25 มี.ค. 2542

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เสนอ

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

การตรวจหายีน polyketide synthase Type I และ Type II จาก actinomycete คัดแยกจากดินในประเทศไทย

รหัสโครงการ BRT 640006

นางสาวยุวดี ตาลาวนิช

นางสาวอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต

ธันวาคม 2541

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เสนอ

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

การตรวจหายีน polyketide synthase Type I และ Type II จาก actinomycete คัดแยกจากดินในประเทศไทย

รหัสโครงการ BRT 640006

นางสาวยุวดี ตาลาวนิช

นางสาวอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต

ธันวาคม 2541

บทคัดย่อ

Streptomycete 96 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินในประเทศไทยถูกนำมาตรวจหาศักยภาพในการผลิตสาร polyketide โดยการตรวจหายีน Type I และ Type II polyketide synthase (PKS) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ไพรเมอร์ที่จำเพาะถูกออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนจากกลุ่มยีน Type I และ Type II PKS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ไพรเมอร์เหล่านี้นำไปสู่การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน PCR ขนาด 1.4 และ 1.2 กิโลเบสซึ่งแสดงถึงยีน Type I และ Type II PKS ตามลำดับ โดยสามารถเพิ่มชิ้นส่วน PCR สำหรับ Type I และ Type II PKS ได้ 64% และ 96% ตามลำดับ การวิเคราะห์โดยวิธี Southern analysis แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ Type I และ Type II PKS ที่โคลนได้สามารถใช้เป็นตัวติดตามยีนกลุ่มนี้ใน *Streptomyces* หลากหลายสายพันธุ์ได้ พบว่ายีนกลุ่มนี้มีการกระจายตัวสูงในกลุ่ม Streptomycete โดยพบ cross-hybridization กับตัวติดตามสำหรับยีน Type I และ Type II PKS ได้ 61% และ 53% ตามลำดับ เมื่อนำโคลน Type I และ Type II PKS มาวิเคราะห์หาลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกันกับยีน PKS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และการวิเคราะห์ในรูป phylogenic tree ถูกนำมาใช้หาความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรมของ *Streptomyces* ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการมียีน Type I และ Type II PKS ในกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบ

Abstract

Ninety-six strains of Streptomycetes isolated from Thai soil were analyzed for the genetic potential to produce polyketides. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, Type I and Type II polyketide (PKS) genes were identified. Degenerated primers were designed from the conserved regions of amino acid alignment among Type I and Type II PKS genes available in the database. These primers lead to amplification of the predicted sizes of 1.4 and 1.2-Kb PCR products which revealed Type I and Type II PKS genes, respectively. 64% and 96% of tested strains were found to generate Type I and Type II PKS PCR products, respectively. Southern analysis showed that these Type I and Type II PCR clones can be used to identify PKS genes in various *Streptomyces* strains. The Type I and Type II PKS probes can cross-hybridize with 61% and 53% of tested strains in orderly. DNA sequencing of these clones revealed highly similarity to polyketide synthase genes in the database. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique and phylogenic tree analysis were used to characterize genetic relationship of tested *Streptomyces*. The result, however, has not shown any significant relation between Type I and Type II PKS producing strains.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินไปได้ด้วยทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) และเงินสนับสนุนงานวิจัยบางส่วนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ. ที่นี้ ขอขอบคุณ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่ช่วยให้ความรู้ เสนอแนะ ตลอดจนถึงตรวจแก้รายงานฉบับนี้ ขอบคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเก็บและรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินมาใช้ในการทำวิจัย ขอบคุณ Prof. I.S. Hunter แห่ง University of Strathclyde, UK.; Prof. Michael Goodfellow แห่ง University of Newcastle, UK.; Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institue, UK. และ Dr. Yoko Takahashi แห่ง Kitasato Institute, Japan. สำหรับการเอื้อเฟื้อสายพันธุ์จุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
คำย่อ	viii
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	4
ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
สรุปผลการวิจัย	42
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	46

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆที่ใช้ในการทดลอง	6
2	ผลการทำ PCR และ Southern analysis ของสายพันธุ์ทดสอบ	27

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แผนภาพการสังเคราะห์ 6-deoxyerythronolide B	2
2	การจัดเรียงยีน Type I และ Type II PKS ของ polyketide บางชนิด	3
3	แผนภาพแสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้จากยีน Type I และ Type II PKS	5
4	แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน Type I และ Type II PKS	12
5	ผลของ PCR บนอะกาโรสเจลและการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามจากยีน PKS Type I ของ *S. rimosus* M4018	13
6	ผลของ PCR บนอะกาโรสเจลและการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามจากยีน Type II PKS ของ *Streptomyces* sp. AR4b-1	18
7	แผนภาพแสดงการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของ Type I ของ *S. rimosus* M4018	24
8	แผนภาพแสดงการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของ Type II ของ *Streptomyces* sp. AR4b-1	25
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Type I และ Type II PKS กับลำดับในฐานข้อมูล	31
10	แสดงโคลนและทิศทางในการหาลำดับเบสของของยีน Type I และ Type II PKS	32
11	ลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของชิ้นส่วน PCR จากพลาสมิด pYT001 ขนาด 1,224 bp	33
12	ลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของชิ้นส่วน PCR จากพลาสมิด pYT004 ขนาด 1,333 bp	34
13	ผลของ RAPD ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ	37
14	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ทดสอบ	41

คำย่อ

g	=	กรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ng	=	นาโนกรัม
µg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
µl	=	ไมโครลิตร
mg/ml	=	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
µg/ml	=	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
M	=	โมลาร์
mM	=	มิลลิโมลาร์
pM	=	พิโคโมลาร์
v/v		ปริมาตร/ปริมาตร
w/v	=	น้ำหนัก/ปริมาตร
unit	=	หน่วย
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

บทนำ

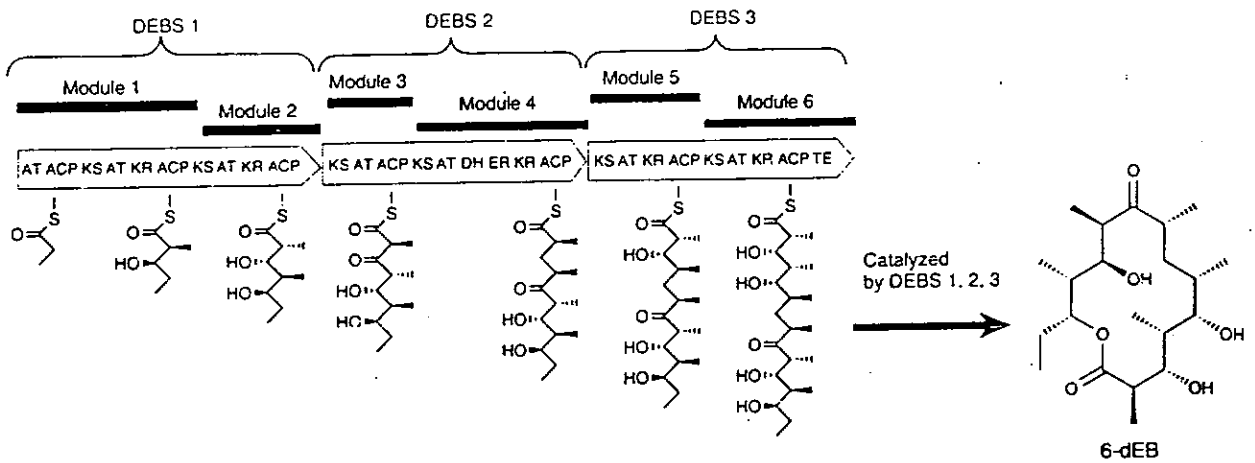
Polyketide เป็นสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย โดยพบได้ตั้งแต่เป็นสารประกอบ aromatic อย่างง่าย ๆ ไปจนถึงสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนแบบ polycyclic ether ขนาดใหญ่ (Simpson, 1991) ผลิตโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รา และแบคทีเรียที่มีสายใย (actinomycete) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม *Streptomyces*

สารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญมากทางการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติ คือ เป็นยาปฏิชีวนะ (ตัวอย่าง เช่น tetracyclin และ erythromycin) anti-tumor (daunomycin และ dynemycin A) anti-fungal (griseofulvin และ strobilurins) anti-parasitics (avermectin และ monensin) immonosuppresser (FK506 และ rapamycin) และ cholesterol-lowering (lovastatin และ squalestatins) เป็นต้น กระบวนการสังเคราะห์ polyketide มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (long chain fatty acid) (Manitto, 1981) โดยมีระบบการทำงานของเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) เป็นตัวดำเนินการ (Hopwood and Sherman, 1990; O'Hagen, 1991) โดยแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ Type I และ Type II (Katz and Donadio, 1993)

Type I PKS เป็น multifunctional polypeptide ขนาดใหญ่ ประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ รวมกันอยู่ในรูปของ domain โปรตีนขนาดใหญ่ซึ่งเหมือนกันกับ Type I fatty acid synthase ที่พบในยูคาริโอต (Wakil, 1989) ตัวอย่างของสารที่สังเคราะห์โดยอาศัย Type I PKS ได้แก่ erythromycin (*Saccharopolyspora erythraea*; Donadio *et al.*, 1991; Bevitt *et al.*, 1992) avermectin (*Streptomyces avermitilis*; MacNiel *et al.*, 1992) และ rapamycin (*Streptomyces hygroscopicus*; Schwecke *et al.*, 1995) เป็นต้น

การจัดเรียงของกลุ่มยีน Type I PKS แบ่งเป็นโมดุล (module) หรือ repeat unit ซึ่งแต่ละโมดุลจะทำหน้าที่สังเคราะห์ 1 หน่วยหมู่ฟังค์ชัน เรียก functional synthase unit (SU) ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ erythromycin (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นสารประเภท macrolide จะถูกสังเคราะห์โดย propionyl-CoA 1 หน่วย และ methylmalonyl-CoA 6 หน่วย จากการวิเคราะห์ลำดับเบส (Donadio *et al.*, 1991) พบว่ากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ประกอบด้วย 6 โมดุล โดยโมดุลแรกประกอบด้วยกลุ่มยีน acyltransferase (AT), acyl carrier protein (ACP), β-ketoacyl synthase (KS), AT, ketoreductase (KR) และ ACP เรียงกันตามลำดับ สำหรับโมดุลที่ 2, 3 และ 5 ประกอบด้วย KS, AT, KR และ ACP ส่วนโมดุลที่ 4 ประกอบด้วย KS, AT, dehydrogenase (DH), enoyl reductase (ER), KR และ ACP โมดุลที่ 6 ประกอบด้วยยีน KS, AT, KR, ACP และ thioesterase (TE) ในแต่ละโมดุลประกอบด้วยเอนไซม์ที่เป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) คือ KS, AT และ ACP ซึ่งมีความสำคัญในการส่งผ่าน methylmalonyl-CoA ในการสังเคราะห์สายยาวของ polyketide backbone โดยอาจมีเอนไซม์อื่น ๆ สำหรับการเกิด reduction ของหมู่คีโตน เช่น ในโมดุล 1, 2, 5 และ 6 ประกอบด้วยยีน KR ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนหมู่คีโตนให้เป็นอัลกอฮอล์ ทำให้พบหมู่ hydroxyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, 5, 11 และ 13 ตามลำดับ ในโมดุลที่ 3 ไม่มี KR ทำให้ไม่เกิด reduction ของหมู่คีโตนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 เป็นต้น สำหรับ TE ในโมดุลที่ 6 ทำหน้าที่ปลดปล่อยสาย polyketide และช่วยให้เกิด lactone ring

รูปที่ 1 แผนภาพการสังเคราะห์ 6-deoxyerythronolide B

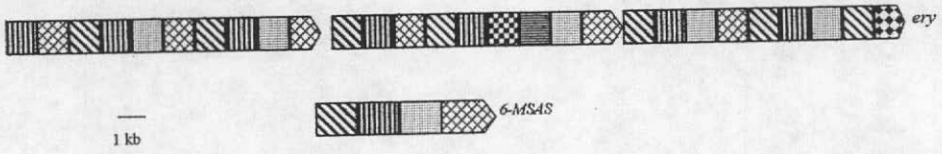


ในทางตรงกันข้าม Type II PKS จะประกอบด้วยเอนไซม์เดี่ยวแยกออกจากกันตามหน้าที่ (monofunctional unit) ซึ่งเหมือนกันกับ Type II fatty acid synthase ยาปฏิชีวนะหลายชนิดถูกสังเคราะห์ด้วยระบบเอนไซม์นี้ เช่น actinorhodin (*Streptomyces coelicolor*; Malpatida and Hopwood, 1986; Fernandez-Moreno *et al.*, 1992), tetracenomycin (*Streptomyces glaucescen*; Hutchinson *et al.*, 1993) และ oxytetracycline (*Streptomyces rimosus*; Rhodes, 1981; Hunter and Hill,1998)

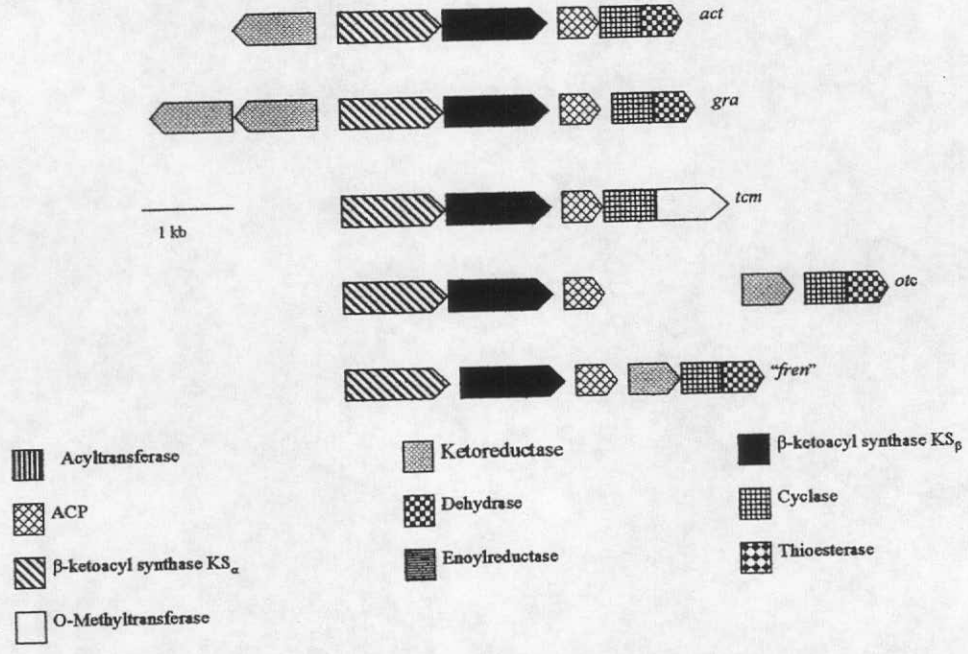
ยีน Type II PKS จะประกอบด้วยกลุ่มของยีนสำหรับการสร้างเอนไซม์หลักคือ β-ketoacyl synthase alpha (KS_α), β-ketoacyl synthase beta (KS_β) และ ACP เรียงต่อกันไปในทิศทางเดียวกันเสมอ เอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โครงสร้างคาร์บอนหลักของสาย polyketide นอกจากนี้ยังอาจพบกลุ่มยีนสำหรับเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการเกิดโครงสร้างวงอะโรมาติก (aromatic ring) หรือสร้างหมู่ฟังค์ชันต่างๆ เช่น cyclase, ketoreductase เป็นต้น ตัวอย่างการจัดเรียงยีน Type I และ Type II PKS ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2

รูปที่ 2 การจัดเรียงยีน Type I และ Type II PKS ของ polyketide บางชนิด

a) Type I PKSs (*ery*, erythromycin; *6-MSAS*, 6-methylsalicylic acid)



b). Type II PKSs (*act*, actinorhodin; *gra*, granaticin; *tcm*, tetracenomycin; *otc*, oxytetracycline; *fren*, frenolicin)



ผลของการวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน PKS จาก *Streptomyces* หลากหลายสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่ายีนกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันในแต่ละสายพันธุ์ (Hopwood and Khosla, 1992) ในการวิจัยนี้จึงจะทำการตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่ม actinomycete ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งคาดว่าจะเป็นการพัฒนาใช้เทคนิคนี้ในการตรวจ actinomycete ที่มีความเป็นไปได้ในการสร้าง Type I และ Type II polyketide โดยใช้ความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์หลักใน Type I และ Type II PKS

ปัจจุบันการศึกษาความสัมพันธ์หรือการจำแนกกลุ่มสิ่งมีชีวิต นอกจากศึกษาความแตกต่างทางสรีรวิทยาหรือสัณฐานวิทยาแล้วยังนิยมศึกษาถึงความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ได้มีการนำเทคนิค RAPD มาช่วยในการจัดจำแนกหรือแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งให้ผลที่น่าพอใจ (Lawrence *et al.*, 1993; Mehling *et al.*, 1995; Chatellier *et al.*, 1997) ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่นำมาตรวจหาศักยภาพในการสร้างสาร polyketide นี้ด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อตรวจหา ยีน Type I และ Type II polyketide synthase จาก actinomycete ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ actinomycete ที่คัดเลือกไว้

แผนงานวิจัย

1. เลือกจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บและรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ (culture collection) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

2. สร้างไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Type I และ Type II PKS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database)

3. ตรวจหา Type I และ Type II PKS โดยเทคนิค PCR

4. ยืนยันผลของชิ้นดีเอนเอที่ได้จาก PCR เบื้องต้นโดยการทำ Southern analysis

5. โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR Type I และ Type II PKS

6. หาลำดับเบสของโคลนจากข้อ 5

7. ศึกษาความสัมพันธ์ของ actinomycete ที่คัดเลือก โดยใช้เทคนิค RAPD

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. จุลินทรีย์และพลาสมิด

1.1 *Streptomyces* สายพันธุ์มาตรฐาน (Type strain)

- *S. rimosus* M4018 (Rhodes *et al.*, 1981) ผลิต oxytetracycline โดยอาศัย Type II PKS ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. I.S. Hunter, University of Strathclyde, UK.

- *S. coerulescens* ISP5146, *S. roseoviolaceus* ISP5277 และ *S. luteogriseus* ISP5486 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. Michael Goodfellow, University of Newcastle, UK.

- *S. hygroscopicus* KA1211, *S. flavoviridis* KA1153, *S. lateritius* KA1228 และ *S. griseus* KA1198 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Yoko Takahashi, Kitasato Institute, Japan.

- *S. lividans* 1326 และ *S. albus* ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. D.A. Hopwood, John Innes Institue, UK.

