสถียรในช่วง pH 4 - 8 (Lai, et al., 2011, pp. 529-539)



ภาพ 3 แสดงโครงสร้าง cell envelope ของแบคทีเรียแกรมลบ การทำงานของเอนโดไลซิน และจุดตัดของเอนโดไลซิน (ภาพซ้าย) โครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและการทำงานของ holing-endolysin system โดย Holin proteins จะแทรกตัวใน inner membrane แล้วรวมตัวเป็น oligomer เป็นผลให้เมมเบรนเกิดเป็นรูทำให้ endolysin สามารถผ่านเข้าไปถึง peptidoglycan (ภาพขวา) แสดงโครงสร้างของ peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมลบรวมถึง *A. baumannii* โดยสามารถแบ่งชนิดของเอนโดไลซินได้จากจุดตัดที่แตกต่างกันเช่น

- 1, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; 2, L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase;
- 3, D-glutamyl-m-DAP endopeptidase; 4, interpeptide bridge-specific endopeptidases;
- 5, N-acetyl- β -D-glucosaminidase และ 6, N-acetyl- β -D-muramidase (lysozyme) and lytic transglycosylase

ที่มา: ดัดแปลงจาก Loessner, 2005

การประยุกต์ใช้เอนโดไลซินในทางการแพทย์ จะเป็นการสร้างโปรตีนลูกผสมเพื่อนำมาใช้เป็น antimicrobial agents หรือ therapeutic agents ทั้งการใช้เอนโดไลซินอย่างเดียวและการใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพ การศึกษาในปี ค.ศ. 2001 โดย Nelson, et al. (2001, pp. 4107-4112) ใช้เอนโดไลซิน PlyC จาก streptococcal phage โดยการให้หนูได้รับเอนโดไลซินทาง oral cavity ก่อนการติดเชื้อ พบว่าสามารถป้องกันการ colonization ของเชื้อ group A streptococci ในหนู mice ถึงร้อยละ 70 และเมื่อปล่อยให้เชื้อ colonize ในหนูทดลองแล้วจึงให้เอนโดไลซิน PlyC ขนาด 500U พบว่าสามารถกำจัดแบคทีเรียได้ภายใน 2 ชั่วโมง (ตาราง 2) นอกจากนี้ยังมีการศึกษามากมายที่ช่วยยืนยันว่า ไม่มีการตรวจพบเชื้อที่ติดต่อเอนโดไลซิน อันเนื่องจากความจำเพาะของเอนโดไลซินในการ recognize บริเวณเป้าหมาย (target) และส่วนมาก target จะเป็นบริเวณที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเชื้อ เช่น เอนโดไลซิน PlyG มีเป้าหมายคือโครงสร้าง galactosylated core ของผนังเซลล์ (Mo, et al., 2012, pp. 15556-15562) ส่วนเอนโดไลซิน Pal มีเป้าหมายบริเวณ choline residual ของ pneumococcal envelope (Garcia, et al., 1988, pp. 914-918) เป็นผลให้ไม่พบการติดต่อเอนโดไลซิน จึงมีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ในการควบคุมหรือรักษาการติดเชื้อที่มีการติดต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด โดยมีการนำเอนโดไลซินมาทดสอบในระดับต่างๆ ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงคุณสมบัติของเอนโดไลซินต่อแบคทีเรียชนิดต่อยารชนิดต่างๆ

Antibiotic-resistant bacteria	Endolysin	Clinical trial	Efficacy model	References
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant (MRSA), vancomycin-resistant (VRSA))	ClyS, LysK	Pre-clinical trial (<i>in vivo</i>)	ทดสอบ ClyS ใน murine sepsis, ทดสอบ LysK, ClyS ใน murine nasal และ murine skin พบว่าสามารถลดการเจริญของเชื้อได้	(Becker, et al., 2008, pp. 185-191; Horgan, et al., 2009, pp. 872-874)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicillin-resistant)	Cpl-1, Pal	Pre-clinical trial (<i>in vivo</i>)	ทดลองในหนู rat ที่เป็นโรค endocarditis และ meningitis พบว่าสามารถลดการ colonize ของเชื้อในหนูทดลองได้	(Entenza, et al., 2005, pp. 4789-4792; Resch, et al., 2011, pp. 516-521)

ตาราง 2 (ต่อ)

Antibiotic-resistant bacteria	Endolysin	Clinical trial	Efficacy model	References
<i>Streptococcus pyogenes</i> (streptomycin-resistant)	PlyC (C1 lysin)	Pre-clinical trial (<i>in vivo</i>)	ทดลองโดยให้หนูได้รับเอนโดไลซินทาง oral cavity ก่อนการติดเชื้อ พบว่าสามารถป้องกันการ colonize ที่ทางเดินหายใจส่วนต้นได้ และเมื่อให้เอนโดไลซินหลังหนูติดเชื้อ พบว่าสามารถกำจัดเชื้อได้ภายใน 2 ชั่วโมง	(Nelson, et al., 2001, pp. 4107-4112)
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	LysAB2	Pre-clinical trial (<i>in vitro</i>)	จากการทดสอบในระดับ <i>in vitro</i> เอนโดไลซินสามารถเกิด lytic activity และ antimicrobial activity โดยทำลายผนังเซลล์ของ <i>A. baumannii</i> และ <i>S. aureus</i> ได้	(Lai, et al., 2011, pp. 529-539)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจและสภาวะการเจริญที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ *A. baumannii* สายพันธุ์ AB1589 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (นริศรา บุญเกิด, 2550) *E. coli* สายพันธุ์ DH5 alpha และ BL21 (DE3) ส่วนแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียโอเฟจสายพันธุ์ ØABP-01 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (Kitti, et al., 2014, pp. 383-388) ดังแสดงในตาราง 3 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth (Criterion, USA) หรือ LB agar ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตาราง 3 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา

Strain or plasmid	Relevant characteristic	Source/Reference
<i>A. baumannii</i> strains		
- ATCC 19606	Reference strain	American Type Culture Collection
- AB 1589	MDR-AB have OXA-23 (plasmid) and OXA-51 (chromosome) : Carbapenem	(นริศรา บุญเกิด, 2550)
<i>E. coli</i> strains		
- DH5 alpha	Strain used for cloning	(Hanahan, 1983, pp. 557-580)
- BL21(DE3) pLysS	Strain used for protein expression	Novagen, Germany
plasmids		
- pBluescript	DNA cloning and sequencing vector	Fermentas, USA
- pRSETa	Overexpression vector	Invitrogen, USA

การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ ØABP-01

การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจดัดแปลงจากวิธีของ Su, Venkatesh และ Bodmer (1998, pp. 44-46) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. baumannii* AB 1589 ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นนำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 250 µl มาเติมลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที บ่มจนกว่าเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะ log phase หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4-0.6 จากนั้นเติมแบคทีเรียโอฟาจ ØABP-01 โดยใช้อนุภาคของแบคทีเรียโอฟาจมีค่า MOI (Multiplicity of Infection) เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปบ่ม โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 ml นำไปบ่มต่อ โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจะทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้วปลดปล่อยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเศษเซลล์แบคทีเรียออกไป ส่วนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจจะอยู่ในชั้นน้ำใสด้านบน นำเอาชั้นน้ำใสด้านบนมารองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 µm เก็บเอาส่วนที่ผ่านการกรองไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำให้อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yamamoto, et al. (1970, pp. 734-744) โดยนำส่วนที่ผ่านการกรองปริมาตร 50 ml มาเติม DNase I (Vivantis, Selangor, Malaysia) ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 10 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือ NaCl (Ajax finechem, New Zealand) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 M เขย่าจนละลายแล้วบ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนน้ำใสถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วเติม PEG8000 (Bio Basic Inc, Markham, Canada) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ ร้อยละ 8-10 (8-10% w/v) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจจะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ละลายตะกอนกลับในสารละลาย SM beffer (NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM และ Tris-Cl 50 mM) ปริมาตร 1 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *ØABP-01*

นำอนุภาคแบคทีเรียที่ละลายใน SM buffer ปริมาตร 600 μ l มาเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 600 μ l ผสมให้เข้ากันจะเห็นสารละลายแยกเป็นสองชั้น โดยดูเอาเฉพาะสารละลายชั้นบนที่มีลักษณะขาวขุ่น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แยกเอาส่วนใสชั้นบนปริมาตร 600 μ l มาผสมกับ TE buffer (Tris-Cl 10 mM และ EDTA 1 mM pH 8.0) ปริมาตร 60 μ l และเติม 10% SDS ปริมาตร 60 μ l นำไปปั่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมฟีนอล ปริมาตร 600 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสชั้นบนสุดปริมาตร 500 μ l มาเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 50 μ l และ isopropanol ปริมาตร 500 μ l ปั่นบดน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอกลับในสารละลาย SM buffer ปริมาตร 500 μ l เติม 8 M potassium acetate ปริมาตร 150 μ l และ isopropanol ปริมาตร 650 μ l นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอกลับในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 μ l นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคทีเรีย *ØABP-01*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:200 (ดีเอ็นเอ:น้ำกลั่น) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ cuvette quartz (Hellma Analytics, Müllheim, Germany) และเครื่อง Beckman Coulter DU[®] 730 UV/Vis Spectrophotometers (Beckman Coulter, Brea, CA) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 320 nm จากนั้นนำมาคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้สูตร $\text{concentration } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} \text{ reading} - A_{320} \text{ reading}) \times \text{dilution factor} \times 50 \mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *HpaI*, *MluI*, *XbaI* และ *SphI* (Vivantis, Selangor, Malaysia) โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 1 μ g มาตัดเดี่ยวและตัดคู่ด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 11 ชนิด โดยปฏิกิริยาประกอบไปด้วย reaction buffer ความเข้มข้น 1X, ดีเอ็นเอ ปริมาณ 1 μ g, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 μ l ด้วย TE buffer นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบ fragment ของ

จีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) โดยใช้ 1% agarose gel และ 0.5X TBE running buffer ปริมาตร 2.5 L ตั้งโปรแกรมอัตโนมัติ (20K-500K automatic program) บนเครื่อง CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) ปรับเวลาให้เป็น 18 ชั่วโมง, อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส และความต่างศักย์ 4.5 V/cm (initial Sw Tm: 0.2s; final Sw Tm 0.5s) และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hind*III Marker (Vivantis, Selangor, Malaysia) และ Lambda DNA/*Pst*I Marker (Vivantis, Selangor, Malaysia) เมื่อครบ 18 ชั่วโมง นำเจลมา ย้อมใน 10 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

การศึกษา genomic library ของแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01

1. การเตรียมชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอและดีเอ็นเอพาหะ

นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (Vivantis, Selangor, Malaysia) โดยปฏิกิริยาประกอบไปด้วย reaction buffer ความเข้มข้น 1X, จีโนมิกดีเอ็นเอปริมาณ 1 µg, เอนไซม์ *Hind*III 1 unit และปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl ด้วย TE buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบ fragment ของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วใช้ใบมีดตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 500 - 4,000 bp นำมาสกัดเอาดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ส่วนดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการโคลน ได้แก่ pBluescript (Fermentas) (ตาราง 3) นำดีเอ็นเอพาหะดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่นเดียวกับที่ใช้ในการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้นนำมากำจัด phosphate group ที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) โดยใช้เอนไซม์ดังกล่าว 1 unit, FastAP™ buffer ความเข้มข้น 1X และใช้น้ำกลั่นในการ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแยกโดย 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วใช้ใบมีดตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 3,000 bp นำมาสกัดเอาดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) เพื่อนำไปใช้ในการประกอบไลบรารี

2. การประกอบไลบรารีและตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ

เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ (insert) เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) โดยปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อกันประกอบไปด้วย สัดส่วนโมลาร์ vector : insert เท่ากับ 1:5 ใช้ reaction buffer ความเข้มข้น 1X, เอนไซม์ T4 DNA Ligase (Vivantis, Selangor, Malaysia) ปริมาณ 1 unit โดยปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 10 μ l ด้วยน้ำกลั่น นำไปปมที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป transform เข้าในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α (Zhiming, et al., 2005, pp. 114-120) จากนั้นคัดเลือกเอาโคลนที่มี insert โดยใช้ blue/white colony screening นำเอาโคโลนีสีขาวมาสกัด พลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III โดยปฏิกิริยามือองค์ประกอบเช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาตรวจและประมาณขนาดของ insert ด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของจีโนมแบคทีเรีย *ØABP-01*

คัดเลือกเอาโคลนที่พบว่ามีส่วนของจีโนม นำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับเบส (Applied Biosystems) โดยใช้ M13 Sequencing Primer นำลำดับเบสของชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอไปเก็บไว้ในโปรแกรม biology workbench (<http://workbench.sdsc.edu>) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาส่วนที่เป็น ORF (Open Reading Frame) โดยใช้โปรแกรม ORF Finder (Open Reading Frame Finder) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf>) จากนั้นนำแต่ละ ORF ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

