



การศึกษาโปรตีนสารพิษ Alpha-Hemolysin (HlyA) ของเชื้อ *Escherichia coli*
สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

**Characterization of Alpha-Hemolysin (HlyA) Toxin Protein from
Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Strain**

กนกพร ปานทอง

Kanokporn Pantong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Biochemistry**

Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาโปรตีนสารพิษ Alpha-Hemolysin (HlyA) ของเชื้อ *Escherichia coli*
สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
Characterization of Alpha-Hemolysin (HlyA) Toxin Protein from
Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Strain

กนกพร ปานทอง
Kanokporn Pantong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาโปรตีนสารพิษ alpha-hemolysin (HlyA) ของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

ผู้เขียน นางสาวกนกพร ปานทอง

สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
วนิดา สะแลแม

.....
ประธานกร

(ดร.วนิดา สะแลแม)

(ศาสตราจารย์ ดร.เทวัญ จันทร์วิไลศรี)

.....
ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา)

.....
อรุณิชา รัตนภรณ์

.....กรรมการ
 (ดร.อรุณิชา รัตนภรณ์)

.....
วนิดา สะแลแม

.....กรรมการ
 (ดร.วนิดา สะแลแม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วน
 หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกิจ วงศ์ศิริ โชติ)

รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....*อนิศา สะแลแม*.....

(ดร.วนิศา สะแลแม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....*กนกพร ปานทอง*.....

(นางสาวกนกพร ปานทอง)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....กนกพร ปานทอง.....

(นางสาวกนกพร ปานทอง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโปรตีนสารพิษ alpha-hemolysin (HlyA) ของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
ผู้เขียน	นางสาวกนกพร ปานทอง
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2565

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะทั่วโลก โปรตีนสารพิษ Hemolysin A (HlyA) เป็น virulence factor ที่สำคัญต่อกลไกการติดเชื้อและสามารถบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของโรคได้ โดยโปรตีน HlyA ทำลายเนื้อเยื่อภายในระบบทางเดินปัสสาวะด้วยการสร้างรูพรุนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย HlyA จะทำงานได้ต้องอยู่ในรูป active form ซึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการผลิตและทำบริสุทธิ์ทั้งโปรตีน HlyA และ HlyC เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นทางชีวเคมี โดยสร้างพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyA* หรือ *hlyC* จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* และ *hlyC* ที่ได้แตกต่างจากของ UPEC สายพันธุ์อื่น เช่น CFT073, J96 และ UTI89 โดยมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ CFT073 มากที่สุด คิดเป็น 99.2% และ 98.8% ตามลำดับ ผู้วิจัยจึงกำหนดให้เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ MNT08 จากนั้นนำมาผลิตโปรตีนโดยแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) พบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม HlyA และ HlyC ปริมาณมากในรูปของ insoluble protein ที่อุณหภูมิ 37 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อนำโปรตีนมาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA affinity chromatography และตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนลูกผสม HlyA ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 110 kDa ส่วนโปรตีนลูกผสม HlyC พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 19 kDa เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของโปรตีนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค mass spectrometry พบว่าเปปไทด์ที่สกัดได้จากโปรตีนลูกผสม HlyA ซึ่งคิดเป็น 55% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด ตรงกับโปรตีน hemolysin ที่แสดงออกโดยยีน *hlyA* จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC (Accession number: P09983) ส่วนโปรตีนลูกผสม HlyC ที่ผลิตได้ตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hemolysin-activating

lysine-acyltransferase (HlyC) จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC (Accession number: P09984) ซึ่งคิดเป็น 56% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด เนื่องจาก HlyA ที่ผลิตได้เป็น pro-HlyA ที่อยู่ในรูปของ unfolded polypeptide จึงต้องนำไป refolding โดยการ folding จะเกิดได้ต้องมี Ca^{2+} มาจับบริเวณ RTX domain ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีน HlyA สามารถเกิดการ folding ได้ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 นอกจากนี้ การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน โดยสร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีน HlyA ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL พบว่าโครงสร้างสามมิติของโปรตีน CyaA จากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* สามารถใช้เป็นแม่แบบที่เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้โปรตีน CyaA มีระบบการหลั่งออกนอกเซลล์แบบ T1SS ที่คล้ายกับ HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดด้านความยาวของแม่แบบดังกล่าว ทำให้แบบจำลองที่สร้างขึ้นสามารถทำนายโครงสร้างของ HlyA ได้เพียงหนึ่งในสามเท่านั้น โดยแสดงโครงสร้าง monomer ของโปรตีน HlyA ที่ครอบคลุมกรดอะมิโนเพียง 339 ตัว ที่อยู่บริเวณ C-terminal (residues 612-950) ในส่วนของแบบจำลองโครงสร้างโปรตีน HlyC นั้นพบว่าโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ApxC จากเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* เป็นแม่แบบที่เหมาะสมทำให้ได้โครงสร้างจำลองของ HlyC ที่เป็น homodimer ซึ่งครอบคลุมกรดอะมิโน 167 ตัว (residues 3-169) คิดเป็น 98.2% ของกรดอะมิโนทั้งหมด โดยสรุป ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับการทำงานของโปรตีน HlyA และการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน HlyA แบบเต็มความยาว โดยใช้เทคนิค X-ray crystallography เพื่อทำความเข้าใจในการสร้างรูพรุนในกลไกการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะได้ในอนาคต

Thesis Title	Characterization of alpha-hemolysin (HlyA) toxin protein from Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> (UPEC) strain
Author	Miss Kanokporn Pantong
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2022

Abstract

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main cause of urinary tract infection (UTI) worldwide. The exotoxin hemolysin A (HlyA) is a virulence factor that plays important role in the mechanism of UTI and indicates the severity of UTI symptoms. HlyA induces the pore formation in membrane of the host cells. It functions as the active HlyA which is activated by HlyC in the acylation reaction. The main objective of this research is to express and purify both HlyA and HlyC proteins as well as to preliminary study the biochemical properties. Constructing the recombinant plasmids pET17b-*hlyA* encoding HlyA and pET17b-*hlyC* encoding HlyC by using UPEC genomics isolated from UTI patients admitted to the hospital in southern Thailand as a template revealed that nucleotide sequences of *hlyA* and *hlyC* genes were different from other UPEC strains i.e. CFT073, J96 and UTI89, with the most similarity to CFT073 corresponding to 99.2% and 98.8%, respectively. The UPEC strain of this research was therefore designated as strain MNT08. Both HlyA and HlyC proteins were overexpressed as insoluble proteins at 37 °C and 25 °C respectively in *E. coli* strain BL21(DE3). After a single-step purification using Ni-NTA affinity chromatography, the purified HlyA and HlyC proteins were analysed by SDS-PAGE revealing a molar mass of approximately 110 kDa and 19 kDa, respectively. Based on mass spectrometry, the purified HlyA protein was identified as hemolysin with 55% similarity to hemolysin encoded by *hlyA* gene from UPEC (Accession number: P09983) while HlyC had 56% similarity to hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC from UPEC (Accession number: P09984). HlyA is expressed as an unfolded protein called pro-HlyA. Normally, pro-HlyA can folding in the condition with Ca^{2+} , which is interaction on the RTX domain. HlyA was successfully folded in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, and 20 mM CaCl_2 . A preliminary study on the structural and functional relationships of proteins. The three-dimensional structural of the HlyA protein was created using

SWISS-MODEL. A homology model of HlyA protein was generated using the structure of CyaA from *Bordetella pertussis*, which has a T1SS secretion system like HlyA from *E. coli*, as the most suitable template. The model was predicted as a monomer covering 339 amino acids at the C-terminus (residues 612-950). Due to the limitation of short-length template, the model in this research was able to predict only one-third portion of HlyA structure. Meanwhile, ApxC of *Actinobacillus pleuropneumoniae* was used as a template for homology modeling of HlyC. The HlyC model was built as a homodimer covering 167 amino acids (residues 3-169), accounting for 98.2% of the total amino acid residues. To sum up, this research is only a preliminary study providing useful information for further functional and structural studies of the full length HlyA using X-ray crystallography in order to acquire a better understanding of the pore formation in UTI mechanism.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้ หากขาดบุคคลสำคัญที่สุด คือ ดร.วนิดา สะแลแม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ อบรมสั่งสอน เสียสละเวลาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาตลอดจนตรวจสอบ และแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ แก่ศิษย์เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เทวัญ จันทร์วิไลศรี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา และ ดร. อรณิชา รัตนภรณ์ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาเสนอแนะ แก้ไข เพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาสับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ และโครงการความเป็นเลิศสาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนสนับสนุนค่าเทอมการศึกษา

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่จากครอบครัว รวมทั้งขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ นักศึกษาปริญญาเอก และปริญญาโทในภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่เป็นกำลังใจในการศึกษา โดยตลอด จึงทำให้ผู้ทำวิทยานิพนธ์สำเร็จการศึกษา

กนกพร ปานทอง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(15)
1. บทนำ	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ทบทวนวรรณกรรม	4
2. สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
สารเคมี	25
วัสดุ อุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	29
3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	45
4. สรุปผลการทดลอง	90
5. ข้อเสนอแนะในการศึกษาครั้งต่อไป	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	101
ประวัติผู้เขียน	139

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ข้อมูลเกี่ยวกับ receptor และ หน้าที่ของ <i>E. coli</i> virulence factor	6
2.1	สารเคมีทั่วไป	25
2.2	ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย	26
2.3	เอนไซม์ (enzyme)	27
2.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer)	27
2.5	ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	32
2.6	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	33
2.7	ส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์	37
2.8	การเตรียมเจล SDS-PAGE	42
3.1	ข้อมูลการระบุชนิดของโปรตีนจากแถบ SDS-PAGE ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS	73

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ	5
1.2	Virulence factors ที่ส่งเสริมการอยู่รอด และบ่งบอกความรุนแรงของ UPEC ภายใน host	7
1.3	ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงจากแบคทีเรีย UPEC ที่ทำให้เกิดโรค UTI	10
1.4	โครงสร้างและองค์ประกอบของ virulence factor ที่อยู่ตรงบริเวณพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย UPEC	11
1.5	โปรตีน HlyA จะถูก encoded บน <i>hlyCABD</i> operon ของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	13
1.6	บริเวณที่สำคัญบน โปรตีน hemolysin A (HlyA)	14
1.7	โครงสร้างของโปรตีน hemolysin A	15
1.8	การกระตุ้น และการหลั่งของโปรตีน HlyA (Activation and secretion of HlyA pathway)	16
1.9	แบบจำลองโครงสร้างของกลไกการหลั่งโปรตีน และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ แบบ T1SS	17
1.10	กลไกการหลั่งโปรตีนแบบ T1SS ของโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC	18
1.11	โครงสร้างของโปรตีน HlyB-NBD dimer กับบริเวณ conserved motifs	19
1.12	โครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน HlyD	20
1.13	โครงสร้างของโปรตีน TolC ที่ทำหน้าที่เป็น outer membrane ในระบบ HlyA T1SS	22
1.14	กลไกการทำงานและผลกระทบของโปรตีน HlyA ต่อเซลล์เป้าหมาย	24
2.1	pET-17b vector	35

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.1	เชื้อ <i>E. coli</i> ที่แยกมาจากผู้ป่วย มีความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ด้วยวิธีการทดสอบ hemolytic activity	45
3.2	การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	46
3.3	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hlyA</i> ด้วยเทคนิค PCR และผลของดีเอ็นเอของยีน <i>hlyA</i> ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	48
3.4	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hlyC</i> ด้วยเทคนิค PCR และผลของดีเอ็นเอของยีน <i>hlyC</i> ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	49
3.5	การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน <i>hlyA</i> จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	52
3.6	การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน <i>hlyC</i> จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	53
3.7	Nucleotide sequence alignment ของยีน <i>hlyA</i> ใน <i>E. coli</i> 4 สายพันธุ์ เป็นการเปรียบเทียบจำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hlyA</i>	56
3.8	Nucleotide sequence alignment ของยีน <i>hlyC</i> ใน <i>E. coli</i> 4 สายพันธุ์ เป็นการเปรียบเทียบจำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hlyC</i>	60
3.9	แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน <i>hlyA</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง	61
3.10	แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน <i>hlyC</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง	62
3.11	แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง	63
3.12	แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyC ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง	64

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.13 ผลการตรวจสอบการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyA	67
3.14 ผลการตรวจสอบการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyC	68
3.15 ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน และผลการตรวจสอบการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม HlyA	71
3.16 ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน และผลการตรวจสอบการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม HlyC	72
3.17 การระบุชนิดโปรตีน HlyA ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS	75
3.18 การระบุชนิดโปรตีน HlyC ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS	76
3.19 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน alpha-hemolysin (ยีน: <i>hly</i> หรือ <i>hla</i>)	77
3.20 Amino acid sequence alignment ของโปรตีน alpha-hemolysin	79
3.21 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน adenylate cyclase toxin (CyaA)	81
3.22 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC	83
3.23 การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ระหว่าง calcium ion กับกรดอะมิโน ของโปรตีน HlyA ตรงบริเวณ RTX domain	87
3.24 การคาดการณ์การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ ระหว่าง calcium ion กับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ตรงบริเวณ RTX domain โดยเปรียบเทียบกับ กับโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน CyaA	88
3.25 Fluorescence emission spectra ของโปรตีน HlyA	89

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

α	=	Alpha
β	=	Beta
BSA	=	Bovine serum albumin
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celsius
EDTA	=	Ethylenediaminetetracetic acid
g	=	Gram
kDa	=	Kilodalton
pH	=	-log hydrogen ion concentration
μ	=	Micro
l	=	Liter
ml	=	Milliliter
M	=	Molar
ng	=	Nanogram
nm	=	Nanometer
mol	=	Mole
OD	=	Optical density
%	=	Percent
PDB	=	Protein data bank
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethane-1,2-diamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
UV	=	Ultraviolet
v/v	=	Volume per volume
w/v	=	Weight per volume

บทที่ 1

บทนำ

การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection หรือ UTI) เป็นโรคติดเชื้อที่ทำให้เกิดการอักเสบของอวัยวะภายในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ 1) การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะตอนล่าง (lower urinary tract infection หรือ lower UTI) การอักเสบเกิดที่บริเวณกระเพาะปัสสาวะ (cystitis) หรือท่อปัสสาวะ (urethritis) และ 2) การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะตอนบน (upper urinary tract infection หรือ upper UTI) เป็นชนิดที่เกิดได้ยากกว่า มีการติดเชื้อที่บริเวณกรวยไตส่งผลให้เป็นโรคกรวยไตอักเสบ (pyelonephritis) (Flores-Mireles *et al.*, 2015)

การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะเป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียที่พบบมากที่สุดทั่วโลก ในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อโดยประมาณ 150 ล้านคนทั่วโลก (Terlizzi *et al.*, 2017) และสามารถเกิดได้ในทุกเพศทุกวัย แต่จะพบบ่อยในผู้สูงอายุ เนื่องด้วยร่างกายของผู้สูงอายุส่วนใหญ่มีภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานโรคต่ำ โดยปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีได้หลายสาเหตุ เช่น การกลั้นปัสสาวะนาน ๆ การใช้สายสวนปัสสาวะในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัมพฤกษ์ อัมพาต ซึ่งมักเกิดกับเพศหญิงมากกว่าเพศชายและเกิดซ้ำได้บ่อยครั้ง เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของท่อปัสสาวะในเพศหญิงเปิดออกสู่ภายนอกบริเวณใกล้เคียงปากช่องคลอดและรอบปากทวารหนักที่เป็นแหล่งของเชื้อโรค รวมถึงขนาดของท่อปัสสาวะของเพศหญิงที่สั้นกว่าของเพศชายมากทำให้เชื้อสามารถเดินทางจากปากท่อไปยังกระเพาะปัสสาวะได้ง่าย (Mody & Juthani-Mehta, 2014) อาการของการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อย ได้แก่ ปัสสาวะครั้งละน้อย ๆ แต่บ่อยครั้ง โดยเฉพาะในเวลากลางคืนและอาจมีอาการปวดแสบในช่วงท้ายของการปัสสาวะ ในบางรายอาจมีปัญหากลั้นปัสสาวะไม่อยู่ โดยปัสสาวะมีลักษณะขุ่นหรือมีกลิ่นแรงผิดปกติ นอกจากนี้อาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น มีไข้ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อช่วงเอว รู้สึกอ่อนเพลีย คลื่นไส้ เป็นต้น การวินิจฉัยการติดเชื้อทำได้โดยดูประวัติอาการ การตรวจปัสสาวะเพื่อดูเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง การเอกซเรย์ช่องท้องและอุ้งเชิงกราน การส่องกล้องตรวจระบบทางเดินปัสสาวะ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม เช่น การตรวจข้อมือเชื้อ การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ ร่วมกับตรวจหาชนิดของยาปฏิชีวนะที่จะใช้ฆ่าเชื้อ (Mehnert-Kay, 2005) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีแถบตรวจหาสารไนไตรท์ในปัสสาวะ (urine nitrite test strip) ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อของแบคทีเรียในกลุ่ม

Enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* ยกเว้น *Candida*, *Streptococci* และ *Enterococci* (Mehnert-Kay, 2005) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารไนเตรต (nitrate) ให้เป็นสารไนไตรท์ (nitrite) ซึ่งการตรวจด้วยวิธีนี้จะต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญทางห้องปฏิบัติการและพบว่ามีข้อบกพร่องอยู่มาก เนื่องจากมักให้ผลการทดสอบเป็นลบโดยไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นเพราะไม่มีการติดเชื้อในตัวอย่างปัสสาวะจริง ๆ หรือเกิดข้อผิดพลาดจากสาเหตุอื่น ดังนั้นจากข้อบกพร่องด้านการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ จึงนำไปสู่การศึกษาโดยมุ่งเน้นให้เกิดการพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้วิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะอย่างง่าย

การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อยมักมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (Uropathogenic *E. coli* หรือ UPEC) คิดเป็นประมาณมากกว่า 80% ของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Parvez & Rahman, 2018) ซึ่งขั้นตอนสำคัญที่ก่อให้เกิดโรค UTI คือ แบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะตรงบริเวณเซลล์เยื่อผนังกระเพาะปัสสาวะ (uroepithelial cell) โดยอาศัยการทำงานของ virulence factor หลายชนิด ได้แก่ โพรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ เช่น *tryp 1 pili*, *P (Pap) pili*, *S pili*, *F1C pili* และ *Afa/Dr adhesins* โพรตีนสารพิษ (toxin) ที่ทำหน้าที่ทำลายการทำงานของเนื้อเยื่อภายในระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น โพรตีน α -hemolysin หรือ hemolysin A (HlyA) และ cytotoxic necrotizing factor1 (CNF1) (Flores-Mireles *et al.*, 2015) จากรายงานการศึกษาการตรวจหาชิ้นที่แสดงออกไปเป็น โพรตีนก่อโรคของเชื้อ UPEC จากผู้ป่วยจำนวน 254 คน ที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ ในภาคใต้ของประเทศไทย ณ โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช พบว่า 33.5% ของผู้ป่วยมีการตรวจพบชิ้นอย่างน้อยหนึ่งชิ้น ซึ่งชิ้นที่พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยมีการตรวจพบในอัตราที่เท่ากันมีทั้งหมด 3 ชิ้น คือ ชิ้นที่สังเคราะห์โปรตีน *P pili*, *CNF1* และ *HlyA* (Sukhumungoon *et al.*, 2015) แต่เนื่องจาก *P pili* จะมีบทบาทที่สำคัญและมีการแสดงออกในระยะเวลาที่มีการติดเชื้อตรงบริเวณไต และ *CNF1* สามารถแสดงออกได้ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งไม่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย UPEC (Kaper *et al.*, 2004) นอกจากนี้ พบการรายงานว่ารระดับความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของชิ้นที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน *HlyA* (O'Hanley *et al.*, 1991) ซึ่งโปรตีน *HlyA* นี้ จะไม่สามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic strains) แต่จะพบได้เฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเท่านั้น (Kerényi *et al.*, 2005) ดังนั้นโปรตีน *HlyA* จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก โดย

การนำโปรตีน HlyA นี้มาใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อระบุการติดเชื้อ แล้วนำไปสู่เป้าหมายในการพัฒนาแถบตรวจการติดเชื้อแบบใหม่ได้ในอนาคต