- actinomycete จำนวน 96 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินในประเทศไทย จากหน่วยเก็บและรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (อรินทิพย์และจรีรัตน์, 2539)

1.2 จุลินทรีย์อื่น ๆ

- *Escherichia coli* JM109

1.3 พลาสมิด

- pGEM-T (promega)

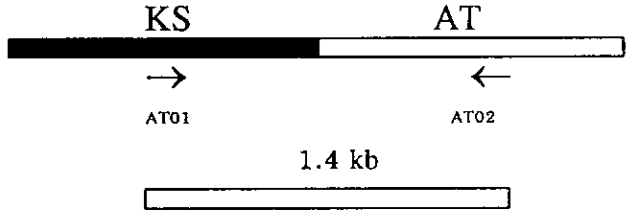
- pUC18

2. <u>การสร้างไพรเมอร์</u>

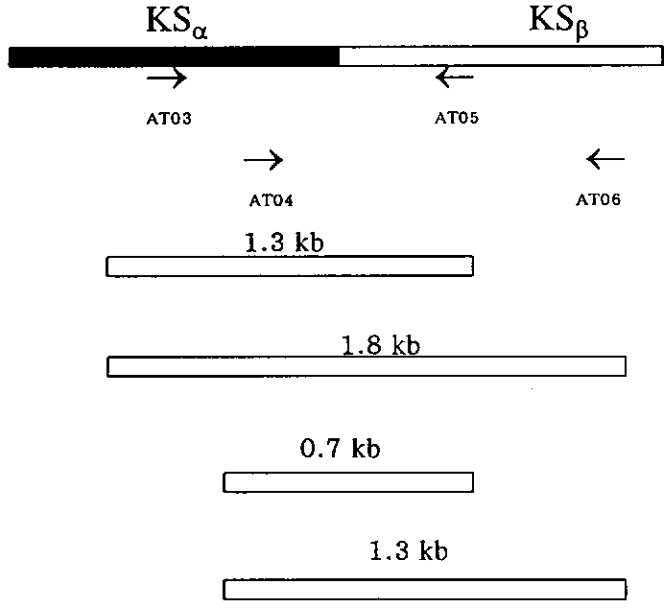
ไพรเมอร์ AT01 และ AT02 สำหรับ Type I PKS ถูกออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน β-ketoacyl synthase (KS) และ acyl transferase (AT) ของ Type I PKS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (รายละเอียดดูในผลการทดลองและวิจารณ์) ใช้เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส สำหรับ Type II PKS ไพรเมอร์ AT03, AT04, AT05 และ AT06 ตามลำดับ ถูกออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน β-ketoacyl synthase alpha (KS_α) และ ยีน β-ketoacyl synthase beta (KS_β) (รายละเอียดดูในผลการทดลองและวิจารณ์) และเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ แผนภาพการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอแสดงดังรูปที่ 3 และลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 1

รูปที่ 3 แผนภาพแสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้จากยีน Type I และ Type II PKS

a) Type I



b) Type II



ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆที่ใช้ในการทดลอง

PKS	Primer	Sequences
Type I	AT01	5'-GTCGACACSGCCTGYTCSTC-3'
Type I	AT02	5'-GCGGCGATCTCGCCCTGSGAGTG-3'
Type II	AT03	5'-GGCTGCACSDCSGGSMTSGAC-3'
Type II	AT04	5'-CWCTCVCTSGGYGCSATCGGYTCS-3'
Type II	AT05	5'-GATSGMGATCTGGCCGGYGYT-3'
Type II	AT06	5'-GMCTTSGGSYCGGTGACSGG-3'

D= T or C or G, M= A or C, S = C or G, V = C or A or G, W = A or T, Y = T or C

3. การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอบนแผ่นผ้าไนลอนซึ่งวางอยู่บนอาหารแข็ง Non-sporulation medium (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นขูดไมซีเลียมที่เจริญบนแผ่นผ้าไนลอนมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Hopwood และคณะ (1985) ดังนี้

1. นำไมซีเลียมประมาณ 50 mg ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วเติมสารละลาย lysozyme 500 µl (ประกอบด้วย 0.3M Sucrose, 25mM Tris-HCl pH8.0, 25mM EDTA pH8.0, lysozyme 10 mg/ml และ RNase 50 µg/ml) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

2. เติม 2% SDS 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง

3. จากนั้นเติม phenol/chloroform 250 µl พลิกหลอดไปมาให้สารละลายผสมกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

4. ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate pH4.8 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรของสารละลาย และเติม isopropanol ปริมาณ 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายออกให้หมด ผึ่งตะกอนให้แห้งโดยเปิดฝาหลอดตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก) 50 µl

6. นำดีเอ็นเอมาวัดความเข้มข้นและบริสุทธิ์โดยเครื่อง spectrophotometer

4. การทำ PCR

4.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน Type I และ Type II PKS

สารเคมีประกอบด้วย

	ปริมาตร(µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer without Mg	2	1X
10mM dNTP mixture	0.4	0.2mM each
50mM $MgCl_2$	0.6	1.5mM
10pM first primer	1	0.05pM
10pM second primer	1	0.05pM
Template DNA	1	50 ng
Taq DNA Polymerase	0.1	0.5 unit
DMSO	1	10%

เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของ Type I PKS คือ

1^{st} cycle	94°C	4	นาที
2^{nd}-29^{th}	94°C	30	วินาที
	66°C	1	นาที
	72°C	1:30	นาที
30^{th}	94°C	30	วินาที
	66°C	1	นาที
	72°C	4	นาที

สำหรับ Type II PKS ทำ PCR ด้วยระบบ 'touch down' PCR โดยอุณหภูมิที่ใช้ anneal จะเริ่มต้นที่ 68°C และลดอุณหภูมิในการ annealing ลง 1°C ทุกๆรอบ จนครบ 10°C และคงไว้ที่อุณหภูมิ 58 °C อีก 20 รอบ สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เป็นดังนี้

1^{st} cycle	94°C	4	นาที
2^{nd}-12^{th}	94°C	30	วินาที
	68-58°C	30	วินาที
	72°C	1	นาที
13^{th}-32^{nd}	94°C	30	วินาที
	58°C	30	วินาที
	72°C	1	นาที

4.2 Rapid Amplified polymorphic DNA (RAPD)

สารเคมีและความเข้มข้นเหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นยีน PKS แต่เติม primer เพียง 1 ชนิด (Operon Technologies, Inc., USA) ลงในปฏิกิริยา และสภาวะที่ใช้ในการทำ RAPD เป็นดังนี้

1st cycle	94°C	4	นาที
2nd-35th	94°C	30	วินาที
	35°C	1	นาที
	72°C	1:30	นาที
36th	94°C	30	วินาที
	35°C	1	นาที
	72°C	4	นาที

ภายหลังจากการทำ PCR จะตรวจสอบรูปแบบของผลิตภัณฑ์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซีส รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จะทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Molecular Analyst V1.11, BIO RAD, USA.

5. การโคลนและการโคลนย่อยชิ้นดีเอ็นเอ

ในการทดลองนี้ใช้พลาสมิดพาหะ 2 ชนิด คือ pGEM-T (promega) และ pUC18 ในการโคลนชิ้นส่วน PCR และการโคลนย่อย (subcloning) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่างๆ โดยนำพลาสมิดเหล่านี้ไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดออกจากเจล

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction kit (QAIGEN)

1. ตัดชิ้นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของชิ้นเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าเจลจะละลายหมด

2. ดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column ที่สวมทับด้วยหลอดเก็บปริมาตร 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง

3. เติม QG buffer ปริมาตร 0.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที

4. เติม PE buffer ปริมาตร 0.75 ml นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง

5. ย้าย QIAquick spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม EB buffer 50 µl ตั้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใส

5.2 การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

5.2.1 การเชื่อมโดยอาศัย pGEM-T

อัตราส่วนจำนวนโมลาร์ของชิ้นดีเอ็นเอต่อพลาสมิดที่ใช้คือ 3:1 การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการจะคำนวณจากสูตร

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

สารเคมีในปฏิกิริยา :

pGEM-T vector (50 ng)	1	µl
PCR product	x	µl
10X buffer	1	µl
T_4 DNA ligase (1 weiss unit/µl)	1	µl
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	10	µl

บ่มที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง

5.2.2 การเชื่อมโดยอาศัย pUC18

ชิ้นส่วน PCR ที่จะนำมาโคลนจะถูกดัดแปลงให้เป็นปลายทู่โดยการเติมปลาย 3' ด้วย T_4 polymerase แล้วจึงเชื่อมกับ pUC18 ที่ตัดด้วย *Hind* II ได้ปลายทู่ พร้อมทั้งกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) เชื่อมพลาสมิดและชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย T_4 ligase บ่มที่ 15°C เป็นเวลาข้ามคืน

5.2.3 การโคลนย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะถูกตัดด้วย restriction enzyme ที่เหมาะสม (ดูผลการทดลองและวิจารณ์) และแยกชิ้นส่วนที่ต้องการโคลนย่อยโดยการสกัดออกจากเจลตามข้อ 5.1 แล้วเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pUC18

5.3 การทรานสฟอร์ม DNA เข้าสู่ *E. coli*

สารละลายดีเอ็นเอจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยวิธี $CaCl_2$ transformation (Manietis *et al.*, 1982) เติมดีเอ็นเอลงใน *E. coli* competent cell แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1:30 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติม LB broth (ภาคผนวก) แล้วนำไปเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปกระจายบน LB agar (ภาคผนวก) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin รวมทั้ง X-gal และ IPTG นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 37°C 16-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ให้สีขาวมาตรวจสอบขนาดของพลาสมิด

6. การยืนยันผลของ PCR โดย Southern Hybridization

ผลิตภัณฑ์ PCR โคลนของ Type I และ Type II PKS ที่ใช้เป็นตัวติดตามจะทำการติดฉลากและตรวจสอบโดยอาศัย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boringer Mannheim)

6.1 การติดฉลากตัวติดตาม

ดีเอ็นเอ 1 µg ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 16 µl ทำให้เสียสภาพโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง เติม DIG High Prime 4 µl นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2M EDTA (pH 8.0) 2 µl แบ่งสารละลายเป็นส่วนย่อยเก็บแช่แข็งที่ -20°C

6.2 Southern blot

ดัดแปลงจากวิธีของ Southern (1975) โดยย้ายดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลไปบนเมมเบรน Hybond^{TM}-N$^+$ โดย capillary blotting ในสภาวะด่าง

แช่เจลใน Denaturing solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) เป็นเวลา 30 นาที นำไป blot กับเมมเบรนโดยใช้ Alkaline transfer buffer (1.5M NaCl, 0.25M NaOH) ทิ้งไว้ข้ามคืน

6.3 Hybridization

บ่มเมมเบรนใน hybridization buffer ที่อุณหภูมิ 62°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง (prehybridization) จากนั้นเติมตัวติดตามที่ถูกทำให้เสียสภาพโดยการต้ม แล้วไฮบริไดซ์ที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลาข้ามคืน ล้างเมมเบรนด้วย 2X SSC, 0.1%(w/v) SDS ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS ที่อุณหภูมิ 68°C พร้อมทั้งเขย่าอย่างสม่ำเสมอ 15 นาที 2 ครั้ง

6.4 การตรวจสอบผล Southern blot

1. นำเมมเบรนที่ผ่านการล้าง มาแช่ใน washing buffer (ภาคผนวก) 1-5 นาที แล้วนำไปบ่มใน blocking solution (ภาคผนวก) 100 ml เป็นเวลา 30 นาที

2. เตรียม antibody solution โดยเจือจาง anti-DIG-AP conjugate (1:10,000) ใน buffer 2 (ภาคผนวก)

3. นำเมมเบรนมาบ่มใน antibody solution 20 ml เป็นเวลา 30 นาที

4. ล้างด้วย washing buffer 100 ml 5 นาที 2 ครั้ง

5. แช่ใน detection buffer (ภาคผนวก) 20 ml 2-5 นาที

6. วางเมมเบรนบนแผ่นพลาสติก (หงายด้านที่มีดีเอ็นเอขึ้น) เติม CSPD® 20 หยด นำพลาสติกแผ่นที่สองมาปิดทับพร้อมทั้งรีดให้เรียบอย่าให้มีฟองอากาศ

7. หลังจาก 5 นาทีให้รีดของเหลวส่วนเกินออก ปิดให้สนิท แล้วบ่มที่ 37°C 5-15 นาที แล้วนำไปวางทาบด้วยฟิล์ม X-ray

7. การหาลำดับเบส

ตัวอย่างถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสทั้งจากผลิตภัณฑ์ PCR โดยตรงหรือหาจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ทำการตรวจหา actinomycete คัดแยกจากดินในประเทศไทย ที่คาดว่ามียีน Type I และ Type II polyketide synthase ด้วยวิธี PCR และศึกษาความสัมพันธ์และการกระจายตัวของ actinomycete ที่นำมาตรวจสอบ

1. การตรวจหายีน Type I และ Type II PKS

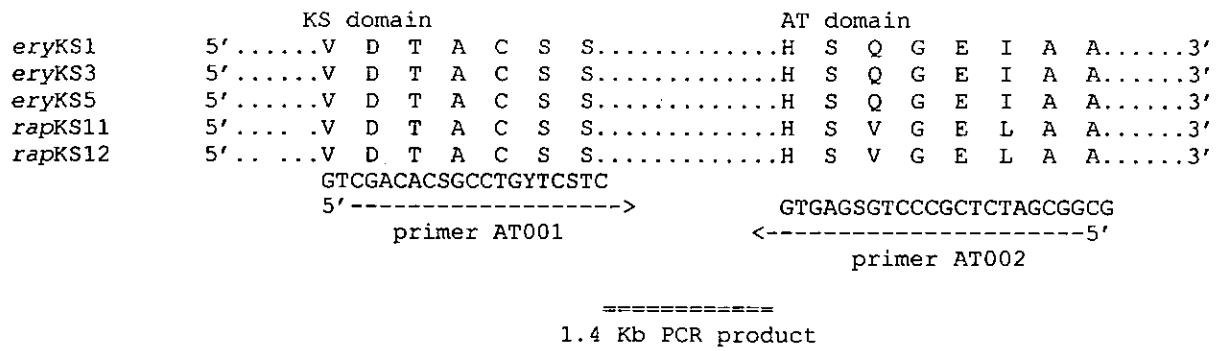
1.1 การออกแบบไพรเมอร์

AT01 และ AT02 เป็นไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน Type I PKS โดยออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน KS และ AT ของ erythromycin จาก *Saccharopolyspora erythraea* (รหัสในฐานข้อมูล คือ X62569, M63676, M63677, X56107) และ rapamycin จาก *S. hygroscopicus* (X86780) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (รูปที่ 4a) ซึ่งจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส

สำหรับ Type II PKS ไพรเมอร์ 4 สาย (AT03, AT04, AT05 และ AT06) ถูกออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน KS_{α} และ ยีน KS_{β} ของ tetracenomycin จาก *S. glaucescen* (X15312), actinorhodin จาก *S. coelicolor* (X63449), granaticin จาก *S. violaceoruber* (X16300), frenolicin จาก *S. roseofulvus* (L26338), jadomycin จาก *S. venezuelae* (L33245) และ griseusin จาก *S. griseus* (X77865) ที่อยู่ในฐานข้อมูล (รูปที่ 4b)

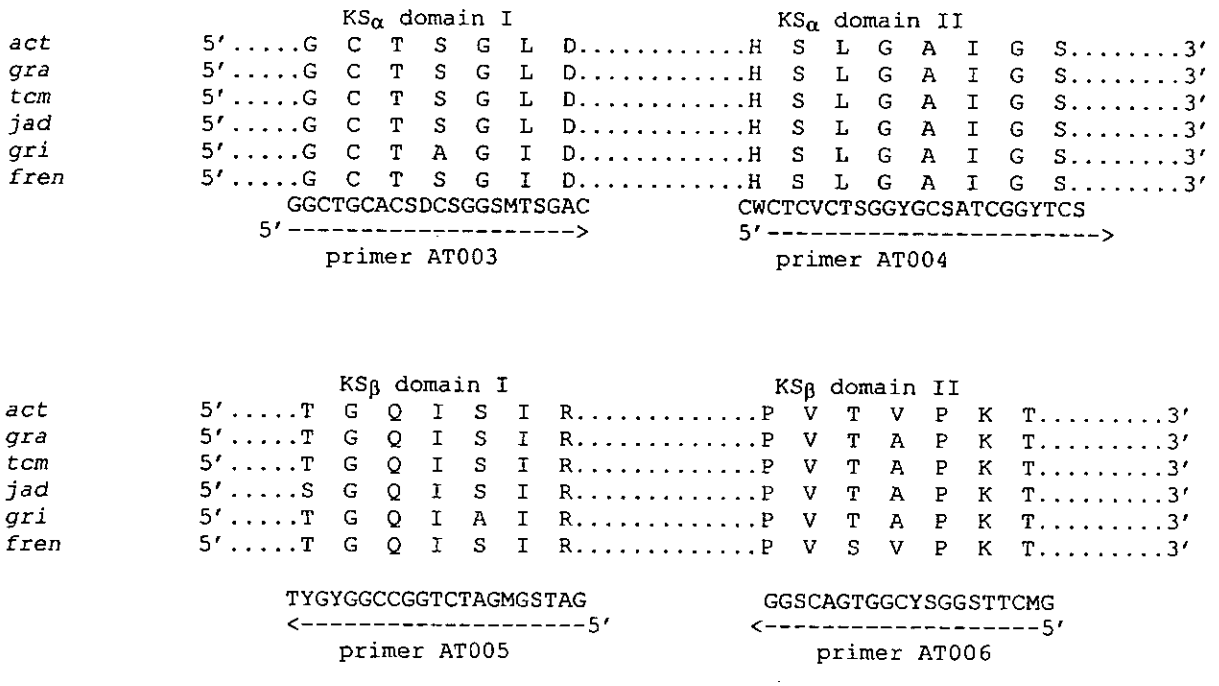
รูปที่ 4 แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน Type I และ Type II PKS

a) Type I PKS



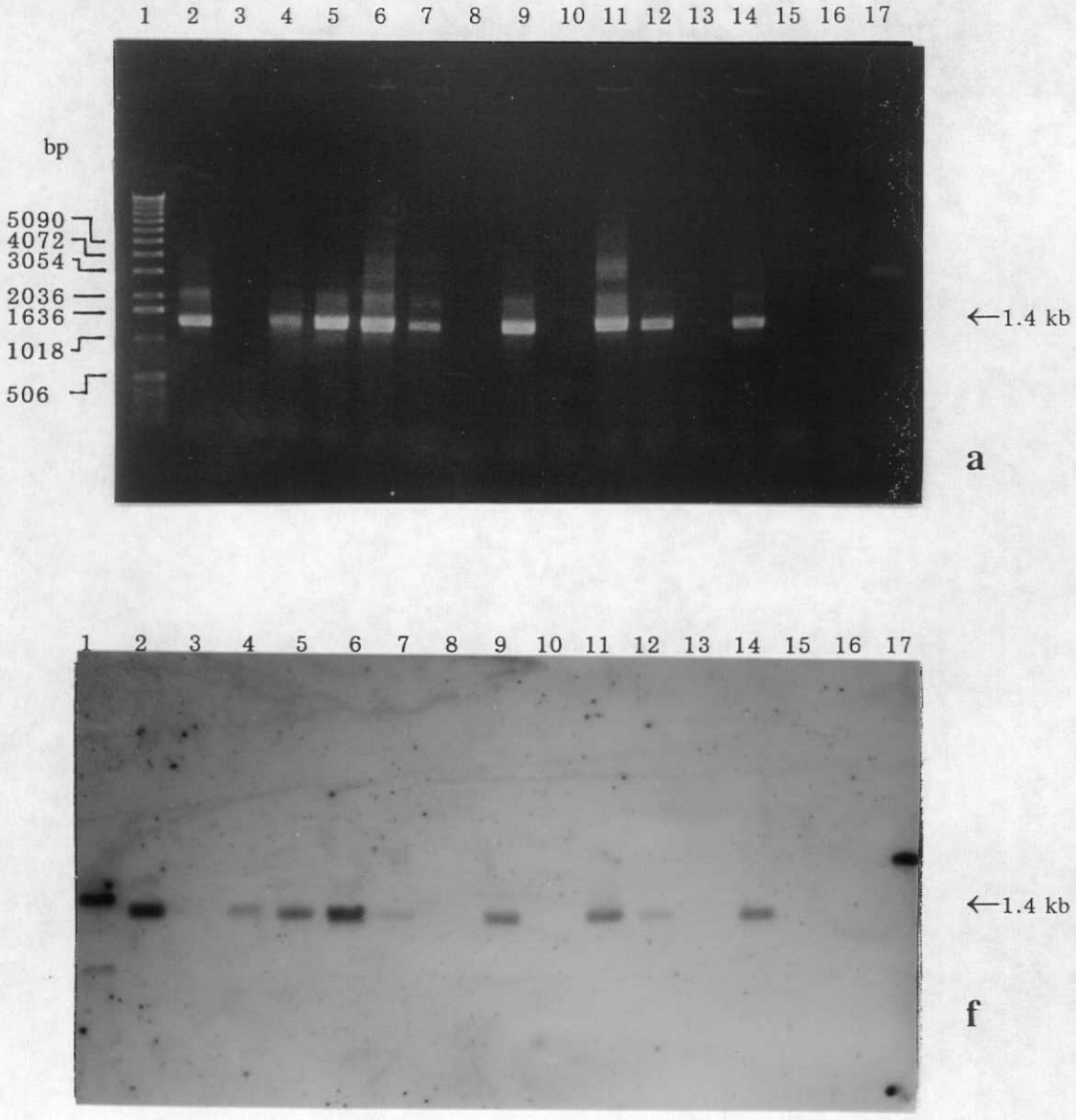
ery, erythromycin; *rap*, rapamycin

b) Type II PKS



act, actinorhodin; *gra*, granaticin; *tcm*, tetracenomycin; *jad*, jadomycin; *gri*, griseusin; *fren*, frenolicin