การตรวจหาและการวิเคราะห์ยีนเอนโดไลซิน

นำจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *ØABP-01* มาตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยค้นหายีนเอนโดไลซินที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งใช้ยีนเอนโดไลซินจากแบคทีเรีย *phiAB2* (Gene bank accession no. HM755898.1) เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ ใช้โปรแกรม Primer3 ใน biology workbench (<http://workbench.sdsc.edu>) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้คือ EndolysinphiAB2-F 5' \rightarrow 3' GCGGATCCATGATTCTGACTAAAGACGGATTTAGTATT โดยที่ปลาย 5' สังเคราะห์ให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (ขีดเส้นใต้) และ

EndolysinphiAB2-B 5' → 3' GCGAATTCCCTATAAGCTCCGTAGAGCACGTTC โดยที่ปลาย 5' สังเคราะห์ให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ขีดเส้นใต้) ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วย reaction buffer ที่ไม่มี magnesium chloride ความเข้มข้น 1X, dNTPs ความเข้มข้น 0.25 mM, magnesium chloride ความเข้มข้น 1 mM, ไพรมเมอร์ EndolysinphiAB2-F และ EndolysinphiAB2-B ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 μ M, ดีเอ็นเอแม่แบบ ความเข้มข้น 10 ng/ μ l และ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 unit โดยในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μ l ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามตาราง 4 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ (PCR product) โดย 1% agarose gel electrophoresis ประมาณขนาดของ PCR product โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Vivantis) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตาราง 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นที่	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และเวลา
ขั้นที่ 1	1	94 °C 2 นาที
ขั้นที่ 2	35	94 °C 20 วินาที
		63 °C 20 วินาที
		72 °C 30 วินาที
ขั้นที่ 3	1	72 °C 5 นาที

เพื่อหาลำดับเบส full length-PCR product จึงทำการโคลนยีนเอนโดไลซินเข้าในดีเอ็นเอพาหะ pBluescript โดยนำทั้ง PCR product และ pBluescript มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกัน แล้วทำการ transform พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α (ตาราง 3) ด้วยวิธี heat shock (Zhiming, et al., 2005, pp. 114-120) และคัดเลือก positive clone โดยการทำให้ colony PCR ซึ่งใช้ไพรมเมอร์ EndolysinphiAB2-F และ EndolysinphiAB2-R เช่นเดียวกับการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซิน เมื่อได้ positive clone หรือโคลนที่มีพลาสมิด pBluescript-lysABP-01 นำมาหาลำดับเบส (Applied Biosystems) เพื่อวิเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีน ORF

(Open Reading Frame) โดยใช้โปรแกรม ORF Finder (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf>) วิเคราะห์ hypothetical peptide sequence โดยโปรแกรม ExPASy-Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) และวิเคราะห์หาบริเวณอนุรักษ์โดยโปรแกรม NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

การสร้างและผลิต Endolysin recombinant protein ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

1. การสร้าง endolysin recombinant protein (LysABP-01) ให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

นำพลาสมิด pBluescript-lysABP-01 มา subclone เข้าในพลาสมิด pRSETa (Invitrogen) (ตาราง 3) โดยแทรกยีนเอนโดไลซิน เข้าไปในตำแหน่ง *Bam*HI และ *Eco*RI ของพลาสมิด pRSETa จากนั้น transform (Zhiming, et al., 2005, pp. 114-120) เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α และคัดเลือก positive clone โดยการทำให้ colony PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ EndolysinphiAB2-F และ EndolysinphiAB2-R เมื่อได้ positive clone (โคลนที่มีพลาสมิด pRSET-lysABP-01) แล้วนำมาสกัดเอาพลาสมิด pRSET-lysABP-01 เพื่อ transform เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) (ตาราง 3) พร้อมทั้งคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิด pRSET-lysABP-01 โดยการทำให้ colony PCR จากนั้นนำโคลนดังกล่าวไปคัดเลือกการแสดงออกของ LysABP-01 ต่อไป

2. การคัดเลือกโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่มีการแสดงออกของ LysABP-01

เมื่อได้โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pRSET-lysABP-01 จำนวนหนึ่งแล้ว จากนั้นนำมาคัดเลือกหาโคลนที่มีการแสดงออกของ endolysin recombinant protein ขั้นตอนการคัดเลือกเริ่มจากนำโคลนต่างๆ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ซึ่งในอาหารเหลวดังกล่าวมียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 μ g/ml และ chloramphenicol 10 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 - 0.6 แล้วเก็บเซลล์ของแต่ละโคลน ปริมาตร 1 ml เพื่อใช้เป็น control (เซลล์ที่ยังไม่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน: uninduce) เซลล์ที่เหลือจะถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน โดยการเติม Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM บ่มต่อเซลล์ต่อจนครบ 4 ชั่วโมง เก็บเซลล์ปริมาตร 1 ml (เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน: induce) นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บตะกอนเซลล์และเติม sample buffer ปริมาตร

100 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวชั้นบนไปวิเคราะห์โดย 12 % SDS-PAGE และติดตามการแสดงออกของโปรตีน endolysin ของโคลนต่างๆ โดยการย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250

3. การผลิต LysABP-01 และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ nickel-charged agarose affinity column

เมื่อได้โคลนที่มีการแสดงออกของ LysABP-01 แล้วจากนั้นนำโคลนดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 50 µg/ml และ chloramphenicol เข้มข้น 10 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที โดยบ่มไว้ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นนำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 4 ml มาเติมลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 ml เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มจนกว่าเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะ log phase หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 - 0.6 จึงทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ LysABP-01 โดยการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM บ่มต่อจนครบ 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงใน centrifuge tube ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (Tris-Cl 20 mM และ NaCl 145 mM pH 7.4) ปริมาตร 20 ml จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์กลับใน binding buffer (NaCl 500 mM, Tris-Cl 20 mM และ imidazole 5 mM pH 7.9) ปริมาตร 40 ml เติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ triton-X 100 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM และ 0.1% ตามลำดับ ทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องสลายเซลล์ด้วยความถี่สูง (sonicator) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บทั้งส่วนของเหลวใส (soluble fraction) และนำตะกอนเซลล์ (insoluble fraction) มาละลายกลับใน binding buffer ปริมาตร 40 ml แล้วนำไป sonicate ซ้ำอีกรอบ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเอาเฉพาะตะกอน (โปรตีนที่มีการแสดงออกในรูป inclusion body) มาละลายใน binding buffer ที่มีส่วนผสมของยูเรีย 6 M (NaCl 500 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 5 mM และ urea 6 M pH 7.9) ปริมาตร 10 ml บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อ inclusion body ละลายแล้วนำมากรองด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 µm จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี nickel-charged agarose affinity chromatography โดยใช้ purification under denaturing condition ซึ่งทำได้โดย load ตัวอย่างลงใน nickel-charged agarose affinity column (Novagen) จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ที่มี

ส่วนผสมของยูเรีย 6 M (NaCl 500 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 5 mM และ urea 6 M pH 7.9) ปริมาตร 20 ml ตามด้วย washer buffer ที่มีส่วนผสมของยูเรีย 6 M (NaCl 500 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 60 mM และ urea 6 M pH 7.9) ปริมาตร 12 ml แล้วชะโปรตีนด้วย elution buffer (NaCl 500 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 300 mM และ urea 6 M pH 7.9) ปริมาตร 12 ml ในระหว่างการชะโปรตีนทำการเก็บแต่ละ fractions ปริมาตร 1 ml ใน microcentrifuge tube โดยนำแต่ละ fractions มาวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE แล้วนำแต่ละ fractions ที่มีโปรตีนบริสุทธิ์มารวมกันและเจือจางด้วย elution buffer ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไป refolding เพื่อแยกเอายูเรียออกไป โดยเริ่มจากการ dialyze ด้วย dialysis buffer 1 (NaCl 250 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 150 mM, urea 2 M และ DTT 1 mM pH 7.9) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย dialysis buffer 2 (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, imidazole 50 mM, urea 1 M และ DTT 1 mM pH 7.9) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย dialysis buffer 3 (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM และ DTT 1 mM pH 7.9) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สุดท้ายทำการ dialyze ด้วย storage buffer (phosphate buffered saline และ glycerol 20 %) นำโปรตีนที่ผ่านการทำ dialysis มาทำให้เข้มข้นโดยใช้ Vivaspin 500 (GE Healthcare, UK) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (Bio-Rad Laboratories Ltd, UK) และวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE จำนวน 2 เจล จากนั้นนำเจลแรกมาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และเจลแผ่นที่สองย้อมด้วยชุด Pierce 6xHis Protein Tag Stain Reagent Set (Thermo scientific, USA) โดยวิธีการย้อมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำโปรตีนที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนโดไลซินต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติของเอนโดไลซิน LysABP-01

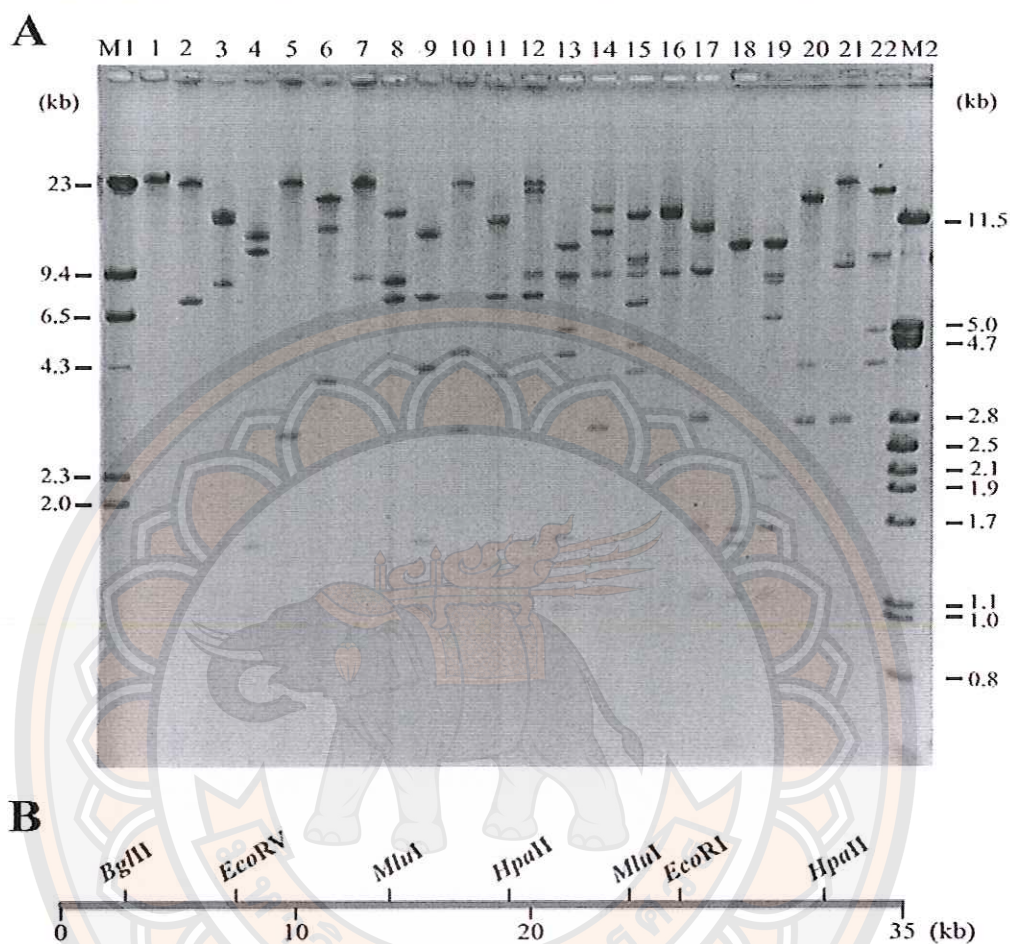
นำโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ด้วยเทคนิค plate lysis assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Donovan, et al. (2006, pp. 5108-5112) เพื่อดูความสามารถของเอนไซม์ในการย่อย substrate (ผนังเซลล์) โดยตรวจสอบจาก clear zone ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ ใช้ egg white lysozyme (EWL) (vivantis) เป็น positive control ใช้ phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) และ storage buffer เป็น negative control โดยคำนวณและเตรียมทั้งโปรตีน LysABP-01 และ EWL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 μ M จากนั้นเตรียม substrate โดยเริ่มจากการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 และสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด AB1589 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 ml จนเซลล์เจริญอยู่ในช่วง exponential growth หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4-0.6 จากนั้นเก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 25 ml ละลายตะกอนเซลล์กลับใน PBS ปริมาตร 25 ml แล้วเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วน soluble fraction ออกไป เก็บเอาเฉพาะส่วนตะกอน (crude cell wall) และนำตะกอน (autoclaved cell) ดังกล่าวไปละลายกลับใน PBS ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1 จากนั้นเติม agar ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5 % แล้วนำไปเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงบน plate เพื่อใช้เป็น substrate เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ นำ PBS, storage buffer, LysABP-01 และ EWL มาหยดลงบน plate ที่เตรียมไว้อย่างละ 10 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนและตรวจสอบ clear zone ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01

