บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะโคลนยีน จาก *P. pseudomallei* เข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือก hemolysin-expressing *E. coli* ที่มีคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง เพื่อนำไปเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป การคัดเลือกสายพันธุ์ ของ *P.pseudomallei* ที่เป็นต้นแบบในการศึกษาการโคลนยีนจะใช้วิธีทดสอบหา hemolytic activity ของ Liu และคณะ (20) คือ cellophane plate technique หลักการคือเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เร่งการสร้างสารพิษ (toxin) ด้วยน้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูง (10% glucose) และป้องกันไม่ให้ toxin ที่สร้างผสมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อบนกระดาษเซโลเฟน ช่วงการทดสอบ hemolytic activity ได้บรรจุขั้นตอนการล้างเอาสารยับยั้ง (inhibitor) ออกจากเซลเม็ดเลือดแดงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ hemolysin ในการสลายเม็ดเลือดแดง ในภาวะปกติ hemolytic activity ได้จาก *P. pseudomallei* ให้ค่า hemolytic activity ต่ำกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จึงไม่สามารถสังเกตลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (blood agar) ได้ชัดเจน ดังนั้นจึงไม่สามารถจะนำวิธีการคัดเลือก hemolytic activity โดยการดูลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (blood agar) มาทดสอบเหมือนการทดสอบ hemolytic activity ของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (22,49,50,51) การทดสอบ hemolytic activity ขึ้นกับความเหมาะสมของการทดสอบแบคทีเรียในแต่ละชนิด ยกตัวอย่าง การคัดเลือกโคลนที่ให้ hemolysin ของ *Streptococcus pneumoniae* จะสังเกตลักษณะ hemolysis บนเจลอะกาโรส 0.5% ที่ราดด้วยเม็ดเลือดแดง 7.5% (V/V) (46) หรือใช้วิธีหาค่า titration ของ hemolysin โดยวิธีเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วย two-fold dilution แล้วจึงนำไปหาการสลายเม็ดเลือดแดงต่อไป (46,49,52)

เชื้อต้นแบบที่นำมาศึกษา hemolysin คือ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 ให้ hemolytic activity สูงสุดคือ 256 HU Host cell ที่ใช้ในการขยายโคลนคือ *E. coli* JM109 ซึ่งได้ทดสอบด้วยวิธีของ Liu และคณะ พบว่าไม่มี hemolytic activity

การโคลนยีน ของ *P. pseudomallei* โดยใช้พลาสมิด pUC18 เป็น vector มีข้อดีคือสามารถคัดเลือกโคลนได้สะดวกเพียงขั้นตอนเดียว คือ เลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ X-gal ก็สามารถคัดเลือกโคลนที่มี DNA insert ได้ pUC18 มี restriction site มากพอให้เลือกโคลนและสามารถย่อยหนุนขนาด DNA ที่ใช้โคลน นอกจากนี้ยังมี restriction site ที่เหมือนกับ M13mp8 ซึ่งมีประโยชน์ในการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) บางรายงานอาจจะใช้ vector ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ pBR322 เพื่อโคลนยีน hemolysin ของ *Vibrio cholerae*

1 17125327

Eltore (49) และ *Actinobacillus pleuropneumoniae* (22) ส่วน *Vibrio vulnificus* ใช้ phage ในการโคลน hemolysin gene (53)

Chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* ได้จากการสกัดด้วยวิธี alkaline lysis method using CTAB มีหลักการคือทำให้เซลแตกโดย 10%SDS และย่อยโปรตีนและสารที่ไม่ต้องการให้มีโมเลกุลขนาดเล็กโดย proteinase K และใช้ CTAB/NaCl ช่วยสลาย polysaceharide ของ *P. pseudomallei* ทำให้แยก chromosomal DNA ได้รวดเร็วและบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นกว่าวิธีธรรมดา

ผลการโคลนยีนจาก *P. pseudomallei* พบ hemolysin-expressing *E. coli* 3 โคลนจากจำนวน transformant ทั้งหมด 160 โคลน ให้ค่า hemolytic activity ระหว่าง 2-4 HU โคลนที่ให้ hemolytic activity สูงสุดคือ *E. coli* JM109 (pWC7) การโคลนยีน hemolysin จากแบคทีเรียอื่น คือ *A. pleuropneumoniae* ใช้ pBR322 เป็น vector ได้จำนวนโคลนที่ express hemolysin 25 โคลนจาก 900 transformants (22) ในการโคลน V.cholerae ใช้ phage เป็น vector ได้จำนวนโคลน 3 โคลนจาก 600 transformants (51) อัตราการพบ hemolysin-expressing clones ของ *P. pseudomallei* คือ 3 โคลน จาก 160 transformant นอกจากนี้ยังพบว่า hemolytic activity ของ hemolysin-express *E. coli* มีค่าต่ำกว่า hemolytic activity ของเซลต้นแบบ คือ *P. pseudomallei* ที่ใช้โคลน เช่นเดียวกับผลที่ได้จากการโคลนยีน hemolysin จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (22,24,49,54) hemonlysin ที่ express น้อยอาจเนื่องจาก 1) hemolysin ที่สร้างใน *E. coli* ไม่ถูกส่งออกนอกเซล เช่นเดียวกับในกรณีของการโคลน phospholipase C ของ *P. aeruginosa* สู่ *E. coli* (23) phospholipase C เมื่อสร้างในเซล *E. coli* แล้วจะไม่ถูกส่งออกนอกเซล *E. coli* จะส่งโปรตีนบางชนิดเท่านั้นออกนอกเซล ได้แก่ extracellular protein โดยจะถูกส่งออกมาแค่ภายในชั้นของ outer membrane 2) hemolysin อาจถูกสร้างโดยมี leader sequence ของ *P. pseudomallei* และไม่ถูกย่อยด้วย *E. coli* protease หรือเป็นโปรตีนที่ขาดหาย (truncated protein) 3) promotor ของ vector ที่ใช้ในการโคลนยีนเป็น weak promotor (pUC18 promotor)

ผลของ southern blot analysis แสดงให้เห็นว่า inserted DNA ที่ได้จากการโคลน มาจาก *P. pseudomallei* genome และพบว่า inserted DNA ทั้งสามโคลน ไม่มี homology กัน ซึ่งยังชี้ว่าโคลนทั้งสามเป็น hemolysin คนละชนิดกันเช่นเดียวกับกรณีของการโคลน hemolysin gene ของ *V. cholerae* classical strain ที่ได้ hemolysin-expressing clones 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกัน (51)