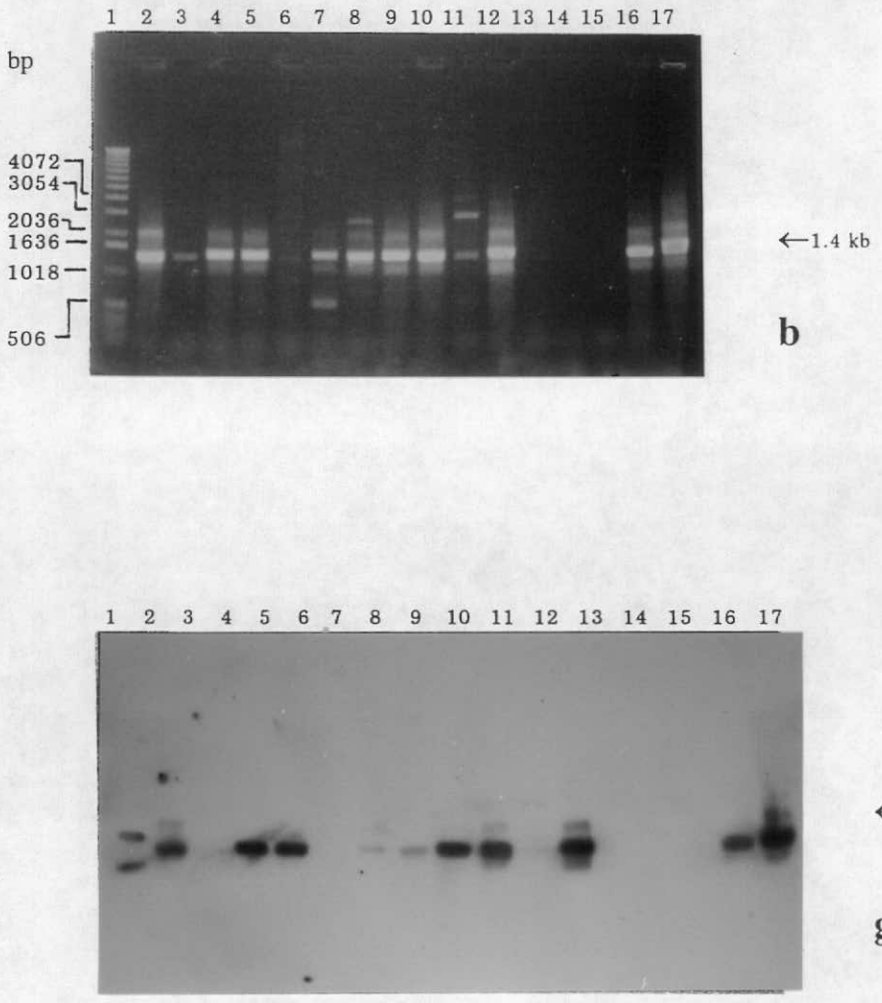
รูปที่ 5 ผลของ PCR บนอะกาโรสเจลและการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามจากยีน TypeI PKS ของ *S. rimosus* M4018



(a) Stained gel and (f) Southern analysis of (a).

1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=AE5b-9, 4=AF5b-17, 5=AM4b-7, 6=AP5b-7, 7=I4d-3, 8=L1d-7, 9=L1d-22, 10=P1d-1, 11=Q4d-1, 12=Y3b-4, 13=AD4b-1, 14=A1a-17, 15=A2a-1, 16=A4a-15, 17=pYT001/*Nco* I+*Nde* I

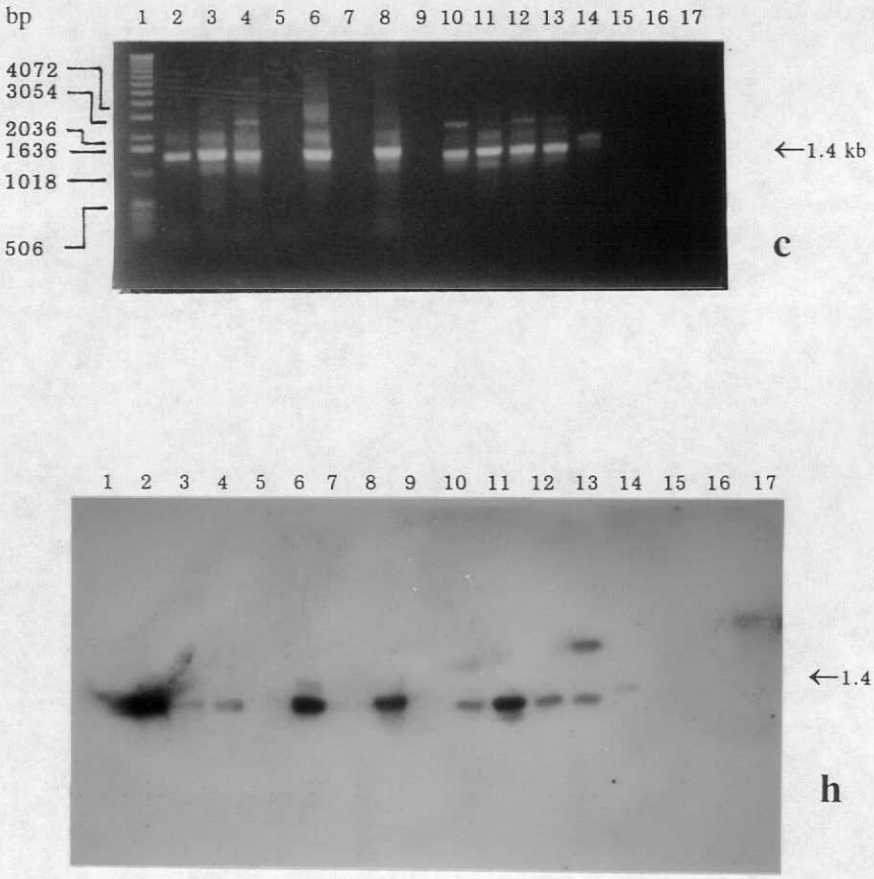
รูปที่ 5 (ต่อ)



(b) Stained gel and (g) Southern analysis of (b).

1=1kb ladder, 2=AE5b-19, 3=AF5b-29, 4=AL2b-2, 5=AM4b-5, 6=AM4b-10, 7=AM4b-13, 8=AM4b-19, 9=AM4b-27, 10=AQ2b-13, 11=AR4b-1, 12=C3b-1, 13=L1d-4, 14=O6b2-5, 15=P1d-3, 16=A1a-14, 17=AI4d-2

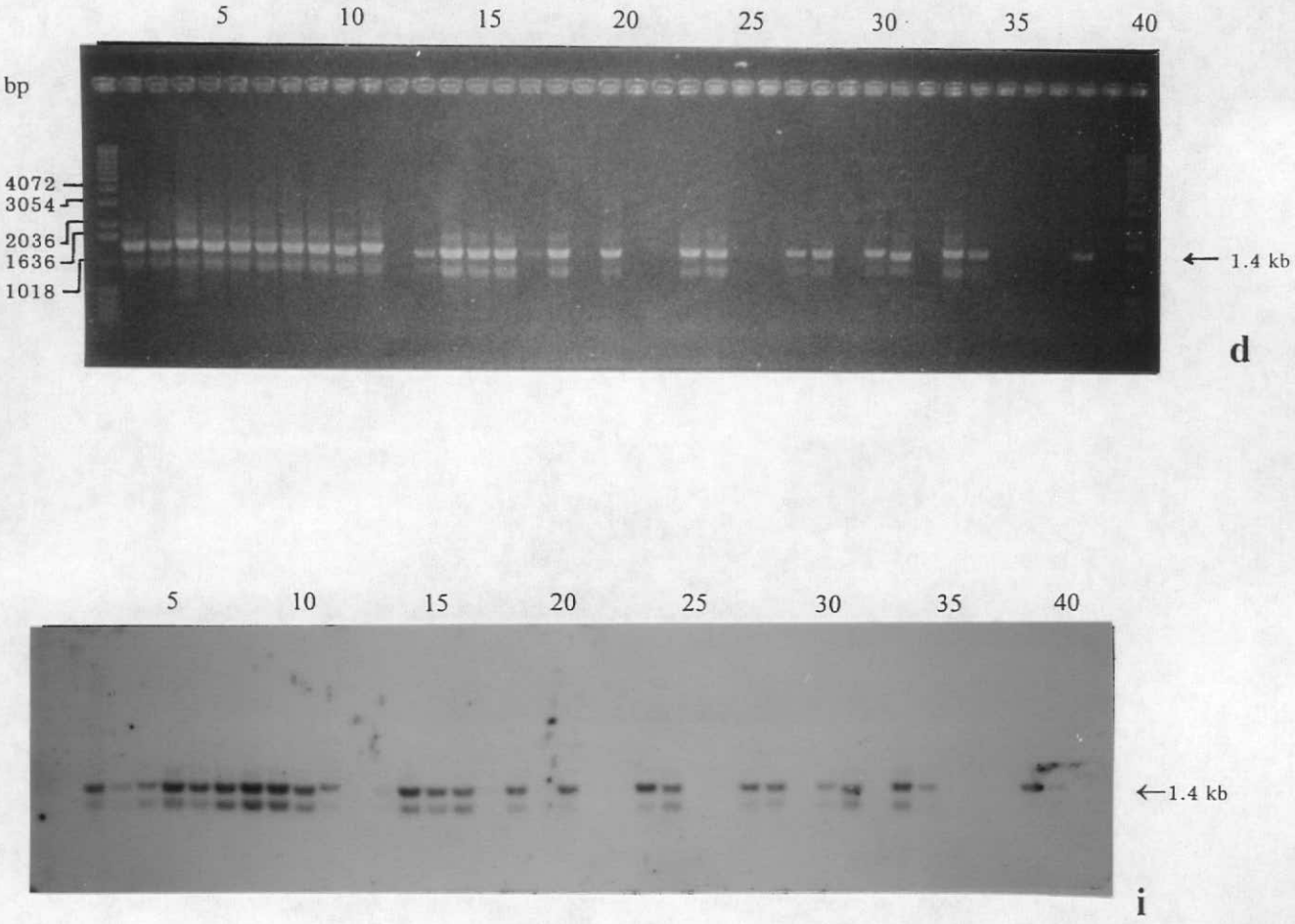
รูปที่ 5 (ต่อ)



(c) Stained gel and (h) Southern analysis of (c).

1=1kb ladder, 2=*S. rimosus* M4018, 3=AE5b-4, 4=AE2b-6, 5=Z4b-15, 6=AE5b-18, 7=F4b-19, 8=Z2b-20, 9=AQ2b-25, 10=F4b-29, 11=AN5b-46, 12=AN5b-47, 13=AN5b-80, 14=Z2b-1, 15=AE2b-4, 16=AE2b-7, 17=AE5b-3

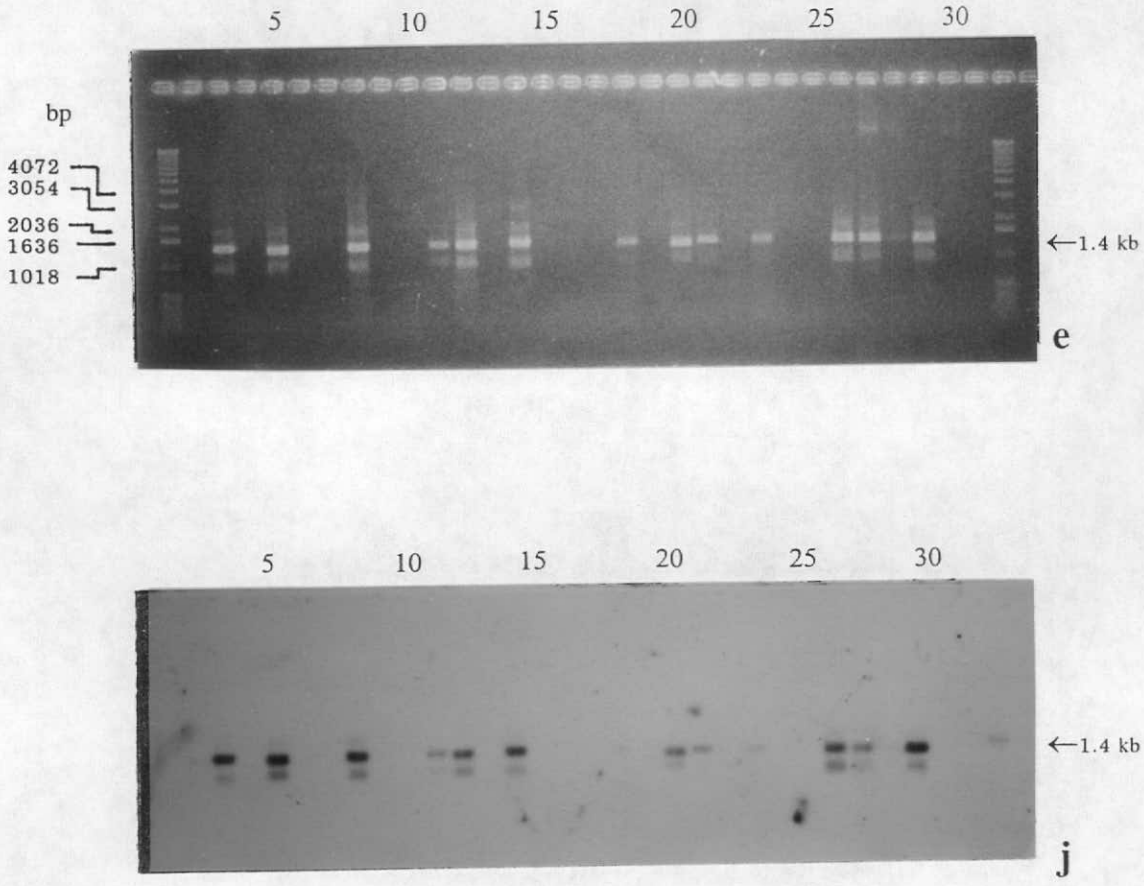
รูปที่ 5 (ต่อ)



(d) Stained gel and (i) Southern analysis of (d).

1=1kb ladder, 2=NOV1, 3=NOV3, 4=NOV5, 5=NOV10, 6=NOV12, 7=NOV17, 8=NOV18, NOV21, 10=A2a-29, 11=A2a-31, 12=A2a-37, 13=A4a-17, 14=A4a-33, 15=A4a-35, 16=A4a-41, 17=F4b-31, 18=G2b-4, 19=I4b-3, 20=L2b-2, 21=O6b2-1, 22=P1b-9, 23=S6c-6, 24=T2b-3, 25=T2b-9, 26=T2b-10, 27=V6c-6, 28=V6c-12, 29=F4b-2, 30=AK5b-13, 31=F4b-14, 32=F4b-16, 33=AN5b-54, 34=Y4b-21, 35=Y4b-24, 36=AE5b-1, 37=AK5b-20, 38=AL2b-1, 39=M4018, 40=1kb ladder

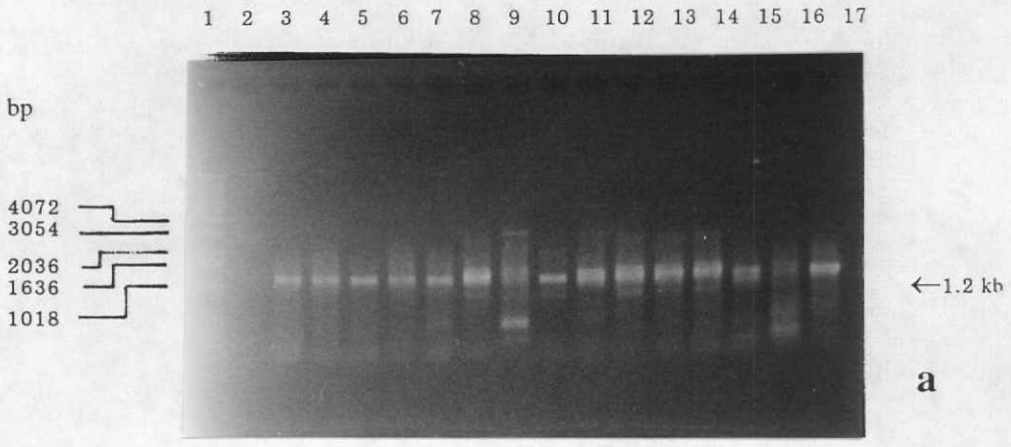
รูปที่ 5 (ต่อ)

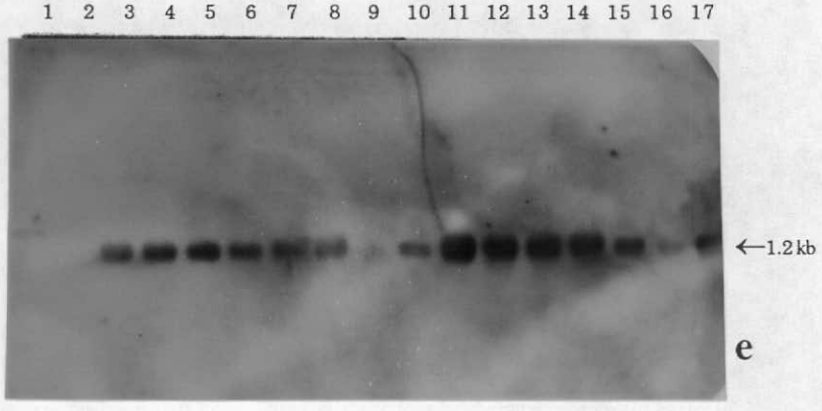


(e) Stained gel and (j) Southern analysis of (e).