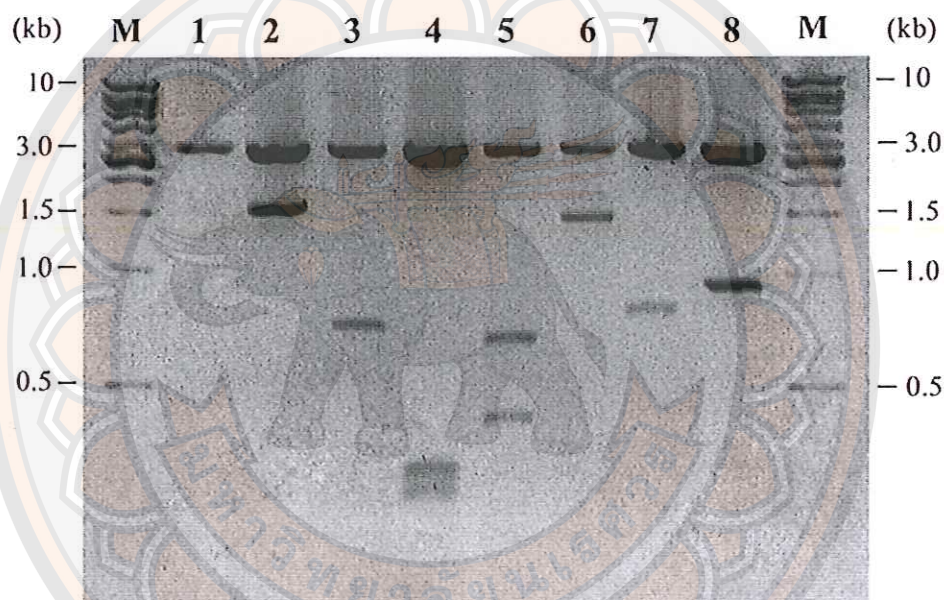
เพื่อประมาณขนาดจีโนมและสร้าง restriction map ของแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01 โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด ได้แก่ *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *HpaII*, *MluI*, *XbaI* และ *SphI* จากนั้นแยก restriction fragment โดยเทคนิค PFGE พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด จากทั้งหมด 11 ชนิด คือเอนไซม์ *BamHI*, *HindIII*, *EcoRV*, *MluI*, *SphI*, *BglII*, *HpaII* และ *EcoRI* เมื่อทำการรวมขนาดของ restriction fragment ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าจีโนมของ ØABP-01 มีขนาดประมาณ 35 kb เนื่องจากเอนไซม์ *EcoRV*, *MluI*, *SphI*, *BglII*, *HpaII* และ *EcoRI* สามารถตัดจีโนมิกดีเอ็นเอแล้วได้ restriction fragment 2 - 4 ชิ้น จึงเลือกเอาเอนไซม์ดังกล่าวมาตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวและสองชนิด (ภาพ 4A) เพื่อนำมาสร้าง restriction map ซึ่งผลที่ได้พบว่าบนจีโนมของ ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่บริเวณต่างๆ ดังในภาพ 4B



ภาพ 4 แสดงรูปแบบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction analysis): PFGE ของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทั้งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวและสองชนิด (A) และ Restriction map ของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 (B), lane1: uncut, lane2: *EcoRV*, lane3: *MluI*, lane4: *SphI*, lane5: *BglII*, lane6: *HpaII*, lane7: *EcoRI*, lane8: *EcoRV+EcoRI*, lane9: *EcoRV+SphI*, lane10: *EcoRV+BglII*, lane11: *EcoRV+HpaII*, lane12: *EcoRV+EcoRI*, lane13: *MluI+SphI*, lane14: *MluI+BglII*, lane15: *MluI+HpaII*, lane16: *MluI+EcoRI*, lane17: *SphI+BglII*, lane18: *SphI+HpaII*, lane19: *SphI+EcoRI*, lane20: *BglII+HpaII*, lane21: *BglII+EcoRI*, lane22: *HpaII+EcoRI*, laneM1: λ *HindIII* marker (vivantis) และ laneM2: λ *PstI* marker (vivantis)

การศึกษา genomic library ของแบคทีเรียโอฟาจ ϕ ABP-01

จากการสร้าง genomic library โดยนำจีโนมดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III แล้วโคลนเข้าไปในพลาสมิด pBluescript จากนั้นทำการ transform เข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5 α ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ (insert) โดยการคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการทำ blue/white colony screening และประมาณขนาดของ insert โดยการสกัดพลาสมิดแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ซึ่งผลที่ได้พบว่าโคลนที่ถูกคัดเลือกมามีขนาด insert ประมาณ 450-1,500 bp ดังที่แสดงในภาพ 5



ภาพ 5 แสดงผลการตรวจสอบหาโคลนที่มีชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ โดยตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และแยกดีเอ็นเอด้วย 1 % agarose gel electrophoresis, laneM: VC 1 kb (Vivantis), lane1: pBluescript, lane2: plasmidClone4, lane3: plasmidClone5, lane4: plasmidClone6, lane5: plasmidClone8, lane6: plasmidClone9, lane7: plasmidClone10 และ lane8: plasmidClone13

เพื่อศึกษาลำดับเบสบางส่วนในจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01 โดยนำพลาสมิดจากโคลนที่ถูกคัดเลือกไปหาลำดับเบส (Applied Biosystems) ใช้ M13 Sequencing Primer ในการหาลำดับเบส และวิเคราะห์หาส่วนที่เป็น ORF โดยใช้โปรแกรม ORF Finder ซึ่งพบ 11 incomplete ORF จากนั้นนำ incomplete ORF ทั้งหมดที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTn ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบแสดงเป็น % identity ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 93-100 % ดังที่แสดงในตาราง 5



ตาราง 5 แสดงผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 โดยโปรแกรม BLASTn

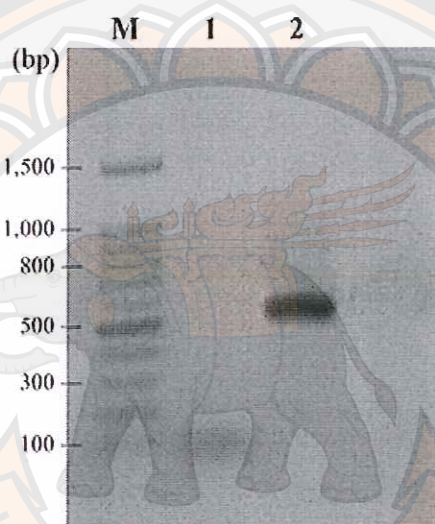
Clone name	ORF (length)	% Identity (predicted function)	Accession no.
4	- orf4-1 (1,329 bp)	- 100 % (type VI secretion protein (<i>A. baumannii</i> MDR-TJ))	- AFI96010
5	- orf5-1 (264 bp)	- 99 % (putative ATP-dependent DNA ligase (Acinetobacter phage phiAB1))	- ADQ12720
	- orf5-2 (183 bp)	- 100 % (DNA-directed DNA polymerase (Acinetobacter phage Petty))	- AGY47989.1
6	- orf6-1 (159 bp)	- 99 % (hypothetical protein (<i>A. baumannii</i> TYTH-1))	- AFU3978
	- orf6-2 (228 bp)	- 98 % (structural protein (Acinetobacter phage phiAB1))	- ADQ12734
8	- orf8-1 (804 bp)	- 98 % (putative DNA helicase (Acinetobacter phage phiAB1))	- ADQ12719
	- orf8-2 (165 bp)	- 99 % (putative ATP-dependent DNA ligase (Acinetobacter phage phiAB1))	- ADQ12720

ตาราง 5 (ต่อ)

Clone name	ORF (length)	% Identity (predicted function)	Accession no.
9	- orf9-1 (351 bp)	- 98 % (hypothetical protein (Acinetobacter phage Abp1))	- AFV51020
	- orf9-2 (687 bp)	- 99 % (hypothetical protein (Acinetobacter phage Abp1))	- AFV51020
10	- orf10-1 (759 bp)	- 97 % (putative internal virion protein (Acinetobacter phage Abp1))	- AFV51021
13	- orf13-1 (891 bp)	- 93 % (putative head-tail connector protein (Acinetobacter phage AB3))	- AGC35314

การตรวจหาและการวิเคราะห์ยีนเอนโดไลซิน

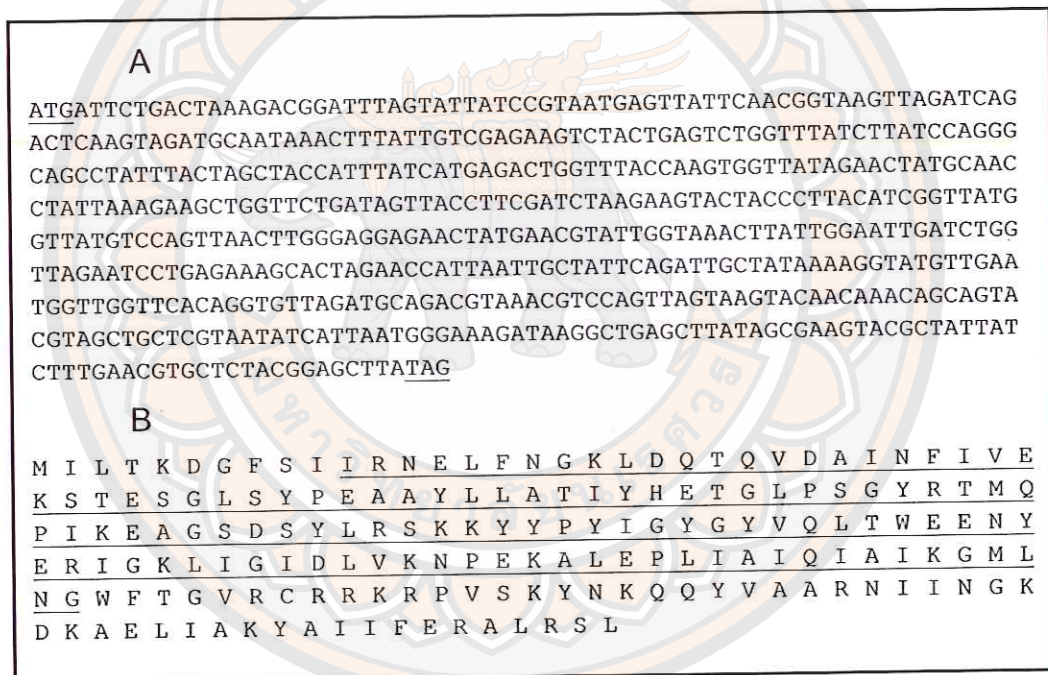
จากการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินในจีโนมิกดีเอ็นเอแบคทีเรียของ *ØABP-01* โดยใช้ไพรเมอร์ EndolysinphiAB2-F และ EndolysinphiAB2-B ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR พบว่ามี PCR product (*lysABP-01*) มีขนาดประมาณ 558 bp (ภาพ 6) ซึ่งมีขนาดตรงกับ full-length ORF ของยีนเอนโดไลซินจากแบคทีเรีย *phiAB2* (GenBank accession no. HM755898.1)



ภาพ 6 แสดง PCR product จากการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินในจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *ØABP-01* ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, laneM: 100 bp leader (Vivantis), lane1: Negative control (น้ำกลั่น) และ lane2: PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *ØABP-01* เป็นแม่แบบ

เพื่อศึกษาลำดับเบสของ *lysABP-01* โดยนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI (*Bam*HI/*Eco*RI-digested *lysABP-01*) ทำการโคลนเข้าไปในพลาสมิด *Bam*HI/*Eco*RI-digested pBluescript ทำการ transform เข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5 α ตรวจสอบหาโคลนที่มีพลาสมิด pBluescript-*lysABP-01* โดยการคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการทำ blue/white colony screening และทำ colony PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซิน เมื่อนำพลาสมิด pBluescript-*lysABP-01* ไปหาลำดับเบส (Applied Biosystems) โดยใช้ M13 Sequencing Primer พบว่ายีน *lysABP-01* มีขนาด 558 bp เมื่อนำไป

วิเคราะห์โดยโปรแกรม ORF Finder (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf>) พบว่ามีบริเวณ open reading frame เท่ากับ 558 bp แปลรหัสได้เป็นโพลีเปปไทด์ 185 กรดอะมิโน (ภาพ 7) จากนั้นนำลำดับเบสทั้ง ORF ไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank Database (KF548002) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI database โดยโปรแกรม BLASTn พบว่ามี % identity กับยีนเอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ Abp1, phiAB2, phiAB1 และ AB3 เท่ากับ 94, 94, 94 และ 93% ตามลำดับ เมื่อนำสายโพลีเปปไทด์ดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม ExPASy-Compute pI/Mw tool พบว่าเอนโดไลซินมีมวลโมเลกุลจากการทำนาย 21.14 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 9.42 และเมื่อวิเคราะห์โดยโปรแกรม NCBI Conserved Domain Search พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ lysozyme like domain ตามที่ขีดเส้นใต้ใน ภาพ 7B