โปรตีน HlyA เป็นโปรตีนสารพิษชนิดหนึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มโปรตีน repeats in toxin หรือ RTX ที่ถูกหลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ผ่านกระบวนการหลั่งแบบ Type 1 secretion system (TISS) โดยการสังเคราะห์ (synthesis), การกระตุ้น (activation) และการหลั่ง (secretion) ของโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC จะถูกกำหนดด้วยการแสดงออกของ *hlyCABD* operon ที่อยู่บนโครโมโซม (chromosome) (Gentschev *et al.*, 2002) ซึ่งโปรตีน HlyA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในตอนแรกจะอยู่ในรูปของ pro-HlyA ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ โปรตีนจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active form) ก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน hemolysin-activating lysine - acyltransferase (HlyC) ผ่านปฏิกิริยา acylation ด้วยการย้าย (transfer) หมู่ acyl 2 หมู่จากโปรตีน acyl carrier protein (ACP) ไปยังตำแหน่ง K564 และ K690 ของ pro-HlyA ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดภายในไซโทซอล (cytosol) การเกิดปฏิกิริยา acylation นี้จึงจำเป็นอย่างมากสำหรับโปรตีน HlyA เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์เป้าหมายหลายชนิด โดยโปรตีน HlyA จะสร้างรูพรุน (pore) ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายส่งผลให้เซลล์เป้าหมายไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Peherstorfer *et al.*, 2018)

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีน HlyA ยังไม่ชัดเจนพอ เนื่องจากขาดข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีน HlyA และการฟอร์มรูพรุน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะผลิตโปรตีน HlyA แต่เนื่องด้วยโปรตีน HlyA จะอยู่ในรูป active form ได้จะต้องถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC ผู้วิจัยจึงต้องทำการผลิตโปรตีน HlyC ควบคู่ไปด้วย ซึ่งโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นและข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางโครงสร้างของโปรตีน active HlyA และอาจนำไปใช้ในการผลิต antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HlyA ของเชื้อ UPEC เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะอย่างง่ายได้ในอนาคต

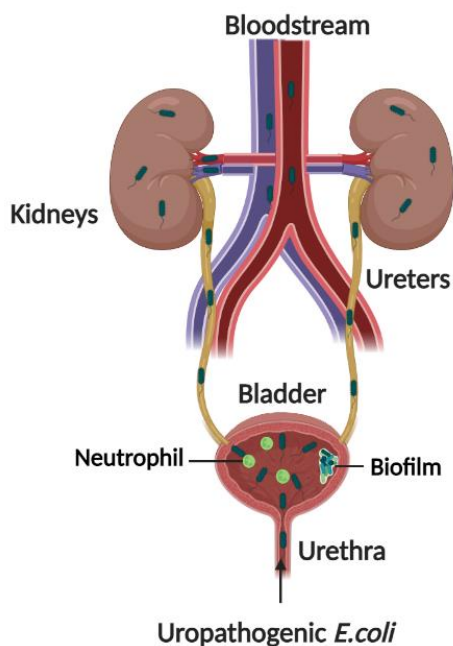
วัตถุประสงค์

1. สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *hlyA* และ *hlyC* จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UPEC ที่แยกได้จากผู้ป่วยในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
2. ผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน hemolysin A (HlyA) และ โปรตีน hemolysin-activating lysine-acetyltransferase (HlyC)
3. ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและโครงสร้างของโปรตีน HlyA และ โปรตีน HlyC

บททวนวรรณกรรม

1.1 กลไกการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ

การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะแบ่งออกเป็น 11 ขั้นตอน (Flores-Mireles *et al.*, 2015) ดังนี้ 1) การติดเชื้อจะเริ่มต้นขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ปนเปื้อนไปยังบริเวณท่อปัสสาวะและตั้งรกราก (colonize) ในท่อปัสสาวะ (รูปที่ 1.1) 2) เชื้อ UPEC ที่อยู่ในท่อปัสสาวะเคลื่อนย้าย (migration) ไปยังกระเพาะปัสสาวะ 3) จากนั้นเชื้อแบคทีเรีย UPEC เพิ่มจำนวนตัวเองแล้วเกิดการแสดงออก (expression) ของ pili และ adhesins เพื่อใช้ในการบุกรุก (invasion) ที่ superficial umbrella cells ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบในกระเพาะปัสสาวะ 4) เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เข้ามายังบริเวณที่อักเสบเพื่อกำจัดแบคทีเรีย 5) แบคทีเรียบางตัวมีการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน ไม่ว่าจะเป็นการบุกรุก host cell หรือผ่านการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphology) ส่งผลให้เกิดการติดต่อ neutrophil แบคทีเรียเหล่านี้จึงเพิ่มจำนวนตัวเองขึ้น 6) แบคทีเรียสร้าง biofilm ขึ้นใน epithelial cell 7) epithelial cell ภายในกระเพาะปัสสาวะถูกทำลายซึ่งเป็นผลมาจากแบคทีเรียผลิต toxins และ proteases 8) แบคทีเรีย UPEC เคลื่อนที่ไปยังไต 9) แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนตัวเองขึ้นภายในไต 10) เนื้อเยื่อภายในไตถูกทำลายจากการที่ UPEC ผลิต toxins 11) ถ้าไม่ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และแบคทีเรียสามารถเคลื่อนผ่าน tubular epithelial barrier ภายในไตได้ จะทำให้พัฒนาไปสู่การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) ได้ในที่สุด



รูปที่ 1.1 อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ

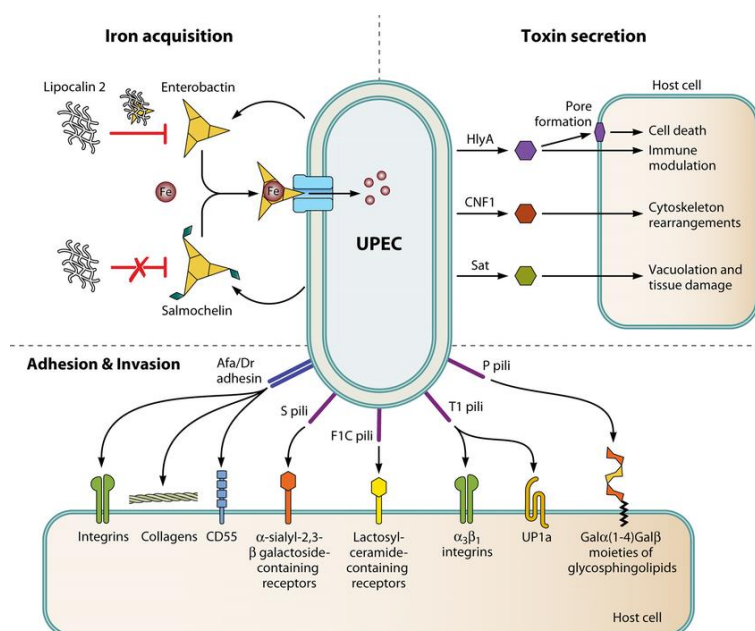
การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจะเริ่มจากเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่เกิดการปนเปื้อนไปยังบริเวณท่อปัสสาวะ (urethra) แล้วมีการเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณกระเพาะปัสสาวะ (bladder) และเพิ่มจำนวนตัวเองมากขึ้น เมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรีย UPEC ได้ด้วยระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้แบคทีเรียเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณไต (kidneys) หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาจะนำไปสู่การติดเชื้อในกระแสเลือด

1.2 Virulence factor ของเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่สำคัญต่อกลไกการก่อโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ

เชื้อแบคทีเรีย UPEC สามารถสร้าง virulence factor หลายชนิดที่ทำหน้าที่สำคัญในกลไกการก่อโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะทั้งในกระเพาะปัสสาวะและไต ซึ่งสามารถแบ่งได้หลายกลุ่มตามหน้าที่ ได้แก่ adhesins (Type 1 pili, P pili, S pili, Afa/Dr adhesins และ F1C pili), toxins (HlyA, CNF1 และ Sat) และ factor อื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 (Etefia, 2021) และรูปที่ 1.2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทในการทำงานและการจับกับ receptor

ตารางที่ 1.1 ข้อมูลเกี่ยวกับ receptor และหน้าที่ของ *E. coli* virulence factor

Virulence factor	Receptor/target	Role	Gene
Type 1 pili	mannosylated uroplakins, $\alpha_3 \beta_1$ integrins	Binding factor	<i>fimH</i>
P pili	Gal- α -1,4-Gal- β containing globoseries glycosphingolipids	For binding to the uroepithelial cells	<i>papG</i>
S pili	α -sialyl-2,3- β -galactoside -containing receptor	Binding factor	<i>sfa</i>
F1C pili	lactosylceramide-containing	Binding factor	<i>focA</i>
Afa/Dr adhesins	Integrins, Collagens, CD55	Binding factor	<i>afa/drB</i>
Hemolysin A (HlyA)	Erythrocytes, Leukocytes	Cell lysis	<i>hlyA</i>
Cytotoxic necrotizing factor1 (CNF1)	RhoA, CDC42, RAC	Altered cytoskeleton, necrosis	<i>cnf1</i>
Secreted autotransporter toxin (Sat)	?	Vacuolation, Tissue damage	<i>sat</i>
Salmochelin	Siderophore receptor	Small iron chelator molecules, uptake	<i>iroN</i>
Aerobactin	Siderophore receptor	Iron chelation, uptake	<i>iucD, iutA</i>
Yersiniabactin	Siderophore receptor	Iron uptake, biofilm formation	<i>fyuA</i>
Haemin	Haem receptors	Iron uptake, biofilm formation	<i>Hmn,</i> <i>chuA</i>
Outer membrane protease T	-	Outer membrane protease production to degrade protamine peptide	<i>ompT</i>



รูปที่ 1.2 Virulence factors ที่ส่งเสริมการอยู่รอดและบ่งบอกความรุนแรงของ UPEC ภายใน host

(ซ้าย) Virulence factors ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบการนำธาตุเหล็ก (Fe) เข้าสู่เซลล์ (iron acquisition systems) เนื่องจากธาตุ Fe เป็นองค์ประกอบสำคัญสำหรับการอยู่รอดของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่ง factor ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น enterobactin และ salmochelin โดย enterobactin จะถูกยับยั้งการนำธาตุ Fe เข้าเซลล์ได้ด้วยโปรตีน lipocalin ของ host ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงกลไกการยับยั้งนี้ แบคทีเรีย UPEC จึงผลิต salmochelin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ enterobactin ที่ถูกดัดแปลงให้อยู่ในรูป glucosylated ทำให้ไม่ถูกจดจำโดยโปรตีน lipocalin และยังคงสามารถนำธาตุ Fe เข้าเซลล์ได้

(ขวา) เชื้อแบคทีเรีย UPEC หลั่งสารพิษหลายชนิด ได้แก่ HlyA, Sat และ CNF1 ที่สามารถทำลาย host proteolytic cascade, membrane trafficking, cytoskeleton rearrangements, inflammatory response และ survival pathway ของ host cell

(ล่าง) แบคทีเรีย UPEC สามารถจับกับ host cell และเนื้อเยื่อผ่าน adhesin หลายชนิด เช่น Afa/Dr adhesin (จับ integrins, collagens หรือ CD55), S pili (จับกับ α -sialyl-2,3- β galactoside-containing receptors), F1C pili (จับ lactosylceramide-containing receptors), type 1 pili (T1) (จับได้ทั้ง $\alpha_3\beta_1$ integrins และ UP1a) และ P pili (จับ glycosphingolipids ตรงบริเวณ Gal α (1-4) Gal β moieties)

(ที่มา: Barber *et al.*, 2016)

1.2.1 Virulence factor ของ UPEC ที่สำคัญต่อกลไกการก่อโรคติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ

ในกระเพาะปัสสาวะ (รูปที่ 1.3A) Type 1 pili หรือ T1 pili ซึ่งเป็น virulence factor ของเชื้อ UPEC ที่เกี่ยวข้องกับกาวยึดเกาะ (adhesin) และจำเป็นสำหรับการ colonization, invasion และ persistence จะถูกกระตุ้นให้แสดงออก โดยปลายสุดของ Type 1 pili ประกอบด้วยโปรตีน FimH (รูปที่ 1.4) ซึ่งจะจับจำเพาะกับ transmembrane protein ได้แก่ mannosylated uroplakins และ $\alpha_3 \beta_1$ integrins (รูปที่ 1.2) เพื่อเริ่มการ colonization และ invasion เข้าสู่ umbrella cells จากการจับกันของ Type 1 pili กับเซลล์เหล่านี้ก่อให้เกิดการถ่ายโอนสัญญาณแบบเป็นลำดับ เพื่อกระตุ้น Rho family GTPases เช่น โปรตีน Rac ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของ actin และแบคทีเรีย UPEC เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่ cytoplasm ของ umbrella cell แล้วเพิ่มจำนวนตัวเองอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเกิด invasion นี้เป็นการทำลายการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host แล้วกลายมาเป็นการติดต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาด้วยการสร้าง intracellular bacterial communities (IBCs) ที่มีรูปร่างเหมือนกับ biofilm เพื่อเปลี่ยนรูปร่างเป็น UPEC filament ส่งผลทำให้เชื้อ UPEC ติดต่อ neutrophil และเมื่อเชื้อ UPEC ที่อยู่ภายใน IBC มีการเจริญเต็มที่แล้วแบคทีเรียเหล่านั้นก็จะแยกย้ายจาก IBC เพื่อไปบุกรุกเซลล์อื่น ๆ ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรีย UPEC สามารถกลับเข้าสู่วัฏจักร IBC ได้อีกครั้ง นอกจากนี้การทำลายการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดยังมีอีกวิธีหนึ่ง คือ แบคทีเรีย UPEC จะสร้าง quiescent intracellular reservoirs (QIRs) ใน transitional cell ที่ประกอบด้วย 4-10 non-replicating bacteria มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกแบ่งเป็นช่องด้วย F-actin ทำให้เชื้อแบคทีเรีย UPEC สามารถอยู่ได้นานหลายเดือน

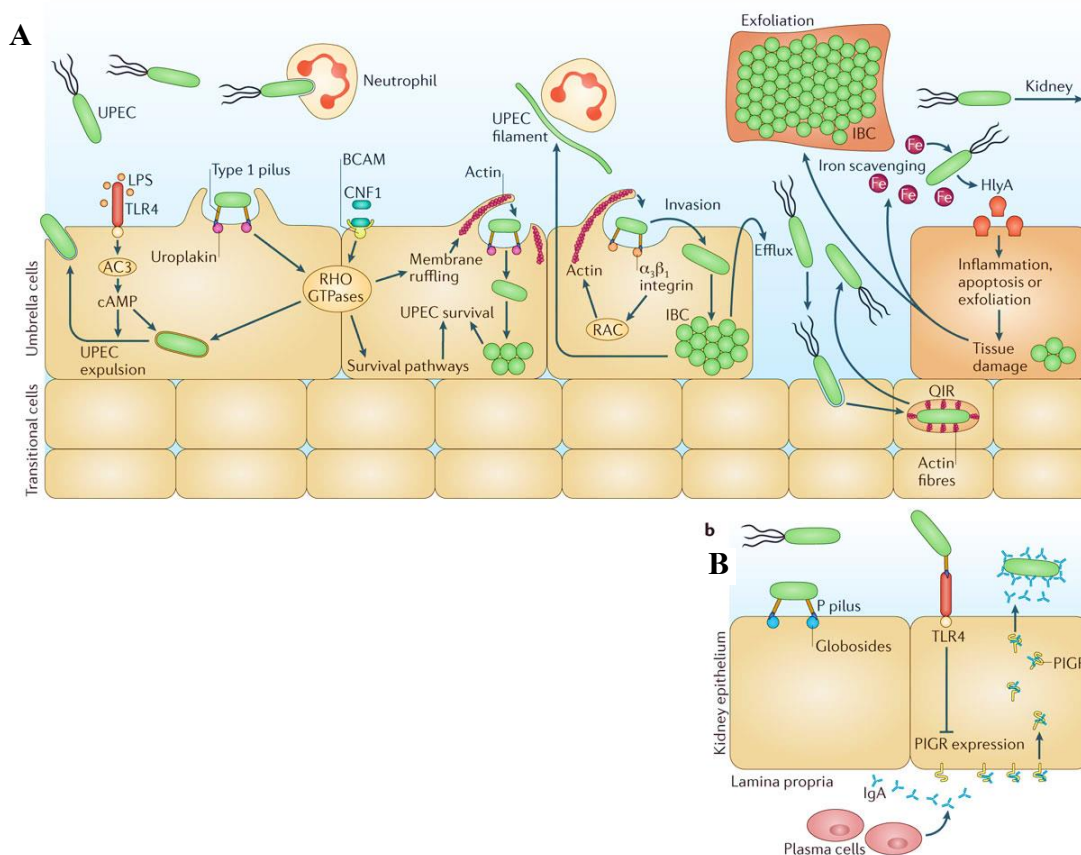
สำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดมีบทบาทที่สำคัญสำหรับการปกป้องเนื้อเยื่อ uroepithelium หลังจากการ invasion ของเชื้อแบคทีเรีย UPEC ผ่านกลไกการกำจัดเชื้อที่ขึ้นอยู่กับกาแสดงออกของ Toll-like receptor 4 (TLR4) ที่อยู่ตรงบริเวณพื้นผิวของ uroepithelial cell โดยจะเริ่มขึ้นเมื่อ lipopolysaccharide (LPS) ถูกปล่อยจากแบคทีเรีย UPEC แล้วจับกับ TLR4 เกิดการกระตุ้น adenylyl cyclase 3 (AC3) ให้ผลิต cyclic AMP จากนั้นส่งผลให้เกิด exocytosis ของ vesicular UPEC โดยจะส่งผ่าน apical plasma membrane ของ umbrella cells เพื่อออกนอกเซลล์ ซึ่งกระบวนการ exocytosis นี้เป็นการกำจัดแบคทีเรียที่เกิดจากการ invasion ออกนอกเซลล์

นอกจากนี้แบคทีเรีย UPEC ยังสามารถอยู่รอดในกระเพาะปัสสาวะที่มีสภาวะแวดล้อมรุนแรงได้ โดยการหลั่ง virulence factor หลายชนิดที่มีความสำคัญต่อการได้รับสารอาหารของเชื้อแบคทีเรีย เช่น โปรตีนสารพิษ α -hemolysin หรือ hemolysin A (HlyA) สารพิษนี้จะส่งเสริมการ

สลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ host ด้วยการสร้างรูพรุนทำให้ธาตุเหล็ก (iron หรือ Fe) และ สารอาหารอื่น ๆ ถูกปล่อยออกมาจาก host cell ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ HlyA ยังกระตุ้นการผลัดเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial exfoliation) เผยให้เห็นชั้นที่สึกลงไปของเนื้อเยื่อ uroepithelium ที่เรียกว่า ชั้น transitional cell เพื่อสนับสนุนการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย UPEC ไปยัง host อื่น ๆ เมื่อมีการขับปัสสาวะ ออก, siderophore (รูปที่ 1.4) ช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถจับกับ Fe ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งถูก ปล่อยออกมาจาก host cell โดยโปรตีน HlyA ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ ในระบบทางเดินปัสสาวะ โปรตีนสารพิษ cytotoxic necrotizing factor1 (CNF1) มีผลต่อการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของ host cell โดย CNF-1 จะจับกับ basal cell adhesion molecule (BCAM) บน host cell เพื่อกระตุ้น RHO GTPases เช่น RAC1, RHOA และ cell division control 42 (CDC42) ส่งผลให้เกิดการจัดเรียงโครงร่างใหม่ของ actin ภายในเซลล์และทำให้เกิด membrane ruffling การกระตุ้น RAC1 ทำให้เกิดการ anti-apoptotic และ pro-survival pathway ของ host cell โดยผ่านการทำงานร่วมกันของ phosphoinositide 3-kinase (PI3K), AKT (มีอีกชื่อคือ PKB) และ nuclear factor- κ B (NF- κ B) ซึ่งจะช่วยป้องกันการ apoptosis ของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีแบคทีเรีย UPEC จำนวนมากเกิดการ colonization อยู่ ซึ่งการอยู่รอดนอก uroepithelial cell ของ UPEC จำเป็นต้องหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) ด้วยการเปลี่ยนสถานะ วิทยาให้มีรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถต้านทานการกำจัดด้วยเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็น bacillus