1=1kb ladder, 2=*S. rimosus* M4018, 3=AN5b-58, 4=AO4b-6, 5=AP5b-7, 6=D1a-5, 7=D1a-6, 8=Q4d-2, 9=X2a-9, 10=AD4b-1, 11=A2a-23, 12=A4a-3, 13=AE2b-5, 14=AK5b-15, 15=AN5b-96, 16=AR4b-6, 17=D2a-2, 18=D2a-11, 19=D2a-17, 20=F4b-9, 21=*S. rimosus*, 22=*S. lividans*, 23=*S. albus*, 24=*S. coerulescens*, 25=*S. roseoviolaceus*, 26=*S. luteogriseus*, 27=*S. hygroscopicus*, 28=*S. flavoviridis*, 29=*S. griseus*, 30=*S. lividans*, 32=1kb ladder

รูปที่ 6 ผลของ PCR บนอะกาโรสเจลและการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามจากยีน Type II PKS ของ *Streptomyces* sp. AR4b-1

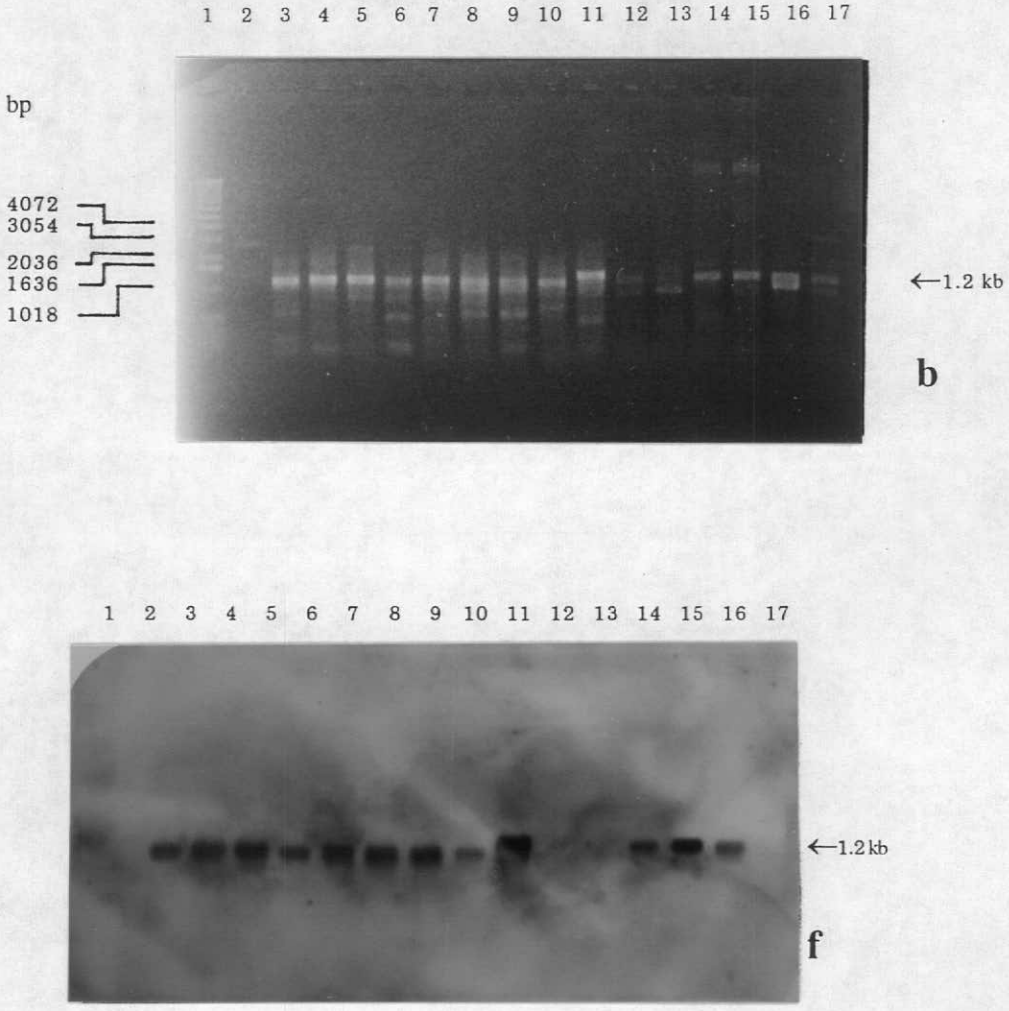




(a) Stained gel and (e) Southern analysis of (a).

1=1kb ladder, 2=pYT004/*Eco*R I+*Hin*d III, 3=NOV10, 4=NOV12, 5=NOV17, 6=NOV18, 7=NOV21, 8=A2a-29, 9=A2a-31, 10=A2a-37, 11=A4a-17, 12=A4a-33, 13=A4a-35, 14=A4a-41, 15=F4b-31, 16=G2b-4, 17=I4b-3

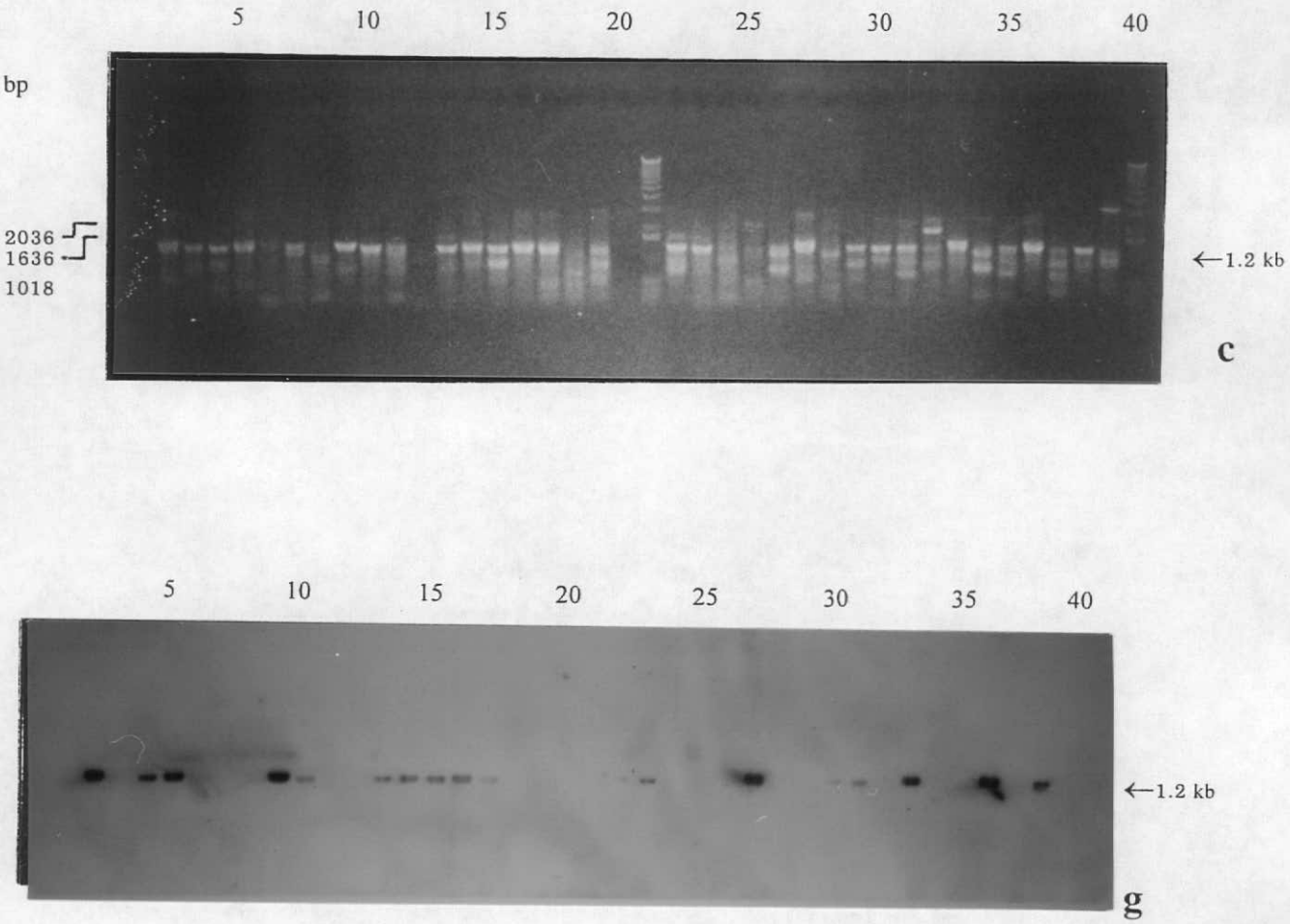
รูปที่6 (ต่อ)



(b) Stained gel and (f) Southern analysis of (b).

1=1kb ladder, 2=pYT004/*Eco*R I+*Hind* III, 3=L2b-2, 4=O6b2-1, 5=P1b-9, 6=S6c-6, 7=T2b-3, 8=T2b-9, 9=T2b-10, 10=V6c-6, 11=V6c-12, 12=*S. coerulescen*, 13=*S. roseoviolaceus*, 14=*S. hygroscopicus*, 15=*S. flavoviridis*, 16=*S. lividans*, 17=*S. rimosus*

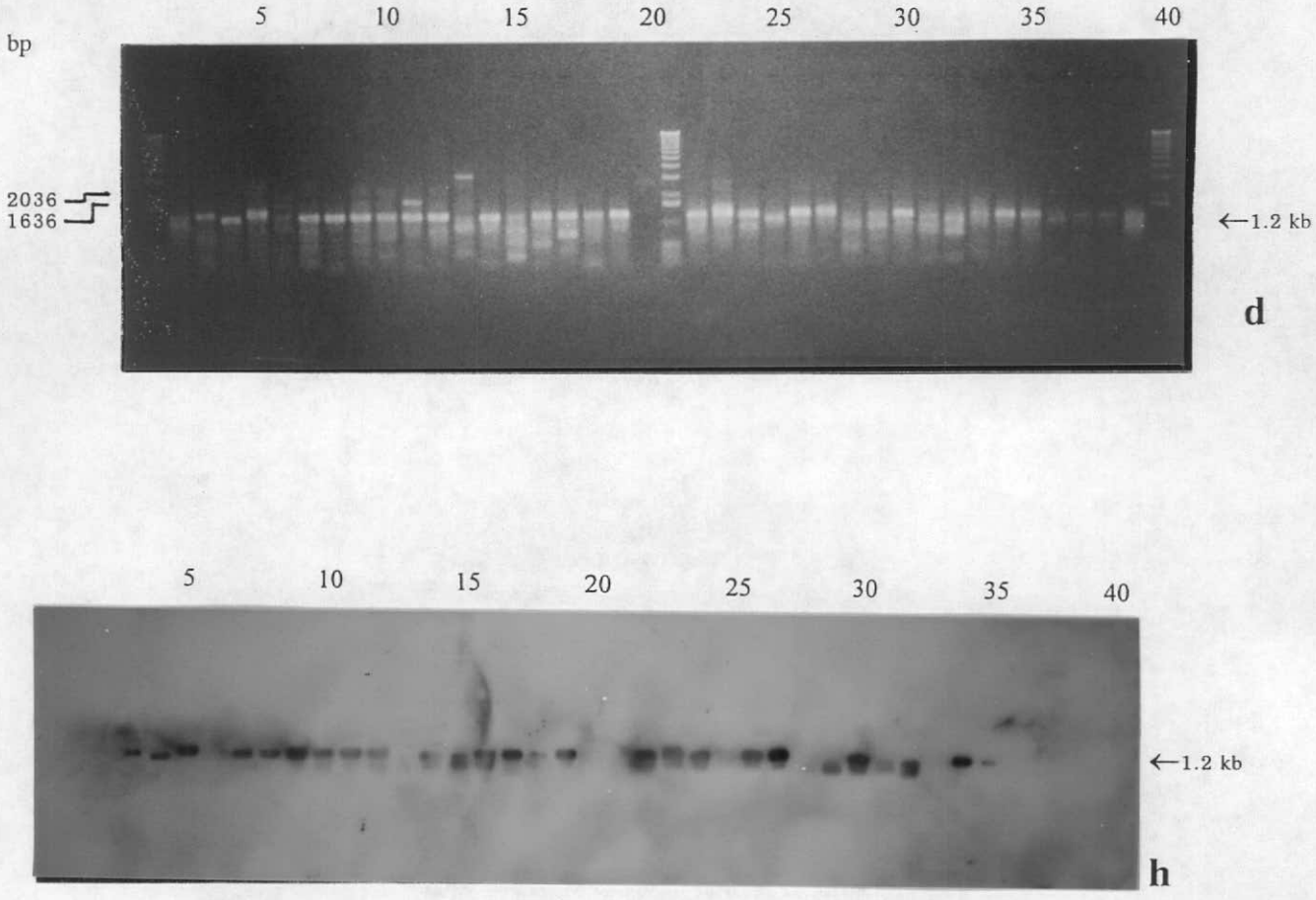
รูปที่ 6 (ต่อ)



(c) Stained gel and (g) Southern analysis of (c).

1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=F4b-2, 4=AE5b-4, 5=AE2b-6, 6=AK5b-13, 7=F4b-14, 8=Z4b-15, 9=F4b-16, 10=AE5b-18, 11=F4b-19, 12=Z2b-20, 13=AQ2b-25, 14=F4b-29, 15=AN5b-46, 16=AN5b-47, 17=AN5b-54, 18=Y4b-21, 19=Y4b-24, 20=pYT004/*Eco*R I+*Hin*d III, 21=1kb ladder, 22=Z2b-1, 23=AE2b-4, 24=AE2b-7, 25=AE5b-1, 26=AE5b-3, 27=AE5b-19, 28=AF5b-17, 29=AF5b-29, 30=AK5b-20, 31=AL2b-1, 32=AL2b-2, 33=AM4b-7, 34=AM4b-10, 35=AM4b-13, 36=AM4b-19, 37=AM4b-27, 38=AN5b-58, 39=AO4b-6, 40=1kb ladder

รูปที่ 6 (ต่อ)



(d) Stained gel and (h) Southern analysis of (d).

1=1kb ladder, 2=AP5b-7, 3=AR4b-1, 4=C3b-1, 5=D1a-5, 6=D1a-6, 7=I4d-3, 8=L1d-4, 9=L1d-7, 10=L1d-22, 11=O6b2-5, 12=P1d-1, 13=P1d-3, 14=Q4d-1, 15=Q4d-2, 16=X2a-9, 17=Y3b-4, 18=AD4b-1, 19=AHb-16, 20=pYT004/*Eco*R I+*Hin*d III, 21=1kb ladder, 22=A1a-14, 23=A1a-17, 24=A2a-1, 25=A2a-23, 26=A4a-3, 27=A4a-15, 28=AE2b-5, 29=AI4d-2, 30=AK5b-15, 31=AN5b-96, 32=AR4b-6, 33=D2a-2, 34=D2a-11, 35=D2a-17, 36=F4b-9, 37=NOV1, 38=NOV3, 39=NOV5, 40=1kb ladder

1.2 การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหายีน Type I และ Type II PKS

S. rimosus M4018, *S. albus*, *S. lividans*, *S. coerulescens*, *S. roseoviolaceus*, *S. hygroscopicus*, *S. flavoviridis* รวมทั้ง *Streptomyces* 96 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทยถูกสุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะบางประการ เช่น สีสปอร์ สีไมซีเลียม และความสามารถในการสร้าง diffusible pigment (อรินทิพย์และจรีรัตน์ 2539) นำมาสกัดดีเอ็นเอและหายีน Type I และ Type II PKS ด้วยเทคนิค PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนดังกล่าวข้างต้น

เมื่อใช้ไพรเมอร์ AT01 และ AT02 สำหรับ Type I PKS พบว่า *Streptomyces* 65 สายพันธุ์ รวมทั้ง *S. rimosus* M4018 ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นชิ้นส่วนขนาด 1.4 กิโลเบส คิดเป็นสัดส่วน 64% ของสายพันธุ์ที่สุ่มตรวจ ดังแสดงในรูปที่ 5 (a, b, c, d และ e)

S. rimosus M4018 สามารถผลิต oxytetracycline โดยอาศัย Type II PKS (Hunter and Hill, 1998) เมื่อนำดีเอ็นเอของ *S. rimosus* 4018 มาเป็นต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Type I PKS พบว่าสามารถให้ผลผลิตเป็นชิ้นส่วนขนาด 1.4 กิโลเบสด้วย แสดงว่า *S. rimosus* M4018 นี้มียีน Type I PKS อยู่ด้วย

นอกจาก oxytetracycline แล้วยังพบว่า *S. rimosus* ผลิต rimocidin (Cope *et al.*, 1965) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น polyene ขนาดใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่ม Type I polyketide ดังนั้น ผลผลิตจาก PCR ที่ได้จาก *S. rimosus* M4018 จึงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดนี้

สำหรับ Type II PKS เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 สายสำหรับการทำ PCR และคาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 3 ปรากฏว่ามีเพียงคู่ไพรเมอร์ AT03 และ AT05 ที่สามารถให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ตามที่คาด สำหรับไพรเมอร์คู่อื่น ๆ ให้ผลิตภัณฑ์ไม่ได้ขนาดตามที่คาดและยังให้ชิ้นดีเอ็นเอหลายขนาดแตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) จึงคาดว่าไพรเมอร์เหล่านั้นไม่มีความเหมาะสม ในการทดลองต่อมาจึงอาศัยเฉพาะไพรเมอร์คู่นี้ในการตรวจหายีนสำหรับ Type II PKS อย่างไรก็ตามในการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์คู่นี้ยังคงได้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดอื่น ๆ ซึ่งไม่จำเพาะ (non-specific) รวมอยู่ด้วย จึงได้ปรับปรุงใช้วิธี 'touch down' PCR (วิธีทดลองข้อ 4.1) เพื่อช่วยกำจัดชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะอื่น ๆ พบว่าได้ผลดีขึ้น สามารถเพิ่มชิ้นส่วนขนาด 1.2 กิโลเบสใน *Streptomyces* 98 สายพันธุ์ คิดเป็น 96% ของสายพันธุ์ที่สุ่มตรวจ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอบางสายพันธุ์แสดงไว้ในรูปที่ 6 (a, b, c และ d)

2. การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

2.1 การโคลนและการโคลนย่อยผลิตภัณฑ์ Type I PKS

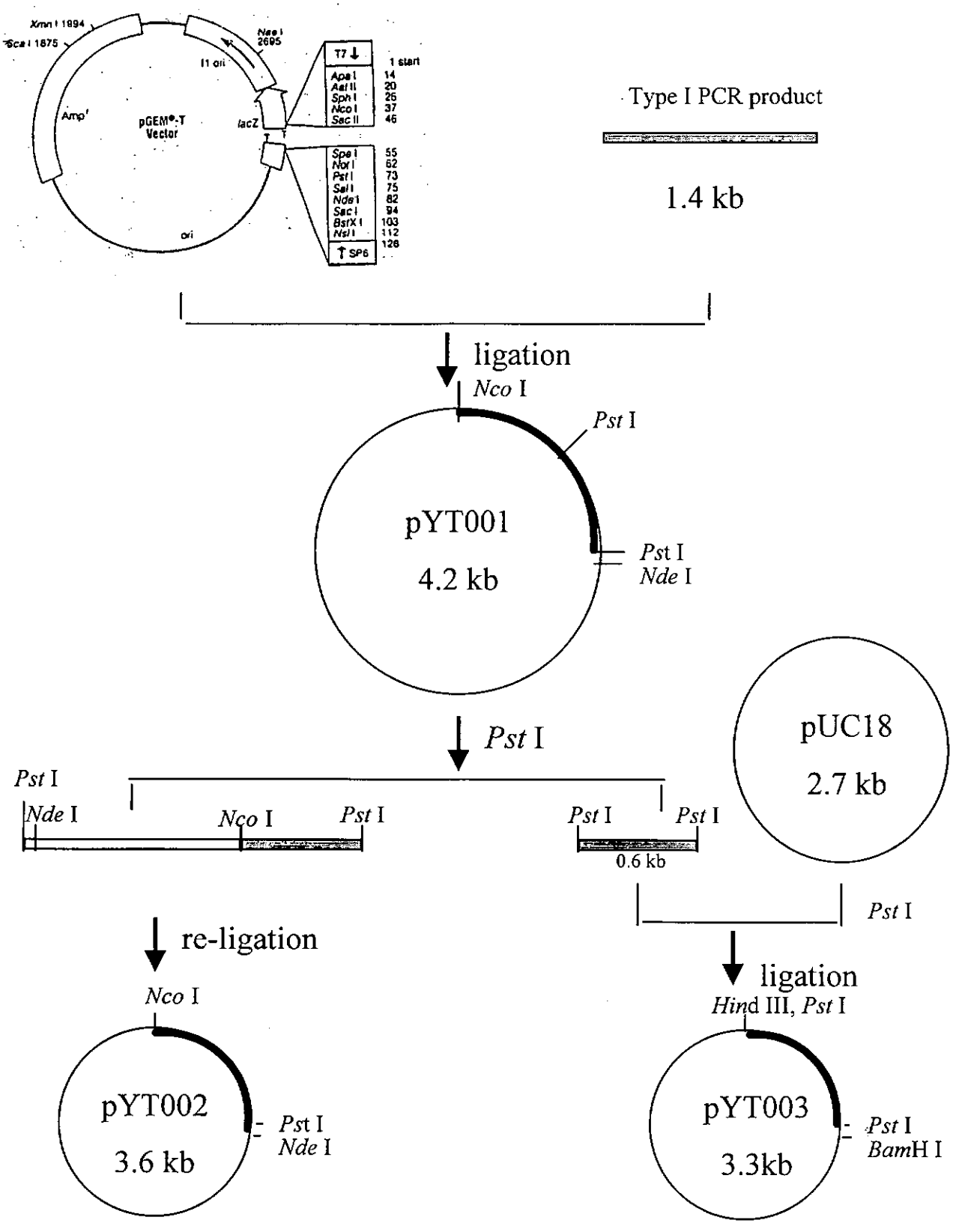
ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1.4 กิโลเบสของ *S. rimosus* M4018 ถูกนำมาโคลนเข้ากับพลาสมิด pGEM-T ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้ชื่อว่า pYT001 และทำการโคลนย่อยดังแสดงในรูปที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYT001 ขนาดประมาณ 4.2 กิโลเบส นำมาโคลนย่อยโดยการตัดด้วย *Pst* I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.6 และ 0.6 กิโลเบส ทำการเชื่อมกลับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.6 กิโลเบส ให้ชื่อเป็นพลาสมิด pYT002 สำหรับชิ้นส่วน 0.6 กิโลเบสถูกโคลนเข้าสู่ pUC18 ได้พลาสมิด pYT003

จากการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYT001 พบว่ามีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กกว่าที่คาด อาจเกิดจากโคลนที่คัดมานี้ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่สมบูรณ์ ได้ลองโคลนผลิตภัณฑ์ขนาด 1.4 กิโลเบสอีกหลายครั้ง แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีชิ้นส่วนสมบูรณ์

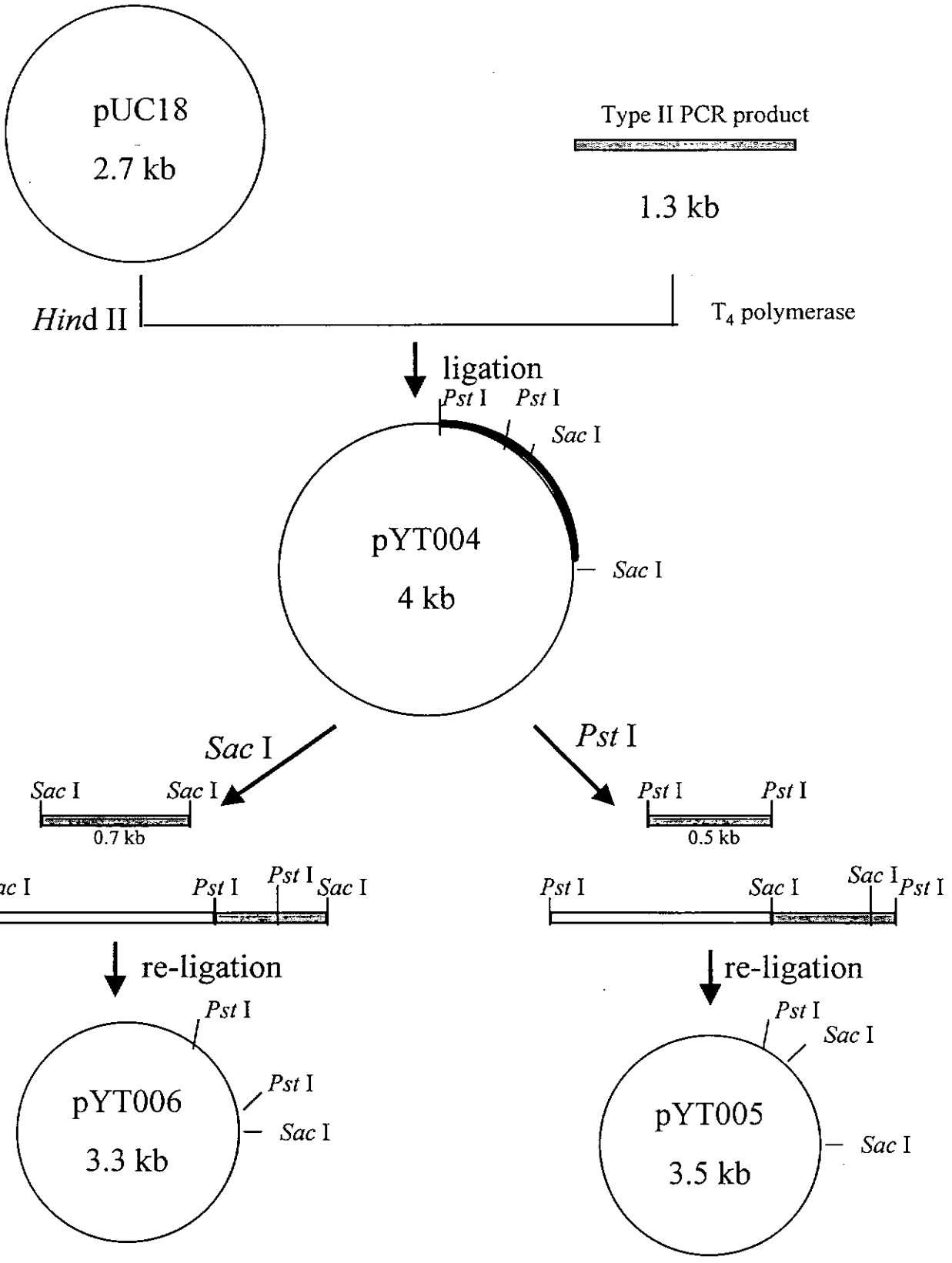
2.2 การโคลนและการโคลนย่อยผลิตภัณฑ์ Type II PKS

ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1.3 กิโลเบสของ *Streptomyces* sp. AR4b-1 ถูกนำมาโคลนเข้าสู่พลาสมิด pUC18 ได้พลาสมิด pYT004 และทำการโคลนย่อยดังแสดงในรูปที่ 8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYT004 ขนาดประมาณ 4 กิโลเบส นำมาโคลนย่อยโดยการตัดด้วย *Pst* I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.5 กิโลเบสและ 0.5 กิโลเบส ทำการเชื่อมกลับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.5 กิโลเบสได้พลาสมิด pYT005 เมื่อนำพลาสมิด pYT001 มาตัดด้วย *Sac* I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 และ 0.7 กิโลเบส ทำการเชื่อมกลับชิ้นดีเอ็นเอ 3.3 กิโลเบส ให้ชื่อเป็น pYT006

รูปที่ 7 แผนภาพแสดงการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของ Type I ของ S. rimosus M4018



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของ Type II ของ *Streptomyces* sp. AR4b-1



3. การวิเคราะห์ยีน Type I และ Type II PKS โดยใช้เทคนิค Southern hybridization

นำพลาสมิด pYT001 (รูปที่ 7) มาตัดแยกชิ้นรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส ออกด้วยเอนไซม์ *Nde* I และ *Nco* I แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลตามวิธีทดลองข้อ 5.1 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาเป็นตัวติดตามในการทำ Southern Hybridization ปรากฏว่าชิ้นส่วน 1.4 กิโลเบสจากสายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถไฮบริไดซ์ได้กับตัวติดตาม ดังรูปที่ 5 (f, g, h, i และ j)

สำหรับชิ้นส่วน PCR ที่ได้จากการโคลนผลิตภัณฑ์ Type II ของ *Streptomyces* sp. AR4b-1 ในพลาสมิด pYT004 ถูกนำมาตัดชิ้นรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส ออกด้วย *Eco*R I และ *Hind* III เพื่อเป็นตัวติดตามในการทำ Southern analysis พบว่าสามารถไฮบริไดซ์กับชิ้นส่วน 1.2 กิโลเบสจากอีกหลายสายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 6 (e, f, g และ h)

ผลของการตรวจหายีน Type I และ Type II PKS โดยวิธี PCR และ Southern analysis ของแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 2) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอจาก pYT001 สามารถให้ผล cross hybridize กับ *Streptomyces* 62 สายพันธุ์ คิดเป็น 61% ของสายพันธุ์ที่สุ่มตรวจ ขณะที่ชิ้นดีเอ็นเอจากโคลนของ *Streptomyces* sp. AR4b-1 ให้ผล positive กับ *Streptomyces* 54 สายพันธุ์ คิดเป็น 53% ของสายพันธุ์ที่นำมาสุ่มตรวจ

ผลจากการเพิ่มชิ้นส่วนยีนด้วย PCR และการยืนยันด้วยวิธี Southern analysis ของ Type I PKS มีความแตกต่างกันเพียง 3% (PCR=64%, Southern analysis=61%) อธิบายได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ (AT01 และ AT02) มีความจำเพาะค่อนข้างสูงต่อยีน Type I PKS ในหลายสายพันธุ์ เป็นผลให้ 95% ของสายพันธุ์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR สามารถ cross hybridize กับตัวติดตาม สำหรับ Type II PKS ผลจากการทำ PCR และ Southern analysis มีความแตกต่างกันถึง 43% (PCR=96%, Southern analysis=53%) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของยีน KS_{α}-KS_{β} มีความแตกต่างกันมากในแต่ละสายพันธุ์ ควรจะทดลองปรับสภาวะการทำ Hybridization เช่น ลดอุณหภูมิเพื่อตรวจสอบว่าดีเอ็นเอติดตามเกิด cross-hybridize ได้มากขึ้นหรือไม่ อนึ่ง การที่ยีน KS-AT ที่ใช้เป็นตัวติดตาม Type I PKS สามารถเกิด cross-hybridize ได้กับสายพันธุ์ส่วนใหญ่อาจมีผลมาจากการที่ Type I PKS มียีน KS-AT ซ้ำกันอยู่มาก (1 โมดุลมี 1 ชุด) จึงมีชิ้นดีเอ็นเออยู่หลายซ้ำในแถบ PCR ซึ่งต่างจาก KS_{α}-KS_{β} ที่อาจมีเพียง 1 หรือ 2 ซ้ำเท่านั้นขึ้นอยู่กับจำนวนชนิดของ Type II polyketide ที่เชื้อนั้น ๆ สร้าง

นอกจากนี้พบว่ามีบางสายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดแตกต่างจากที่ประมาณไว้ แต่ยังคงให้ผล cross hybridize กับตัวติดตาม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์เหล่านี้มียีน PKS ในรูปแบบที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น (ดูรูปที่ 2 ประกอบ) จึงให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างไป ตัวอย่างเช่น *Streptomyces* sp. Z2b-1 และ *Streptomyces* sp. F4b-14 ให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ Type I PKS ขนาดเล็กกว่าที่คาด ขณะที่ *Streptomyces* sp. V6c-12 และ *Streptomyces* sp. AI4d-2 ให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ Type II PKS ใหญ่กว่าที่คาด ผลการตรวจหายีน Type I และ Type II PKS โดยวิธี PCR และ Southern analysis ของแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทำ PCR และ Southern analysis ของสายพันธุ์ทดสอบ

strain	KU no.	Type I		Type II	
		PCR	southern	PCR	southern
S. rimosus M4018		+	+	+	+
S. lividans 1326		-	-	+	+
S. albus		+	+	ND	ND
S. coerulescens ISP5146		-	-	+	-
S. roseoviolaceus ISP5277		-	-	+	-
S. luteogriseus ISP5486		ND	ND	ND	ND
S. hygroscopicus KA1211		+	+	+	+
S. flavoviridis KA1153		+	+	+	+
S. griseus KA1198		+	+	ND	ND
S. lateritius KA1228		ND	ND	ND	ND
(V) 1	F4b-1	+	+	+	+
2	F4b-2	-	-	+	-
4	AE5b-4	+	+	+	+
6	AE2b-6	+	+	+	+
13	AK5b-13	+	+	+	-
14	F4b-14	+	+	+	-
15	Z4b-15	-	-	-	-
16	F4b-16	-	-	+	+
18	AE5b-18	+	+	+	+
19	F4b-19	-	-	+	-
20	Z2b-20	+	+	-	-
25	AQ2b-25	-	-	+	+
29	F4b-29	+	+	+	+
46	AN5b-46	+	+	+	+
47	AN5b-47	+	+	+	+
54	AN5b-54	+	-	+	+
(P) 1	Y4b-21	+	+	-	-

strain	KU no.	Type I		Type II	
		PCR	southern	PCR	southern
2	Y4b-24	-	-	+	-
3	Z2b-1	+	+	+	+
5	AE2b-4	-	-	+	+
6	AE2b-7	-	-	+	-
7	AE5b-1	-	-	+	-
8	AE5b-3	-	-	+	-
10	AE5b-19	+	+	+	+
12	AF5b-17	+	+	-	-
13	AF5b-29	+	-	+	-
15	AK5b-20	-	-	+	+
16	AL2b-1	+	+	+	+
17	AL2b-2	+	+	+	-
20	AM4b-7	+	+	+	+
21	AM4b-10	+	-	+	+
22	AM4b-13	+	+	+	-
23	AM4b-19	+	+	+	+
24	AM4b-27	+	+	+	-
26	AN5b-58	+	+	+	+
27	AO4b-6	-	-	+	-
28	AP5b-7	+	+	+	-
30	AR4b-1	+	+	+	+
32	C3b-1	+	+	+	+
33	D1a-5	-	-	+	+
34	D1a-6	-	-	+	-
38	I4d-3	+	+	+	+
39	L1d-4	-	-	+	+
40	L1d-7	-	-	+	+
41	L1d-22	+	+	+	+
42	O6b2-5	-	-	+	+

strain	KU no.	Type I		Type II	
		PCR	southern	PCR	southern
43	P1d-1	+	+	+	+
44	P1d-3	-	-	+	-
46	Q4d-1	+	+	+	+
47	Q4d-2	+	+	+	+
48	X2a-9	-	-	+	+
49	Y3b-4	+	+	+	+
50	AD4b-1	-	-	+	+
51	AHb-16	-	-	+	+
52	A1a-14	+	+	+	+
53	A1a-17	+	+	+	+
54	A2a-1	-	-	+	+
55	A2a-23	+	+	+	-
56	A4a-3	+	+	+	+
57	A4a-15	-	-	+	+
58	AE2b-5	-	-	+	-
59	AI4d-2	+	+	+	+
60	AK5b-15	+	+	+	+
61	AN5b-96	-	-	+	+
62	AR4b-6	-	-	+	+
63	D2a-2	-	-	+	-
64	D2a-11	+	+	+	+
65	D2a-17	-	-	+	+
66	F4b-9	+	+	+	-
(T) 1	NOV1	+	+	+	-
2	NOV3	+	+	+	-
3	NOV5	+	+	+	-
4	NOV10	+	+	+	+
5	NOV12	+	+	+	+
6	NOV17	+	+	+	+

strain	KU no.	Type I		Type II	
		PCR	southern	PCR	southern
7	NOV18	+	+	+	+
8	NOV21	+	+	+	+
9	A2a-29	+	+	+	+
10	A2a-31	+	+	+	-
11	A2a-37	-	-	+	+
12	A4a-17	+	+	+	+
13	A4a-33	+	+	+	+
14	A4a-35	+	+	+	+
15	A4a-41	+	+	+	+
16	F4b-31	+	+	+	+
17	G2b-4	+	+	+	+
18	I4b-3	-	-	+	+
19	L2b-2	+	+	+	+
20	O6b2-1	-	-	+	+
21	P1b-9	-	-	+	+
22	S6c-6	+	+	+	+
23	T2b-3	+	+	+	+
24	T2b-9	-	-	+	+
25	T2b-10	-	-	+	+
26	V6c-6	+	+	+	+
27	V6c-12	+	+	+	+

ND = not determine

4. การหาลำดับเบสและการเปรียบเทียบลำดับสายดีเอ็นเอ

ก่อนที่จะทำการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ของ Type I และ Type II PKS ชิ้นส่วน PCR บางสายพันธุ์ถูกนำมาทดลองทำการหาลำดับเบสบางส่วน (partial sequencing) โดยตรงจากชิ้นส่วน PCR โดยเลือกชิ้น PCR ของ *Streptomyces* sp. AN5b-46 และ *S. rimosus* M4018 เป็นตัวแทนของ Type I PKS และ *Streptomyces* sp. AR4b-1 เป็นตัวแทนของ Type II PKS ซึ่งพบว่าข้อมูลของลำดับเบสเมื่อแปรเป็นกรดอะมิโนแล้ว แสดงให้เห็นว่าเป็นยีน Type I และ Type II PKS จริง โดยมีลำดับกรดอะมิโนเช่นเดียวกับยีน Type I PKS ของ erythromycin จาก *Sac. erythraea* และยีน Type II PKS ได้แก่ CurB จาก curamycin (*S. cyaneus*); whiE orfIV จาก *S. coelicolor*; β-ketoacyl synthase จาก *S. halstedii* และ tcmL จาก tetracenomycin (*S. glaucescens*) แสดงในรูปที่ 9

รูปที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Type I และ Type II PKS กับลำดับในฐานข้อมูล

a) *Streptomyces* sp. AN5b-46 กับ erythronolide synthase จาก *Sac. erythraea*

```
AN5b-46:      2 LHXAVXSVRXGXCRLALAGGVTVXTNSDSFXRFXXLGAXAPDGRSKAFXEXADGISFXEG 61
                LH A  S+R G C LA+AGGV+V    + F  F   G  A DGR KAF   ADG  F EG
Ery syn:   1664 LHSACGSLRDGDCGLAVAGGVSVMAGPEVFTEFSRQGGLAVDGRCKAFSAEADGFGFAEG 1723
```

b) *S.rimosus* M4018 กับ erythronolide synthase จาก *Sac. erythraea*

```
S.rimosus 4018:  1  VDTACSSPLVAVHLACQALRAGECPLAVAGGVSAALGPEISAASARWRMYSPTGRCRAFD 60
                    VDTACSS LVAVHLACQ+LR GE  LA+AGGV+    P +    +R    +P GRC+AF
Ery syn:       673  VDTACSSSLVAVHLACQSLRRGESSLAMAGGVTVMPTPGMLVDFSRMNSLAPDGRCKAFS 732

S.rimosus 4018:  61 AGADGYLRAEGCGMVVLKLLAAAQHDGDRVLAVLPGSAVNQEGRSDQLTVPSSQAQAAMF 120
                    AGA+G+  AEG GM++L+ L+ A+ +G  VLAVL G+AVN +G S+ L+ P+ +AQ  +
Ery syn:       733 AGANGFGMAEGAGMLLLERLSDARRNGHPVLAVLRGTAVNSDGASNGLSAPNGRAQVRVI 792

S.rimosus 4018:121 TEALPPPGLKPARLGMLKRTAPAPPLG 147
                     +AL   GL PA +  ++       LG
Ery syn:       793 QQALAESGLGPADIDAVEAHGTGTRLG 819
```