ภาพ 7 แสดงผลของการวิเคราะห์ยีนเอนโดไลซิน (*lysABP-01*) ของแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01, ลำดับเบส ORF ของยีน *lysABP-01* รวมถึง start codon และ stop codon (ขีดเส้นใต้) จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม ORF Finder (A), และลำดับกรดอะมิโน (hypothetical peptide sequence) ของเอนโดไลซินจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม ExPASy-Compute pI/Mw tool และแสดงบริเวณอนุรักษ์ lysozyme like domain (ขีดเส้นใต้) (B)

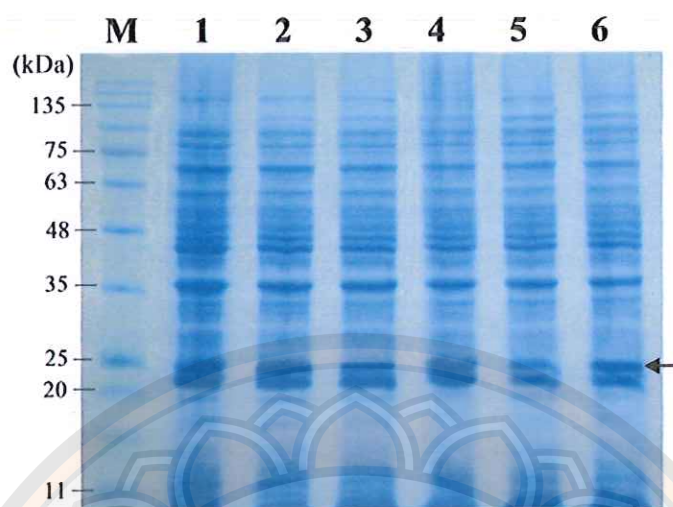
การสร้างและผลิต endolysin recombinant protein ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

1. การสร้าง endolysin recombinant protein (LysABP-01) ให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์ LysABP-01 ให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS โดยใช้พลาสมิด pBluescript-lysABP-01 ซึ่งมีการยืนยันลำดับเบสจาก sequencing และถูกตรวจสอบ ORF แล้ว นำมา subclone เข้าในพลาสมิด pRSETa (Invitrogen) แล้วจึง transform เข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5 α ตรวจสอบหาโคลนที่มี พลาสมิด pRSETa-lysABP-01 เพื่อนำมา transform เข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) ซึ่งใช้เซลล์ดังกล่าวเป็น expression strain ตรวจสอบหาโคลนที่ได้รับพลาสมิด pRSETa-lysABP-01 โดยการทำให้ colony PCR และการสกัดพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ EcoRI

2. การคัดเลือกโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่มีการแสดงออกของ LysABP-01

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 มาคัดเลือกหาโคลนที่มีการแสดงออกของ LysABP-01 โดยการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียโคลนต่างๆ ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 μ g/ml และ chloramphenicol 10 μ g/ml จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 – 0.6 ทำการเก็บเซลล์เพื่อใช้เป็น control (uninduced) จากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการแสดงออกโปรตีน โดยการเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM และบ่มต่อเซลล์ต่อจนครบ 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำ (induced) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE ผลจากการคัดเลือกพบว่าโปรตีน LysABP-01 มีการแสดงออกในแบคทีเรียโคลนต่างๆ หลังการเหนี่ยวนำ และแถบโปรตีนมีขนาดประมาณ 25 kDa ดังแสดงในภาพ 8

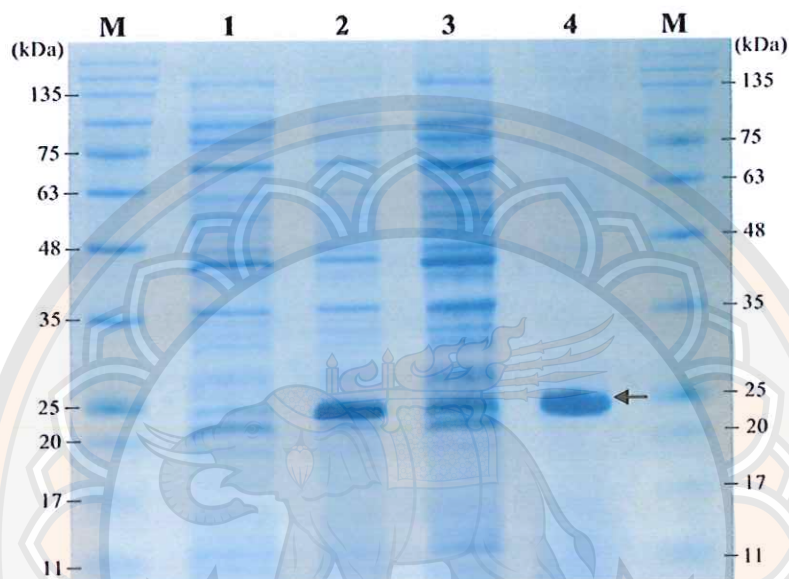


ภาพ 8 แสดงผลการคัดเลือกโคลนแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของโปรตีน LysABP-01 โดยใช้ 12 % SDS-PAGE, laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone1 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane3: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone2 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane4: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone2 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane5: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone3 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced) และ lane6: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 clone3 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced)

3. การผลิต LysABP-01 และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ nickel-charged agarose affinity column

นำโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน LysABP-01 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกโปรตีนเช่นเดียวกับขั้นตอนในการคัดเลือก โดยเลี้ยงในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเพื่อนำมาทำให้เซลล์แตก โดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวใส (soluble fraction) และตะกอนเซลล์ (insoluble fraction) มาวิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE ซึ่งพบโปรตีน LysABP-01 ในส่วนของ insoluble fraction แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกในรูปแบบ inclusion body

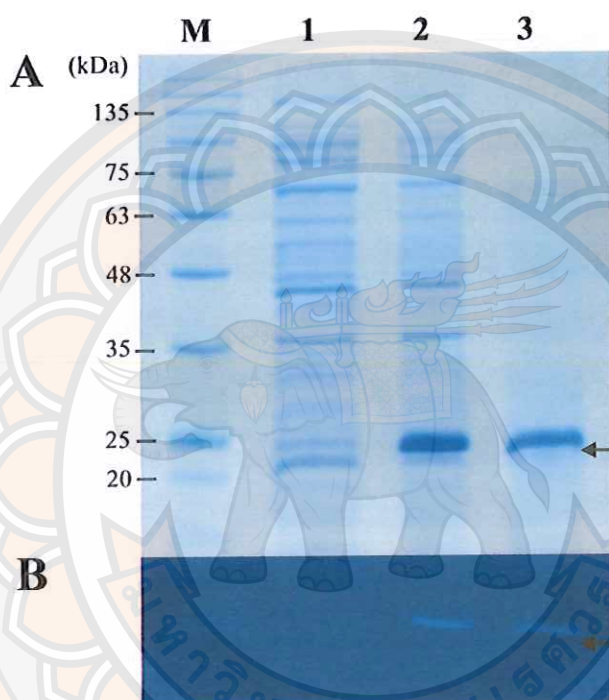
จากนั้นนำไป denature โดยใช้ยูเรีย เมื่อโปรตีนละลายในยูเรียแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี nickel-charged agarose affinity chromatography (Novagen) แล้วนำโปรตีนบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE แถบโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 มีขนาดประมาณ 25 kDa ดังแสดงในภาพ 9



ภาพ 9 แสดงผลการผลิตและวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 ด้วย 12 % SDS-PAGE laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), lane3: ส่วนที่เป็นของเหลวจากการทำให้เซลล์แตก (soluble fraction) และ lane4: LysABP-01 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี nickel-affinity chromatography

นำโปรตีน LysABP-01 ที่ผ่านคอลัมน์ affinity chromatography ไป refolding ด้วยวิธีการ dialysis เพื่อให้ยูเรียค่อยๆ แพร่ออกจาก dialysis membrane ที่ละนิด โดยใช้ dialysis buffer 1, dialysis buffer 2 และ dialysis buffer 3 ซึ่งบัฟเฟอร์มีส่วนผสมของยูเรียเข้มข้น 2 M, 1 M และ 0 M ตามลำดับ สุดท้ายนำไป dialyze ด้วย storage buffer และนำโปรตีนที่ผ่านการ refolding มาทำให้เข้มข้นโดยใช้ Vivaspin 500 (GE Healthcare, UK) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (Bio-Rad Laboratories Ltd, UK) และวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนด้วยเทคนิค 12 % SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 พบว่าโปรตีน LysABP-01

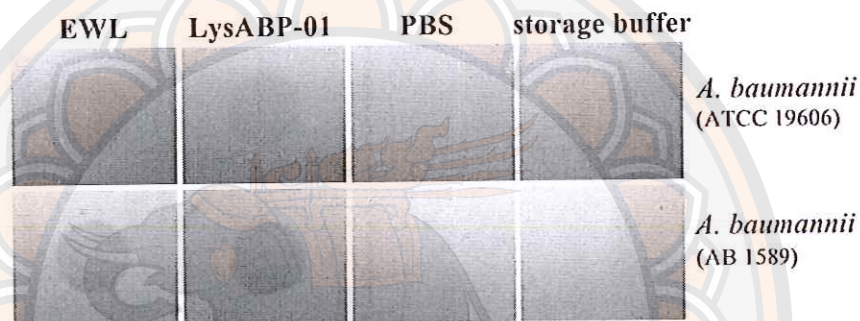
มีขนาดประมาณ 25 kDa ดังแสดงในภาพ 10A และเพื่อตรวจสอบส่วน 6xHistidine-tag ของโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 โดยการนำเจลที่แยกด้วย 12 % SDS-PAGE มาย้อมสีด้วยชุด Pierce 6xHis Protein Tag Stain Reagent Set (Thermo scientific, USA) จากนั้นนำเจลดังกล่าวไปตรวจสอบแถบโปรตีนภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งพบว่าแถบโปรตีน LysABP-01 สามารถย้อมติดสีและเรืองแสงดังแสดงในภาพ 10B



ภาพ 10 แสดงผลการวิเคราะห์และตรวจสอบ 6xHistidine-tag ของโปรตีน LysABP-01, การแยกโปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (A) และการตรวจสอบ 6xHistidine-tag โดยการย้อมด้วย Pierce 6xHis Protein Tag Stain Reagent Set (Thermo scientific, USA) (B), laneM: BLUeye Prestained Protein Ladder (GeneDirect), lane1: *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (uninduced), lane2 *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-lysABP-01 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (induced), และ lane3: LysABP-01 ที่ผ่านการ refolding และทำให้เข้มข้น

การศึกษาคุณสมบัติของเอนโดไลซิน LysABP-01

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ด้วยเทคนิค plate lysis assay โดยการนำโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 มา spot ลงบน autoclaved cell พบว่าโปรตีนเอนโดไลซินที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ ปริมาตร $10 \mu\text{l}$ สามารถย่อย autoclaved cell ที่ถูกตรึงในวุ้น 1.5% เกิดเป็น clear zone เมื่อเปรียบเทียบกับ egg white lysozyme (EWL) ซึ่งใช้เป็น positive control ดังแสดงในภาพ 11 โดยโปรตีนบริสุทธิ์ LysABP-01 สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้กับ autoclaved cell ที่เตรียมมาจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด AB 1589



ภาพ 11 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค plate lysis assay โดยนำ egg white lysozyme (EWL) เข้มข้น $10 \mu\text{M}$, โปรตีน LysABP-01 เข้มข้น $10 \mu\text{M}$, PBS และ storage buffer อย่างละ $10 \mu\text{l}$ มาทดสอบบน autoclaved cell ที่เตรียมมาจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ ATCC 19606 และ AB 1589

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 จากการศึกษา restriction analysis และสร้าง restriction map พบว่าจีโนมดีเอ็นเอของ ϕ ABP-01 ถูกตัดได้ด้วย เอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I และ *Sph*I จีโนมของ ϕ ABP-01 มีขนาดประมาณ 35 kb จากนั้นสร้าง genomic library เพื่อศึกษาลำดับเบสบางส่วนของจีโนม พบว่าเมื่อนำลำดับเบสของ insert จาก 7 โคลนมาวิเคราะห์หาส่วนที่เป็น ORF โดยใช้โปรแกรม ORF Finder พบ 11 incomplete ORF จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลโดยใช้ โปรแกรม BLASTn พบว่ามีความคล้ายกับ ORF ของ *Acinetobacter* phage สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Acinetobacter* phage ϕ AB1, *Acinetobacter* phage ϕ Abp1 และ *Acinetobacter* phage ϕ AB3 เป็นต้น โดยแต่ละ ORF แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มี predicted function เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication/recombination และ structural/morphogenesis แต่ไม่พบ lysis system เพราะฉะนั้นจึงใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบหายีนเอนโดไลซิน และพบยีนดังกล่าวในจีโนมของ แบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 เมื่อนำมาหาลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ายีนเอนโดไลซิน ของ ϕ ABP-01 (*lys*ABP-01) มีขนาด 558 bp แปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลจากการทำนาย 21.14 กิโลดาลตัน (185 กรดอะมิโน) มีบริเวณอนุรักษ์ lysozyme like domain จากนั้นผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน (*Lys*ABP-01) แล้วทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค 12% SDS-PAGE พบแถบโปรตีน *Lys*ABP-01 มีขนาดประมาณ 25 kDa และจากการศึกษา คุณสมบัติของ *Lys*ABP-01 พบว่าสามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ autoclaved cell ของแบคทีเรีย *A. baumannii* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด AB 1589