1.2.2 Virulence factor ของ UPEC ที่สำคัญต่อการก่อโรคติดเชื้อในไต

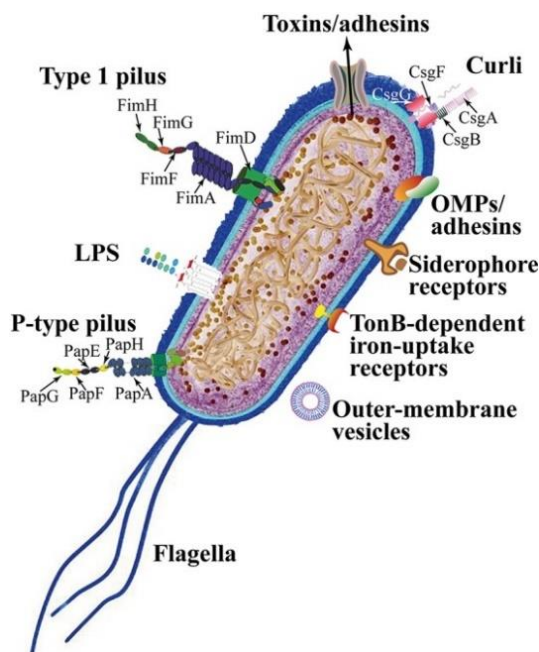
การ colonization ของเชื้อแบคทีเรีย UPEC ภายในไต (ดังรูปที่ 1.3B) จะขึ้นอยู่กับ การ expression ของ pyelonephritis-associated (P) pili โดยปลายสุดของ P pilus จะประกอบด้วยโปรตีน adhesin PapG (รูปที่ 1.4) ซึ่งจะ ไปจับกับ globoside-containing glycolipids ที่เคลือบอยู่บน renal tissue นอกจากนี้ PapG ยังสามารถจับกับ TLR4 ได้ทำให้ช่วยลดการแสดงออกของ polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) ส่งผลให้การขนส่ง immunoglobulin A (IgA) จาก lamina propria ไปที่ renal epithelium ลดลง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อแบคทีเรีย UPEC สามารถหลบหลีกกลไกการ ป้องกันที่สำคัญของ host cell เนื่องจากขาดการขนส่ง IgA ใน renal epithelial แล้วนำไปสู่การเพิ่ม จำนวนของแบคทีเรียให้ไปยังส่วนอื่น ๆ ของทางเดินปัสสาวะ (Flores-Mireles *et al.*, 2015)



รูปที่ 1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงจากแบคทีเรีย UPEC ที่ทำให้เกิดโรค UTI

- (A) Virulence factor ของเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่เกิดการแสดงออกในขณะที่มีการติดเชื้อมากในกระเพาะปัสสาวะ ได้แก่ Type 1 pili ทำหน้าที่ในการยึดเกาะเซลล์ และจำเป็นสำหรับการ colonization, invasion และ persistence ของ host cell, โพรตีนสารพิษ HlyA ทำหน้าที่ในการสลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ host ด้วยการสร้างรูพรุน ส่งผลทำให้ Fe และ สารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียถูกปล่อยออกมาจาก host cell, siderophore ช่วยให้แบคทีเรียสามารถจับกับ Fe ที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งเป็น Fe ที่เกิดจากการถูกปลดปล่อย โดยโปรตีน HlyA ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ และ โพรตีนสารพิษ CNF-1 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของ host cell
- (B) Virulence factor ที่สำคัญต่อการเกิด โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะที่พบภายในไต ประกอบด้วย P pili ทำหน้าที่ในการยึดเกาะเซลล์และจำเป็นสำหรับการ colonization

(ที่มา: Flores-Mireles *et al.*, 2015)



รูปที่ 1.4 โครงสร้างและองค์ประกอบของ virulence factor ที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย

UPEC

Type 1 pili ถูกถอดรหัสด้วย *fim* operon และ P pili ถูกถอดรหัสด้วย *pap* operon โดย pili ทั้งสองประเภทนี้เป็น heteropolymeric ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยโปรตีน pilus ซึ่ง Type 1 pili จะมีโปรตีน FimH ส่วน P pili มีโปรตีน PapG อยู่ตรงบริเวณส่วนปลายสุดและเป็นตัวแทนของ adhesin ที่แท้จริง ทำหน้าที่ในการจับกับ carbohydrates ตรงบริเวณพื้นผิวของ host cell, lipopolysaccharide (LPS) เป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น amphipathic ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) ที่ต่อกับ oligosaccharide และมีความสามารถในการตั้งรกรากตรงบริเวณกระเพาะปัสสาวะอย่างเหนียวแน่น โดยจะจับกับ TLR4, siderophore ทำหน้าที่เป็น receptor ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียไปจับกับ Fe ที่อยู่นอกเซลล์

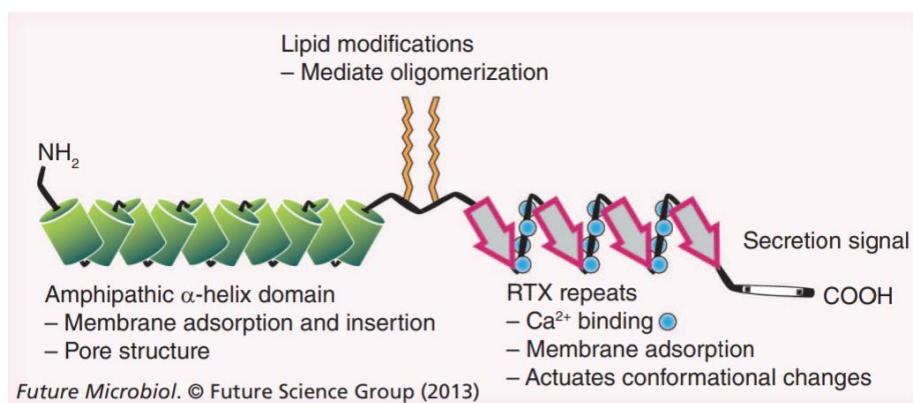
(ที่มา: Terlizzi *et al.*, 2017)

1.3 คุณสมบัติของโปรตีน HlyA

จากการศึกษาข้อมูลของโปรตีน HlyA พบว่า โปรตีนนี้ยังไม่มีแบบจำลองและผลึกโครงสร้าง 3 มิติ มีแต่การศึกษาที่เป็น fragment สั้น ๆ แล้วนำข้อมูลที่ได้มารวบรวมเพื่อใช้อธิบายคุณสมบัติของโปรตีน HlyA ทั้งโปรตีน โดยโปรตีน HlyA ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 1,024 ตัว มีมวลโมเลกุล 110 kDa และแบ่งออกได้เป็นหลาย domain บริเวณ C-terminus ประกอบด้วย non-cleaved secretion signal และ RTX domain ซึ่งเป็นชนิด nonapeptide มีลำดับซ้ำ (repeats) เป็น GGxGxDxUx (U คือ large hydrophobic amino acid และ x คือ amino acid ชนิดใดก็ได้) (Thomas, Holland *et al.*, 2014) โดยบริเวณ RTX domain นี้จะจับกับ calcium ion (Ca^{2+}) หลังจากที่โปรตีนถูกหลั่งออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้บริเวณ RTX domain ที่อยู่ตรง C-terminus มีโครงสร้างเป็นแบบ β -roll (รูปที่ 1.5) และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทั้งโปรตีน เพื่อให้โปรตีน HlyA เกิดความเสถียรและเผยให้เห็นบริเวณ side chains ที่จะสามารถเกิด interaction กับผนังเซลล์ของ host cell ได้ ส่วน N-terminus ของโปรตีน HlyA มีโครงสร้างเป็นแบบ α -helices และมีคุณสมบัติเป็น amphipathic ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positively charged amino acid) จำนวน 10 ตัว ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างรูพรุนบนพื้นผิวเซลล์ของ host cell (host cell surface) หรือภายในชั้นเมมเบรนของ host cell (host cell membrane) (Wiles & Mulvey, 2013)

นอกจากนี้โปรตีน HlyA ยังมีบริเวณที่สำคัญอีกหลายบริเวณซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกัน (รูปที่ 1.6) ดังนี้ บริเวณของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) ได้แก่ ตำแหน่ง amino acid ที่ 9-37, 564-739 และ 626-726 โดยพบว่า amino acid ที่ 9-37 หากขาด amino acid ตรงบริเวณนี้จะทำให้ hemolytic เพิ่มขึ้น 2.5 เท่าจากเดิมของ wild-type และส่งผลให้การสร้าง pore เสถียรยิ่งขึ้น (Ludwig *et al.*, 1991) และที่ตำแหน่ง amino acid 564-739 สามารถเกิด hemolytic activity กับเซลล์เป้าหมายได้ แต่จะไม่รุนแรงเท่ากับโปรตีน HlyA ที่อยู่ในรูปของ wild-type (Forestier & Welch, 1991) ตำแหน่ง amino acid 626-726 ของโปรตีน HlyA เป็นบริเวณที่จับกับ anti-HlyA monoclonal D12 antibody ซึ่ง antibody นี้มีหน้าที่ในการ blocking ต่อ hemolytic activity โดยจะจดจำบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา acylation ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของแอนติเจน (epitope) เพื่อไม่ให้โปรตีน HlyA อยู่ในรูป active form (Rowe *et al.*, 1994) ส่วนบริเวณของกรดอะมิโนอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการ hemolytic activity เช่น ตำแหน่ง amino acid 272-301 พบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้แทรกอยู่ใน lipid bilayer ของเซลล์เป้าหมายตอนระหว่างการสร้าง pore (Valeva *et al.*, 2008) ตำแหน่ง

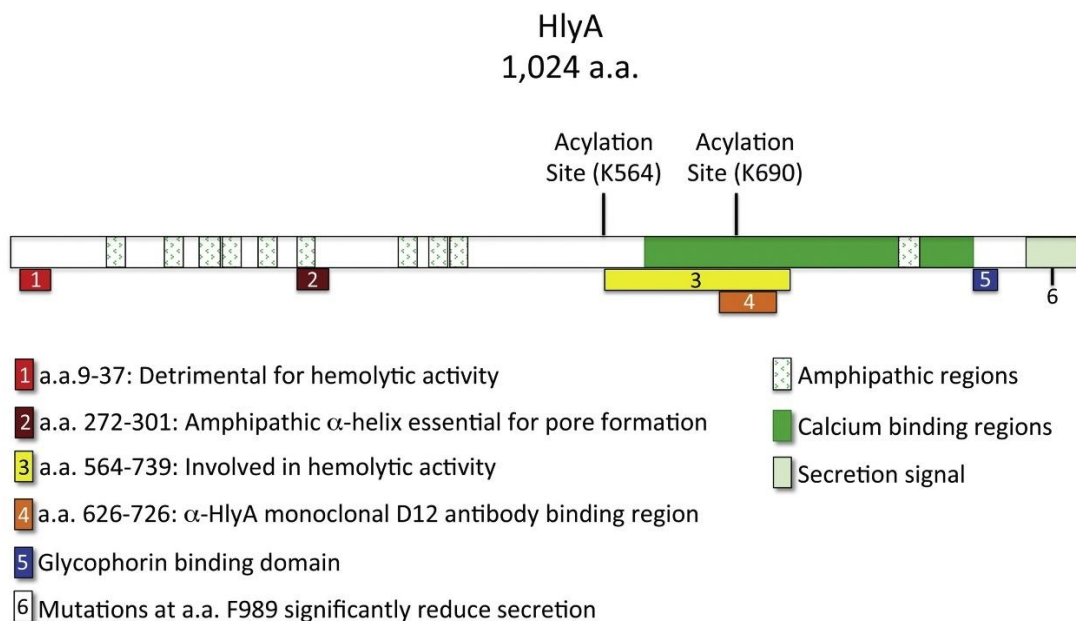
amino acid 914-936 จะจับกับ glycophorin receptor บน red blood cell (RBC) ซึ่งกลไกการทำงาน ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Cortajarena *et al.*, 2003) และตำแหน่ง amino acid 989 ซึ่งเป็น phenylalanine (F989) สำคัญสำหรับใช้ในกระบวนการหลังโปรตีน HlyA (Ristow & Welch, 2016)



รูปที่ 1.5 องค์ประกอบ (domain) ของโปรตีน hemolysin A

ส่วน N-terminus ของ HlyA มีลักษณะทางโครงสร้างเป็น α -helices และมีคุณสมบัติเป็น amphipathic ในขณะที่ ส่วน C-terminus มีโครงสร้างเป็นแบบ β -roll ประกอบด้วย non-cleaved secretion signal และ RTX domain ซึ่งบริเวณกึ่งกลางระหว่างปลายทั้งสองมีกรดอะมิโนที่สำคัญ 2 ตำแหน่ง คือ K564 และ K690 กรดอะมิโนทั้งสองตำแหน่งนี้จะช่วยให้โปรตีน HlyA ถูกเปลี่ยนไปเป็น active form ในกระบวนการ acylation

(ที่มา: Wiles & Mulvey, 2013)



รูปที่ 1.6 บริเวณที่สำคัญบนโปรตีน hemolysin A (HlyA)

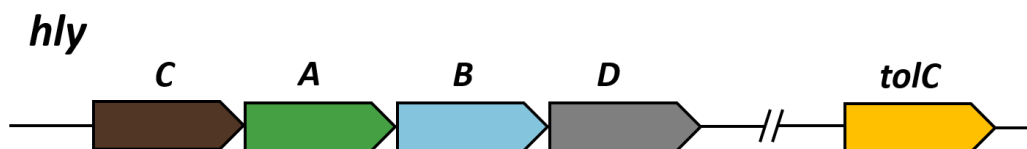
จากกรดอะมิโนทั้งหมด 1,024 ตัว บนสาย polypeptide ของโปรตีน HlyA สามารถแบ่งตามหน้าที่หรือการทำงาน ได้ดังนี้ บริเวณที่เกี่ยวข้องกับ hemolytic activity ประกอบด้วย หมายเลข 1 หรือ ตำแหน่ง amino acid ที่ 9-37, หมายเลข 3 หรือ ตำแหน่ง amino acid 564-739, หมายเลข 4 หรือ ตำแหน่ง amino acid 626-726 ของโปรตีน HlyA ส่วนหมายเลข 2 หรือ ตรงตำแหน่ง amino acid 272-301 ทำหน้าที่สำคัญในการสร้าง pore, หมายเลข 5 หรือ ตำแหน่ง amino acid 914-936 เป็นบริเวณที่จับกับ glycophorin receptor บนเซลล์เม็ดเลือดแดงเป้าหมาย และหมายเลข 6 เป็นบริเวณที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลั่งโปรตีน HlyA และมักมีการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้น เช่น ตำแหน่ง amino acid 989 ซึ่งเป็น phenylalanine

(ที่มา: Ristow & Welch, 2016)

1.4 การสังเคราะห์ การกระตุ้น และการหลั่งของ โปรตีน HlyA

กระบวนการสังเคราะห์ การกระตุ้น และการหลั่งของโปรตีน HlyA จะถูกควบคุมผ่าน *hlyCABD* operon และ *tolC* gene (รูปที่ 1.7) ซึ่งอยู่บน chromosome ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะในมนุษย์ (UPEC) (Nagy *et al.*, 2006) โดยในช่วงแรกของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน HlyA จะอยู่ในรูปของ pro-HlyA ที่เป็น unfolded polypeptide และไม่สามารถทำงานได้ (inactive) โปรตีน HlyA จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นให้

เปลี่ยนไปอยู่ในรูป active form โดยการทำงานของ HlyC และถูกปล่อยออกจากเซลล์แบคทีเรียเพื่อไปยังเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีน HlyB, HlyD และ TolC



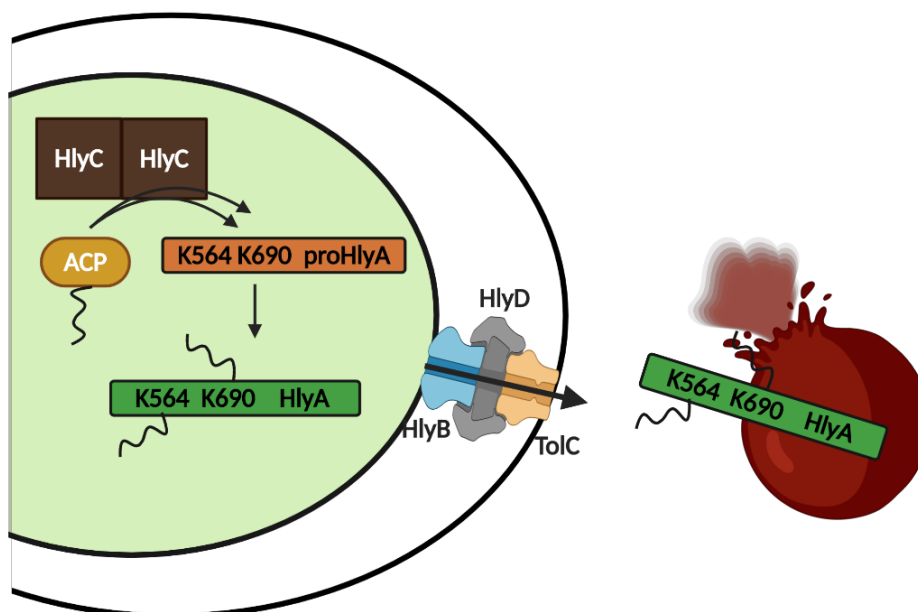
รูปที่ 1.7 การจัดเรียง *hlyCABD* operon และยีน *tolC* บนโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรีย UPEC

ยีน *hlyC* สังเคราะห์โปรตีน hemolysin-activating lysine-acyltransferase (HlyC), ยีน *hlyA* สังเคราะห์โปรตีน hemolysinA (HlyA), ยีน *hlyB* สังเคราะห์โปรตีน HlyB, ยีน *hlyD* สังเคราะห์โปรตีน HlyD และยีน *tolC* สังเคราะห์โปรตีน TolC โดยยีน *tolC* ไม่เกี่ยวข้องกับ *hlyCABD* operon แต่มีความสำคัญสำหรับกระบวนการหลังโปรตีน HlyA ออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

1.4.1 การกระตุ้นโปรตีน HlyA (Activation of HlyA) ด้วยเอนไซม์ HlyC

โปรตีน pro-HlyA ที่ถูกผลิตออกมาในตอนแรกจะยังไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งต้องผ่านการเกิดกระบวนการ post-translation ก่อน นั่นคือ การเกิดปฏิกิริยา fatty acylation โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ hemolysin-activating lysine-acyltransferase (HlyC) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาด้วยการย้ายหมู่ acyl 2 หมู่จากโปรตีน acyl carrier protein (ACP) ไปทำปฏิกิริยา acylation กับกรดอะมิโน lysine 2 ตัว คือ K564 และ K690 ใน pro-HlyA (รูปที่ 1.8) ทำให้โปรตีน pro-HlyA เปลี่ยนไปอยู่ในรูป active HlyA ที่มีฤทธิ์ hemolytic activity เพื่อไปทำลาย host cell (Peherstorfer *et al.*, 2018) กระบวนการสังเคราะห์และการกระตุ้นดังกล่าวเกิดขึ้นภายใน cytosol ของเซลล์แบคทีเรีย (Vázquez *et al.*, 2016)

HlyC เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างเป็น homodimer โดยแต่ละ monomer จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 20 kDa เอนไซม์ HlyC มีความสำคัญอย่างมากสำหรับการกระตุ้นให้โปรตีนสารพิษ HlyA ทำงานได้ และโปรตีน HlyC มีความสามารถในการจับกับ heme ที่ถูกปล่อยจากเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยโปรตีน HlyA ตรงตำแหน่ง histidine 151 (H151) ด้วยพันธะ coordinate ตรงตำแหน่ง histidine 152 (H151) ด้วยพันธะ ไฮโดรเจน ซึ่งเมื่อ heme จับกับโปรตีนจะทำให้เกิดการยับยั้ง enzymatic activity ของโปรตีน HlyC (Peherstorfer *et al.*, 2018)