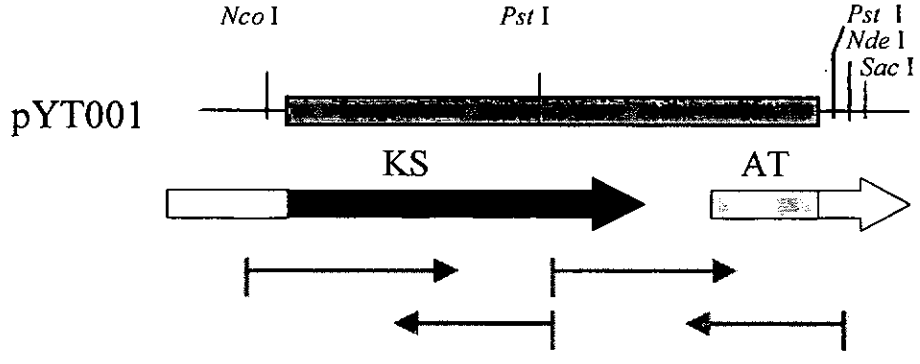
c) *Streptomyces* sp. AR4b-1 กับ CurB จาก curamycin (*S. cyaneus*); whiE orfIV จาก *S. coelicolor*; β-ketoacyl synthase จาก *S. halstedii* และ tcmL จาก tetracenomycin (*S. glaucescens*)

```
AR4b-1:     5 RGAAVTGIGVVATQRTGHRAYWKSVREGLGVLDLITREGCEHLPLRVAGEVRSFDPAAFI 64
CurB  :    11 RRTAVTGIGVVAPNGLHADTYWKSVKEGASVLDRITREGCEHLPLRVAGEVRGFDPSALI 70
whiEIV:  12 GSRRAVVTGLGVLSPHGTGVEAHWKAVADGTSSLGPVTREGCAHLPLRVAGEVHGFDAAE 71
S.hal :  2 SAPRRAVVTGLGVVAPHGIGAETFWKTAVDGTSSLARIDREGCGHLPLKIAGQVPDFDPA 61
tcmL  :         9 VTGLGIVAPNGTGTEEYWAATLAGKSGIDVIQRFDPHGYPVRVGGEVLAFDAAAHL 64
                  ***** *          *     *         *     *    * *  **
```

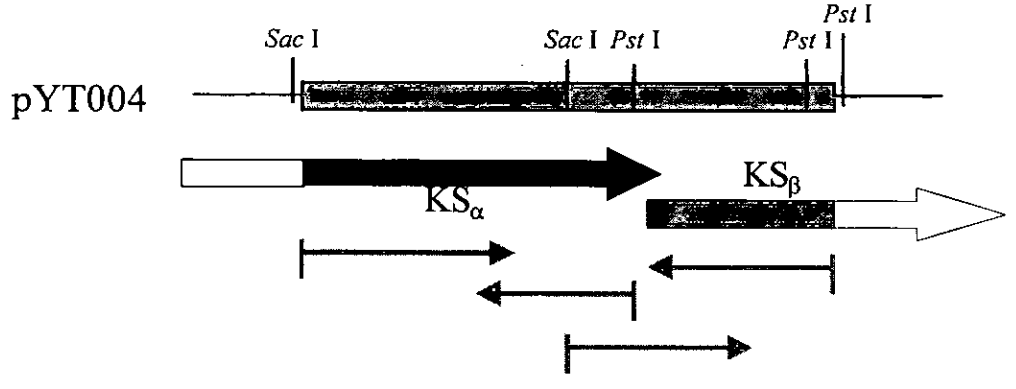
จากข้อมูลของกรดอะมิโนสามารถยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นส่วนของยีน Type I และ Type II PKS จึงได้ทำการหาลำดับเบสทั้งหมดของชิ้น PCR ของ Type I และ Type II จากพลาสมิด pYT001 (รูปที่ 7) และ pYT004 (รูปที่ 8) ตามลำดับ โดยทิศทางของการหาลำดับเบสแสดงดังรูปที่ 10 นำลำดับเบสที่ได้แปรรหัสเป็นกรดอะมิโน และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับในฐานข้อมูล จากลำดับของโคลน Type I PKS (pYT001) แสดงให้เห็นบริเวณของยีน KS และ AT (รูปที่ 11) สำหรับลำดับของโคลน Type II PKS (pYT004) แสดงให้เห็นบริเวณของยีน KS_{α} และ KS_{β} รวมทั้งบริเวณที่เป็น translational coupling ซึ่งเป็นลักษณะของยีน Type II PKS ด้วย (รูปที่ 12)

รูปที่ 10 แสดงโคลนและทิศทางในการหาลำดับเบสของของยีน Type I และ Type II PKS

A) Type I PKS



B) Type II PKS



รูปที่ 11 ลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของชิ้นส่วน PCR จากพลาสมิด pYT001 ขนาด 1,224 bp

KS domain →

```
GTCGACACCGCCTGCTCCTCGCCCCTGGTGGCCGTGCACCTGGCGTGCCAGGCGCTGCGGGCCGGAGAGTGTCCGCTGGCGGTG
 V  D  T  A  C  S  S  P  L  V  A  V  H  L  A  C  Q  A  L  R  A  G  E  C  P  L  A  V

GCGGGCGGTGTCTCTGCGGCCCTGGGACCGGAGATCAGTGCGGCTTCGGCCCGGTGGCGGATGTATTCGCCCACCGGCCGGTGC
 A  G  G  V  S  A  A  L  G  P  E  I  S  A  A  S  A  R  W  R  M  Y  S  P  T  G  R  C

CGGGCCTTCGATGCGGGGGCCGACGGTTATCTGCGGGCCGAGGGCTGCGGAGTGGTCGTCCTCAAGCTGCTGGCCGCCGCGCAG
 R  A  F  D  A  G  A  D  G  Y  L  R  A  E  G  C  G  V  V  V  L  K  L  L  A  A  A  Q

CACGACGGGGACCGGGTCCTGGCGGTGCTGCGGGGCTCGGCCGTCAACCAGGACGGCCGCTCCGACCAGCTGACGGTGCCTTCC
 H  D  G  D  R  V  L  A  V  L  R  G  S  A  V  N  Q  D  G  R  S  D  Q  L  T  V  P  S

TCCCAGGCGCAGGCCGCGATGTTCACCGAGGCACTGCGCCGCGCCGGGGTGGAGGCCGGCCGGGTGGGGATGGTGGAGGCGCAC
 S  Q  A  Q  A  A  M  F  T  E  A  L  R  R  A  G  V  E  A  G  R  V  G  M  V  E  A  H

GGCACCGGCACCCCGGTGGGCGACCCGCGGGAGTTCGCCGCGCTGAAGGACGTCTACGGGACGGGGCCCGGACGGTGCGCGATC
 G  T  G  T  P  V  G  D  P  R  E  F  A  A  L  K  D  V  Y  G  T  G  P  G  R  C  A  I

GGGTCGGTGAAGACGAACATCGGTCACACCGAGCCCGCCTCCGGTGTGGTGGGGCTGTTGAAGACCGTCGTGTCTCTGCAGCGG
 G  S  V  K  T  N  I  G  H  T  E  P  A  S  G  V  V  G  L  L  K  T  V  V  S  L  Q  R

GGTCGGGTGCCGGCCAGCTTGCACTTCACCCGGTGGCATCCCGAGATCGATGCCGGCGGGTGCCGGCTGTTCGTGCCGACACAG
 G  R  V  P  A  S  L  H  F  T  R  W  H  P  E  I  D  A  G  G  C  R  L  F  V  P  T  Q

GCGGCCGACTGGCCGGTGCCGGGCCGGCCCCGGCTGGCGGCGGTCTCCTCCTACGGGGTCGGCGGCACGAACGCGCACGTCCTC
 A  A  D  W  P  V  P  G  R  P  R  L  A  A  V  S  S  Y  G  V  G  G  T  N  A  H  V  L
```

C-terminal KS

```
GTCGAGGAAGCCCCCGCCGCAAAGGCCGCGCCGGTTTCCGGTACGGACCGTACGGCCGGGGCCCGGAACCAGACGTTTGTGCTG
 V  E  E  A  P  A  A  K  A  A  P  V  S  G  T  D  R  T  A  G  A  R  N  Q  T  F  V  L

AGTGCCGCTTCGCCGGGTGCGTTGCACCAGACCGCGGCGCGGCTGGCGGACTGGCTGGAAGGGGACGGTGCCGGCCAGCCGCTG
 S  A  A  S  P  G  A  L  H  Q  T  A  A  R  L  A  D  W  L  E  G  D  G  A  G  Q  P  L

CGGGATGTGGCCTACACGCTGGCGGTGCGGCGCTCGCACGGGGCGCACCGGGCGGCTGTGGTGGCCGATGGCCGCAGCGAACTG
 R  D  V  A  Y  T  L  A  V  R  R  S  H  G  A  H  R  A  A  V  V  A  D  G  R  S  E  L

ACCACCGGGCTCAGGCAACTGGCCGCCGGTCGAGCGGCAGTCAACTGCGCCACTGGGCGGGCCGGGGCGCAGGAGTGTGGGGCG
 T  T  G  L  R  Q  L  A  A  G  R  A  A  V  N  C  A  T  G  R  A  G  A  Q  E  C  G  A
```

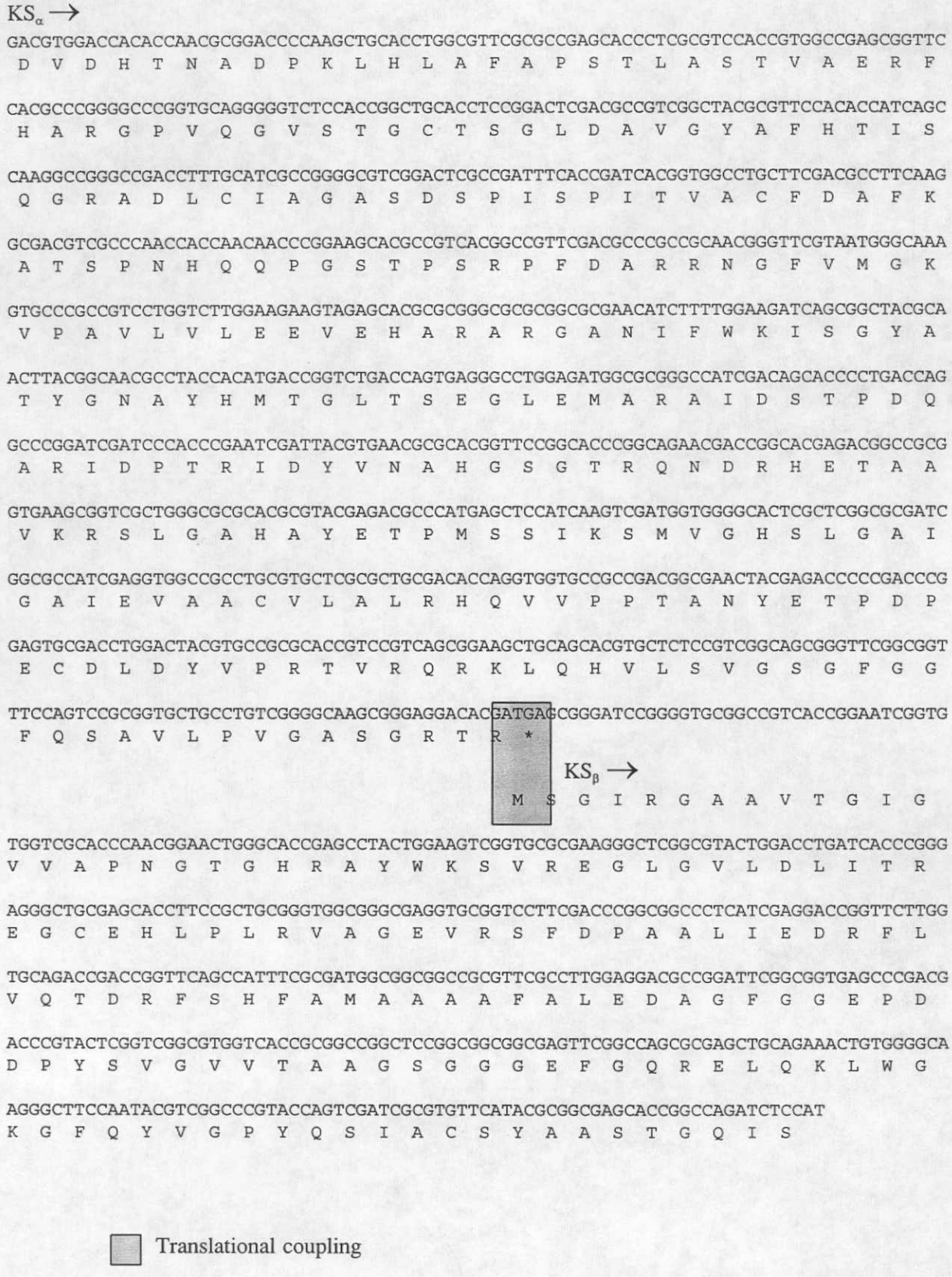
AT domain →

```
GTGTTCGTCTACTCCGGCCACGGCTCGCAATGGGCCCGCATGGGCCAGGGTTTGTTGGGCCGGGATGCGGCGTTCACCGCCGCC
 V  F  V  Y  S  G  H  G  S  Q  W  A  R  M  G  Q  G  L  L  G  R  D  A  A  F  T  A  A

TTGGAGGAGCTGGAGCCGCTGGTGCAGGCGGAGAGCGGCTTCTGCGCT
 L  E  E  L  E  P  L  V  Q  A  E  S  G  F  C  A
```

KS domain AT domain

รูปที่ 12 ลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนของชิ้นส่วน PCR จากพลาสมิด pYT004 ขนาด 1,333 bp



Translational coupling

5. การหาความสัมพันธ์ของ *Streptomyces* ด้วยเทคนิค RAPD

RAPD เป็นอีกวิธีหนึ่งในการตรวจหารูปแบบดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกได้ผลเร็ว ในการทดลองนี้ได้นำ RAPD มาใช้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ *Streptomyces* เพื่อดูความสัมพันธ์ในระดับดีเอ็นเอ โดยนำ *S. rimosus*, *S. lividans* 1326, *S. albus*, *S. coerulescens* ISP5146, *S. roseoviolaceus* ISP5277, *S. luteogriseus* ISP5486, S. *hygroscopicus* KA1211, *S. flavoviridis* KA1153, *S. griseus* KA1198 และ *S. lateritius* KA1228 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถให้รูปแบบดีเอ็นเอจากชุดไพรเมอร์ 40 ชนิด ของ Operon Technologies, INC (USA) สามารถเลือกไพรเมอร์ 4 ชนิดที่ให้รูปแบบที่ชัดเจน โดยมีลำดับของไพรเมอร์ดังนี้

OPAC-04	5′ ACGGGACCTG 3′
OPAE-01	5′ TGAGGGCCGT 3′
OPAE-10	5′ CTGAAGCGCA 3′
OPAE-14	5′ GAGAGGCTCC 3′

นำรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 4 (รูปที่ 13 a, b, c และ d) ไปวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst V.1.11 ของ BIO RAD แผนภาพความสัมพันธ์แสดงดังรูปที่ 14 จากแผนภาพพบว่าจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบถูกจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เรียกกลุ่ม A และ B กลุ่ม A มีสมาชิกประมาณ 91% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด และยังแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยอย่างเด่นชัด (AI และ AII)โดยสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 6 สายพันธุ์ (*S. rimosus*, *S. lividans* 1326, *S. coerulescens* ISP5146, *S. roseoviolaceus* ISP5277, S. *hygroscopicus* KA1211 และ *S. flavoviridis* KA1153) ถูกจัดอยู่รวมกันในกลุ่ม AI กลุ่ม B ประกอบด้วยสมาชิก 9% ซึ่งจากแถบแสดงระดับความคล้ายคลึง จะพบว่าสมาชิกในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ และแตกต่างจากกลุ่ม A อย่างมาก สำหรับสายพันธุ์ *S. albus*, *S. griseus* KA1198, *S. lateritius* KA1211 และ *S. luteogriseus* ISP5486 ไม่ได้นำรูปแบบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้ให้ผลแสดงแถบดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ไม่ชัดเจน

การวิเคราะห์ phylogenic tree โดยใช้ UPGMA algorithm นี้ พบว่าความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดอยู่ที่ประมาณ 97% โดยที่กลุ่ม B มีความสัมพันธ์ห่างไกลกันมากคือมีความสัมพันธ์ใกล้ที่สุดเพียง 73% เท่านั้น

พบว่า *Streptomyces* ในกลุ่ม NOV (ต้านทานต่อ Novobiocin) ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม AII เป็นที่น่าสังเกตว่า สายพันธุ์ NOV1, NOV18, NOV21 และ NOV12 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์ 91-96% เมื่อพิจารณาดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ไม่ได้แสดงผล) ประกอบกับการมียีน Type I และ Type II PKS อาจคาดได้ว่าจะเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด สำหรับ *Streptomyces* กลุ่มอื่นที่พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบของ Type I และ Type II PKS เหมือนกันโดยมีความใกล้ชิดกันมากกว่า 90% นั้นได้แก่ สายพันธุ์ NOV17, A2a-29, F4b-31, A4a-33 และ A4a-41 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม AII เป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่ม AI สายพันธุ์ D2a-2, D2a-17, F4b-9, *S. roseoviolaceus*, A2a-23 และ *S. hygroscopicus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างทาง

ด้านสัณฐานวิทยาและรูปแบบของ Type I และ Type II PKS ค่อนข้างมาก แต่มีค่าความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกว่า 90% แสดงว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจมีลักษณะอื่นใกล้เคียงกัน

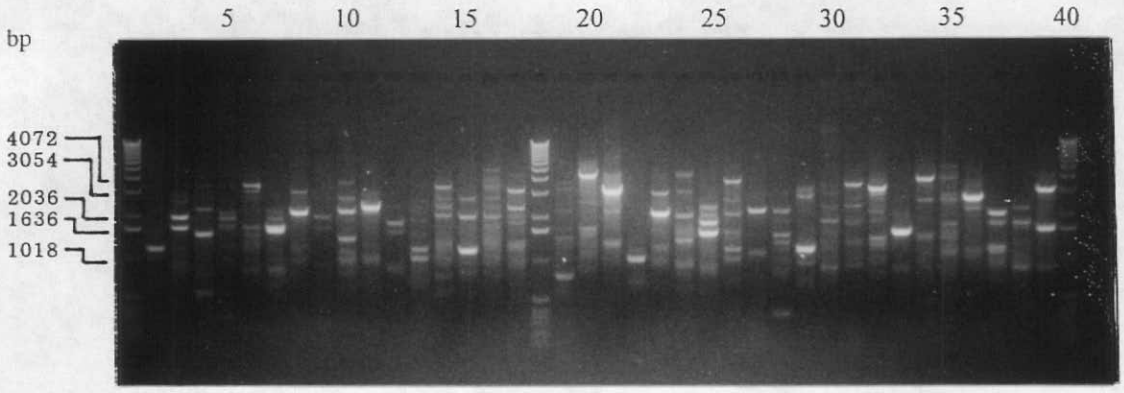
จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า *Streptomyces* 96 สายพันธุ์คัดแยกจากดิน 30 แหล่งแตกต่างกัน (อรินทิพย์ และจรีรัตน์ 2539) แต่บางสายพันธุ์ก็มีความใกล้ชิดกันมาก

เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจพบยีน Type I และ Type II PKS พบว่ามีการกระจายของสายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน PKS อยู่ในทั้งสองกลุ่ม โดยในกลุ่ม A พบสัดส่วนของสายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน Type I PKS 58% Type II PKS 71% สำหรับกลุ่ม B สายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน Type I PKS 89% และ Type II PKS 67% โดยมีสายพันธุ์ที่พบยีน Type I อยู่มากกว่า Type II ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างแตกต่างจากกลุ่มแรก