อภิปรายผล

จากการศึกษาของ Kitti, et al. (2014, pp. 383-388) ได้ทำการแยกแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* (AB 1589) จากบ่อน้ำบาดน้ำเสียในประเทศไทย และศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าแบคทีเรียโอฟาจสายพันธุ์ ϕ ABP-01 มีโครงสร้างส่วนหัวเป็นทรงหกเหลี่ยม (icosahedral head) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 nm มีหางสั้น (short tail) ขนาด 9 nm มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Podoviridae* และที่สำคัญ ϕ ABP-01 มีคุณสมบัติในการติดเชื้อ *A. baumannii* กว้างและมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียโฮสต์ได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียโอฟาจสายพันธุ์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบเฟจบำบัด ทั้งการนำอนุภาคและ lytic enzyme ของแบคทีเรียโอฟาจมาใช้ในการควบคุมรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* และเนื่องจาก ϕ ABP-01 เป็นแบคทีเรียโอฟาจสายพันธุ์ใหม่ที่มีการแยกและศึกษาเฉพาะคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ยังขาดข้อมูลทางด้านอณูชีววิทยา เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคทีเรียโอฟาจสายพันธุ์ ϕ ABP-01 จากการศึกษา restriction analysis การสร้าง restriction mapping ศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมโดยการสร้าง genomic library รวมถึงการตรวจสอบหายีนเอนโดไลซินและนำมาผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

การศึกษา restriction analysis ของจีโนมดีเอ็นเอ ϕ ABP-01 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ พบรูปแบบของ restriction fragment ที่แตกต่างกันไป โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด ได้แก่ *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *HpaI*, *MluI*, *XbaI* และ *SphI* ในการตัดจีโนมดีเอ็นเอ จากนั้นแยก restriction fragment โดยเทคนิค PFGE พบว่าจีโนมดีเอ็นเอของ ϕ ABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิดคือ *BamHI*, *HindIII*, *EcoRV*, *MluI*, *SphI*, *BglII*, *HpaI* และ *EcoRI* โดยเอนไซม์ *HindIII* สามารถตัดแล้วได้จำนวน restriction fragment มากกว่า 10 ชิ้น ส่วนเอนไซม์ *EcoRV*, *MluI*, *BglII*, *HpaI* และ *EcoRI* สามารถตัดแล้วได้ restriction fragment ประมาณ 2, 3, 2, 3 และ 2 ชิ้นตามลำดับ เพราะฉะนั้นจึงเลือกเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดมาใช้ในการสร้าง restriction mapping โดยการนำจีโนมดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวและสองชนิดพร้อมกัน เมื่อเปรียบเทียบโดยนำแบคทีเรียโอฟาจในวงศ์ *Podoviridae* อื่นๆ ที่มีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมและเก็บลำดับเบสไว้ในฐานข้อมูล NCBI database ได้แก่ Abp1 (JX658790), phiAB1(HQ186308) และ AB3 (KC311669) โดยการนำลำดับเบสทั้งจีโนมมาศึกษารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด ด้วยโปรแกรม TACG Analyze a NS for Restriction Enzyme Sites (<http://workbench.sdsc.edu>)

พบรูปแบบของ restriction fragment ที่แตกต่างกันทั้งในเชิงจำนวนและขนาดของ restriction fragment แสดงให้เห็นว่าแบคทีริโอเฟจในวงศ์ *Podoviridae* จากการศึกษาอื่นๆที่มีการรายงาน มีความแตกต่างและเป็นคนละสายพันธุ์กับ ØABP-01 เมื่อรวมขนาดของ restriction fragment ทำให้สามารถประมาณขนาดของจีโนม ØABP-01 ได้เท่ากับ 35 kb ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาอื่นๆ ที่มีการรายงานว่าขนาดจีโนมของแบคทีริโอเฟจในวงศ์ *Podoviridae* เช่นแบคทีริโอเฟจ AB3, vB_AbaP_Acibel007 และ BØ-B1251 มีขนาดเท่ากับ 31, 42 และ 45 kb ตามลำดับ (Jeon, et al., 2012, pp. 12437-12438; Jie and Yong-ai, 2012, pp. 589-593; Merabishvili, et al., 2014)

ผลจากการศึกษา restriction analysis พบว่าเอนไซม์ *HindIII* สามารถตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วได้จำนวน restriction fragment มากกว่า 10 ชิ้นและมีขนาดที่เหมาะสม ที่สามารถเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBluescript จึงเลือกใช้เอนไซม์ *HindIII* ในการสร้าง genomic library เมื่อเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอ (insert) เข้ากับเวกเตอร์ คัดเลือกโคลน และประมาณขนาดของ insert โดยการสกัดพลาสมิดจากโคลนต่างๆ แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ซึ่งพบว่าโคลนที่ถูกเลือก 7 โคลนมีขนาดของ insert โดยประมาณ 500-1,500 bp จากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวไปหาลำดับเบส โดยใช้ M13 Sequencing Primer พบว่า insert จากโคลนต่างๆ มีขนาดตั้งแต่ 473-1,641 bp (ตาราง 6) ซึ่งสัมพันธ์กับการประมาณขนาดของ insert จากการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และยังพบว่าใน Clone 8 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 400 และ 650 bp ซึ่งสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยพบว่า insert ของโคลนดังกล่าวมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *HindIII* อยู่ช่วงกลาง จึงทำให้เมื่อตรวจสอบจากการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* พบว่ามีดีเอ็นเออยู่ 2 แถบ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอ เกิดการตัดของเอนไซม์ *HindIII* อย่างไม่สมบูรณ์ทำให้ insert ใน Clone 8 และ Clone 6 มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *HindIII* อยู่ช่วงกลาง เมื่อนำลำดับเบสจาก insert ทั้ง 7 โคลนมาวิเคราะห์โดยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์พบ 11 incomplete ORF จากนั้นเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI database พบว่ามีความคล้ายกับลำดับเบสของแบคทีริโอเฟจสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Acinetobacter* phage phiAB1, *Acinetobacter* phage Abp1 และ *Acinetobacter* phage AB3 เป็นต้น โดยแต่ละ ORF แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มี predicted function เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication/recombination เช่น DNA polymerase (orf5-2), DNA helicase (orf8-1) และ DNA ligase (orf5-1) นอกจากนี้ยังพบว่ามี ORF ที่มี predicted function เกี่ยวข้องกับกระบวนการ structural/morphogenesis เช่น structural protein (orf6-2), head-tail connector protein

(orf13-1), internal virion protein (orf10-1) และ type VI secretion protein (orf4-1) เป็นต้น จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ insert ใน clone8 พบว่ามี 2 incomplete ORF ซึ่งมี predicted function เป็นโปรตีน helicase และ ligase ซึ่งยีนทั้งสองมีส่วนที่ซ้อนทับกัน (overlapping gene) อยู่ 4 bp โดยสัมพันธ์กับจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ Abp1 (JX658790), phiAB1 (HQ186308) และ petty (NC_023570) แบคทีเรียโอเฟจทั้งสามสายพันธุ์มี ORF ของโปรตีน helicase และ ligase ที่ซ้อนทับกันอยู่ 4, 4 และ 23 bp ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเป็นการปรับตัวของไวรัสที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอและมีจีโนมขนาดเล็ก เพื่อให้มีการแปลรหัสได้โปรตีนที่หลากหลายและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Chirico, et al., 2010, pp. 3809-3817) ซึ่งสามารถพบได้ในไวรัสทั่วไปรวมถึงในแบคทีเรียโอเฟจ นอกจากนี้ยังพบว่า clone4 มี ORF มีลำดับเบสที่คล้ายกับ type VI secretion protein ของเชื้อ *A. baumannii* MDR-TJ โดยการเปรียบเทียบโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนใน type VI secretion system (T6SS) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของหางแบคทีเรียโอเฟจ (Leiman, et al., 2009, pp. 4154-4159) ทั้งในเชิงโครงสร้างและหน้าที่ (analogous) โดยแบคทีเรียโอเฟจจะใช้ส่วนหางในการเจาะเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ ส่วนแบคทีเรียจะใช้ T6SS ในการหลั่งสารพิษโมเลกุลออกนอกเซลล์

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสใน genomic library ของจีโนม ØABP-01 พบว่าแต่ละ ORF มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication/recombination และ structural/morphogenesis แต่ไม่พบ ORF ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ lysis system แต่มีการศึกษาอื่นๆ รายงานว่าแบคทีเรียโอเฟจที่มีจีโนมแบบ ds DNA รวมถึงแบคทีเรียโอเฟจในวงศ์ *Podoviridae* ใช้โปรตีน endolysin ในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์ (Young, et al., 2000, pp. 120-128) เพราะฉะนั้นแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01 ก็น่าจะมียีนเอนโดไลซินอยู่ในจีโนม จึงใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบหายีนดังกล่าว โดยการสืบค้นหายีนดังกล่าวที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI database โดยเลือกยีนเอนโดไลซินจากแบคทีเรียโอเฟจ phiAB2 (HM755898.1) เนื่องจากจัดอยู่ในวงศ์เดียวกันและมีสรีรวิทยาที่คล้ายกัน จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบยีนลำดับเบส และวิเคราะห์ลำดับเบส ผลที่ได้พบว่ายีนเอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ ØABP-01 (*lysABP-01*; KF548002) มีขนาด 558 bp เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLASTn พบค่า % identity กับยีนเอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ Abp1, phiAB2, phiAB1 และ AB3 มากกว่า 90% แสดงให้เห็นว่าเอนโดไลซินเป็นยีนที่มีความจำเป็นต่อและพบการอนุรักษ์ในแบคทีเรียโอเฟจ ถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียโอเฟจคนละสายพันธุ์ก็สามารถตรวจพบและมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์โดยโปรแกรม Expasy-Compute

pI/Mw tool พบว่า *lysABP-01* มีมวลโมเลกุลจากการทำนาย 21.14 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 9.42 ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดเอนโดไลซินของ *Acinetobacter* phage ที่มีการรายงานขนาดจากการทำนาย ตั้งแต่ 18.54-21.55 kDa (Merabishvili, et al., 2014; Peng, et al., 2014) เพื่อศึกษาหน้าที่และคุณสมบัติของเอนโดไลซิน *lysABP-01* โดยใช้โปรแกรม NCBI Conserved Domain Search พบบริเวณอนุรักษ์คือ lysozyme like domain ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม enzyme catalytic domain (ECD) โดยบริเวณดังกล่าวทำหน้าที่เช่นเดียวกับ egg white lysozyme (EWL) คือตัดพันธะ β -1,4-glycosidic bond ระหว่างน้ำตาล *N*-acetyl muramic acid และ *N*-acetyl glucosamine บนโครงสร้างผนังเซลล์ (peptidoglycan) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ อาจจะมีหรือไม่มีบริเวณ cell wall binding domain (CBD) ก็ได้ แต่จะต้องมี ECD อย่างน้อยหนึ่งโดเมน รวมถึงเอนโดไลซินของ *Acinetobacter* phage ที่พบว่ามีเพียงหนึ่งโดเมนคือ lysozyme like domain เช่นเอนโดไลซินของ Abp1, phiAB2, phiAB1 และ AB3 เป็นต้น มีเพียงแค่การศึกษาของ Jeon, et al. (2012, pp. 12437-12438) ที่รายงานว่าเอนโดไลซินของแบคทีเรียโอเฟจ BØ-B1251 (JX403940) มีทั้งโดเมน CBD และ ECD ซึ่งโดเมน ECD คือ lysozyme like domain แสดงให้เห็นว่าโดเมนดังกล่าวมีความสำคัญและมีการอนุรักษ์ในแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii*

จากการวิเคราะห์ในระดับ *in silico* ทำให้ทราบว่า *lysABP-01* มีบริเวณอนุรักษ์คือ lysozyme like domain สามารถย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียได้ เพื่อเป็นการทดสอบและยืนยันคุณสมบัติดังกล่าว จึงทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน (*LysABP-01*) ทำให้บริสุทธิ์และนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในระดับ *in vitro* โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนในการศึกษานี้เลือกใช้พลาสมิด pRSETa ซึ่งควบคุมการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายภายใต้การทำงานของ T7 promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21 (DE3) จากการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* BL21 ที่มี pRSETa-*lysABP-01* มากกระตุ้นโดยใช้ IPTG พบว่าโปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเห็นได้จากแถบโปรตีนที่เข้มขึ้น ขนาดประมาณ 25 kDa เทียบกับแถบโปรตีนของกลุ่ม uninduced (ภาพ 8) ซึ่งขนาดของเอนโดไลซินจากการทำนายคือ 21.14 kDa เมื่อนำมาสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีส่วนปลายเป็น 6 x Histidine จากเวคเตอร์ pRSETa (ขนาดประมาณ 4 kDa) จึงทำให้ตรวจพบโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 25 kDa เมื่อนำเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นมาทำให้เซลล์แตกและปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนที่เป็น soluble fraction และ insoluble fraction มาทำการวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE พบแถบโปรตีน *LysABP-01* ในส่วนของ insoluble fraction แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเป้าหมายมีการแสดงออกในรูป inclusion body ซึ่งโดยส่วนมาก