รูปที่ 1.8 กลไกการทำงานของโปรตีน HlyA

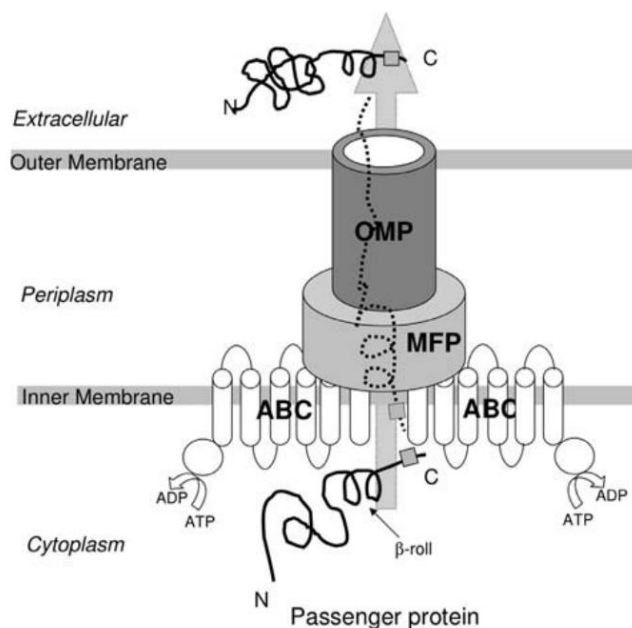
โปรตีน HlyA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นตอนแรกจะอยู่ในรูปของ proHlyA ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ โดยโปรตีน proHlyA จะอยู่ในรูปของ active form ได้จะต้องถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC ผ่านการเกิดปฏิกิริยา acylation ด้วยการย้ายหมู่ acyl 2 หมู่จากโปรตีน ACP ไปยังตำแหน่ง K564 และ K690 ของ proHlyA ภายในไซโทซอล เมื่อโปรตีน HlyA เกิดการ active แล้วจะถูกหลั่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย ผ่านกระบวนการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย มีชื่อทางการว่า Type1 secretion systems (T1SS) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนสามชนิด คือ hemolysin A translocation ATP-binding protein (HlyB), hemolysin-secretion membrane fusion protein (HlyD) และ โปรตีน outer membrane protein (TolC) แล้วไปจับและทำลายเซลล์เป้าหมาย

1.4.2 การหลั่งโปรตีน HlyA ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Secretion of HlyA)

Type 1 secretion systems (T1SS) เป็นกระบวนการหลั่งโปรตีนหรือสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ออกจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเป็นที่พบแพร่หลายในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *E. coli*, *Vibrio cholerae* และ *Bordetella pertussis* เป็นต้น โดยกระบวนการหลั่งแบบ T1SS ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อแบคทีเรีย UPEC ที่สังเคราะห์โปรตีน HlyA (Thomas, Holland, *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตาม กลไกการหลั่งของโปรตีนแบบ T1SS จะเกิดขึ้นเพียงขั้นตอนเดียว โดยไม่ผ่านตัวกลางอย่างชั้น periplasmic ของแบคทีเรีย ซึ่งกลไกของ T1SS จะประกอบด้วยโปรตีนสามชนิด

เท่านั้น (ดังรูปที่ 1.9) คือ โปรตีน ATP - binding cassette (ABC) transporter ซึ่งได้รับพลังงานผ่าน ATP hydrolysis, membrane fusion protein (MFP) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะ form complex ที่เสถียรอยู่ตรงบริเวณ inner membrane และเชื่อมเข้าไปในชั้น periplasm ของแบคทีเรีย แล้วก็เชื่อมต่อกับ outer membrane protein (OMP) ที่อยู่บริเวณ outer membrane แต่มีความยาวลึกลงไปในชั้น periplasm ให้เป็นท่อปล่อง (tunnel) (Holland *et al.*, 2005)

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย UPEC โปรตีนสามชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลั่งแบบ T1SS ของโปรตีน HlyA ประกอบด้วย โปรตีน HlyB ทำหน้าที่เป็น ABC transporter, HlyD ทำหน้าที่เป็น MFP และ TolC ทำหน้าที่เป็น OMP (รูปที่ 1.10) (Lecher *et al.*, 2012)

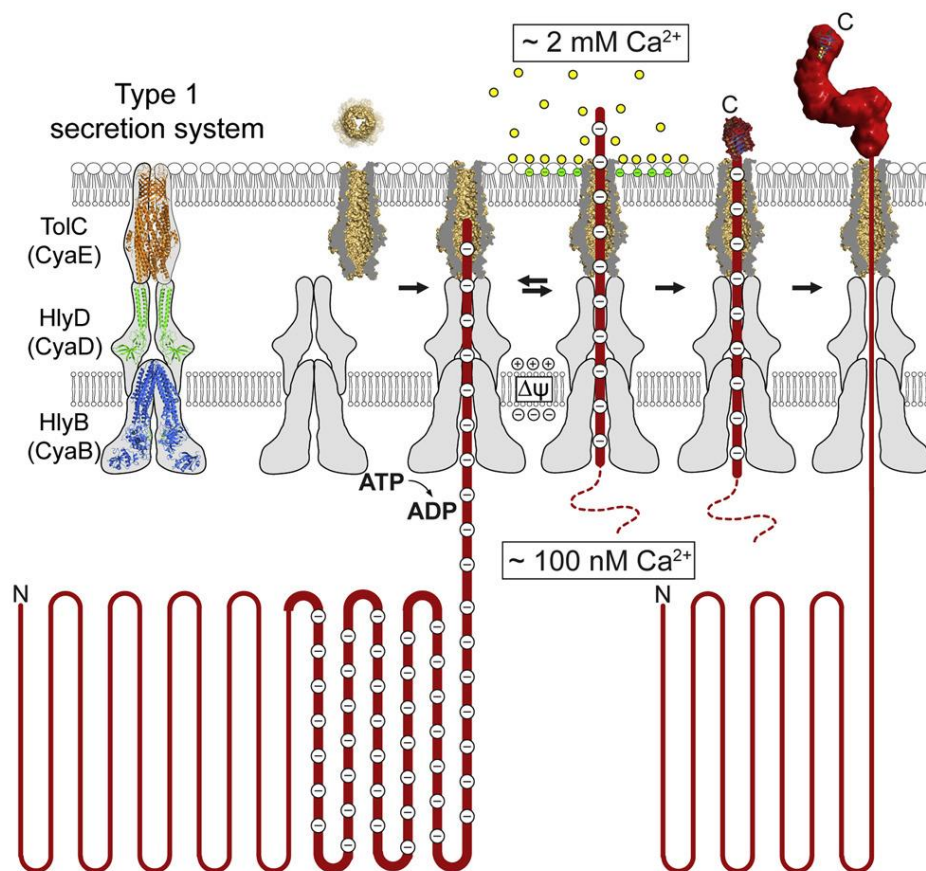


รูปที่ 1.9 แบบจำลองโครงสร้างของกลไกการหลั่งโปรตีนและสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ แบบ T1SS

(A model of T1SS mechanism)

โปรตีนสามชนิดที่ทำงานร่วมกันใน T1SS ได้แก่ ABC หรือ ATP-binding cassette transporter, MFP หรือ membrane fusion protein และ OMP หรือ outer membrane protein

(ที่มา: Angkawidjaja & Kanaya, 2006)

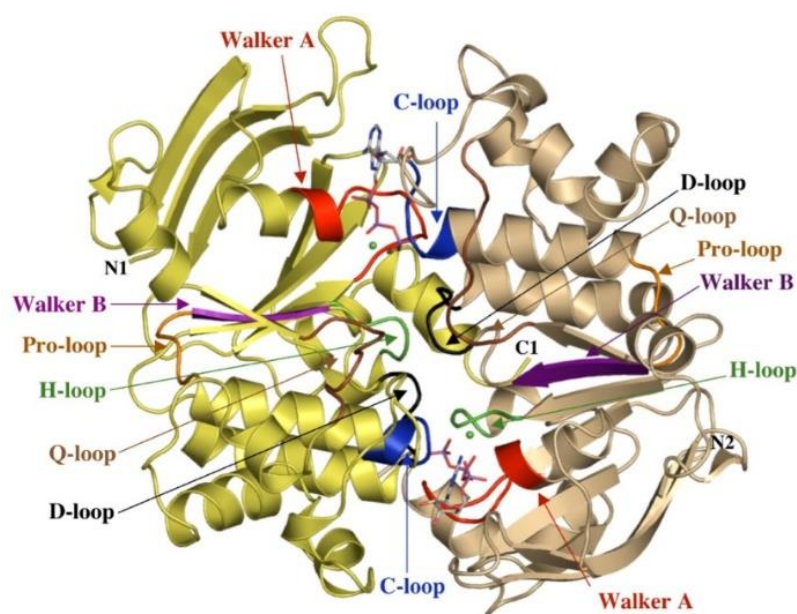


รูปที่ 1.10 กลไกการหลั่งโปรตีนแบบ T1SS ของโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย UPEC
 HlyB ทำหน้าที่เป็น ABC transporter (สีฟ้า) มีโครงสร้างเป็น dimer, HlyD ทำหน้าที่เป็น MFP (สีเขียว) และ TolC ทำหน้าที่เป็น OMP (สีเหลือง) มีโครงสร้างเป็น trimer
 (ที่มา: Bumba *et al.*, 2016)

1.4.2.1 HlyB

โปรตีน HlyB ทำหน้าที่เป็น ABC transporter ใน HlyA T1SS ซึ่งจะกระตุ้นการขนส่งสารจำนวนมากเข้าหรือออกจากเซลล์ เช่น ions, amino acids, antibiotics และ proteins เป็นต้น โดยอาศัยพลังงานสำหรับการขนส่งผ่านกระบวนการ ATP hydrolysis โครงสร้างของโปรตีน HlyB จะเหมือนกับ ABC transporter ทั่ว ๆ ไป กล่าวคือ ประกอบด้วย hydrophobic transmembrane domains (TMDs) จำนวน 2 domain และ hydrophilic nucleotide binding domains (NBDs) จำนวน 2 domain ซึ่งทั้ง 4 domain นี้จะอยู่บนสาย polypeptide 2 เส้นที่แตกต่างกัน โดยแต่ละเส้นของ polypeptide จะ

ประกอบด้วย TMD และ NBD อย่างละหนึ่ง domain เพื่อให้มีโครงสร้างเป็น dimer ทำให้โปรตีน HlyB อยู่ในรูป active form (Thomas, Holland, *et al.*, 2014) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ TMD จาก HlyB มีความคล้ายคลึงน้อยหรือไม่เหมือนเลยเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่น ๆ ในกลุ่ม ABC transporter จึงทำให้ยังไม่มีโครงสร้างในฐานข้อมูลให้ศึกษาเปรียบเทียบ แต่สำหรับ NBDs จาก HlyB มีหลายบริเวณที่เป็น conserved motif สูง เช่น Walker A, Walker B, C-, Q-, D-, H- และ Pro-loops โดยโครงสร้างผลึกของ HlyB-NBD-dimer แสดงดังรูปที่ 1.11 (Zaitseva *et al.*, 2005)

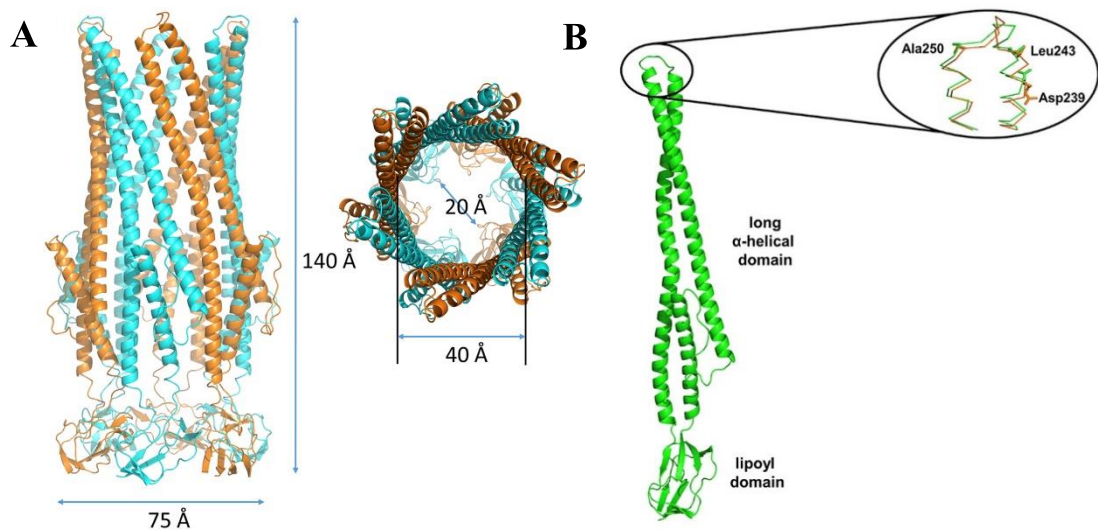


รูปที่ 1.11 โครงสร้างของโปรตีน HlyB-NBD dimer และบริเวณ conserved motifs

จากโครงสร้างผลึกของ HlyB-NBD-dimer H662A (PDB ID: 2FFA) แสดงตำแหน่งที่เป็น conserved motif สูง ได้แก่ Walker A (สีแดง), Walker B (สีม่วง), C-loop (สีน้ำเงิน), Q-loop (สีน้ำตาลอ่อน), D-loop (สีดำ), H-loop (สีเขียว) และ Pro-loop (สีเขียว) จากโครงสร้างจะแสดงให้เห็นตรงที่เป็นก้าน (sticks) คือ ATP ส่วนสีเขียวรูปทรงกลม (sphere) คือ Mg^{2+} (ที่มา: Zaitseva *et al.*, 2005)

1.4.2.2 HlyD

MFP ของ HlyA T1SS คือโปรตีน HlyD หรือเรียกอีกชื่อว่า periplasmic adaptor protein ซึ่ง จะเชื่อมอยู่ระหว่างโปรตีน HlyB ตรงบริเวณ inner membrane และ TolC ตรงบริเวณ periplasmic มี ลักษณะเป็นช่อง โดยโครงสร้างของ HlyD (PDB ID: 5C21) จะประกอบด้วย 2 domain คือ α -helical domain และ lipoyl domain ดังแสดงตามรูป 1.12A สำหรับการสร้างช่องโปรตีน HlyD จะ form โครงสร้างเป็น hexameric (รูปที่ 1.12B) และมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ Ala250, Leu243 และ Asp239 เพื่อใช้ในการจับกับบริเวณ α -helical region ของโปรตีน TolC อย่างไรก็ตามโครงสร้างของโปรตีน HlyD ยังไม่ครอบคลุมโปรตีนเต็มความยาว โดยยังขาด โครงสร้างบริเวณปลาย N-terminal ที่ตำแหน่ง residues 1-95 และตรงบริเวณปลาย C-terminal ตรง ตำแหน่ง residues 372-478 ทำให้ไม่ทราบโครงสร้างทั้งหมดที่ชัดเจน เนื่องจากส่วนที่ขาดหายไป ของโปรตีน HlyD เหล่านี้ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม MFP อื่นๆ (Kim *et al.*, 2016)



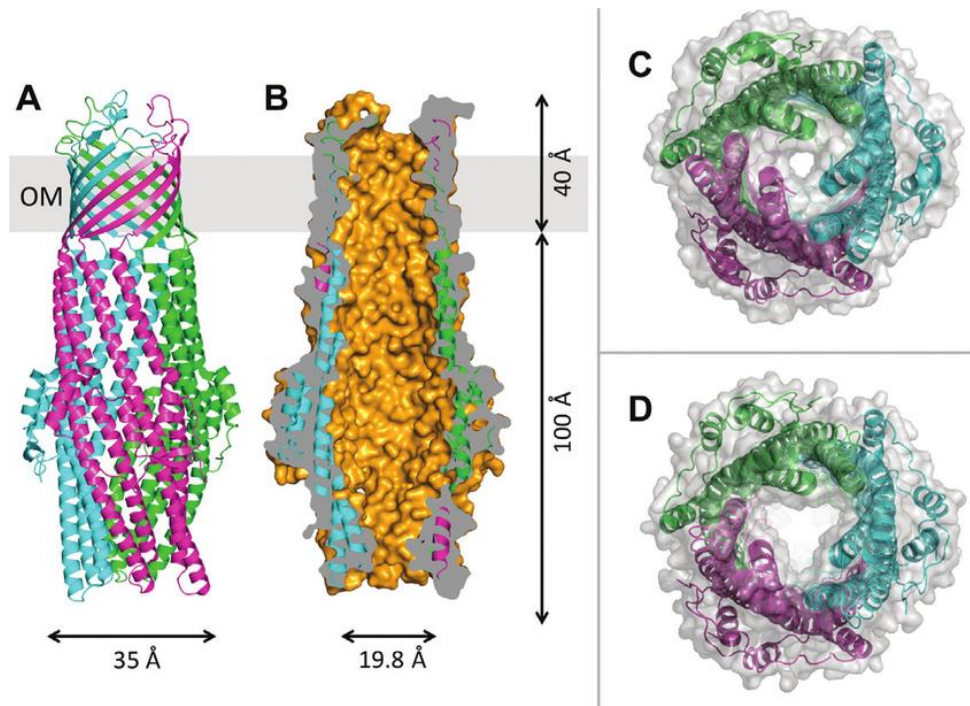
รูปที่ 1.12 โครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน HlyD

- (A) แบบจำลองโครงสร้างของโปรตีน HlyD ที่มีลักษณะเป็น hexameric โดยภาพด้านซ้ายเป็นการมองโครงสร้างจากทางด้านข้าง ส่วนภาพขวาจะเป็นการมองภาพจากทางด้านบน
- (B) องค์ประกอบของโปรตีน HlyD ซึ่งจะประกอบด้วย 2 domains คือ α -helical domain และ lipoyl domain และมี residues ที่สำคัญ คือ Ala250, Leu243 และ Asp239 ซึ่งอยู่ตรงบริเวณ α -helical ตรงกลางสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน HlyD เพื่อใช้ในการจับกับโปรตีน TolC (PDB ID: 5C21)

(ที่มา: Kim *et al.*, 2016)

1.4.2.3 TolC

Outer membrane protein ของ HlyA T1SS คือ TolC โดยการฟอร์มโครงสร้างของโปรตีน TolC ในระบบ T1SS จะเป็นแบบ homotrimeric ดังแสดงรูปที่ 1.13A ทำหน้าที่สร้างช่องที่มีความยาวขนาด 140 Å จากบริเวณปลาย periplasmic ไปจนถึง loop ของ β -barrel การสร้างช่องของ TolC นี้มีความยาวต่อเนื่องติดกัน ซึ่งความยาวของช่องตรงบริเวณ outer membrane มีขนาดความยาวเพียง 10 Å แล้วขยายความยาวไปจนถึงตรงบริเวณ periplasmic ที่มีความยาว 100 Å (รูปที่ 1.13B) โดยบริเวณ β -barrel ที่อยู่ตรงตำแหน่ง outer membrane ประกอบด้วย β -stain จำนวน 4 อัน ต่อ 1 monomer ที่ก่อตัวเป็นทรงกระบอก และส่วนของ polypeptide ที่ติดกับ β -barrel บริเวณ periplasmic มีโครงสร้างเป็นแบบ α -helix จำนวน 12 เส้นต่อ 1 monomer มีความกว้างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางซึ่งวัดจากภายนอกของช่อง 35 Å และมีความกว้างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางซึ่งวัดจากภายในของช่อง ประมาณ 20 Å ดังแสดงตามรูป 1.13A และ 1.13B ตามลำดับ เมื่อช่องรูพรุนบริเวณปากท่อตรงตำแหน่ง periplasmic ปิดจะมีขนาดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 3.5 Å ทำให้มันเล็กเกินกว่าจะปล่อยให้ไอออนผ่านไปได้ (รูปที่ 1.13C) (Lenders *et al.*, 2013) กรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับการปิดปากท่อ คือ T152, D153, Y362 และ R367 เพราะเมื่อทำการ mutation ที่ amino acid เหล่านี้ให้เป็น alanine พบว่ามีผลทำให้โครงสร้างของปากท่อ TolC เปิดออก และจากการทดลองของ Pei *et al.*, 2011 พบว่าเมื่อทำการ double mutation ตรงตำแหน่ง Y326F และ R367S ส่งผลให้ปากท่อของโปรตีน TolC ตรงบริเวณ periplasmic ขยายใหญ่ขึ้น (รูปที่ 1.13D) เป็นผลอันเนื่องมาจากการอ่อนตัวลงของ ionic interaction ระหว่าง monomers (Lenders *et al.*, 2013)