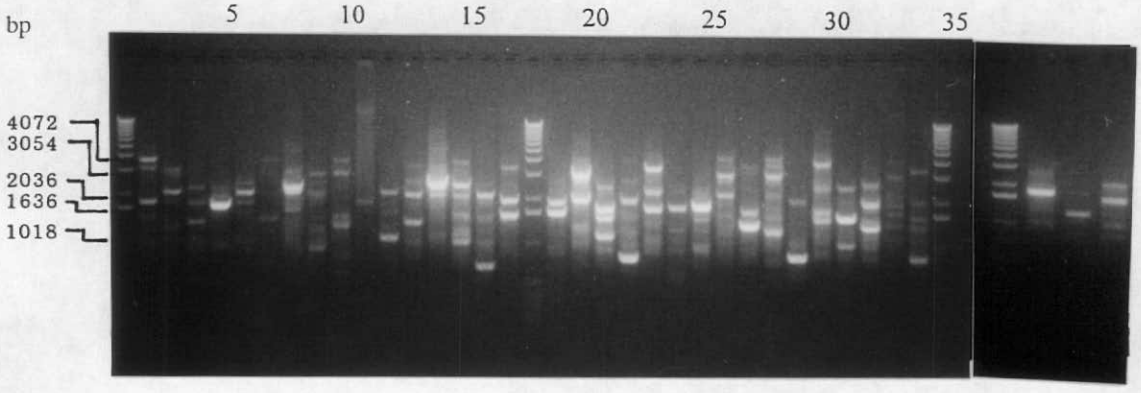
อย่างไรก็ตาม RAPD ยังเป็นเทคนิคที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ในแง่สัณฐานวิทยาได้ไม่ละเอียดนัก และจาก phylogenic tree ก็ยังไม่อาจหาความสัมพันธ์ของ Type I และ Type II PKS ในการแบ่งกลุ่มได้ แสดงว่าการสร้างสาร polyketide ทั้งสองชนิดไม่มีความสัมพันธ์กัน คาดว่าถ้าใช้ลำดับเบสของ 16s RNA ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มาวิเคราะห์ phylogenic tree น่าจะได้รูปแบบของการจัดกลุ่มที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้หากสามารถเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่นำมาวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอ อาจจะได้ผลของความสัมพันธ์ที่ชัดเจนขึ้นด้วย

รูปที่ 13 ผลของ RAPD ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

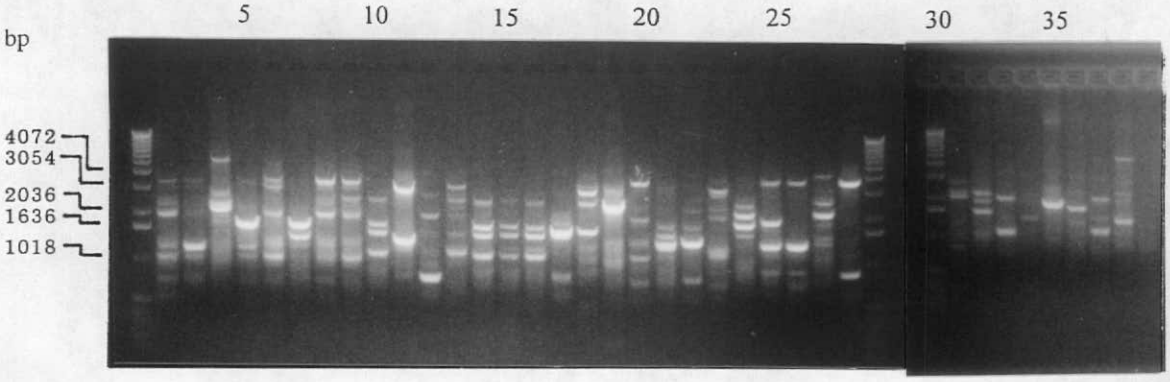
a) AC04



1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=F4b-2, 4=AE5b-4, 5=AE2b-6, 6=AK5b-13, 7=F4b-14, 8=Z4b-15, 9=F4b-16, 10=AE5b-18, 11=F4b-19, 12=Z2b-20, 13=AQ2b-25, 14=F4b-29, 15=AN5b-46, 16=AN5b-47, 17=AN5b-54, 18=1kb ladder, 19=Y4b-21, 20=Y4b-24, 21=Z2b-1, 22=AE2b-4, 23=AE2b-7, 24=AE5b-1, 25=AE5b-3, 26=AE5b-19, 27=AF5b-17, 28=AF5b-29, 29=AK5b-20, 30=AL2b-1, 31=AL2b-2, 32=AM4b-7, 33=AM4b-10, 34=AM4b-13, 35=AM4b-19, 36=AM4b-27, 37=AN5b-58, 38=AO4b-6, 39=AP5b-7, 40=1kb ladder

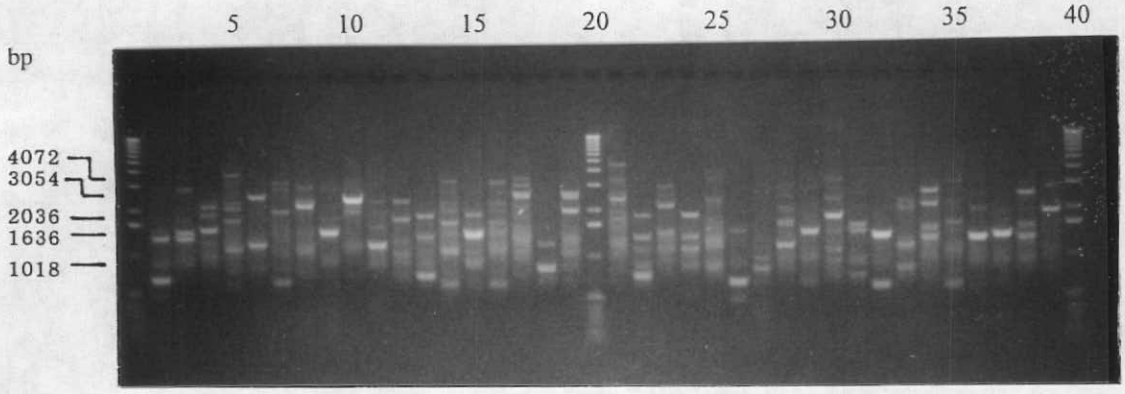


1=1kb ladder, 2=AR4b-1, 3=C3b-1, 4=D1a-5, 5=D1a-6, 6=I4d-3, 7=L1d-4, 8=L1d-7, 9=L1d-22, 10=Ob2-5, 11=P1d-1, 12=P1d-3, 13=Q4d-1, 14=Q4d-2, 15=X2a-9, 16=Y3b-4, 17=AD4b-1, 18=1kb ladder, 19=AHb-16, 20=A1a-14, 21=A1a-17, 22=A2a-1, 23=A2a-23, 24=A4a-3, 25=A4a-15, 26=AE2b-5, 27=AI4d-2, 28=AK5b-15, 29=AN5b-96, 30=AR4b-6, 31= D2a-11, 32=*S. lividans*, 33=*S. albus*, 34=*S. rimosus*, 35,36=1kb ladder, 37=D2a-2, 38=D2a-17, 39=F4b-9

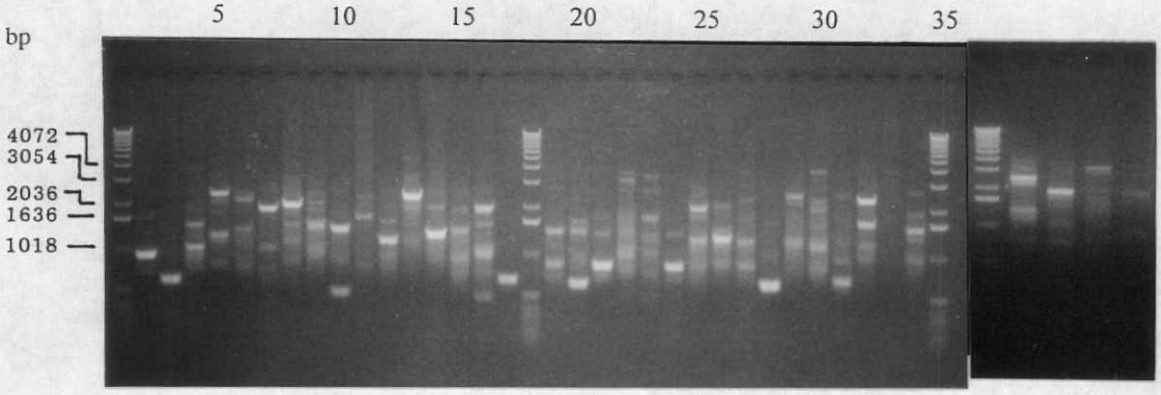


1=1kb ladder, 2=NOV1, 3=NOV3, 4=NOV5, 5=NOV10, 6=NOV12, 7=NOV17, 8=NOV18, 9=NOV21, 10=A2a-29, 11=A2a-31, 12=A2a-37, 13=A4a-17, 14=A4a-33, 15=A4a-35, 16=A4a-41, 17=F4b-31, 18=G2b-4, 19=I4b-3, 20=L2b-2, 21=O6b2-1, 22=P1b-9, 23=S6c-6, 24=T2b-3, 25=T2b-9, 26=T2b-10, 27=V6c-6, 28=V6c-12, 29,30=1kb ladder, 31=*S. coerulescens*, 32=*S. roseoviolaceus*, 33=*S. luteogriseus*, 34=*S. albus*, 35=*S. hygroscopicus*, 36=*S. flavoviridis*, 37=*S. griseus*, 38=*S. lividans*

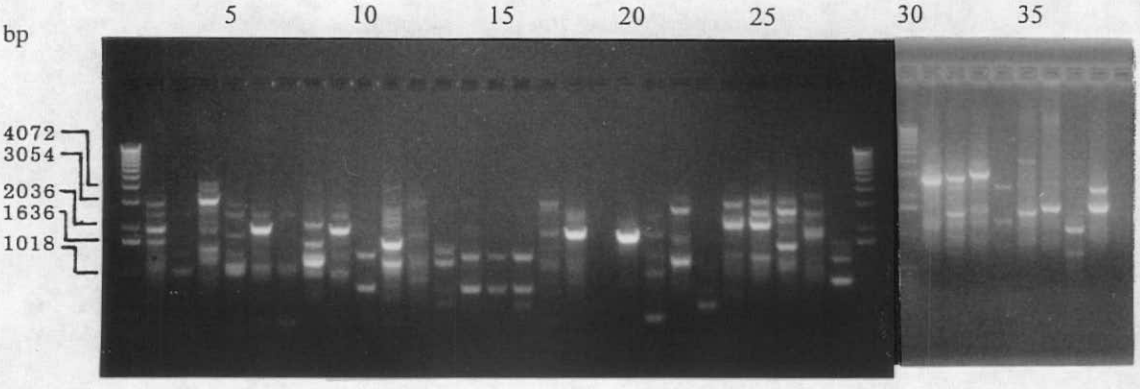
b) AE01



1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=F4b-2, 4=AE5b-4, 5=AE2b-6, 6=AK5b-13, 7=F4b-14, 8=Z4b-15, 9=F4b-16, 10=AE5b-18, 11=F4b-19, 12=Z2b-20, 13=AQ2b-25, 14=F4b-29, 15=AN5b-46, 16=AN5b-47, 17=AN5b-54, 18=Y4b-21, 19=Y4b-24, 20=1kb ladder, 21=Z2b-1, 22=AE2b-4, 23=AE2b-7, 24=AE5b-1, 25=AE5b-3, 26=AE5b-19, 27=AF5b-17, 28=AF5b-29, 29=AK5b-20, 30=AL2b-1, 31=AL2b-2, 32=AM4b-7, 33=AM4b-10, 34=AM4b-13, 35=AM4b-19, 36=AM4b-27, 37=AN5b-58, 38=AO4b-6, 39=AP5b-7, 40=1kb ladder

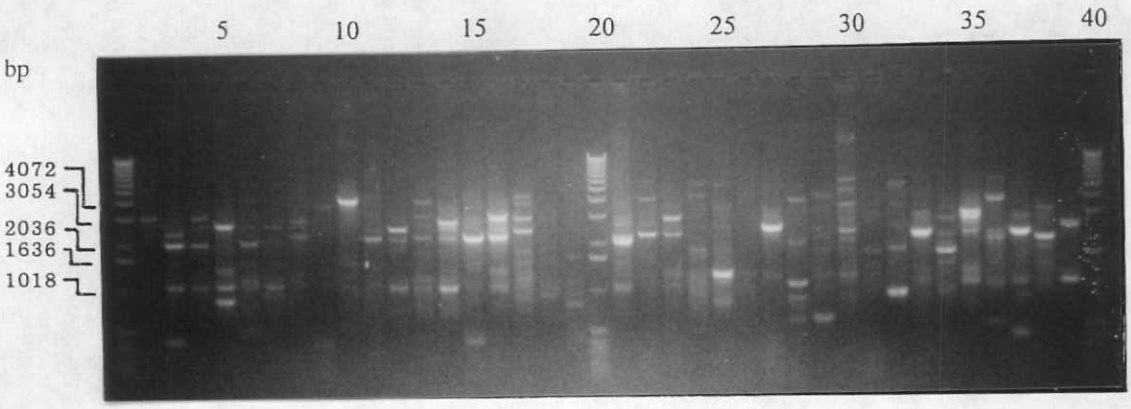


1=1kb ladder, 2=AR4b-1, 3=C3b-1, 4=D1a-5, 5=D1a-6, 6=I4d-3, 7=L1d-4, 8=L1d-7, 9=L1d-22, 10=Ob2-5, 11=P1d-1, 12=P1d-3, 13=Q4d-1, 14=Q4d-2, 15=X2a-9, 16=Y3b-4, 17=AD4b-1, 18=1kb ladder, 19=AHb-16, 20=A1a-14, 21=A1a-17, 22=A2a-1, 23=A2a-23, 24=A4a-3, 25=A4a-15, 26=AE2b-5, 27=AI4d-2, 28=AK5b-15, 29=AN5b-96, 30=AR4b-6, 31= D2a-11, 32=*S. lividans*, 33=*S. albus*, 34=*S. rimosus*, 35,36=1kb ladder, 37=D2a-2, 38=D2a-17, 39=F4b-9

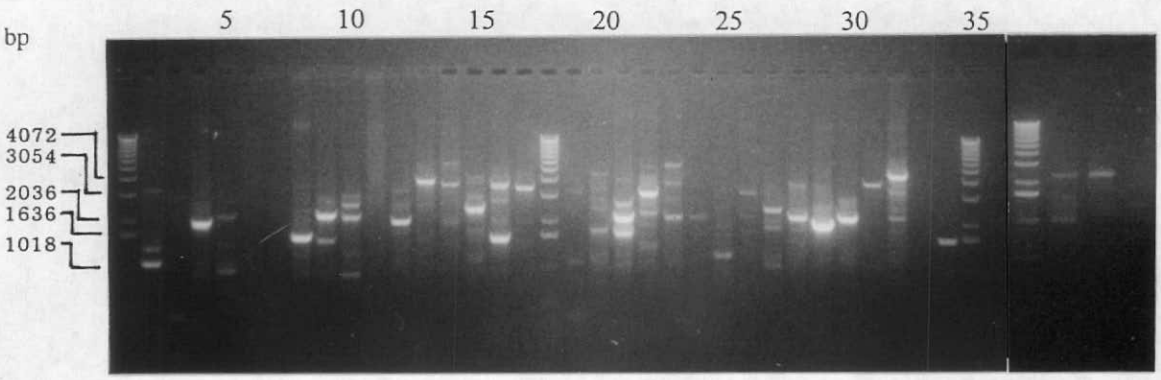


1=1kb ladder, 2=NOV1, 3=NOV3, 4=NOV5, 5=NOV10, 6=NOV12, 7=NOV17, 8=NOV18, 9=NOV21, 10=A2a-29, 11=A2a-31, 12=A2a-37, 13=A4a-17, 14=A4a-33, 15=A4a-35, 16=A4a-41, 17=F4b-31, 18=G2b-4, 19=I4b-3, 20=L2b-2, 21=O6b2-1, 22=P1b-9, 23=S6c-6, 24=T2b-3, 25=T2b-9, 26=T2b-10, 27=V6c-6, 28=V6c-12, 29,31=1kb ladder, 31=*S. coerulescens*, 32=*S. roseoviolaceus*, 33=*S. luteogriseus*, 34=*S. albus*, 35=*S. hygroscopicus*, 3=*S. flavoviridis*, 37=*S. griseus*, 38=*S. lividans*

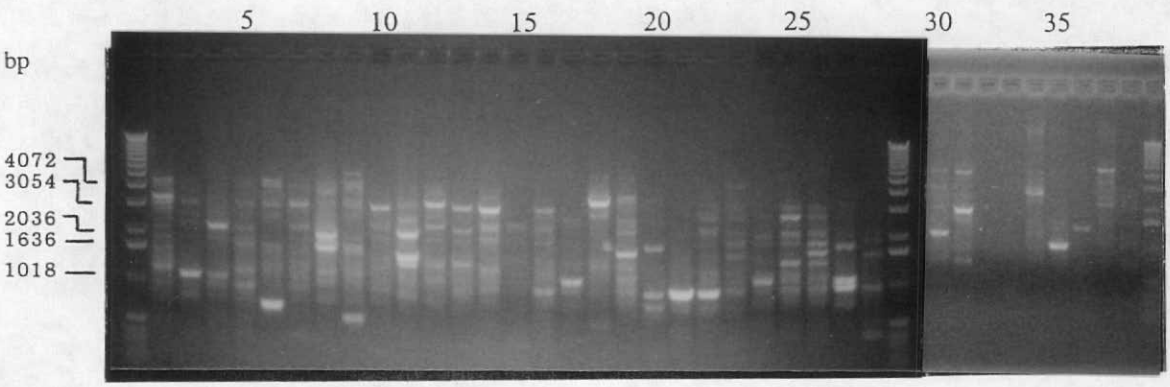
c) AE10



1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=F4b-2, 4=AE5b-4, 5=AE2b-6, 6=AK5b-13, 7=F4b-14, 8=Z4b-15, 9=F4b-16, 10=AE5b-18, 11=F4b-19, 12=Z2b-20, 13=AQ2b-25, 14=F4b-29, 15=AN5b-46, 16=AN5b-47, 17=AN5b-54, 18=Y4b-21, 19=Y4b-24, 20=1kb ladder, 21=Z2b-1, 22=AE2b-4, 23=AE2b-7, 24=AE5b-1, 25=AE5b-3, 26=AE5b-19, 27=AF5b-17, 28=AF5b-29, 29=AK5b-20, 30=AL2b-1, 31=AL2b-2, 32=AM4b-7, 33=AM4b-10, 34=AM4b-13, 35=AM4b-19, 36=AM4b-27, 37=AN5b-58, 38=AO4b-6, 39=AP5b-7, 40=1kb ladder