เมื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนในระดับสูงและโปรตีนนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเป็นผลให้โปรตีนเป้าหมายเกิดการเกาะกลุ่มและรวมตัวเป็น inclusion body (Kane and Hartley, 1988, pp. 95-101; Fahnert, et al., 2004, pp. 93-142) ซึ่งโปรตีนที่อยู่ในรูปร่างดังกล่าวจะไม่สามารถละลายน้ำได้และไม่มี biological activity จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการ solubilization และ refolding เพื่อให้โปรตีนอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และมี biological activity (Vallejo and Rinas, 2004) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HydH5 และ K11 lysozyme ซึ่งเป็น lytic enzyme ของแบคทีเรียโอเฟจ vB_SauS-phiPLA88 และ K11 ตามลำดับ มีการแสดงออกในรูป inclusion body (Junn, et al., 2005, pp. 78-84; Rodríguez, et al., 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยูเรียในการ solubilize ตะกอน inclusion body ให้สามารถละลายน้ำได้ จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีน LysABP-01 โดยใช้เทคนิค nickel-charged agarose affinity chromatography และทำการ refolding เพื่อกำจัดยูเรียออกไปโดยการทำให้ dialyze ด้วย dialysis ที่ค่อยๆ ลดความเข้มข้นของยูเรีย เพื่อยูเรียค่อยๆ แพร่ผ่าน dialysis membrane สุดท้าย dialyze ด้วย storage buffer ซึ่งมีส่วนผสมของกลีเซอรอล ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพเอนไซม์ไว้ได้และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนโดไลซิน

เนื่องจากเอนโดไลซินจัดเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ (substrate) จึงนำโปรตีน LysABP-01 มาศึกษาความสามารถในการย่อย substrate ด้วยเทคนิค plate lysis assay (Donovan, et al., 2006, pp. 5108-5112) โดยการเตรียม autoclaved cell (crude cell wall) และตรึงในวุ้น 1.5 % จากนั้นหยดโปรตีนที่ต้องการทดสอบลงไป เนื่องจากว่าเอนโดไลซินมีบริเวณอนุรักษ์คือ lysozyme like domain การศึกษาครั้งนี้จึงใช้ EWL เป็น positive control และมี PBS และ storage buffer เป็น negative control เพื่อเปรียบเทียบโปรตีน LysABP-01 กับ EWL จึงจำเป็นต้องเตรียมโปรตีนมีความเข้มข้นในหน่วย 10 μ M เพราะว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีมวลโมเลกุลที่ต่างกัน ผลที่ได้พบว่าโปรตีน LysABP-01 สามารถย่อย substrate เกิดเป็น clear zone ชัดเจนเช่นเดียวกับโปรตีน EWL และสามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้กับ autoclaved cell ที่เตรียมมาจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19606 และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด AB 1589 โดยในปัจจุบันมีเพียงการศึกษาของ Lai, et al. (2011, pp. 529-539) ที่ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ phiAB2 แล้วนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค zymogram โดยการเตรียมผนังเซลล์จากแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *S. aureus* แล้วนำมาตรึงใน polyacrylamide gel เมื่อแยกโปรตีนแล้วบ่มโปรตีนเพื่อให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าที่แถบโปรตีนเอนโดไลซิน

สามารถย่อยผนังเซลล์ของทั้ง *A. baumannii* และ *S. aureus* เกิดเป็น clear band แสดงให้เห็นว่า โปรตีนเอนโดไลซินสามารถย่อยผนังเซลล์ของแกรมบวกและแกรมลบได้

ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติทางอนุชีววิทยา โดยการสร้าง restriction map และการหาลำดับเบสบางส่วนจาก genomic library สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจ ϕ ABP-01 เพื่อจะได้ตรวจสอบและวิเคราะห์หายีนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ lysis system โดยในการศึกษานี้ได้ตรวจพบยีนเอนโดไลซินในจีโนมของ ϕ ABP-01 ด้วยเทคนิค PCR เมื่อนำมาสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินพบว่าสามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ autoclaved cell เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เช่นความสามารถในการฆ่า viable cell หรือความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (growth inhibition activity) แต่เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane เป็นโครงสร้างที่ป้องกันไม่ให้เอนโดไลซินย่อยผนังเซลล์ จึงต้องมีการทดสอบเอนโดไลซินร่วมกับสารที่มีคุณสมบัติเป็น outer membrane permeable เช่น EDTA และสารลดแรงตึงผิว รวมถึงยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาหาสารที่จะทำให้เกิด synergistic effect ต่อเซลล์แบคทีเรีย MDR-AB และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคตได้



บรรณานุกรม

- นริศรา บุญเกิด. (2550). การดื้อยา carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa*. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- ฟีไลพันธ์ พุทธิวัฒน์. (2540). Bacteriophages. ใน ฟีไลพันธ์ พุทธิวัฒน์ (บรรณาธิการ), *ไวรัสวิทยา* (หน้า 27.1-27.13). กรุงเทพฯ: อักษรสมัย.
- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of Virology*, 146(5), 843-857.
- Ackermann, H. W. (2004). Bacteriophage classification. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: Biology and applications* (pp. 68-81). USA: CRC Press.
- Becker, S.C., Foster-Frey, J. and Donovan, D.M. (2008). The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiology Letters*, 287(2), 185-191.
- Bernhardt, T.G., Struck, D.K. and Young, R. (2001). The lysis protein E of phiX174 is a specific inhibitor of the *MraY*-catalyzed step in peptidoglycan synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6093-6097.
- Bernhardt, T.G., Wang, I.N., Struck, D.K. and Young, R. (2001). A protein antibiotic in the phage Q β virion: diversity in lysis targets. *Science*, 292(5525), 2326-2329.
- Bigot, B., Lee, W.J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J.A., Billington, C., et al. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiology*, 28(8), 1448-1452.
- Bonomo, R.A. and Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2), 49-56.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., et al. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48 (1), 1-12.

- Bouvet, P.J.M. and Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., *Acinetobacter junii* sp. nov. & emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(2), 228-240.
- Brauers, J., Frank, U., Kresken, M., Rodloff, A.C. and Seifert, H. (2005). Activities of various beta-lactam and beta-lactam/ beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(1), 24-30.
- Carey, R.B., Banerjee, S.N. and Srinivasan, A. (2006). Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections, 1995-2004. In the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco: USA.
- Carruthers, M.D., Nicholson, P.A., Tracy, E.N. and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE*, 8(3), e59388.
- Chaiwarith, R., Mahatthanphak, S., Boonchoo, M., Supparatpinyo, K. and Sirisanthana, T. (2005). Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, 22(1), 1-8.
- Chang, K.C., Lin, N.T., Hu, A., Lin, Y.S., Chen, L.K. and Lai, M.J. (2011). Genomic analysis of bacteriophage ØAB1, a ØKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, 97(4), 249-255.
- Chirico, N., Vianelli, A. and Belshaw, R. (2010). Why genes overlap in viruses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1701), 3809-3817.
- Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H., et al. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1127-1138.

- Choi, C.H., Lee, J.S., Lee, Y.C., Park, T.I. and Lee, J.C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology*, 8, e216.
- Donovan, D.M., Foster-Frey, J., Dong, S., Rousseau, G.M., Moineau, S. and Pritchard, .G. (2006). The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 endolysin relies on the cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5108-5112.
- Ellis, T.N. and Kuehn, M.J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81-94.
- Entenza, J.M., Loeffler, J.M., Grandgirard, D., Fischetti, V. A. and Moreillon, P. (2005). Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4789-4792.
- Fahnert, B., Lile, H. and Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: Formation and utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 89, e93-142.
- Falagas, M.E. and Kasiakou, S.K. (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infection. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1333-1341.
- Fournier, P.E. and Richet, H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 692-699.
- Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., Lopez-Rojas, R., Pachon, J. and Actis, L.A. (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars and mice. *Infection and Immunity*, 80(3), 1015-1024.

- Garcia, E., Garcia J.L., Garcia, P., Arraras, A., Sanchez-Puelles, J.M., López, R., et al. (1988). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 914-918.
- Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S. and Opferkuch, W. (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy*, 37(6), 405-412.
- Gordon, N.C. and Wareham, D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219-226.
- Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. (2004). Basic phage biology. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: Biology and applications* (pp. 29-46). USA: CRC Press.
- Hagens, S. and Loessner, M.J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 513-519.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: An appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118-128.
- Ho, P.L., Ho, A.Y., Chow, K.H. and Chang, V.C. (2010). Surveillance for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A lesson on definitions. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), 469-471.
- Horgan, M., O'Flynn, G., Garry, J., Cooney, J., Coffey, A., Fitzgerald, G.F., et al. (2009). Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 872-874.

- Huang, G., Le, S., Peng, Y., Zhao, Y., Yin, S., Zhang, L., et al. (2013). Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current Microbiology*, 66 (6), 535-543.
- Jacobs, A.C., Hood, I., Boyd, K.L., Olson, P.D., Morrison, J.M., Carson, S., et al. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 1952-1962.
- Jeon, J., Kim, J.W., Yong, D., Lee, K. and Chong, Y. (2012). Complete genome sequence of the podoviral bacteriophage YMC/09/02/B1251 ABA BP, which causes the lysis of an OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from a septic patient. *Journal of Virology*, 86(22), 12437-12438.
- Jie, Z. and Yong-ai, L. (2012). Isolation and biological characteristics of phages of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Shanghai jiao tong da xue xue bao Yi xue ban*, 32(5), 589-593.
- Junn, H.J., Youn, J., Suh, K.H. and Lee, S.S. (2005). Cloning and expression of Klebsiella phage K11 lysozyme gene. *Protein Expression and Purification*, 42(1), 78-84.
- Kane, J.F. and Hartley, D.L. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 6(5), 95-101.
- Keerasuntonpong, A., Samakeenich, C., Tribuddharat, C. and Thamlikitkul, V. (2006). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in Siriraj hospital. *Siriraj Medical Journal*, 58(8), 951-954.
- Kim, S.W., Choi, C.H., Moon, D.C., Jin, J.S., Lee, J.H., Shin, J.H., et al. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 301(2), 224-231.
- Kitti, T., Thummeepak, R., Thanwisai, A., Boonyodying, K., Kunthalert, D., Ritvirool, P., et al. (2014). Characterization and detection of endolysin gene from three *Acinetobacter baumannii* bacteriophages isolated from sewage water. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 383-388.

- Kutter, E., Raya, R. and Carlson, K. (2004). Molecular mechanism of phage infection. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (Eds.), **Bacteriophages: biology and applications** (pp. 165-222). USA: CRC Press.
- Lai, M.J., Lin, N.T., Hu, A., Soo, P.C., Chen, L.K., Chen, L.H., et al. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ØAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90(2), 529-539.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106(11), 4154-4159.
- Lin, N.T., Chiou, P.Y., Chang, K.C., Chen, L.K. and Lai, M.J. (2010). Isolation and characterization of phi AB2: A novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. **Research in Microbiology**, 161(4), 308-314.
- Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. **Current Opinion in Microbiology**, 8(4), 480-487.
- Luke, N.R., Sauberan, S.L., Russo, T.A., Beanan, J.M., Olson, R., Loehfelm, T.W., et al. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. **Infection and Immunity**, 78(5), 2017-2023.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P. and van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, 22(2), 157-163.
- Maragakis, L.L., Cosgrove, S.E., Song, X., Kim, D., Rosenbaum, P., Ciesla, N., et al. (2004). An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. **The journal of the American Medical Association**, 292(24), 3006-3011.

- Maragakis L.L. and Perl T.M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical Infectious Diseases*, 46(8), 1254-1263.
- McConnell, M.J., Actis, L. and Pachón, J. (2012). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130-155.
- Merabishvili, M., Vandenheuvel, D., Kropinski, A.M., Mast, J., De Vos, D., Verbeken, G., et al. (2014). Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 9(8), e104853.
- Misbah, S., Hassan, H., Yusof, M.Y., Hanifah, Y.A. and AbuBakar, S. (2005). Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Medical Journal*, 46(9), 461-464.
- Mo, K.F., Li, X., Li, H., Low, L.Y., Quinn, C.P. and Boons, G.J. (2012). Endolysins of *Bacillus anthracis* bacteriophages recognize unique carbohydrate epitopes of vegetative cell wall polysaccharides with high affinity and selectivity. *Journal of the American Chemical Society*, 134(37), 15556-15562.
- Nelson, D., Loomis, L. and Fischetti, V.A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4107-4112.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. and Lan, Q.C. (2007). Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 1-13.
- Peng, F., Mi, Z., Huang, Y., Yuan, X., Niu, W., Wang, Y., et al. (2014). Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiology*, 14, e181.