รูปที่ 1.13 โครงสร้างของโปรตีน TolC ในระบบ HIYA T1SS

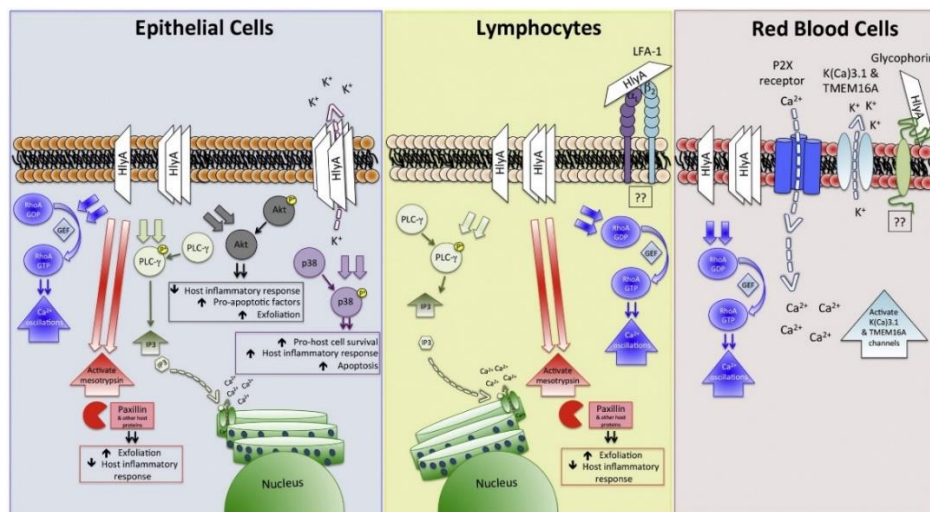
- (A) แสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน TolC homotrimer จากมุมมองด้านข้าง โดยแต่ละ monomer ถูกแสดงด้วยสีต่างกัน คือ สีเขียว, สีฟ้า และสีม่วง
- (B) ภาพตัดขวางบริเวณด้านข้างของ TolC trimer แสดงให้เห็นช่องที่มีความต่อเนื่องกันจาก β -barrel บริเวณ outer membrane เข้าไปจนถึงบริเวณ periplasmic ของ α -barrel และพื้นผิวสี่เหลี่ยมจะเป็นการเน้นพื้นที่หน้าตัด ส่วนพื้นผิวสี่เหลี่ยมแสดงให้เห็นถึงพื้นผิวด้านในและด้านนอกของ TolC (ลูกศรสีดำระบุขนาดของโปรตีน TolC)
- (C) การแสดงภาพรูพรุนขณะปิดของปากช่องตรงบริเวณ periplasmic ของ α -barrel โดยพื้นผิวของโปรตีน TolC ถูกแสดงเป็นสีเทาโปร่งใส (จากข้อ (A), (B) และ (C) โครงสร้างอ้างอิงมาจาก PDB ID: 1EK9)
- (D) การแสดงภาพรูพรุนของปากช่องต่อตรงบริเวณ periplasmic ของ α -barrel ในขณะที่เปิด โดยพื้นผิวของโปรตีน TolC ถูกแสดงเป็นสีเทาโปร่งใส (PDB ID: 2XMN)

(ที่มา: Lenders *et al.*, 2013)

1.5 เซลล์เป้าหมาย (host cell) ของโปรตีน HlyA

โปรตีนสารพิษ RTX toxin ถูกแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ hemolysin และ leukotoxin โดยเซลล์เป้าหมายของกลุ่ม hemolysin นั้นมีหลากหลายมาก แต่สำหรับกลุ่ม leukotoxin เซลล์เป้าหมายจะมีความจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) ซึ่งโปรตีนสารพิษ HlyA จัดอยู่ในกลุ่ม hemolysin ทำให้สามารถสลายเซลล์ได้หลากหลายชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว (ชนิด monocyte, lymphocyte, neutrophil), เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte), fibroblasts ตลอดจน renal epithelial cell และ endothelial cell โดยโปรตีน HlyA เป็น toxin ด้วยการสร้างรูพรุนเพื่อทำลายเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เซลล์เหล่านั้นเกิดการแตก (lysis) ซึ่งกลไกการสร้างรูพรุนของโปรตีน HlyA จะมี pathway ที่แตกต่างกันในเซลล์แต่ละประเภท (Thomas, Holland, *et al.*, 2014) อาจพบโปรตีน HlyA ในรูป monomer หรือ multimer ก็ได้ แล้วเมื่อ HlyA จับและก่อตัวสร้างรูพรุนที่เซลล์เป้าหมาย จะเกิดการกระตุ้น RhoA และนำมาซึ่งการเกิด calcium oscillations หรือกลไกการส่งสัญญาณที่แพร่หลายภายในเซลล์ สำหรับกลไกการทำงานของ HlyA ใน bladder epithelial cell โปรตีน HlyA จะทำให้โปรตีน Akt หรือมีอีกชื่อว่า Protein kinase B (PKB) ที่ทำหน้าที่เป็น multifunctional signaling regulator เกิด dephosphorylated ส่งผลให้ลดการตอบสนองต่อการอักเสบ (inflammatory response) ของ host cell, เพิ่ม pro-apoptotic factors และมีส่วนในการผลัดเซลล์ (exfoliation) นอกจากนี้ทั้งใน epithelial cell และ lymphocyte โปรตีน HlyA สามารถนำไปสู่การเกิด phosphorylation ของ PLC- γ ทางอ้อม ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นช่อง calcium ที่เปิดปิดโดยศักย์ไฟฟ้า (voltage-gated calcium channel) ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum (ER) เพื่อปลดปล่อย calcium ออกจาก ER มาสะสมอยู่ใน cytoplasm และจากการจับแล้วก่อตัวสร้างรูพรุนของโปรตีน HlyA ยังก่อให้เกิดการกระตุ้น protease mesotrypsin ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการสลายโปรตีนจาก host cell จำนวนมาก รวมถึง focal adhesion adaptor protein และ paxillin ด้วยเหตุนี้การย่อยสลายของโปรตีนจึงนำไปสู่การผลัดเซลล์แล้วทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ ใน lymphocyte นั้น hemolysin สามารถจับกับ LFA-1 ได้ แต่ยังไม่มียังมีข้อมูลที่ระบุผลกระทบของการทำปฏิกิริยานี้ ส่วนการเกิด interaction ของโปรตีน HlyA กับเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของ intoxication หลายอย่าง โดย HlyA จะไปกระตุ้น P2X receptor ส่งผลให้มี calcium ไหลเข้าเซลล์ ทำให้เกิด calcium oscillation อันเป็นผลเนื่องมาจากการกระตุ้นของ RhoA และ K(Ca)3.1 & TMEM16A channel เพื่อส่ง potassium (K^+) ออกนอกเซลล์ นอกจากนี้โปรตีน HlyA ยังสามารถเกิด interaction กับ glycophorin receptor ที่

เฉพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่ผลกระทบของปฏิกริยานี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ดังแสดงรูปที่ 1.14 (Ristow & Welch, 2016)



รูปที่ 1.14 กลไกการทำงานและผลกระทบของโปรตีน HlyA ต่อเซลล์เป้าหมาย เช่น epithelial cells, lymphocytes และ red blood cells

ในเซลล์ทุกประเภท HlyA อาจจับกันเป็น monomer หรือ multimer ก็ได้ เมื่อ HlyA จับและก่อตัวเป็นรูพรุนที่เซลล์เป้าหมาย จะเกิดการกระตุ้น RhoA และนำมาซึ่งการเกิด calcium oscillations (A) epithelial cells จะเริ่มเมื่อ Akt ถูกกระตุ้นด้วย HlyA ให้เกิด dephosphorylated ส่งผลให้ลดการตอบสนองต่อการอักเสบของ host cell, เพิ่ม pro-apoptotic factors และมีส่วนในการผลัดเซลล์ (B) lymphocyte โปรตีน HlyA สามารถนำไปสู่การเกิด phosphorylated ของ PLC- γ ทางอ้อม ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นช่องแคลเซียมที่อยู่ใน endoplasmic reticulum เพื่อปลดปล่อยแคลเซียมออกมาสะสมภายในเซลล์ และจากการจับแล้วก่อตัวสร้างรูพรุนของ HlyA ก่อให้เกิดการกระตุ้น protease mesotrypsin ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการสลายโปรตีนจำนวนมาก รวมถึง focal adhesion adaptor protein และ paxillin จึงนำไปสู่การผลัดเซลล์ของ intoxicated cell นอกจากนี้ HlyA ยังสามารถจับกับ LFA-1 ที่พบใน lymphocyte เท่านั้น แต่ยังไม่มียข้อมูลที่ระบุผลกระทบของการทำปฏิกริยานี้ (C) red blood cells การจับกันของ HlyA กับเม็ดเลือดแดงจะแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของ intoxication หลายอย่าง โดย HlyA จะไปกระตุ้น P2X ส่งผลให้มี Ca^{2+} ไหลเข้าเซลล์ ทำให้เกิด calcium oscillation อันเป็นผลมาจากการกระตุ้นของ RhoA และ K(Ca)3.1 & TMEM16A channel เพื่อส่ง K^+ ออกนอกเซลล์ นอกจากนี้โปรตีน HlyA ยังสามารถเกิด interact กับ glycothorin receptor ที่เฉพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่ผลกระทบของปฏิกริยานี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (ที่มา: Ristow & Welch, 2016)

บทที่ 2

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

ตารางที่ 2.1 สารเคมีทั่วไป

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	ANaPURE
Acrylamide	71.08	LOBA CHEMIE
Agar agar powder	-	TM MEDIA
Agarose	-	Vivantis
Ammonium persulphate	228.20	Fluka chemika
Ammonium sulphate	132.14	Labscan Asia
Ampicillin, sodium salt	371.39	Bio BASIC CANADA
Bovine serum albumin	-	Sigma-Aldrich
Bromophenol blue	669.96	Amresco
Buffer solution pH 7.0	-	ANaPURE
Buffer solution pH 4.00	-	ANaPURE
Calcium chloride	110.99	Ajax Finechem
Columbia blood agar base	-	Oxoid
Coomassie brilliant blue G-250	854.04	PanReac Applichem
Coomassie brilliant blue R-250	825.98	PanReac Applichem
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	78.13	Vivantis
Ethanol	46.07	QRëC®
Ethidium bromide	394.30	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	372.24	Merck
6X Gel Loading Dye, Purple	-	NEB
Glycerol	92.09	HIMEDIA
Hydrochloric acid 37%	36.46	QRëC®

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	บริษัทผู้ผลิต
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	238.30	PanReac Applichem
Imidazole	68.08	PanReac Applichem
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	238.31	Promega
Methanol	32.04	LOBA CHEMIE
Nickel (II) chloride (NiCl ₂)	237.69	LOBA CHEMIE
N,N'-methylene bisacrylamide	154.17	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	116.21	Fluka chemika
OneMARK B DNA ladder	-	GeneDireX
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	174.19	PanReac Applichem
Potassium chloride (KCl)	74.55	APS Finechem
Sodium chloride	58.44	LOBA CHEMIE
Sodium dodecyl sulfate	288.38	LOBA CHEMIE
Tris (hydroxymethylaminomethane)	121.14	Fisher Chemical
Tryptic Soy Broth (TSB)	-	HIMEDIA
Tryptone	-	Merck
Urea	60.06	Ajax Finechem
Whole blue range protein ladder	-	Vivantis
Yeast extract	-	Pronadisa

ตารางที่ 2.2 ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

ชุดสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
GenepHlow™ Gel/PCR Kit	Geneaid
Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	Geneaid
Presto™ Mini Plasmid Bacteria Kit	Geneaid

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Lysozyme	Vivantis
NheI Restriction Endonuclease	NEB
NotI Restriction Endonuclease	NEB
Phusion DNA polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	Invitrogen

ตารางที่ 2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (Primer)

Primer name	Sequence	Amplicon size (bp)
<i>hlyA</i> - F	5'- ATGGCTAGCCCAACAATAACCGCTGC -3'	3,104
<i>hlyA</i> - R	5'-GCGGCCGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGTGC TGATGCTGTC -3'	
<i>hlyA</i> check - F	5'- AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT -3'	-
<i>hlyA</i> check - R	5'- ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA -3'	
<i>hlyC</i> - F	5'- ATGGCTAGCAACAGAAACAATCCATTAGAGG -3'	527
<i>hlyC</i> - R	5'- GCGGCCGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGACCTG TTAATGAAAAATTG-3'	

2.2 แบคทีเรีย

2.2.1 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UPEC) ที่แยกได้จากผู้ป่วย ณ โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ภรณ์ยศ สุขุมังกูร ซึ่งจะใช้เป็นแหล่งของโครโมโซมดีเอ็นเอเพื่อการโคลนนิ่งยีน

2.2.2 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการ cloning และเพิ่มจำนวนพลาสมิดลูกผสม (New England, Biolabs, CA, USA)

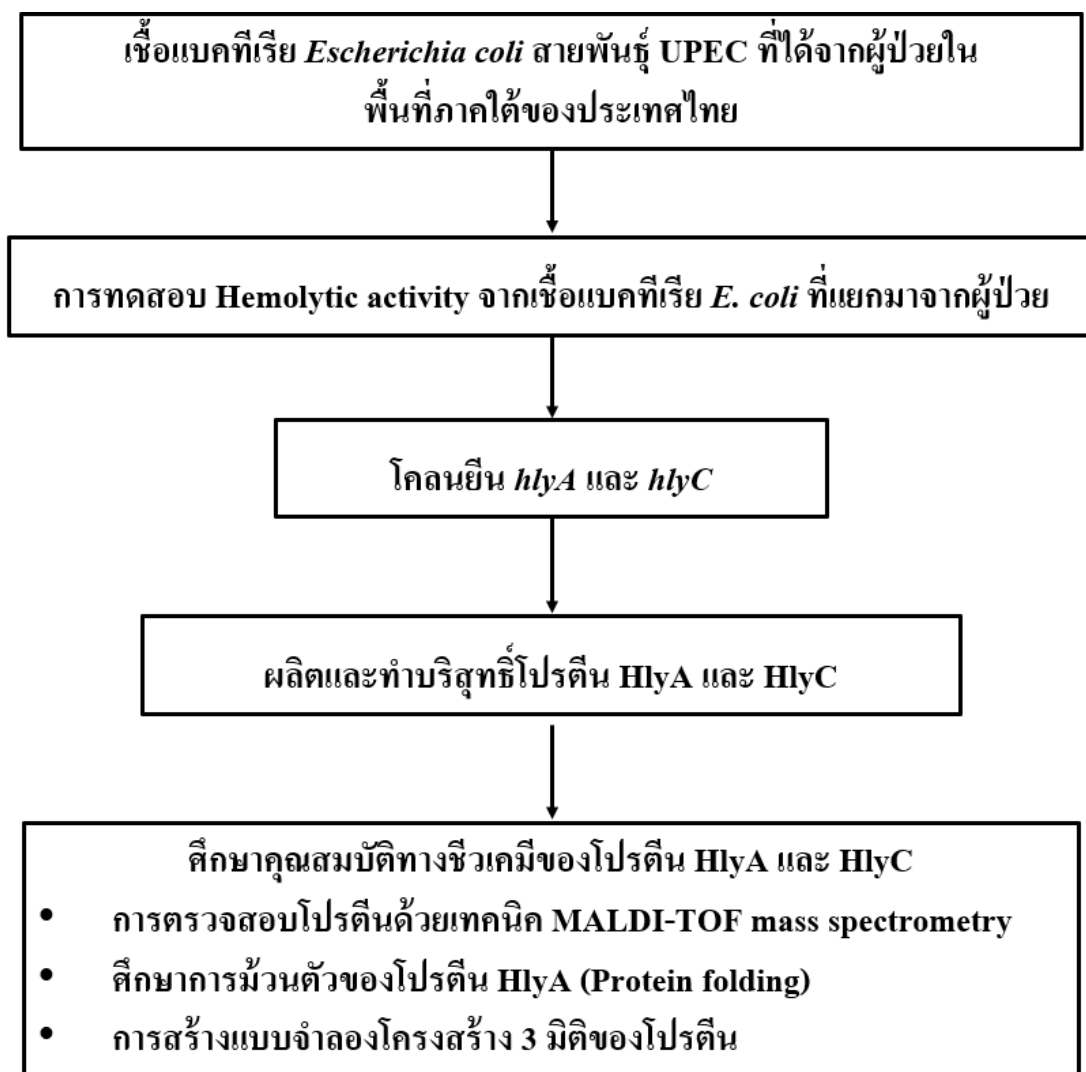
2.2.3 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

2.3 วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องถ่ายรูป
2. คอลัมน์ HisTrap™ FF (Cytiva)
3. เครื่องขังไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
4. เครื่องขังไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
6. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก
7. ตู้ปลอดเชื้อ
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320)
9. Benchtop UV transilluminator (model: M-15V, UVP)
10. Centrifuge (Mikro 200R, Hettich)
11. Centrifuge (MX-307, Tomy)
12. Electrophoresis apparatus (OTTA Cooperration)
13. Incubator (Mini incubator, Labnet)
14. Microcentrifuge tube
15. Micropipette (Labnet)
16. Nanodrop Spectrophotometer (2000C, Thermo Fisher Scientific)
17. Orbital Shaker Incubator (Excella E25, New Brunswick scientific)
18. pH meter (713, Metrohm)
19. Power supply (PAC 300, Bio-Rad)
20. Sonicator (Ultrasonic processor, Sonics vibracell)
21. Spectrofluorophotometer (RF-1501, Shimadzu)
22. Super Speed Centrifuge (J2-21, Beckman)
23. Thermal Cycler (MyCycler™, Bio-Rad)
24. Vortex mixer

วิธีการทดลอง

ภาพรวมของวิธีการดำเนินวิจัย



2.1 การทดสอบ hemolytic activity ของเชื้อ *E. coli*

ฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่บนลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ด้วยการเผาไฟจนร้อนแดง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที หรือแตะที่ผิวหน้าวุ้นเพื่อให้ลวดเขี่ยเชื้อเย็นลง แล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะตัวอย่างเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นเขี่ย (streak) บนผิวของวุ้นให้เป็นแนว ๆ ละ 4-5 แถว โดยเริ่มต้นจากด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น blood agar ทำเช่นนี้ 3-4 แถว โดยก่อนที่จะเริ่มแนวใหม่ต้องเผาลวดเขี่ยเชื้อ เพื่อฆ่าเชื้อเสียก่อนและให้แนวใหม่ซ้ำกับรอยเดิมเล็กน้อยเพื่อดึงเชื้อให้กระจายออกยิ่งขึ้น จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน โดยให้ฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อหงายขึ้น ขั้นตอนสุดท้ายสังเกตการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบน blood agar

2.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *hlyA* หรือ *hlyC*

2.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction)

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ทำโดยใช้ชุดสกัด Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) (HIMEDIA) ปริมาตร 1-5 ml เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง centrifuge (Mikro 200R, Hettich) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย GT buffer ปริมาตร 180 µl โดยบีบเปิดขึ้นลง เมื่อตะกอนละลายสมบูรณ์แล้วนำมาเติม proteinase K ปริมาตร 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และในระหว่างการบ่มให้พลิกหลอดขึ้นลงทุก ๆ 3 นาที หลังจากการบ่มนำมาเติม GB buffer ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าการแตกของเซลล์สมบูรณ์แล้ว สารละลายของตัวอย่างจะต้องมีลักษณะใส และในระหว่างการบ่มให้พลิกหลอดขึ้นลงทุก ๆ 3 นาที หลังจากการบ่มนำมาเติม RNase A ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วยการพลิกหลอดขึ้นลง ถ้าตัวอย่างมีการตกตะกอนให้นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงแยก แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้มาใส่ใน GD column ที่มีขนาดปริมาตร 2 ml และนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ส่วนของสารละลายที่ผ่านลงมาจาก GD column ให้เทส่วนนี้

ทิ้งไป แล้วนำ GD column มาล้างด้วย W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และนำมาล้างต่อด้วย Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำ GD column ให้แห้งด้วยการนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายคือการชะจีโนมิกดีเอ็นเอตัวอย่าง ทำโดยการนำ GD column ไปใส่ในหลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) และเติม elution buffer ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

2.2.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การเตรียมเจลอะกาโรส 1.5% ทำโดยการละลายผงอะกาโรส (agarose) ลงในสารละลาย 1X TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Acetic acid และ 1 mM EDTA pH 8.0) แล้วนำไปต้มจนเดือดหรือจนผงอะกาโรสละลายหมด จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ทำการเทเจลลงในถาดแล้วเสียบหวี จากนั้นรอให้เจลอะกาโรสแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที ดึงหวีที่เสียบออกแล้วนำถาดเจลไปวางในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis, OTTA) เทสารละลาย 1X TAE buffer ให้ท่วมเหนือเจลอะกาโรส นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับ 6X Gel loading dye, purple (NEB) ในอัตราส่วน 5:1 (V/V) ไปไหลลงในช่องบนเจลอะกาโรส โดยดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิงขนาดและน้ำหนักคือ One MARK B DNA ladder (GeneDireX) แล้วจึงเริ่มให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเจลอะกาโรสไปย้อมสีด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ที่มีความเข้มข้น 2 μ g/ml เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที เพื่อล้างสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกจากเจล นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตหรือแสงยูวี (UV) ด้วยเครื่อง benchtop UV transilluminator (model: M-15V, UVP) แล้วถ่ายภาพเจลด้วยกล้องถ่ายรูป