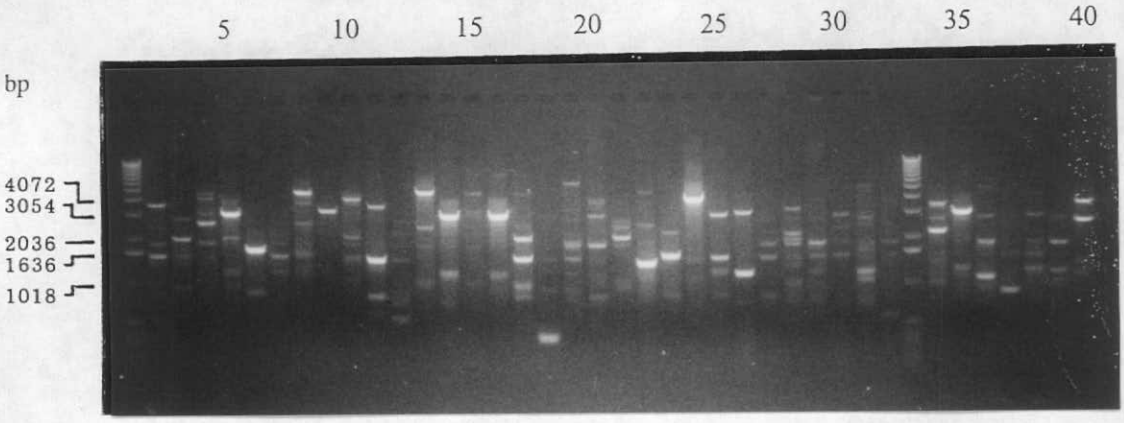


1=1kb ladder, 2=AR4b-1, 3=C3b-1, 4=D1a-5, 5=D1a-6, 6=I4d-3, 7=L1d-4, 8=L1d-7, 9=L1d-22, 10=Ob2-5, 11=P1d-1, 12=P1d-3, 13=Q4d-1, 14=Q4d-2, 15=X2a-9, 16=Y3b-4, 17=AD4b-1, 18=1kb ladder, 19=AHb-16, 20=A1a-14, 21=A1a-17, 22=A2a-1, 23=A2a-23, 24=A4a-3, 25=A4a-15, 26=AE2b-5, 27=AI4d-2, 28=AK5b-15, 29=AN5b-96, 30=AR4b-6, 31= D2a-11, 32=*S. lividans*, 33=*S. albus*, 34=*S. rimosus*, 35,36=1kb ladder, 37=D2a-2, 38=D2a-17, 39=F4b-9

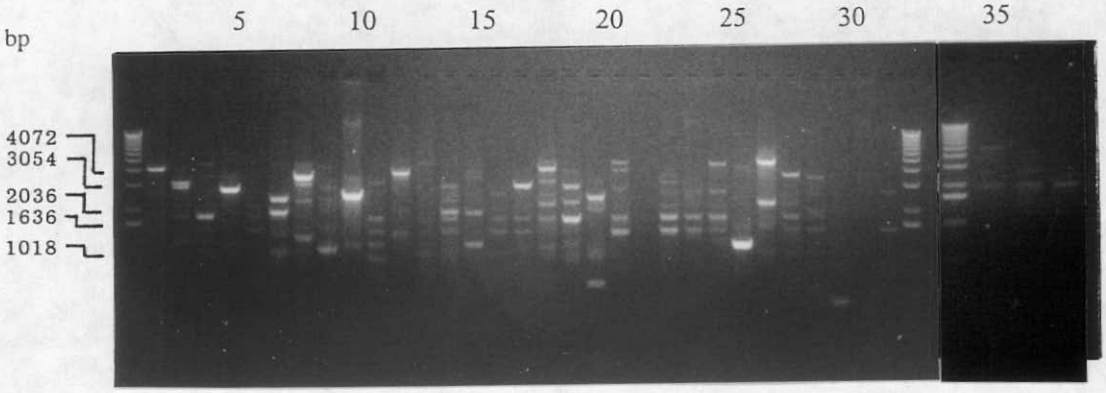


1=1kb ladder, 2=NOV1, 3=NOV3, 4=NOV5, 5=NOV10, 6=NOV12, 7=NOV17, 8=NOV18, 9=NOV21, 10=A2a-29, 11=A2a-31, 12=A2a-37, 13=A4a-17, 14=A4a-33, 15=A4a-35, 16=A4a-41, 17=F4b-31, 18=G2b-4, 19=I4b-3, 20=L2b-2, 21=O6b2-1, 22=P1b-9, 23=S6c-6, 24=T2b-3, 25=T2b-9, 26=T2b-10, 27=V6c-6, 28=V6c-12, 29=1kb ladder, 30=*S. coerulescens*, 31=*S. roseoviolaceus*, 32=*S. luteogriseus*, 33=*S. albus*, 34=*S. hygroscopicus*, 35=*S. flavoviridis*, 36=*S. griseus*, 37=*S. lividans*, 39=1kb ladder

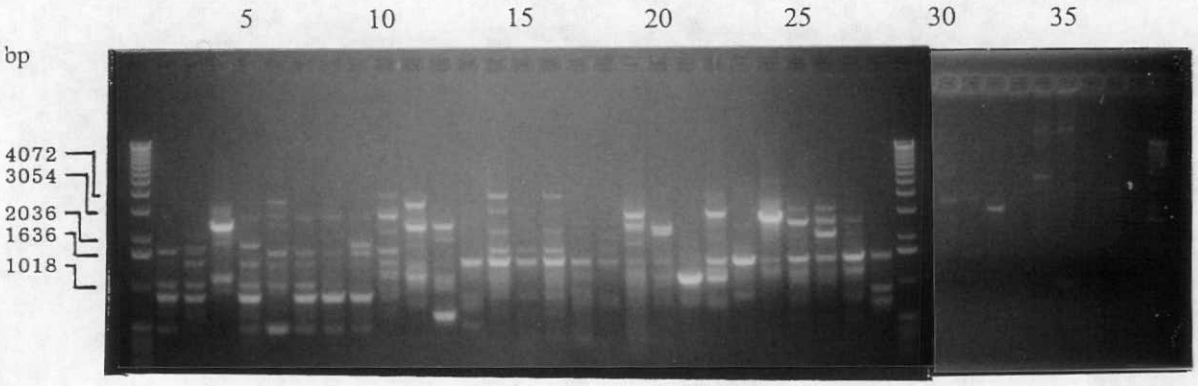
d) AE14



1=1kb ladder, 2=F4b-1, 3=F4b-2, 4=AE5b-4, 5=AE2b-6, 6=AK5b-13, 7=F4b-14, 8=Z4b-15, 9=F4b-16, 10=AE5b-18, 11=F4b-19, 12=Z2b-20, 13=AQ2b-25, 14=F4b-29, 15=AN5b-46, 16=AN5b-47, 17=AN5b-54, 18=Y4b-21, 19=Y4b-24, 20=Z2b-1, 21=AE2b-4, 22=AE2b-7, 23=AE5b-1, 24=AE5b-3, 25=AE5b-19, 26=AF5b-17, 27=AF5b-29, 28=AK5b-20, 29=AL2b-1, 30=AL2b-2, 31=AM4b-7, 32=AM4b-10, 33=1kb ladder, 34=AM4b-13, 35=AM4b-19, 36=AM4b-27, 37=AN5b-58, 38=AO4b-6, 39=AP5b-7, 40=AR4b-1

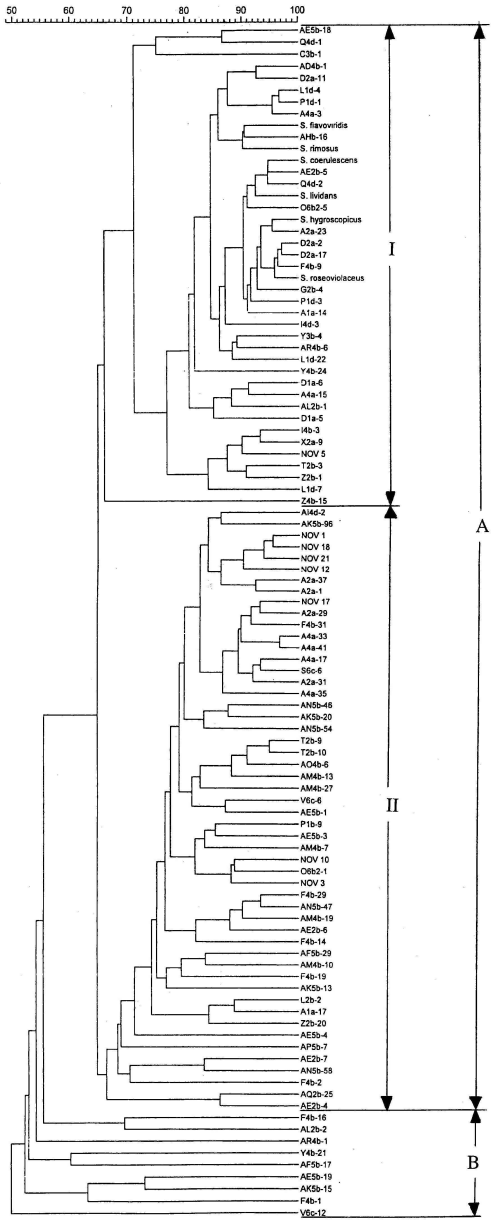


1=1kb ladder, 2=C3b-1, 3=D1a-5, 4=D1a-6, 5=I4d-3, 6=L1d-4, 7=L1d-7, 8=L1d-22, 9=Ob2-5, 10=P1d-1, 11=P1d-3, 12=Q4d-1, 13=Q4d-2, 14=X2a-9, 15=Y3b-4, 16=AD4b-1, 17=AHb-16, 18=A1a-14, 19=A1a-17, 20=A2a-1, 21=A2a-23, 22=A4a-3, 23=A4a-15, 24=AE2b-5, 25=AI4d-2, 26=AK5b-15, 27=AN5b-96, 28=AR4b-6, 29= D2a-11, 30=*S. lividans*, 31=*S. albus*, 32=*S. rimosus*, 33,34=1kb ladder, 35=D2a-2, 36=D2a-17, 37=F4b-9



1=1kb ladder, 2=NOV1, 3=NOV3, 4=NOV5, 5=NOV10, 6=NOV12, 7=NOV17, 8=NOV18, 9=NOV21, 10=A2a-29, 11=A2a-31, 12=A2a-37, 13=A4a-17, 14=A4a-33, 15=A4a-35, 16=A4a-41, 17=F4b-31, 18=G2b-4, 19=I4b-3, 20=L2b-2, 21=O6b2-1, 22=P1b-9, 23=S6c-6, 24=T2b-3, 25=T2b-9, 26=T2b-10, 27=V6c-6, 28=V6c-12, 29=1kb ladder, 30=*S. coerulescens*, 31=*S. roseoviolaceus*, 32=*S. luteogriseus*, 33=*S. albus*, 34=*S. hygroscopicus*, 35=*S. flavoviridis*, 36=*S.griseus*, 37=*S. lividans*, 39=1kb ladder

รูปที่ 14 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ทดสอบ



สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงถึงการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหายีน Type I และ Type II PKS โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 ไพรเมอร์ AT01 และ AT02 ที่สร้างขึ้นจากบริเวณอนุรักษ์ในยีน KS และ AT ของ Type I PKS สามารถใช้เพิ่มชิ้นส่วนขนาด 1.4 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีน Type I PKS จาก Streptomycete ส่วนใหญ่ (64%) ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของสายพันธุ์ทดสอบในการสร้างสาร polyketide ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จาก Type I PKS ของ *S. rimosus* M4018 ถูกนำมาโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอ จากการเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล พบว่าเป็นรหัสของเอนไซม์ Type I PKS จริง ชิ้นดีเอ็นเอนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวติดตามเมื่อตรวจสอบด้วย Southern hybridization ผลของ Southern hybridization พบว่า 61% ของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สุ่มมานี้สามารถให้ผล positive กับตัวติดตาม แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงของยีนในจุลินทรีย์กลุ่มนี้ สำหรับ Type II PKS เมื่อใช้ไพรเมอร์ AT03 และ AT05 ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน KS_{α} และ KS_{β} พบว่า 96% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1.2 กิโลเบสเป็นชิ้นส่วนหลัก ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR จาก Type II PKS ของสายพันธุ์ AR4b-1 ถูกนำมาโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอ เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูล ปรากฏว่าเป็นยีนของ Type II PKS จึงได้นำชิ้นส่วนนี้มาใช้เป็นตัวติดตามในการวิเคราะห์ Southern hybridization พบว่า 53% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถ cross-hybridize กับตัวติดตาม ซึ่งแสดงถึงความคล้ายคลึงของยีนนี้ในจุลินทรีย์ทดสอบ

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าการสร้าง rimocidin ซึ่งมีโครงสร้างเป็น polyene (Type I polyketide) นั้นผลิตโดย *S. rimosus* (Cope *et al.*, 1965) จึงเป็นไปได้ว่าชิ้นส่วนของยีน Type I PKS ที่ตรวจพบจากการทำ PCR ของ *S. rimosus* M4018 สายพันธุ์กลายของ *S. rimosus* อาจเป็นส่วนหนึ่งที่เป็นรหัสของกระบวนการสังเคราะห์ rimocidin ในสายพันธุ์นี้ การทดลองนี้จึงเป็นการโคลนยีน Type I PKS ครั้งแรกจาก *S. rimosus*

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคการตรวจหายีนโดย PCR มาตรวจหาจุลินทรีย์ที่มียีน Type I และ Type II PKS ได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR เป็นตัวติดตามในการตรวจหาสายพันธุ์ที่ผลิตสาร polyketide ใน actinomycete ที่แยกจากดิน และจากการตรวจพบว่าบางสายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างจากที่ประมาณไว้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์เหล่านี้อาจมียีน PKS ในรูปแบบที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น จึงอาจเป็นแนวทางในการค้นพบสารโครงสร้างใหม่ด้วย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ที่สุ่มตรวจหายีน PKS โดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenic tree พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดิน 30 แหล่งแตกต่างกันถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม (A และ B) กลุ่ม A มีสมาชิก 91% และมีค่าความสัมพันธ์สูง (80-97%) และกลุ่ม B มีสมาชิก 9% ซึ่งพบว่ามีค่าความสัมพันธ์ค่อนข้างไกลกัน (60-72%) แผนภูมิแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันจะถูกจัดอยู่ใกล้กันและมีค่าความสัมพันธ์สูง แต่ในบางกลุ่มไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกันก็ยังถูกจัดไว้ใกล้กันและมีค่าความสัมพันธ์ที่สูงเช่นกัน และจากแผนภูมิไม่ได้แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของกลุ่มที่แบ่งกับการตรวจพบยีน PKS ในสายพันธุ์เหล่านั้น ยังคงพบการกระจายตัวของสายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน PKS อยู่ในทั้งสองกลุ่ม

แต่ในสัดส่วนที่ต่างกัน คือ กลุ่ม A มีสายพันธุ์ที่พบยีน Type II PKS มากกว่าสายพันธุ์ที่พบยีน Type I PKS ส่วนกลุ่ม B ให้ผลที่ตรงข้าม เป็นไปได้ว่าเทคนิค RAPD แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ได้ไม่ละเอียด อาจปรับปรุงโดยการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ หรือนำวิธีวิเคราะห์รูปแบบอื่นมาใช้ เช่น การหาลำดับเบสของ 16s RNA เป็นต้น.

เอกสารอ้างอิง

อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และ จรีรัตน์ ผลจันทร์ (2539) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง "การเก็บรวมรวมและการเก็บรักษาสายพันธุ์ Actinomycetes ในดิน" เสนอต่อศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Bevitt, D. J., Cortes, J., Haydock, S. F., and Leadlay, P. F. (1992). 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Sacharopolyspora erythraea*. Eur. J. Biochem. 204: 39-49

Chatellier, S., Ramanantsoa, C., Harriau, P., Rolland, K., Rosenau, A. and Quentin, R. (1997). Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 35: 2573-2579.

Cope, A. C., Burrows, E. P., Derieg, M. E., Moon, S. and Wirth, W. D. (1965). Rimocidin. I. Carbon skeleton, partial structure, and absolute configuration at C-27. J. Am. Chem. Soc. 87: 5452-5460.

Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J., and Katz, L. (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science. 759: 675-679.

Fernandez-Moreno, M. A., Martinez, E., Boto, L., Hopwood, D. A., and Malpartida. F. (1992). Nucleotide sequence and deduced functions of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. J. Biol. Chem. 267: 19278-19290.

Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., and Shrempf, H. (1985). In: "Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual." The John Innes Foundation.

Hopwood, D. A. and Khosla, C. (1992). Genes for polyketide secondary metabolic pathways in microorganisms and plants. In: "Secondary Metabolites: Their Function and Evolution". Cladwick, D. J. and Whelan, J. (eds.). Ciba Foundation Symposium 171. John Willey & Sons. Chichester, UK. pp. 88-112.

Hopwood, D. A. and Sherman, D. H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. Annu. Rev. Genet. 24: 37-66.

Hutchinson, C. R., Decker, H., Motamedi, H., Shen, B., Summers, R. G., Wendt-Pienkowski, E., and Wessel, W. L. (1993). Molecular genetics and biochemistry of a bacterial Type II polyketide synthase. In "Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics" Baltz, R. H. Hegeman, G. D., and Skatrud, P. L. (eds) American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 203-216.

Hunter, I. S. and Hill, R. A. (1997). Tetracyclins: chemistry and molecular genetics of their function. In: "Biotechnology of Industrial Antibiotics". Strohl, W.R. (ed.) Marcel Decker, pp. 659-682.

Katz, L., and Donadio, S. (1993). Polyketide synthesis : Prospect for hybrid antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 47: 875-912.

Lawrence, L. M., Harvey, J. and Gilmour, A. (1993) Development of random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 408-415.

MacNeil, D. J., Occi, J. L., Gewain, K. M., MacNeil, T., Gibbons, P. H., Ruby, C. L., and Danis, S. J. (1992). Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase . Gene. 115: 119-125.

Malpatida, F., and Hopwood D. A. (1986). Physical and genetic characterization of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Gen. Genet. 205: 66-73.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Dpring Harbor, New York, USA.

Manitto, P. (1981). The polyketides. In: "Biosynthesis of Natural Products". Manitto, P. (ed.). Chichester, UK. pp. 169-212.

Mehling, A., Wehmeier, U. F. and Piepersberg, W. (1995). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay in identifying conserved regions of actinomycete genomes. FEMS Microbiol. Lett 128: 119-126.

O'Hagen, D. (1991). In: "The Polyketides Metabolites". Ellis Horwood, Chichester, UK.

Rhodes, P. M., Winskill, N., Friend, E. J., and Warren, M. (1981). Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis. J. Gen. Microbiol. 124: 329-338.

Schwecke, T., Aparicio, J. E., Molnar, I., Konig, A., Khaw, L. E., Haydock, S. F., Olinyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J. B., Bohm, G.A., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1995). The biosynthesis gene cluster for the polyketide immunosupressant rapamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 7839-7843.

Simpson, T. G. (1991). The biosynthesis of polyketides. Nat. Prod. Rep. 8: 573-602.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-507.

Wakil, S. J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochem. 28: 4523-4530.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Non-sporulating Medium (1 litre)

Soluble starch	20	g
Yeast extract	4	g
Casamino acids	20	g
Agar	20	g

2. Luria Bertani broth (LB) (1 litre)

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Sodium Chloride	10	g

pH 7.2

3. Luria Bertani agar (LA) (1 litre)

เหมือนกับ LB แต่เพิ่ม agar 15 g

4. Hybridization buffer

SSC	5X
N-laurylsarcosine	0.1%(w/v)
SDS	0.02%(w/v)
Blocking reagent	1%

5. TE buffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

pH 8.0

6. Solutions required for DIG Southern blot detection

Buffer 1: maleic acid buffer

0.1M maleic acid, 0.15M NaCl; adjust to pH 7.5 (20°C) with solid NaOH

Washing buffer

Maleic acid buffer plus 0.3% Tween 20 (v/v)

Buffer 2: blocking solution (1X)

Prepare by diluting the 10X blocking solution in maleic acid buffer.

Buffer 3: detection buffer

0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5 (20°C)