- Petrov, V.M., Ratnayaka, S., Nolan, J.M., Miller, E.S. and Karam, J.D. (2010). Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology*, 7, e292.
- Phumkhom, P. (2009). Bacteriophage therapy. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy*, 21(2), 94-103.
- Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E.S. and Novik, G.I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145-155.
- Resch, G., Moreillon, P. and Fischetti, V.A. (2011). A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(6), 516-521.
- Rodriguez-Bano, J., Garcia, L., Ramirez, E., Martínez-Martínez, L., Muniain, M.A., Fernández-Cuenca, F., et al. (2009). Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. *American Journal of Infection Control*, 37(9), 715-722.
- Rodríguez, L., Martínez, B., Zhou, Y., Rodríguez, A., Donovan, D.M. and García, P. (2011). Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiPLA88. *BMC Microbiology*, 11, e138.
- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W. and Mougous, J.D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(7356), 343-347.
- Russo, T.A., Luke, N.R., Beanan, J.M., Olson, R., Sauberman, S.L., MacDonald, U., et al. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity*, 78(9), 3993-4000.
- Russo, T.A., MacDonald, U., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, I.J., Sauberman, S.L., et al. (2009). Penicillin binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(4), 513-521.

- Santimaleeworagun, W., Wongpoowarak, P., Chayakul, P., Pattharachayakul, S., Tansakul, P. and Garey, K. W. (2011). Clinical outcomes of patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with single or combination antibiotic therapy. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 94(7), 863-870.
- Seifert, H., Strate, A. and Pulverer, G. (1995). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology and preactirs of mortality. *Medicine (Baltimore)*, 74(6), 340-349.
- Soothill, J. S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, 37(4), 258-261.
- Souli, M., Galani, I. and Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveillance*, 13(47), 1-11.
- Su, M.T., Venkatesh, T.V. and Bodmer, R. (1998). Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. *BioTechniques*, 25(1), 44-46.
- Tjernberg, I. and Ursing, J. (1989). Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 97(7), 595-605.
- Vallejo, L.F. and Rinas, U. (2004). Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3, e11.
- Wagenaar, J.A., Van Bergen, M.A., Mueller, M.A., Wassenaar, T.M. and Carlton, R.M. (2005). Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, 109(3-4), 275-283.
- Wang, I.N., Smith, D.L., and Young, R. (2000). Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*, 54, 799-825.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. and Edmond, M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 309-317.

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970).

Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40(3), 734-744.

Young, I., Wang, I. and Roof, W.D. (2000). Phages will out: Strategies of host cell lysis.

Trends in Microbiology, 8(3), 120-128.

Zhiming, T., Guangyuan, H., Kexiu, X.L., Mingjie, J.C., Junli, C., Ling, C., et al. (2005). An

improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 114-120.





ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรัตนนคร

ภาคผนวก ก

ตาราง 6 แสดงลำดับเบสของ insert จากแต่ละโคลนของ genomic library

Clone name (length)	Nucleotide sequence of clone libraries and recognition site for the <i>Hind</i> III (underlined)
4 (1,641 bp)	<p><u>AAGCTTAATTGGTGAGCTTGCTAAAGAAGTAATGGCAGGGACCATTACTGTTTCTG</u> AAAATATGACTTTATCAATTGATAAGCGTATTGCAGAAATTGATGCTCTGATTTC AAGCAGTTAAGTCAGATCATGCACAAATGAACAAATCCAAAAAATTGAGTCAACTTG GCGTGGTCTTTATTACTTTTGTTCAGGAAACGCCTTCAAATCCGCTCATTTAAATTC GTATGCTTAATACGACTAAGAAAGAGTTGGTAAAAGATTTCCAAGGTGCTACAGAC TTTGATCAAAGCACTTTGTTTAAGAAAATCTACGAAGAAGAATACGGTCTTTTGG TGGTGCACCATACTCAGCATTAAATGGTGATTTTGGTGTGATCGTACTCCATCTG ATATGTATTTGCTTGAGCAAATCTCTCATGTTGCAGCGGCAGCACATGCACCATTT ATTTACAGCTGCTAGTCCGAGCATTTTAGGCCTTGAATCATTTACAGATATTGATCG TCCTAGAGATGTTTCAAAAATCTTTGAAACCGCTGAATATGTTCAATGGCGTTTCTG TCCGTGATAGTGAAGACTCACGTTATGTTGCATTGACTTTGCCTCATGCTCTGGGT CGTCTCCCATATCATCCAAAAGAAGGTACTGCGACAGAAGGCTTAAATTTTATTGA AGATGTTTCTGGTAAAACCACAATGAATATTTGTGGATGAATGCAGCTTATGCTT TTGGTACTCGCTTAACAAATGCATTTGATATGCATGGTTGGTGTGCTGCTATTCGC GGTGTTGAAGGTGGTGGTTTAGTTGAAGGCTTGCCAGTACATACTTTTAAAACACA AGATGGCGAAGTGGTATTCAAGTGTCCAATGAAATGCAATCACGGATCGCCGTG AAAAGAGTTAAGCGATCTAGGCTTCATTCCGTTAGTACATTGTAATAATACAGAT TACGCAGCTTTCTTTGGCGCGCAATCAACTCAAAAACCTAAAAAATATGACAATGA TACAGCCAATGCAAACTCGGCTTTATCAAGTCAGATTGAGTACATCATGGCTGTTT CACGTATTGCACATTACTTAAAAGCAATGATGCGAGATAAAGTGGGTAGCTTTGCT TCTGCTGGAAATGTTGAAGCATTCTTAAATGAGTGGTTGTCACAGTATGCTTACT TGACGATGGTGCTTCTCAAGAAGCAAAGCTCAATACCCGTTACGTGAAGCGTCTG TAAAAGTTGTAGAAGATCCTGCTCAACCAGGTCCTACAAATCTGTGGTTTTCTTG CGACCACATTTCCAGCTGGATGAGTTGTCGGTTTTCTTTACGACTTGTCACTGAGTT ACCTCAGTCCTCAAATTAATCAAGGTGAGCTAAAGAATAACTTTAAATTAATAATA GGAAAGTTCTAAATGAAAGATATATACGTTGAGTTTCCGCGGTAAATATAAAGTTGA TGGAGAATCTCGTGATTCTGAGCACAAAGGTTGGTTAGAAGTTAACTCTTGGTCTC ATAACATCCGTCAACCTAAATCTGCTACTTCAAGTAGTGTAGGCGGCCACACTGCT GAACGTGTTGAACATTCTGACATGGTTTTTCGTGAAAGACTTAGACGCAACTAGCCC TAAATTATGGGAAGCTT</p>
5 (699 bp)	<p><u>AAGCTTAAAATCTCTTATAAGGGCAATGTGTTCTCCGCAGACTTGGGTAAAGGATG</u> GACTGATGAGCGTCGTAAAGCACTTACGTTAGCACATCAATCTGGAGTAGGTAAGT CGGTATTTCCAGATAAAGGAAAAGGAAGTACGGAGTATCCACCTGTAGGTAAGATT TGGGAAGTTAAAGCACTTCAAGAATCAAGTACAGGTAAAGCATTAAAGATTACCTAA AGTGGTTCGGATACGTGAAGATAAAGGAGGAACCTGATGCTTGAATGGTGGAAATGCT CTTGAAGGGTGGCAACAAACACTACTGTTTATATCTGTAGTAGTGTTCCTAATTAG TCGTTAATTGGGTACTGTAAGTAACTGATTTAGTAGTTAGTTATTTGAAGTTACAC TAATAGAAGGAGATATAAATATGATATTAATATTTATAAATAAATAACTATAATAATA TACATAAGTAATATTATAGTATTCTTATTTATACTTCTTCTTATAAACATACTTAA AGGTAAATAATATGGCATGGTTAATCCACGACTATGAAACAGAGAACTATGAGTAT TGTGGTCTTTAGCAAGTCCACATTGCTCTGAGAAGTACATTGTAGCTACTGGTTG GGCAATTGATAATGGACCAGTACAGAGTCTTTACTTTAACAATAAGGAAGAAGGTT TAACTTCTAACTGGTTGAAAAAGCTT</p>

ตาราง 6 (ต่อ)

Clone name (length)	Nucleotide sequence of clone libraries and recognition site for the <i>Hind</i> III (underlined)
6 (473 bp)	<p><u>AAGCTTTGGTTATTTTTCCAGTTATCGCCTTGGTAGCGTGGTAACTGGCGACGGAA</u> ATCATTTTTCGTCTAAGTTATTTACATCAAGCGTATTGGTGATTAGACCACGCGATA ACGGAGAATATGGCACAAGGCTAATACCTAACTCACGAATGGTTTTGCAAATGGGTT TGCTCAAACCTCACGGGTAAGTAGCGAATATTCATGTTGAACCGCTGCAATCGGGTG AATCGAATGTGCTTTACGAATGGTTTCAGCCGAAGCTTTAGGTAGTGTATGGGTA TGTTTGGTATTGGTGGGCAGGATGACCTCGGAAAGAAGTATGAGGAAGAATGCGT CGTCAAGCAGAAGCTCAGAACTACAACAAGCTAACGAACAGAAAGAAGTAACACA ATTTGATGATACAGGAGGTACTACCTTCACAGGTGCAGATGGTCCTCGTAAGAAAC GACCTACAGGTGGTTATTCAAGCTT</p>
8 (1,051 bp)	<p><u>AAGCTTTACAAACATATAATAAGGAAAATGCTGATCGTCTTATTGCATTAGGTCGT</u> AGTGATCAAATGAATGACGTCCAGCGTGAGGTGAACTGGCTTGATGGTAAATACTA TAATCAGGGTAAAGAATACCAGAAGTTAGTAGCTACACAAGCACAACAACCTCAAC AATTCAATGCACGTATCAAAGAGATGGCAGACAGTGGTGCAAGCTCGGATGAGATG TACCAAGTAGGTAAGAGTATTTAACTCAATACACAGATGCTATCTATAACAGCGA TCTTGATGCTGACTTTAAAGAACATCTTTATAAGGAAGGTTAAAAGAGAACGCTG TCTATCAGAAAACCTATTAAGGATACACAACAGCGTGTTGCTATTGATAAAGCTTAT AAGAAAGTAGTTGGACGTATTGATGCTATTTCGATTAGTGAATATTCATGGTGCAAC AACTGCTGATGTTAATAAGTTAATCAGTAAACATAAACCTTCTGTGTGATCACAG ATATGACTGGACGTATTCGCTGTGTAGGCGCTCAAGCTGCTAACGATGTACAGCAG TTAGAAACGGTGTGGGATACGATGCGACAGTTTCGCAGCGATTTCATAAGATGATTCA TATCGGAAGTATTCAGGTGAGTGCTGAGGGTATGGATATGCTATTCACCACCTAT CTGCATTACAGAACAGTAAAACAGGTGTACAACTACACTTGACTIONAGCCATCTTT GGTGGTGCTTGGATGCAACCTACAGAGGATATTGAGTACCAACGTGGTATCAGTAC ACCGAAGAATAAACTTAAACGTGCAGGTAAGAAATCATATCTCAAAGCTGAGACAT TCTTTAACCCCTGACTTAAACACTTGGAAATGATTATGGATATATTTGATTCAATTG AGGAATACTTAGCTAAGACTAAGAACCCTGTGCAGCTTGTCAGCACTTTGATGAA GTACCTGAAAGTAAGATTAATTACCCTTTAATTGGTCAGATTAAATACGATGGGGG TTTATATTCTTATCGTTATTCATAATGGGTATGCCTAAAGCTT</p>

ตาราง 6 (ต่อ)