2.2.3 การวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA) ปริมาตร 1-2 μl หยดลงบนแท่นวัดของเครื่อง nanodrop spectrophotometer (2000C, Thermo Fisher Scientific) แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วย $\text{ng}/\mu\text{l}$ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เพื่อหาค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงระหว่าง 260/280 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและค่าต้องอยู่ในช่วง 1.8-1.9

2.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วย มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) และใช้ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2.4) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyA* และ *hlyC* โดยนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ตารางที่ 2.5) ในปริมาตร 50 μl ภายใต้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 2.6 ด้วยเครื่อง thermal cycler (MyCycler™, Bio-Rad) การตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจะตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ขั้นตอนที่ 2.2.2)

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
5x Phusion GC buffer สำหรับ <i>hlyA</i> (หรือ 5x Phusion HF buffer สำหรับ <i>hlyC</i>)	10
50 mM MgCl_2	0.5
10 mM dNTPs	1
10 μM Forward primer	2.5
10 μM Reverse primer	2.5
Genomic DNA (template)	1
DMSO	2.5
Phusion DNA polymerase	0.5
Milli-Q water	20.5
Total	50

ตารางที่ 2.6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial Denaturation	98	3 นาที	1
Denatured	98	10 วินาที	
Annealing	54 สำหรับ <i>hlyA</i> 64 สำหรับ <i>hlyC</i>	30 วินาที	30
Extension	72	1.50 นาที สำหรับ <i>hlyA</i> 40 วินาที สำหรับ <i>hlyC</i>	
Final Extension	72	7 นาที	1
Hold	4	∞	

2.2.5 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ (PCR cleanup)

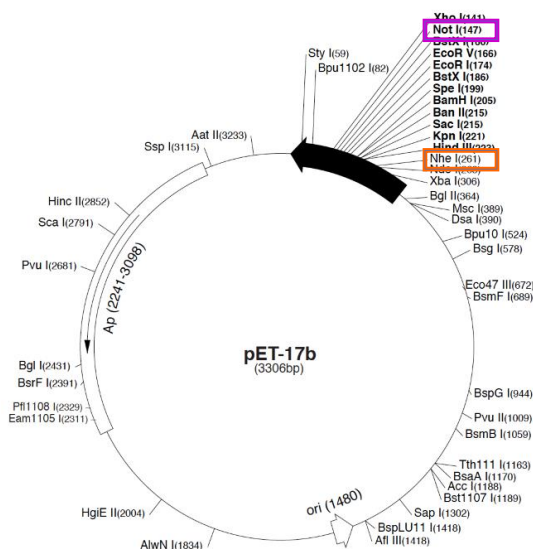
การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ทำโดยใช้ชุดสกัด GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ปริมาตร 100 µl ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วเติมสารละลาย Gel/PCR buffer ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำสารละลายผสมไปใส่ใน DFH column แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านลงมาจาก DFH column ที่ตั้ง และนำมาเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 600 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำ DFH column ให้แห้งด้วยการปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายคือการชะดีเอ็นเอ ทำโดยการนำ DFH column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และเติม elution buffer ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20-50 µl ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

2.2.6 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากการสกัดเจล (gel extraction)

การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากการสกัดเจลทำโดยใช้ชุดสกัด GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) คือ นำเจลที่ผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส มาตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วเติมสารละลาย Gel/PCR buffer ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วปั่นหมุนเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายตกลงมาที่ก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เจลละลาย ในระหว่างการบ่มพลิกหลอดขึ้นลงทุก ๆ 3 นาที เมื่อเจลละลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวกันแล้วนำไปใส่ใน DFH column ปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง centrifuge (Mikro 200R, Hettich) เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านลงมาจาก DFH column ทิ้ง แล้วนำ DFH column มาเติมสารละลาย W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้นนำ DFH column มาเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 600 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำ DFH column ให้แห้งด้วยการปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายคือการชะดีเอ็นเอ ทำโดยการนำ DFH column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และเติม elution buffer ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20-50 μ l ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

2.2.7 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector)

การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pET17b (รูปที่ 2.1) เป็นการทำปฏิกิริยา ligation ทั้งนี้ดีเอ็นเอของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์หลังการทำพีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะ pET17b ที่นำมาใช้จะต้องผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* (NEB) และ *NotI* (NEB) (วิธีการตัดด้วยเอนไซม์มีอธิบายไว้ในหัวข้อ 2.2.11) ตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อ 2.2.6 ก่อนที่จะถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่มีดีเอ็นเอของยีนและดีเอ็นเอพาหะคิดเป็นอัตราส่วน 3:1 ในสารละลาย 5x DNA ligase reaction buffer และมีเอนไซม์ T4 DNA ligase (invitrogen) 1 unit จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน



รูปที่ 2.1 pET-17b vector

แผนภาพแสดงตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI* ใน MCS (multiple cloning site) เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อชิ้น DNA ที่ต้องการ (ที่มา: Seed, 1987)

2.2.8 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (competent cells) โดยวิธี CaCl_2

เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้สำหรับการดำเนินงานวิจัยนี้คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านมีดังนี้ นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่ต้องการเตรียม ลงใน Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า orbital shaker incubator (Excella E25, New Brunswick scientific) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่บ่มไว้มาใส่ในอาหารเหลว LB broth ที่เตรียมใหม่ ในอัตราส่วน 1:75 (V/V) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 บ่มเชื้อในน้ำแข็ง 20 นาที แล้วจึงนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส่ทิ้งแล้วละลายตะกอนที่วางบนน้ำแข็งด้วยการเติมสารละลาย 0.1M CaCl_2 ที่เย็นปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตขึ้นลงเบา ๆ แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส่ทิ้ง หลังจากนั้นทำซ้ำอีกครั้งตั้งแต่ขั้นตอนที่ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.1M CaCl_2 เมื่อทำครบ 2 รอบ เทส่วนใส่ทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยการเติมสารละลายที่เย็นปริมาตร 5 ml ซึ่งประกอบด้วย 0.1M CaCl_2 และ 15% Glycerol ผสมให้เข้ากันโดย

ใช้เปิดขึ้นลงเบา ๆ ชั้นตอนสุดท้ายแบ่งเซลล์เข้าบ้านปริมาตร 100 ml ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วแช่เก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.9 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เข้าบ้าน (transformation)

นำเซลล์เข้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่แช่ไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งให้ละลาย 5 นาที แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.7 ใส่ในเซลล์เข้าบ้าน แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งต่อ 2 นาที ทันทีก่อนเวลาเติมอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 900 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง คูดอาหารเหลวทิ้งไป 800 μl ละลายตะกอนเซลล์โดยเปิดขึ้นลงเบา ๆ แล้วนำสารละลายเซลล์นั้นไปเกลี่ย (spread) ลงบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

สำหรับการนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing แล้วจะถูกนำเข้าสู่เซลล์เข้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับการนำเข้าสู่เซลล์เข้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

2.2.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA extraction)

นำโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอลูกผสมเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 20 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด Presto™ Mini Plasmid kit (Geneaid) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ (ทำซ้ำในขั้นตอนการเก็บเซลล์สำหรับตัวอย่างปริมาตรระหว่าง 1.5-7 ml) นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยการเติมสารละลาย PD1 buffer ปริมาตร 200 μl ผสมให้เข้ากันโดยเปิดขึ้นลง เติมสารละลาย PD2 buffer ปริมาตร 200 μl ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ โดยการพลิกหลอดขึ้นลง 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที แต่ไม่เกิน 5 นาที แล้วเติมสารละลาย PD3 buffer ปริมาตร 300 μl ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วโดยการพลิกหลอดขึ้นลง 10 ครั้ง และนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-8 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายใส่ใน DFH column แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น

ล้าง DFH column ด้วยการเติมสารละลาย W1 buffer ปริมาตร 400 μ l นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และล้าง DFH column ต่อด้วยการเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 600 μ l นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายที่ผ่านลงมาจาก DFH column ทิ้งแล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ขั้นตอนสุดท้ายคือ การชะพลาสติกดีเอ็นเอทำโดยการนำ DFH column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) และเติม elution buffer ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

2.2.11 การตรวจสอบพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเฉพาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมให้นำพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมที่สกัดได้จากข้อ 2.2.10 มาตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* (NEB) และ *NotI* (NEB) ตามลำดับ(ตารางที่ 2.7) ในปริมาตรรวมทั้งหมด 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายคือ ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 2.7 ส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์

ส่วนประกอบ	ปริมาตร	
	<i>NheI</i>	<i>NotI</i>
Milli-Q water	ปรับให้ครบ 50 μ l	ปรับให้ครบ 50 μ l
DNA	(1 μ g)	(1 μ g)
10X NEB buffer 2.1	5	-
10X NEB buffer 3.1	-	5
Restriction Enzyme	1	1
Total	50	50

2.2.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เตรียมตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดจากแบคทีเรีย *E. coli* strain DH5 α สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* มีขนาดมากกว่า 4 kb ต้องมีความเข้มข้น 200 ng/ μ l ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyC* มีขนาดต่ำกว่า 4 kb ต้องมีความเข้มข้น 100-150 ng/ μ l จากนั้นส่งตัวอย่างปริมาตร 10 μ l ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen-Korea ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer สำหรับยีน *hlyA* จะใช้ primer 4 เส้น ได้แก่ SP6, T7 terminator, forward primer (*hlyA*check) และ reverse primer (*hlyA*check) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.4) เป็นแม่แบบในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนยีน *hlyC* จะใช้ SP6 และ T7 terminator เป็นแม่แบบ

2.3 การผลิตและการทำบริสุทธิ์โปรตีน (protein expression and purification)

2.3.1 การผลิตโปรตีนลูกผสม (protein expression)

นำโคโลนีของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml ปริมาตร 5 ml ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อ 1:100 ในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ในช่วงระหว่าง 0.4-0.6 แบ่งสารละลายเซลล์ปริมาตร 3 ml ไว้เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ (เรียกส่วนนี้ว่า non-induced cells) นำส่วนที่เหลือมาเติมสารละลาย isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mM (เรียกส่วนนี้ว่า induced cells) บ่มทั้งส่วนที่เป็น non-induced cells และ induced cells ต่อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น 18 หรือ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้มีการสังเคราะห์โปรตีน หลังจากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง super speed centrifuge (J2-21, Beckman) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนเซลล์สามารถเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.2 การสกัดโปรตีนทั้งหมดออกจากเซลล์ (whole cell lysate)

นำตะกอนเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดคิเอ็นเอลูกผสมที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG (หรือที่เรียกว่า induced และ non-induced cells) จากข้อ 2.3.1 มาในปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1 จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 μ l แล้วผสมกับ 5x buffer ปริมาตร 20 μ l (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 5% (W/V) SDS, 50% glycerol, 0.25% (W/V) bromophenol blue) ในอัตราส่วน 4:1 (V/V) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลาย ปริมาตร 15 μ l มาใช้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนลูกผสมที่เราต้องการด้วยขั้นตอนที่ 2.3.7

2.3.3 การสกัดแยกส่วนสารละลายโปรตีน

นำตะกอนเซลล์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีคิเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 2.3.1 มาละลายด้วย wash 1 buffer ปริมาตร 10 ml (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเติมสารละลาย PMSF และ Lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mM และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator (Ultrasonic processor, Sonics vibracell) โดยใช้ 70% amplitude ครั้งละ 30 วินาที และพัก 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนเหล่านี้ 10 ครั้ง แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนจากความร้อน เมื่อเซลล์แตกแล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (MX-307, Tomy) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนสารละลายโปรตีนหรือโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble protein) ออกจากตะกอนเซลล์แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง ส่วนของตะกอนเซลล์นำมาละลายต่อด้วย denaturing wash 1 buffer ปริมาตร 10 ml (8 M Urea, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole) แล้วนำไป sonicate อีกครั้ง และนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ได้คือส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein หรือ inclusion bodies) จากนั้นนำโปรตีนที่ละลายน้ำและโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำมาปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.25 ไมครอน สารละลายโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผ่านการกรองแล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ตามขั้นตอนที่ 2.3.7)

2.3.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมด้วยวิธี Ni-NTA affinity chromatography

สารละลายโปรตีน HlyA และ HlyC ที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies) จะถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF (Cytiva) ซึ่งในขั้นตอนแรกจะต้องนำคอลัมน์มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml แล้วตามด้วยสารละลาย denaturing wash 1 buffer ปริมาตร 5 ml เพื่อให้สารละลายในคอลัมน์ (mobile phase) เป็นสารละลายชนิดเดียวกันกับที่โปรตีนละลาย จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาไหลลงในคอลัมน์ แล้วชะโปรตีนอื่นๆ ออกด้วย denaturing wash 1 buffer ปริมาตร 10 ml และ denaturing wash 2 buffer (8 M Urea, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole) ปริมาตร 10 ml ตามลำดับ ขั้นตอนสุดท้ายชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วย denaturing elution buffer (8M Urea, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) โดยเก็บโปรตีนที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ หลอดละ 1 ml จนครบ ปริมาตร 10 ml ทั้งนี้ทุกขั้นตอนทำด้วยอัตราการไหล 1 ml/min นำโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข้อ 2.3.7) และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (ข้อ 2.3.5)

2.3.5 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจะใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยการเตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/ml จากนั้นนำสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 μ l ใส่ลงในคิวเวทท์ (cuvette) เติมสารละลาย Bradford ปริมาตร 1 ml ที่ประกอบด้วย coomassie blue G-250 100 mg, phosphoric acid 8.5% และ ethanol 5% ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Genesys 20, Thermo spectronic) เพื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ส่วนการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนตัวอย่างก็ทำเช่นเดียวกัน โดยใช้สารละลายโปรตีนตัวอย่างแทนสารละลาย BSA แต่ไม่ต้องเตรียมหลายความเข้มข้น เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างนำไปคำนวณปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.3.6 การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน (protein concentration)

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore) จะใช้สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน โดยต้องนำมาล้างคอลัมน์ก่อนด้วยน้ำ milli Q จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย denaturing elution buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่โปรตีนละลายอยู่ แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเท buffer ที่ทิ้ง แล้วใส่โปรตีนถูกผสมที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ลงตรงกลาง filter ของคอลัมน์ นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ลงมาให้เททิ้งได้เลย ตั้งแต่ขั้นตอนใส่โปรตีนให้ทำซ้ำเพื่อให้ปริมาณของสารละลายโปรตีนน้อยลง เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามที่ต้องการแล้วให้ดูดสารละลายโปรตีนด้วยปิเปต นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.7 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) มีขั้นตอนดำเนินการภายใต้สภาวะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ การเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์จะประกอบด้วยเจล 2 ชั้นคือ separating และ stacking ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.8 ซึ่งการเตรียมจะเริ่มจากเทเจลชั้น separating ลงในช่องระหว่างกระจก แล้วเติมน้ำกลั่นให้เต็มช่องเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ จากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวให้เทน้ำกลั่นออก แล้วเทชั้น stacking ต่อทันทีจนเต็มช่องและเสียบหวีโดยไม่ให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดึงหวีออก จากนั้นนำแผ่นกระจกไปใส่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส และเติม Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 200 mM glycine และ 0.1% SDS) นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 2.3.1 และโปรตีนอ้างอิงขนาดที่ใช้คือ Whole Blue Range Protein Ladder (Vivantis) หยอดในแต่ละช่องของเจลให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลานำเจลลงไปแช่ในสารละลายสีย้อม staining solution ที่ประกอบด้วย 50% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 เขย่าเจลเบาๆ ระหว่างการย้อมสีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีย้อมบนเจลออกด้วยสารละลาย destaining solution ที่ประกอบด้วย 10% methanol และ 10% acetic acid ข้ามคืนหรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 2.8 การเตรียมเจล SDS-PAGE

สารละลาย	10% Separating gel	4% Stacking gel
30% Acrylamide - 0.8% Bisacrylamide	4.33 ml	0.67 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1.25 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3.25 ml	-
10% SDS	200 μ l	50 μ l
10% Ammonium persulfate	200 μ l	50 μ l
TEMED	13 μ l	12 μ l
DI water	4.80 ml	2.80 ml
ปริมาตรรวม	13 ml	5 ml

*ปริมาตรรวมที่ใช้สำหรับการเตรียมเจล 2 แผ่น

2.4 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีน

2.4.1 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Mass Spectrometry (MS)

2.4.1.1 การเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS

ตัดเจล SDS-PAGE ที่ถูกย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 (ขั้นตอนที่ 2.3.7) แล้วตรงตำแหน่งโปรตีนบริสุทธิ์ HlyC และ HlyA ปริมาณ 5-10 mg และเก็บไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ที่มีน้ำ Milli-Q หลังจากนั้น Dr. Jaime Jacqueline ซึ่งเป็นผู้ร่วมวิจัยจาก Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Universiti Malaya, Kuala Lumpur ประเทศมาเลเซีย จะนำไปวิเคราะห์ต่อ โดยจะล้างสีย้อมของเจลที่ถูกเตรียมไว้ในตอนต้นออกจนเจลโปร่งใส โดยใช้สารละลายซึ่งประกอบด้วย $K_3[Fe(CN)_6]$ 15mM และ 50mM $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ แล้วนำสารละลายโปรตีนจากเจลมาทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) และ แอลคิลเลชัน (alkylation) โดยใช้ 10 mM DTT ในตัวทำละลาย 100 mM NH_4HCO_3 และ 55 mM iodoacetamide ในตัวทำละลาย 100mM NH_4HCO_3 ตามลำดับ หลังจากทำปฏิกิริยานำมาล้างด้วย 50% acetonitrile (ACN) ในสารละลาย 100 mM NH_4HCO_3 และ 100% ACN เอาน้ำออกโดยการหมุนเหวี่ยงที่สูญญากาศ และนำโปรตีนไปย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ที่มีความเข้มข้น 6 ng/ml ในสารละลาย 50 mM NH_4HCO_3 ปริมาตร 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพปไทด์ (peptide) ที่ได้จากการย่อยนำมาสกัดด้วย 50% ACN และ 100% ACN จากนั้นทำให้แห้งด้วยการหมุนเหวี่ยงที่สูญญากาศ เพื่อนำเพปไทด์ไปใช้

สำหรับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค MS แบบ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF)

2.4.1.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค MS

นำเปปไทด์ที่แห้งมาละลายด้วย 0.1% formic acid และนำเกลือออกโดยใช้คอลัมน์ ZipTip ซึ่งเป็น reverse phase ที่มี C18 เป็น stationary phase (Millipore, MA, USA) แล้วนำตัวอย่างเปปไทด์และสารละลาย α -cyano-4-hydroxycinnamic acid ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตรเท่ากันมาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายผสมของตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.7 ml มาทำการหยดลงบน Opti-Tof 384 well (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems/ MDS Sciex) พร้อมกับการใช้ mass standard kit เพื่อการเปรียบเทียบผลของ MS และใช้เปรียบเทียบขนาดสเปกตรัมของ MS/MS mass

2.4.2 การสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน

แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA และ HlyC ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ออนไลน์ SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) ของบริษัท Swiss institute of bioinformatics ด้วยการนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการวิเคราะห์เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว มาทำการค้นหาโครงสร้าง 3 มิติที่เป็นแม่แบบด้วยโหมดการค้นหาแบบอัตโนมัติ ซึ่งการค้นหาแม่แบบที่เหมาะสมจะต้องมีค่า Global Model Quality Estimation (GMQE), Quaternary Structure Quality Estimation (QSQE), % Sequence identity และ % Coverage สูงเพื่อใช้ในการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA และ HlyC

2.4.3 ศึกษาการม้วนตัวของโปรตีน (protein folding)

นำโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาทำให้เกิดการคลายตัว (unfolded) อย่างสมบูรณ์ โดยทำการเจือจางโปรตีนในสารละลายที่ประกอบด้วย 7 M Urea และ 20 mM EDTA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำโปรตีนที่บ่มไว้มาทำให้เกิดการม้วนตัวด้วยการเจือจางในสารละลายต่าง ๆ ที่มีส่วนประกอบคล้ายกัน ดังนี้ 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ และ Urea ที่มีความเข้มข้น 0, 2, 5, 7 M บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการเจือจางนี้โปรตีนจะต้องมีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละสารละลายเป็น 0.2 μ M จากนั้นนำโปรตีนไปวิเคราะห์การม้วนตัวด้วยเทคนิคการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence spectrophotometry)

2.4.4 การวัดฟลูออเรสเซนซ์ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan; Trp Fluorescence spectrophotometry)

นำโปรตีนจากข้อ 2.4.2 ซึ่งต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาทำการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Trp) ที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง spectrofluorophotometer (RF-1501, Shimadzu) และใช้ควอตซ์ (quartz) โดยกำหนดค่าความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation wavelength) ของ Trp ที่ 295 นาโนเมตร และทำการแสกนหาความยาวคลื่นของการคายพลังงาน (emission wavelength) ในช่วงความยาวคลื่น 310 ถึง 450 nm

บทที่ 3

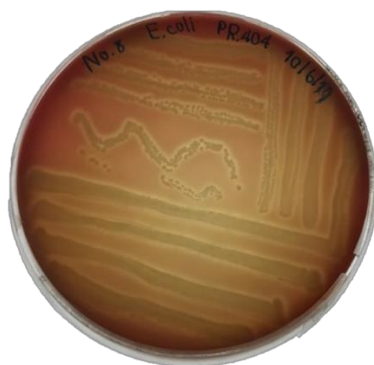
ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาโปรตีนสารพิษ HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งการที่โปรตีน HlyA จะสามารถทำงานได้ต้องถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการโคลนยีน *hlyA* และ *hlyC* ที่อยู่บนโครโมโซม แล้วนำไปผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน HlyA และ HlyC เพื่อมุ่งหวังในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนสารพิษ HlyA

3.1 การทดสอบ Hemolytic activity จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

การทดสอบ hemolytic activity เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อ *E. coli* ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มียีน *hlyA* หรือไม่ โดยดูจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากยีน *hlyA* จะสามารถผลิตไปเป็นโปรตีน HlyA ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด hemolytic ของเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นหนึ่งในเซลล์เป้าหมายหลายชนิดได้ (Welch, 2016)

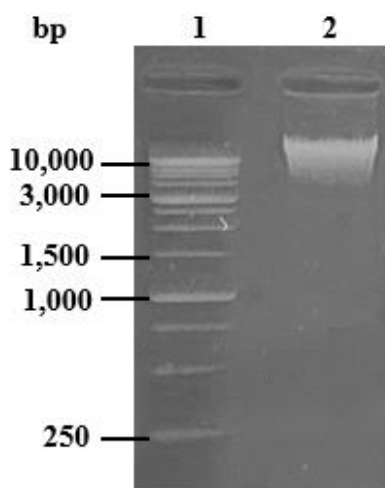
จากการทดลองเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ณ โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช มาทำการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก โดยสังเกตจากบริเวณรอบ ๆ โคนโคนของเชื้อจะมีรอยจางๆ และสว่างขึ้น (รูปที่ 3.1) ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยนี้มียีน *hlyA* จากนั้นนำเชื้อมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ



รูปที่ 3.1 เชื้อ *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ มีความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ด้วยวิธีการทดสอบ hemolytic activity

3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA Extraction)

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ ณ โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช โดยใช้ชุดสกัดและเมื่อนำมาตรวจสอบผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอตัวอย่างมีขนาดมากกว่า 10,000 bp เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder (รูปที่ 3.2) และจากการวัดความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (nanodrop spectrophotometer) พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอตัวอย่างมีความเข้มข้น 182 ng/ μ l และมีค่าการดูดกลืนแสง 260/280 เท่ากับ 1.92 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยจะต้องมีค่าประมาณ 1.8 แต่ต้องไม่เกิน 2.0 หรือต่ำกว่า 1.7 ดังนั้นจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีความบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีน จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีน *hlyA* และ *hlyC* ด้วยเทคนิค PCR



รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

Lane 2: จีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีขนาดมากกว่า 10,000 bp

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

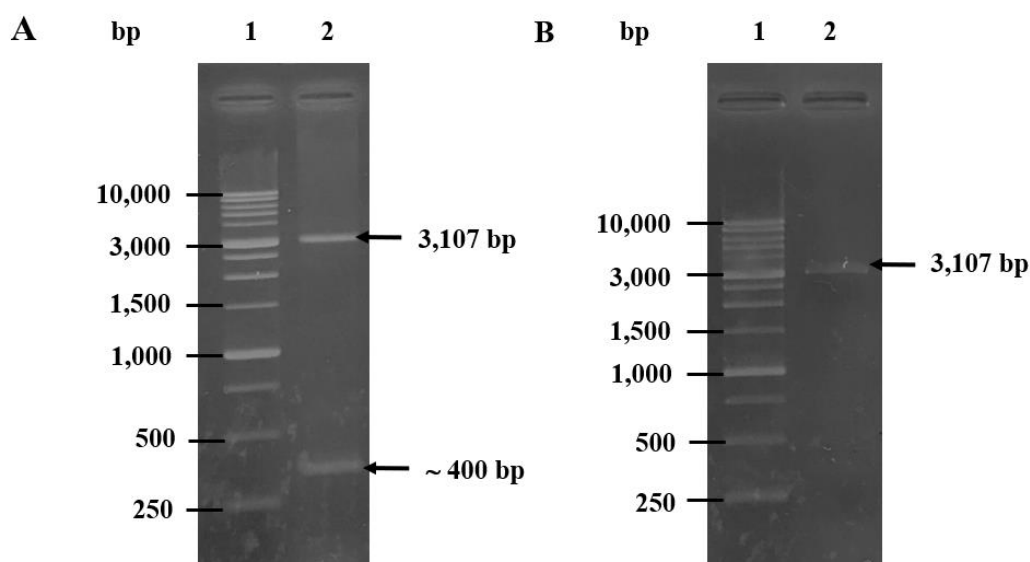
นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2.4) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เอนไซม์ Phusion DNA Polymerase ที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำปฏิกิริยา PCR และมีอัตราความผิดพลาดที่ต่ำกว่า Taq DNA polymerase ถึง 50 เท่า ซึ่งเป็นเอนไซม์สำหรับการ cloning ที่ต้องการความแม่นยำสูง ทำให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดต่างกันแต่มีตำแหน่งตัดจำเพาะเหมือนกัน คือ 5'-*NheI* และ *NotI*-3' แต่เพราะเอนไซม์ Phusion DNA Polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำ PCR ไม่เติม poly-A tail จึงไม่สามารถทำการ ligate ยีนที่ผลิตได้เข้าสู่ pGEM[®]-T Easy vector เพื่อใช้ระบบของเซลล์ *E. coli* DH5 α เพิ่มจำนวนยีนให้เพียงพอต่อการนำไป ligate เข้าสู่ pET17b ต่อได้ ดังนั้นจึงต้องเพิ่มปริมาณผลผลิตด้วยวิธี PCR ในปริมาณมากพอสำหรับการ ligate เข้าสู่ pET17b โดยตรงแทน ทั้งนี้ก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอนการ ligate ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

3.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyA*

ผลการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hlyA* ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นสองแถบ คือ ที่ขนาดประมาณ 3,000 bp และอีกแถบที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-500 bp หรือประมาณ 400 bp (รูปที่ 3.3A) แต่เนื่องจากยีน *hlyA* ที่มี 6x His tag มีขนาด 3,107 bp ดังนั้นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 bp จึงคาดว่าเป็นยีน *hlyA* ที่ถูกสร้างขึ้นมาได้ด้วยวิธี PCR จึงทำการตัดชิ้นเจลตรงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดเจล (gel extraction) ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอขนาด 3,000 bp มีความบริสุทธิ์สูงและไม่พบดีเอ็นเอขนาดอื่นเจือปนในสารละลาย ดังปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (รูปที่ 3.3B)

3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyC*

ผลการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis ปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีขนาดประมาณ 500 bp (รูปที่ 3.4A) แต่เนื่องจากยีน *hlyC* ที่มี 6x His tag มีขนาด 545 bp ดังนั้นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp จึงคาดว่าเป็นยีน *hlyC* ที่ถูกสร้างขึ้นมาได้ด้วยวิธี PCR จึงทำการตัดชิ้นเจลตรงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดเจล ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp มีความบริสุทธิ์สูงและไม่พบดีเอ็นเอขนาดอื่นเจือปนในสารละลาย ดังปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (รูปที่ 3.4B)



รูปที่ 3.3 การวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyA* ด้วยเทคนิค PCR และผลของดีเอ็นเอของยีน *hlyA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

(A) ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *hlyA* ด้วยเทคนิค PCR

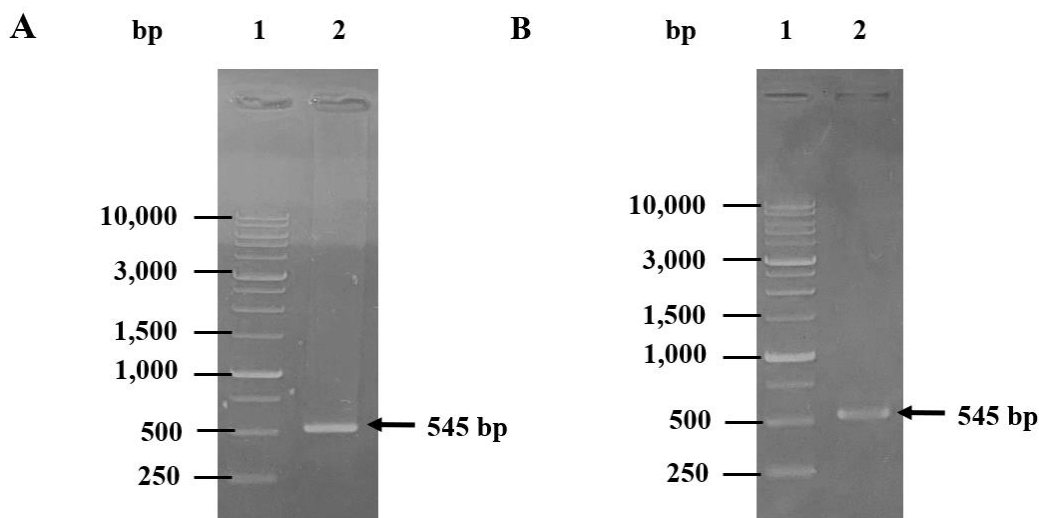
Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

Lane 2: แถบผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hlyA* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นสองแถบ คือ ที่ขนาดประมาณ 3,000 bp และอีกแถบที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-500 bp

(B) ผลผลิตของสารละลายดีเอ็นเอยีน *hlyA* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

Lane 2: แถบดีเอ็นเอของยีน *hlyA* ที่มีขนาดประมาณ 3,000 bp



รูปที่ 3.4 การวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ด้วยเทคนิค PCR และผลของดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

(A) ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ด้วยเทคนิค PCR

Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

Lane 2: แถบผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่มีขนาดประมาณ 500 bp

(B) ผลของดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder

Lane 2: แถบดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่มีขนาดประมาณ 500 bp

3.4 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *hlyA* หรือ *hlyC*

การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *hlyA* หรือ *hlyC* เป็นการนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว และดีเอ็นเอพาหะ pET17b มาตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* และ *NotI* จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pET17b ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นเลี้ยงเชื้อแล้วทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยวิธี restriction enzyme digestion โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI* แล้วตรวจหาแถบดีเอ็นเอของยีนที่ถูกตัดออกมาจากพลาสมิดด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyA*

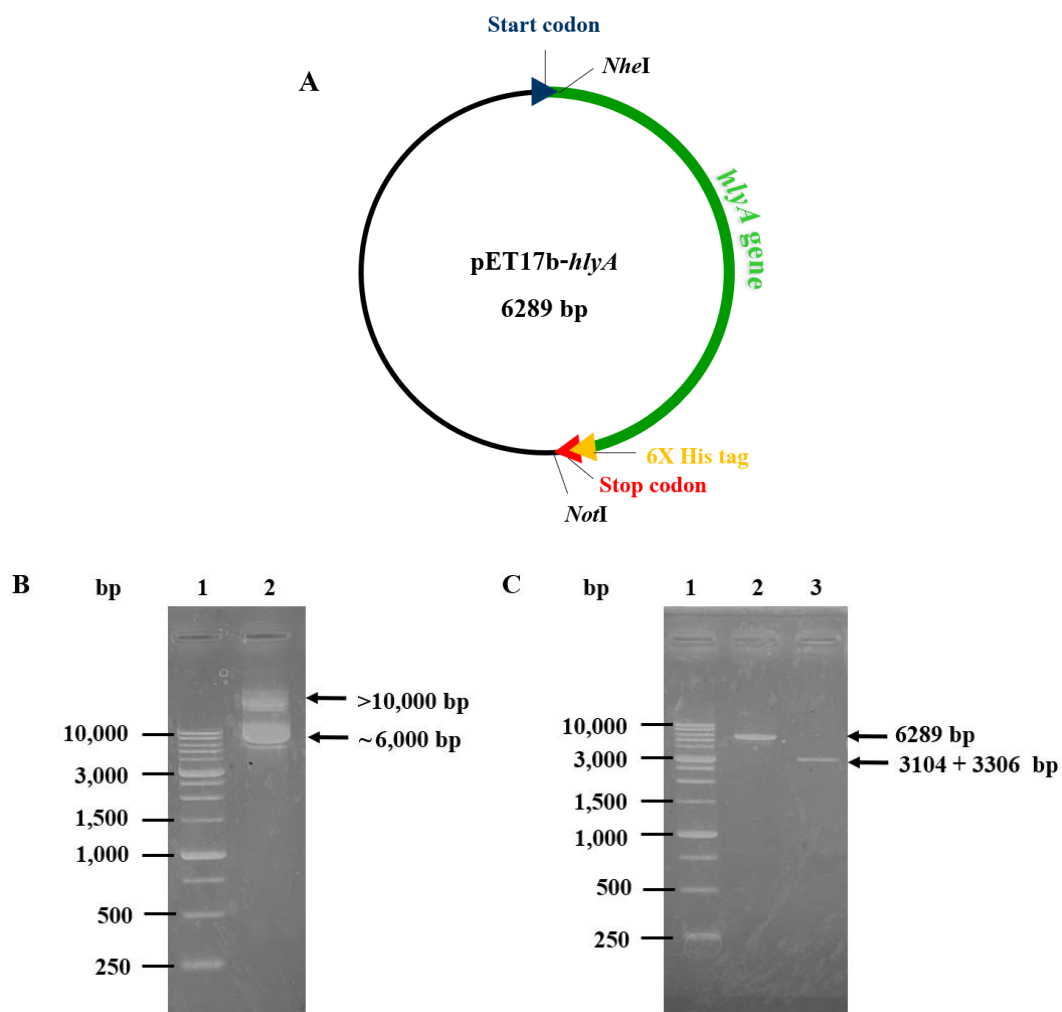
เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของยีน *hlyA* หรือที่เรียกว่า pET17b-*hlyA* ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5'-*NheI* และ *NotI*-3' ดังแสดงในรูปที่ 3.5A มาทำการสกัดพลาสมิด pET17b-*hlyA* ซึ่งเมื่อนำสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบบน 1.5% agarose gel electrophoresis พบว่ามีแถบดีเอ็นเอสองแถบที่ขนาดมากกว่า 10,000 bp และขนาดประมาณ 6,000 bp (รูปที่ 3.5B, Lane 2) ซึ่งคาดว่าเป็นดีเอ็นเอพลาสมิดที่มีรูปร่างเป็น circular และเป็น supercoil ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายพลาสมิดนี้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* พบว่าผลผลิตที่ได้ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 6,000 bp (รูปที่ 3.5C, Lane 2) แสดงว่าปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* ทำให้พลาสมิดที่เป็น circular ก่อนหน้าถูกตัดให้กลายเป็น linear ได้ทั้งหมด ดังนั้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 6,000 bp นี้จึงถูกนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel extraction ก่อนนำไปใช้ตัดอีกครั้งด้วยเอนไซม์ *NotI* ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด แต่จากการตรวจสอบ พบว่าผลผลิตที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 3,000 bp เพราะเนื่องจากดีเอ็นเอของยีน *hlyA* มีขนาด 3,107 bp และดีเอ็นเอพาหะ pET17b มีขนาด 3,306 bp (Seed, 1987) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันจึงทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (รูปที่ 3.5C, Lane 3)

3.4.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyC*

เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของยีน *hlyC* หรือที่เรียกว่า pET17b-*hlyC* ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5'-*NheI* และ *NotI*-3' ดังแสดงในรูปที่ 3.6A มาทำการสกัดพลาสมิด pET17b-*hlyC* ซึ่งเมื่อนำสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบบน 1.5% agarose gel electrophoresis พบว่ามีแถบดีเอ็นเอสองแถบที่ขนาดมากกว่า 10,000 bp และขนาดประมาณ 3,000 bp (รูปที่ 3.6B, Lane 2) ซึ่งคาดว่าเป็นดีเอ็นเอพลาสมิดที่มีรูปร่างเป็น circular และเป็น supercoil ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายพลาสมิดนี้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* พบว่าผลผลิตที่ได้ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 3,000 bp (รูปที่ 3.6C, Lane 2) แสดงว่าปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* ทำให้พลาสมิดที่เป็น circular ก่อนหน้าถูกตัดให้กลายเป็น linear ได้ทั้งหมด ดังนั้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 3,000 bp นี้จึงถูกนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel extraction ก่อนนำไปใช้ตัดอีกครั้งด้วยเอนไซม์ *NotI* ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด ดังปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะ pET17b ที่มีขนาดเท่ากับ 3,306 bp (Seed,

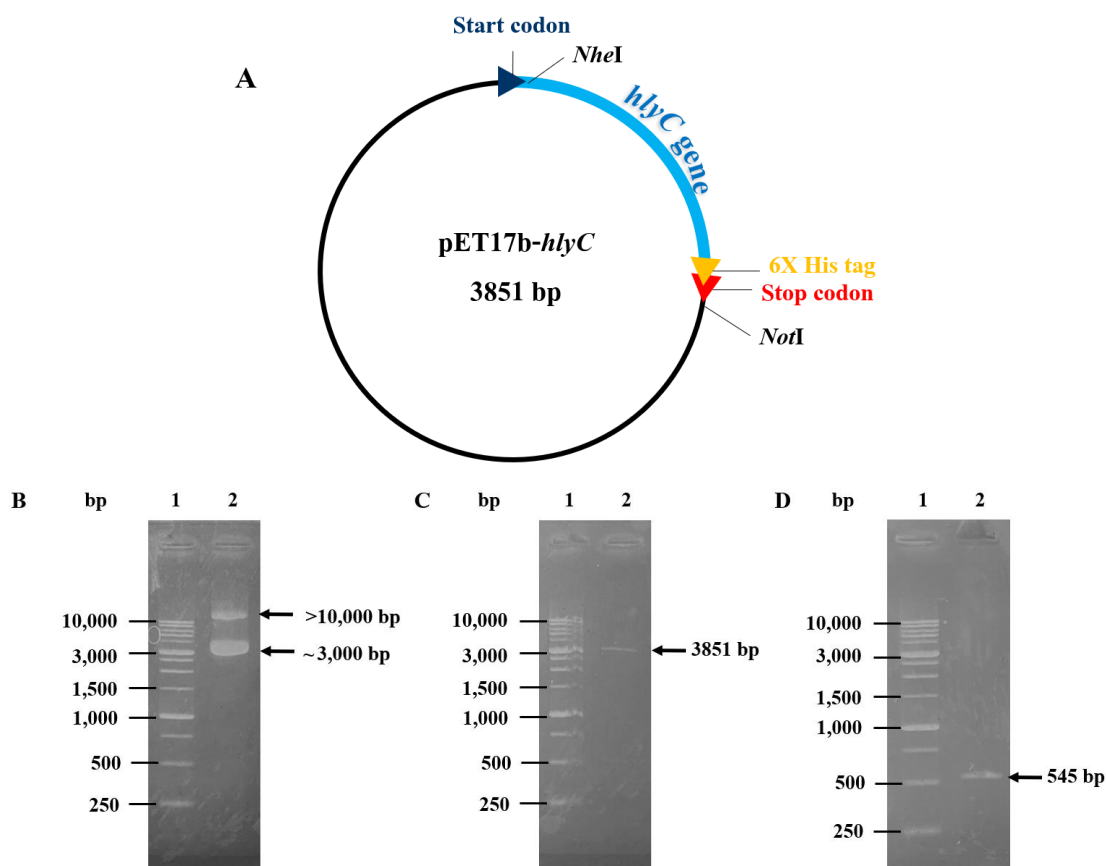
1987) และแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่งประมาณ 500 bp มีลักษณะค่อนข้างจางสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอนี้ได้เมื่อดูด้วยตาเปล่า แต่เห็นได้ไม่ชัดบนรูปถ่ายเจล) คาดว่าเป็นชิ้นดีเอ็นเอยีน *hlyC* เพราะมีขนาดใกล้เคียงกับ 545 bp ของยีน *hlyC* จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี restriction enzyme digestion นี้ บ่งชี้ว่าพลาสมิดลูกผสมที่นำมาตรวจสอบมีชิ้นดีเอ็นเอยีน *hlyC* แทรกอยู่ภายในตรงตำแหน่งที่ถูกต้อง