Clone name (length)	Nucleotide sequence of clone libraries and recognition site for the <i>Hind</i> III (underlined)
9 (1,500 bp)	<p> <u>AAGCTTATCAGAGTACATTAACATTACAGGCTAACTATGTAAATACATTACGTACT</u> ACAGAGTTAAGTGGTGTGAATTAGATGTACTTACGTATTCCTATGTGAATCGTTC TGTAGCTGCTAAGATGACTGCCGATCCTAACCTAACATTAGAGGAAGCTACTAAGT CAGCACAGGATGAAATAGCAAGTGCCTTTAAGTTTATCGGGCAGCAAATGATCCT ACAGCACAAAGGTGCAGATCAAGTGGTAAATAAACTACGTGGTATGGTAGATCATGC TTATACTAAAGGATATGTTGATCTAGATACCTTACAGGTGTACGTAAGATTGCAG ATGATATTCATGTAGGTATTACTAATTACAATGATACTATGGCAGATCGTAAAGTT ACTGAGTATATTGCTAGTGTGAAGTAGGTGAAATTCCTTTAGATTCTGATGATTA TAATGAGCAGATGCATGCTAAACCTAATTTGAGTGAGGATAAGAAGACAGCTTTG ACTCGTCAATTAACCTAATCATATGTATCTCAACATAATAAGGTTATGAATGCCGA TATTGATATTAACACTATTGATCAATTCCTGATTTATAATCATGATTGACTTTAT TGCAAGTACAGGTAAGGGTGAAGATACGTTTGTAAACCTTTGGACACAGAAGCATC TACGAGAAGCTAATGGTGTGTTTTGCAGGGTGGTATGGCTATGATTAACCAGCC TTCTCGGGTAAGACAGATGTACCAGAATTAGCTAAGAAAGGTGCAGAGTACGCTAG TTCACAATTTACAGGTTTTATGGGTATGACTCAAGCTGAGGCTGAGAAAGACCTT ACTACAAGAACCGTGAGCAAGTGTAAATAACAATGGCAGGTATGTACCGCAATTAT TCACAAACAAATCCAGCACGTGCTGCACAGTTGCTTGCAGGTGTTCCAGAAGAATA TCGTGGAGCAGTAGAGCAGTTATGGCGTAATGGTGGGCGTATGCCTGATGCTCGTG AATTAGTACGTAATCCAGTTAACCCTCAAGTTTCGTTATGAGAACATTGACAAAGCG ACGACTGCTTTGACAGCCGATACAATAAATTAGATAAATGGTTTTAGTCGTGGTCA CGGTGGTGGCTTCTGGAATAGTCAGAAATCCGCTGTAAAGATTACAGCTTAATG CTATTATTATTGCGGCTAAAGCTGGTAAGTTCCAGTTAGCACCAGTACTACTACA GCTAGTCCTGAACTTCTTATGGCTAACATGGAGGCTTTAGGTATGCTACAGAAATC ACCTAAAGGTTATGCGAGTACTGTATTAAACACCTAATGCTAATGTGGTGAAG GTATGAAGTCAGATAACGGTGTTCCTTTAAGTTCTGATCTGTTAGGTATAGTAGTA GATAACTACCGTCAAGAAATTGCTAAGAGCCTTAAGACTAGACCAGAGGATATTGT TGTATCTTCTGATGAGGGTGGTACAGGTTTATATTTCCAAGCTT </p>
10 (808 bp)	<p> AAGCTTCAAACATACGAGCAGTTACACCCTAGCATCTTCGTTACTTAAACCTGCA CGGGTAAGTACATCATGAATCTGTTCCCTTAGTCATACCTGTGGTTGCTACCTCAGA TAAGTTCCCTAGCAGCGTCACGTTGTGTTTGTAAAGAAGTGTGCCCCAAGTTGTTTTT CAGTTAATTTGAAATTACCTTTGGGGTTTAAACAGTTACAGGGTAGATACGTGTAATC TGTTTACCATAGAAATGAGCAATATCGTCCCACGAACCTAAGTACTTCGACGTA CGCATCTAATATACGATCATAACTATGACGTACAGGCATATAAGTACTTCGACGTA CAATCTGATCAGCACCTTCTGCTTCTAAGAATCCTACCGCTTTAGCATCATCTAGT ACACGTGTAGCGAAACCTGAATCAATGTATGTTTCGCATAACACGTTGCATACTTGG ATGTGGTTTCGATAGTATTAATAAGTTGCTTGATAGTTGCATCAGAAGGTAAGTACTTGC CTAATTGCTCTGTTAATTCTAAGACTTTAGCGTCTAAGCGTTGCATGGACTCTTGG AACTTCTCCATTGTTTCTTGTGTGGCTCTACCATACGATCCATTATTTTCGAGTAAT AGGATTAGGTTTAAACCAACGTAATCTCTGATACAGCATCACTTAAATCTTCTCTA AACCAGCCAAACGCCATGAATAGTTGTTTAAAGTACGCTGCTTGTGCTGTAGCTACA TCATCACCATTGTTGTGTACACCTGTTAATAAACGATTAACCAGTGTGAATTATC ACCTTGAGTCAAATAATAAAGCTT </p>

ตาราง 6 (ต่อ)

Clone name (length)	Nucleotide sequence of clone libraries and recognition site for the <i>Hind</i> III (underlined)
13 (945 bp)	<p> <u>AAGCTT</u>TATCAGAGTACATTAACATTACAGGCTAACTATGTAAATACATTACGTTACT ACAGAGTTAAGTGGTGATGAATTAGATGTACTTACGTATTCCTATGTGAATCGTTC TGTAGCTGCTAAGATGACTGCCGATCCTAACCTAACATTAGAGGAAGCTACTAAGT CAGCACAGGATGAAATAGCAAGTGCCTTTAAGTTTATCGGGCAGCAAATTGATCCT ACAGCACAAGGTGCAGATCAAGTGGTAAATAAACTACGTGGTATGGTAGATCATGC TTATACTAAAGGATATGTTGATCTAGATAACCTTACAGGTGTACGTAAGATTGCAG ATGATATTCATGTAGGTATTACTAATTACAATGATACTATGGCAGATCGTAAAGTT ACTGAGTATATTGCTAGTGTGAAGTAGGTGAAATTCCTTTAGATTCTGATGATTA TAATGAGCAGATGCATGCTAAACCTAATTTGAGTGAGGATAAGAAGACAGCTTTG ACTCGTCAATTAACCTAATCATATGTATCTCAACATAATAAGGTTATGAATGCGGA TATTGATATTAACACTATTGATCAATTCCTGATTTATAATCATGATTGACTTTAT TGCAAGTACAGGTAAGGGTGAAGATACGTTTGTAAACCTTTGGACACAGAAGCATC TACGAGAAGCTAATGGTGATGTTTTGCAGGGTGGTATGGCTATGATTAACCCAGCC TTCTCGGGTAAGACAGATGTACCAGAATTAGCTAAGAAAGGTGCAGAGTACGCTAG TTCACAATTTACAGGTTTTATGGGTATGACTCAAGCTGAGGCTGAGAAAGACCCTT ACTACAAGAACCGTGAGCAAGTGTTAATACAATGGCAGGTATGTACCGCAATTAT TCACAAACAAATCCAGCACGTGCTGCACAGTTGCTTGCAGGTGTTCCAGAAGAATA TCGTGGAGCAGTAGAGCAGTTATGGCGTAATGGTGGGCGTATGCCGTGATGCTCGTG AATTAGTACGTAATCCAGTTAACCGTCAAGTTCGTTATGAGAACATTGACAAAGCG ACGACTGCTTTGACAGCCGATACAACATAAATTAGATAAATGGTTTAGTCGTGGTCA CGGTGGTGGCTTCTGGAATAGTCAGAAATCCGCTGTTAAAGATTACAGCTTAATG CTATTATTATTGCGGGCTAAAGCTGGTAAGTTCAGTTAGCACCGAGTACTACTACA GCTAGTCCTGAACCTCTTATGGCTAACATGGAGGCTTTAGGTATGCTACAGAAATC ACCTAAAGGTTATGCGAGTACTGTATTAACACCTAATGCTGCTAATGTGGTGAAG GTATGAAGTCAGATAACGGTGTTCCTTTAAGTTCTGATCTGTTAGGTATAGTAGTA GATAACTACCGTCAAGAAATTGCTAAGAGCCTTAAGACTAGACCAGAGGATATTGT TGTATCTTCTGATGAGGGTGGTACAGGTTTTATATTTCCAAGCTT </p>

ภาคผนวก ข

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Beckman Coulter DU[®] 730 UV/Vis Spectrophotometers (Beckman Coulter, Brea, CA)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ScanSpeed 2236 R (LaboGene Aps, Denmark)
3. อ่างน้ำร้อน water bath DT (Heto lab Equipment, Denmark)
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อ UNB300 (MEMMERT, Federal Republic, Germany)
5. หม้อนึ่งความดันไอ SS-325 (TOMY, Contherm , New Zealand)
6. ตู้ปลอดเชื้อ HVR 2472 (Holten LaminAir: Denmark)
7. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Manasquan, New Jersey., USA)
8. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SL SHEL LAB Model 1565 Incubator (Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Oregon, USA)
9. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel Doc 2000 Gel documentation system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif, USA)
10. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส Mini-PROTEAN[®]Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif, USA)
11. เครื่องวัดกรดต่าง CyberScan pH510 (Eutech Instruments, Malaysia)
12. เครื่อง CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
14. เครื่องแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง SONICS Vibra-cell[™] VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter (Sonic & Material Inc, Newtown, CT, USA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB broth)

ซึ่งอาหาร Luria-Bertani broth ปริมาณ 25 g มาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1 L นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar (LBA) ให้เติมวุ้นผง (agar) ลงไปร้อยละ 1.5



สารเคมี

1. การเตรียม SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-Cl) ปริมาตร 500 ml

NaCl	2.9	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	g
1 M Tris-Cl (pH 7.5)	25	ml

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 500 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 5X TBE buffer (450 mM Tris-borate, 10 mM EDTA) ปริมาตร 1 L

Tris base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	ml

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1 L จากนั้นนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5X เพื่อนำไปใช้ในการเตรียม agarose gel และการทำ agarose gel electrophoresis โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 100 ml

ละลาย disodium EDTA·2H₂O ปริมาณ 18.16 g ในน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH โดยการเติม NaOH ให้ได้ pH เท่ากับ 8.0 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม 1.0 % agarose gel ปริมาตร 100 ml

เตรียมผง agarose 1.0 g ละลายใน 0.5 X TBE buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปให้ความร้อนเพื่อหลอม agarose gel แล้วเติม ethidium bromide ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 µg/ml

5. การเตรียม 3M Sodium acetate (CH_3COONa) ปริมาตร 100 ml

ละลาย CH_3COONa ปริมาณ 24.62 g ในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. การเตรียม 8M Potassium acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) ปริมาตร 100 ml

ละลาย CH_3COONa ปริมาณ 78.52 g ในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. การเตรียม 10 % sodium dodecyl sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}^+$) ปริมาตร 100 ml

ละลาย $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}^+$ ปริมาณ 10 g ในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

8. การเตรียม Destaining solution ปริมาตร 1 L

นำ Methanol ปริมาตร 300 ml และ Acetic acid ปริมาตร 100 ml มาผสมลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1 L เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม 0.125 % Comassies blue ปริมาตร 100 ml

Comassies blue	0.25	g
Methanol	45	ml
Acetic acid	10	ml

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. การเตรียม 5X Running buffer ปริมาตร 600 ml

Tris base	9.0	g
Glycine	43.2	g
SDS	3.0	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 600 ml จากนั้นนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1X เพื่อใช้ในการทำ SDS polyacrylamide gel electrophoresis เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. การเตรียม 30% Acrylamide: bis solution (37.5:1) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

Acrylamide	37.5	g
N,N'-methylenebisacrylamide (bis)	1	ml

ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 128 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อละลายส่วนผสมต่างๆ จากนั้นกรองสารละลายโดยใช้ filter membrane ขนาด 0.45 μ m

12. การเตรียม 12% SDS-polyacrylamide gel (SDS)

12.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 12% Separating gel

30% Acrylamide mix	4.0	ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5	ml
10% SDS	0.1	ml
10% Ammonium persulfate	0.1	ml
TEMED	10	μ l
Sterile dH ₂ O	3.3	ml

12.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 5% Stacking gel

30% Acrylamide mix	0.5	ml
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.38	ml
10% SDS	0.03	ml
10% Ammonium persulfate	0.03	ml
TEMED	5	μ l
Sterile dH ₂ O	2.1	ml

13. การเตรียม 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1 L

Tris base	121	g
-----------	-----	---

ละลาย tris base ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml จากนั้นปรับค่า pH ด้วยกรด HCl ให้ได้เท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 L นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

14. การเตรียม 8X Binding buffer (4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 480 mM imidazole, pH 7.9) ปริมาตร 100 ml

NaCl	23.38	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	16	ml
imidazole	0.27	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. การเตรียม 8X Wash buffer (4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 480 mM imidazole, pH 7.9) ปริมาตร 100 ml

NaCl	23.38	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	16	ml
Imidazole	3.26	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. การเตรียม 4X Elution buffer (2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, 1.2 M imidazole, pH 7.9)

ปริมาตร 100 ml

NaCl	11.69	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	8	ml
imidazole	8.16	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. การเตรียม 4X Strip buffer (2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, 400 mM EDTA, pH 7.9)

ปริมาตร 100 ml

NaCl	11.69	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	8	ml
EDTA	14.89	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

18. การเตรียม 8X Charge buffer (400 mM NiSO₄) ปริมาตร 50 ml

NiSO ₄	3.09	g
-------------------	------	---

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ml และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. การเตรียม dialysis buffer 1 (250 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, 150 mM imidazole, 2 M urea, DTT 1 mM pH 7.9) ปริมาตร 500 ml

NaCl	7.31	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
Imidazole	5.11	g
Urea	60	g
DTT (DL-Dithiothreitol)	0.077	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 400 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 ml นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

20. การเตรียม dialysis buffer 2 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, 50 mM imidazole, 1 M urea, DTT 1 mM pH 7.9) ปริมาตร 500 ml

NaCl	4.38	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
Imidazole	1.7	g
Urea	30	g
DTT (DL-Dithiothreitol)	0.077	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 400 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 ml นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

21. การเตรียม dialysis buffer 3 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, DTT 1 mM pH 7.9) ปริมาตร 500 ml

NaCl	7.31	g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
DTT (DL-Dithiothreitol)	0.077	g

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 400 ml จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.9 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 ml นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

22. การเตรียม Storage buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM phosphate buffer, 20% glycerol) ปริมาตร 500 ml

Phosphate buffer saline 5 tablets

(PBS) tablets

100% glycerol 100 ml

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