นอกจากวิธีข้างต้นแล้ว ผู้วิจัยยังได้นำพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์สำหรับ *hlyC* (ตารางที่ 2.4) ในการทำ PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่ขนาดประมาณ 500 bp (ภาพที่ 3.6D, Lane 2) จึงสามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิดลูกผสมนี้มียีน *hlyC* แทรกอยู่



รูปที่ 3.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyA* จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

- (A) แผนภาพพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA* ที่แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI*
- (B) ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA*
 Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder
 Lane 2: พลาสมิดที่สกัดได้จากเชื้อ *E. coli* ที่ถูก transform ด้วย pET17b-*hlyA*
- (C) ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI*
 Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder
 Lane 2: พลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI*
 Lane 3: พลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA/NheI* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI*



รูปที่ 3.6 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyC* จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

- (A) แผนภาพพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI*
- (B) ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC*
 Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder
 Lane 2: พลาสมิดที่สกัดได้จากเชื้อ *E. coli* ที่ถูก transform ด้วย pET17b-*hlyC*
- (C) ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI*
 Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder
 Lane 2: พลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI*
- (D) ผลการยืนยันว่าพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* มียีน *hlyC* ด้วยการทำ PCR
 Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน One MARK B DNA Ladder
 Lane 2: แถบผลผลิตดีเอ็นเอของยีน *hlyC* ที่มีขนาดประมาณ 500 bp

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* หรือ pET17b-*hlyC* ที่ผ่านการตรวจสอบจากข้อ 3.4 ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer ที่บริษัท MacroGen Korea จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่ได้มีการรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เช่น สายพันธุ์ CFT073 (NC_004431.1), J96 (M10133) และ UTI89 (NC_007946.1) เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* โดยใช้ซอฟต์แวร์ออนไลน์ของ Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) และ LALIGN Expasy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

3.5.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA*

เนื่องจากยีน *hlyA* ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธี PCR มีขนาดใหญ่เท่ากับ 3,107 bp ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI* นิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* และนิวคลีโอไทด์ของ 6x His-tag ดังนั้นในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงใช้ไพรเมอร์หลายอัน ได้แก่ SP6, T7 terminator, *hlyA* check forward primer และ *hlyA* check reverse primer ซึ่ง primer นี้เป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณกลางยีน เพื่อให้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครอบคลุมทั้งยีน ผลได้พบว่า สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครอบคลุมทั้งยีนนั้นคือ มีจำนวนเท่ากับ 3,107 bp โดยนับเริ่มต้นจาก ATP ที่เป็น start codon จนถึงนิวคลีโอไทด์ที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* (ดังแสดงรูปที่ 3.7) และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* (ไม่รวมนิวคลีโอไทด์ที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *NotI* และ codon ของ His-tag) พบว่ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากับที่พบได้ในยีน *hlyA* ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ CFT073 แต่จะมีจำนวนมากกว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 อยู่ 3 bp นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* มีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 คิดเป็น 97%, 99.3% และ 99.2% ตามลำดับ โดยมีตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันถึง 110 ตำแหน่ง เทียบกับทั้งสามสายพันธุ์

3.5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC*

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ใช้เพียง SP6 และ T7 terminator ก็สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครบถ้วนทั้งยีน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 545 bp ที่ประกอบไปด้วย start codon และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* ที่ปลาย 5' end ส่วนปลาย 3' end ของยีน *hlyC* มี codon ของ 6x His-tag ตามด้วย stop codon และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* (รูปที่ 3.8) เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* พบว่ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากับที่พบในยีน *hlyC* ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ CFT073 แต่จะมีมากกว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 จำนวน 1 bp ทั้งนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* มีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 คิดเป็น 98.8%, 98.6% และ 98.8% ตามลำดับ โดยมีตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันถึง 11 ตำแหน่ง เทียบกับทั้งสามสายพันธุ์ ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกตั้งชื่อให้เป็นสายพันธุ์ MNT08

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่สังเคราะห์มาจากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นแม่แบบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนไม่เหมือน 100% กับยีนที่มีรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลซึ่งเป็นการศึกษายีนดังกล่าวจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะสายพันธุ์ใดเลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตั้งชื่อ *E. coli* ที่แยกมาได้จากผู้ป่วยที่ถูกนำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ว่าเป็น สายพันธุ์ MNT08 ย่อมาจาก Maharaj Nakhon Si Thammarat โคลินี่ที่ 8 อย่างไรก็ตามเนื่องจากผู้วิจัยมีระยะเวลาและงบประมาณในการทำวิจัยที่จำกัดจึงไม่สามารถยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ใหม่นี้อีกครั้งด้วยวิธี genome sequencing ได้

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

UTI89	-----ATGCCAACAAATAACCACTGCACAAATTAAGACACACTACAGTCTGCAAAGCAA	54
J96	-----ATGCCAACAAATAACCGCTGCACAAATTAAGACACACTGCAGTCTGCAAAGCAA	54
CFT073	-----ATGCCAACAAATAACCACTGCACAAATTAAGACACACTACAGTCTGCAAAGCAA	54
MNT08	ATG SCTAGC CCAACAATAACCGCTGCACAAATTAAGACACACTACAGTCTGCAAAGCAA	60
	Start codon * <i>NheI</i>	
UTI89	TCCGCTGCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGAAAGCA	114
J96	TCCGCTGCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGAAAGCA	114
CFT073	TCCTCTGCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGAAAGCA	114
MNT08	TCCGCTGCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGAAAGCA	120

UTI89	GCAGAGCAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAA	174
J96	GCAGAGCAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAA	174
CFT073	GCAGAGCAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAA	174
MNT08	GCAGAGCAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAA	180

UTI89	GGACAGGGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTGACGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTC	234
J96	GGGACAGGGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTGACGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTC	234
CFT073	GGACAGGGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTGACGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTC	234
MNT08	GGACAGGGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTGACGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTC	240
	**	
UTI89	CAGTATGATGAAAAGAATGGCAGCGGACTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAA	294
J96	CAGTATGATGAAAAGAATGGCAGCGGACTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAA	294
CFT073	CAGTATGATGAAAAGAATGGCAGCGGACTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAA	294
MNT08	CAGTATGATGAAAAGAATGGCAGCGGACTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAA	300

UTI89	CTCATTGGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTAAGTC	354
J96	CTCATTGGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTAAGTC	354
CFT073	CTCATTGGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTAAGTC	354
MNT08	CTCATTGGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTAAGTC	360

UTI89	CAAAAGTATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGTGAAAAATATAGGTGATAAC	414
J96	CAAAAGTATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGTGAAAAATATAGGTGATAAC	414
CFT073	CAAAAGTATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGTGAAAAATATAGGTGATAAC	414
MNT08	CAAAAGTATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGTGAAAAATATAGGTGATAAC	420

UTI89	TTAGGAAAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTTCTGGGTAAGTGCACCTTCC	474
J96	TTAGGAAAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTTCTGGGTAAGTGCACCTTCC	474
CFT073	TTAGGAAAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTTCTGGGTAAGTGCACCTTCC	474
MNT08	TTAGGAAAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTTCTGGGTAAGTGCACCTTCC	480

UTI89	TCAATGAAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTTCT	534
J96	TCAATGAAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTTCT	534
CFT073	TCAATGAAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTTCT	534
MNT08	TCAATGAAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTTCT	540

UTI89	GAACTGGCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATT	594
J96	GAACTGGCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATT	594
CFT073	GAACTGGCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATT	594
MNT08	GAACTGGCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATT	600

UTI89	AA TAA TAATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAAT	654
J96	AA---TAATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAAT	651
CFT073	AA TAA TAATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAAT	654
MNT08	AA TAA TAATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAAT	660
	**	

ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จาก *E. coli* สายพันธุ์ J96 ที่หายไป 3 bp

UTI89	ACAAAGCACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATC	714
J96	ACAAAGCACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATC	711
CFT073	ACAAAGCACCTGACCGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATC	714
MNT08	ACAAAGCACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATC *****	720
UTI89	GGTGCAGGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTACAGCAAGCTTCATTCTG	774
J96	GGTGCAGGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTACAGCAAGCTTCATTCTG	771
CFT073	GGTGCAGGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTACAGCAAGCTTCATTCTG	774
MNT08	GGTGCAGGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTACAGCAAGCTTCATTCTG *****	780
UTI89	AGCAATGCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAA	834
J96	AGCAATGCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAA	831
CFT073	AGCAATGCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAA	834
MNT08	AGCAATGCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAA *****	840
UTI89	GTA CTGGGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAG	894
J96	GTA CTGGGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAG	891
CFT073	GTA CTGGGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAG	894
MNT08	GTA CTGGGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAG ***** **	900
UTI89	GGGTTATCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATT	954
J96	GGGTTATCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATT	951
CFT073	GGATTATCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATT	954
MNT08	GGGTTATCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATT ** ***** *	960
UTI89	AGTCCCCTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAAGTTAAACGTGCAAAATAAAATAGAGGAG	1014
J96	AGTCCCCTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAAGTTAAACGTGCAAAATAAAATAGAGGAG	1011
CFT073	AGTCCCCTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAAGTTAAACGTGCAAAATAAAATAGAGGAG	1014
MNT08	AGTCCCCTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAAGTTAAACGTGCAAAATAAAATAGAGGAG *****	1020
UTI89	TATTCACAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCAC	1074
J96	TATTCACAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCAC	1071
CFT073	TATTCACAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCAC	1074
MNT08	TATTCACAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCAC ***** **	1080
UTI89	AAAGAAACAGGAGCTATTGATGCATCATTAAACAACGATAAGCACGTACTGGCTTCAGTA	1134
J96	AAAGAAACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAAACAAGGATAAGCACGTCTGGCTTCAGTA	1131
CFT073	AAAGAAACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAAACAACGATAAGCACGTCTGGCTTCAGTA	1134
MNT08	AAAGAAACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAAACAACGATAAGCACGTCTGGCTTCAGTA *****	1140
UTI89	TCTTCAGGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTG	1194
J96	TCTTCAGGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTG	1191
CFT073	TCTTCAGGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTG	1194
MNT08	TCTTCAGGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTG ***** **	1200
UTI89	GTAGGTGCTGTTACGGGGATAATTTACGGTATCCTTGAGGCTTCAAAGCAGGCAATGTTT	1254
J96	GTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTACGGCATCCTTGAGGCTTCAAACAGGCAATGTTT	1251
CFT073	GTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTACGGCATCCTTGAGGCTTCAAACAGGCAATGTTT	1254
MNT08	GTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTACGGCATCCTTGAGGCTTCAAACAGGCAATGTTT *****	1260
UTI89	GAACATGTTGCCAGTAAATGGCTGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGTAAA	1314
J96	GAACATGTCGCCAGTAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAA	1311
CFT073	GAACATGTCGCCAGTAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAA	1314
MNT08	GAACATGTCGCCAGTAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAA ***** **	1320

UTI89	ACCGAAGCGGGTAATTACACGGTAACACGTGACTTGGTGGTATGTTAAGGTTTTACAG	2034
J96	ACCGAAGCGGGTAATTACACGGTAACACGTGACTTGGTGGTATGTTAAGGTTTTACAG	2031
CFT073	ACCGAAGCGGGTAATTACACGGTAACACGTGACTTGGTGGTATGTTAAGGTTTTACAG	2034
MNT08	ACCGAAGCGGGTAATTACACGGTAACACGTGACTTGGTGGTATGTTAAGGTTTTACAG *****	2040
UTI89	GAAGTTGTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTCGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGG	2094
J96	GAAGTTGTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGG	2091
CFT073	GAAGTTGTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGG	2094
MNT08	GAAGTTGTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGG *****	2100
UTI89	AGTTATGAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACAGATAACTTATATTCC	2154
J96	AGTTATGAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATTCC	2151
CFT073	AGTTATGAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATTCC	2154
MNT08	AGTTATGAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATTCC *****	2160
UTI89	GTGGAAGAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGAT	2214
J96	GTGGAAGAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTGCTGAT	2211
CFT073	GTGGAAGAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGAT	2214
MNT08	GTGGAAGAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGAT *****	2220
UTI89	ATCTTCCATGGCGCGGATGGTATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTA	2274
J96	ATCTTCCATGGCGCGGATGGTATGACCATATAGAAGGAAATGACGGGAATGACCGCTTA	2271
CFT073	ATCTTCCATGGCGCGGATGGTATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTA	2274
MNT08	ATCTTCCATGGCGCGGATGGTATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTA *****	2280
UTI89	TATGGTGATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGGATGACCAGCTCTATGGC	2334
J96	TATGGTGATAAAGGTAATGACACACTGAGTGGTGGAAACGGAGATGACCAGCTCTATGGC	2331
CFT073	TATGGTGATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGGATGACCAGCTCTATGGC	2334
MNT08	TATGGTGATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGAGATGACCAGCTCTATGGC ***** ** *****	2340
UTI89	GGTGATGGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGAC	2394
J96	GGTGATGGCAACGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTGAACGGCGGAGAT	2391
CFT073	GGTGATGGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGAC	2394
MNT08	GGTGATGGCAACGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTGAACGGCGGAGAT ***** *****	2400
UTI89	GGAGATGATGAGCTTCAGGTTGAGGGAAATCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGA	2454
J96	GGCGATGATGAGCTTCAGGTTGAGGGAAATCTCTTGCAAAAAATGTATTATCCGGTGGA	2451
CFT073	GGAGATGATGAGCTTCAGGTTGAGGGAAATCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGA	2454
MNT08	GGCGATGATGAGCTTCAGGTTGAGGGAAATCTCTTGCAAAAAATGTATTATCCGGTGGA ** *****	2460
UTI89	AAAGGTAATGACAAGTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGG	2514
J96	AAAGGTAATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGG	2511
CFT073	AAAGGTAATGACAAGTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGG	2514
MNT08	AAAGGTAATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGG ***** *****	2520
UTI89	AATGATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGC	2574
J96	AATGATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGC	2571
CFT073	AATGATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGC	2574
MNT08	AATGATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGC *****	2580
UTI89	CATCATATTATTGACGATGAAGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATAGAT	2634
J96	CATCATATTATTGACGATGATGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGAT	2631
CFT073	CATCATATTATTGACGATGATGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGAT	2634
MNT08	CATCATATTATTGACGATGATGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGAT *****	2640

UTI89	TTCCGGGACGTTGCCTTTAAGCGAGAAGGGAATGACCTCATTATGTATAAAGCTGAAGGT	2694
J96	TTCCGGGATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGT	2691
CFT073	TTCCGGGATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGT	2694
MNT08	TTCCGGGATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGT	2700
	***** ** ***** * ***** ***** ***** *****	
UTI89	AATGTTCTTTCTATTGGCCACAAAAATGGTATTACATTTAAAACTGGTTTGAAAAAGAG	2754
J96	AATGTTCTTTCCATTGGCCACAAAAATGGTATTACATTTAAAACTGGTTTGAAAAAGAG	2751
CFT073	AATGTTCTTTCCATTGGTCATAAAAAATGGTATTACATTCAGGAAGCTGGTTTGAAAAAGAG	2754
MNT08	AATGTTCTTTCCATTGGTCATAAAAAATGGTATTACATTCAGGAAGCTGGTTTGAAAAAGAG	2760
	***** ***** ** * ***** ***** * ***** *****	
UTI89	TCAGATGATCTCTCTAATCATCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATC	2814
J96	TCAGGTGATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATC	2811
CFT073	TCAGGTGATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATC	2814
MNT08	TCAGGTGATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATC	2820
	*** ** * ***** ***** ***** ***** *****	
UTI89	ACACCAGATTCTCTAAAAAGCATTGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTAT	2874
J96	ACACCAGATTCCCTTAAAAAGGCATTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTAT	2871
CFT073	ACACCAGATTCCCTTAAAAAGGCATTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTAT	2874
MNT08	ACACCAGATTCCCTTAAAAAGGCATTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTAT	2880
	***** ***** ** * ***** ***** ***** *****	
UTI89	GTGTATGGACATGATGCATCAACTTATGGGAGCCAGGACAATCTTAATCCATTAATTAAT	2934
J96	GTGTATGGGAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTAATCTTAATCCATTAATTAAT	2931
CFT073	GTGTATGGGAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAAT	2934
MNT08	GTGTATGGGAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAAT	2940
	***** ***** * * ***** * * ***** ***** *****	
UTI89	GAAATCAGCAAATCATTTAGCTGCAGGTAATTCGATGTTAAGGAGGAAAGATCTGCC	2994
J96	GAAATCAGCAAATCATTTAGCTGCAGGTAATTTGATGTTAAGGAGGAAAGAGCTGCA	2991
CFT073	GAAATCAGCAAATCATTTAGCTGCAGGTAATTTGATGTTAAGGAGGAAAGAGCTGCA	2994
MNT08	GAAATCAGCAAATCATTTAGCTGCAGGTAATTTGATGTTAAGGAGGAAAGAGCTGCA	3000
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
UTI89	GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGCTCAATA	3054
J96	GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGCTCAATA	3051
CFT073	GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGCTCAATA	3054
MNT08	GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGCTCAATA	3060
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
UTI89	ACTTTGACAGCATCAGCATAA-----	3075
J96	ACTTTGACAGCATCAGCATAA-----	3072
CFT073	ACTTTGACAGCATCAGCATAA-----	3075
MNT08	ACTTTGACAGCATCAGCATCATCACCATCACCAC TAA GCGGCCGC	3107
	***** ***** * * ***** * * ***** ***** *****	

รูปที่ 3.7 Nucleotide sequence alignment ของยีน *hlyA* ของ *E. coli* 4 สายพันธุ์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ในพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA* ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นแม่แบบ ซึ่งกำหนดให้ชื่อสายพันธุ์ MNT08 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ของ *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 UTI89 และ J96 กล่องสีเขียวคือตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่พบในสายพันธุ์ J96 กล่องสีส้มคือนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* กล่องสีชมพูคือนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* กล่องสีเหลืองคือ codon ของ 6x His tag ATG ในกล่องสีน้ำเงินคือ start codon และ TAA ในกล่องสีแดงคือ stop codon

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Start codon NheI

MNT08	ATG GCTAGC AACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTTGGCTCTGGGCC	60
J96	-----ATGAACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTTGGCTCTGGGCC	54
UTI89	-----ATGAATATGAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTTGGCTCTGGGCC	54
CFT073	-----ATGAATATGAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTTGGCTCTGGGCC	54
	* * * * *	
MNT08	AGTTCCCCATTACACAGAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCA	120
J96	AGTTCCCCATTACACAGAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCA	114
UTI89	AGTTCCCCATTACACAGAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCA	114
CFT073	AGTTCCCCATTACACAGAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCA	114

MNT08	ATACGGGCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCTGTTGCATATTGTAGT	180
J96	ATACGGGCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCTGTTGCATATTGTAGT	174
UTI89	ATACGGGCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCTGTTGCATATTGTAGT	174
CFT073	ATACGGGCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCTGTTGCATATTGTAGT	174

MNT08	TGGGCTAATTTAAGTTTAGAAAATGAAAT TAAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTC	240
J96	TGGGCTAATTTAAGTTTAGAAAATGAAAT TAAATATCTTAATGATGTTACTTCATTAGTC	234
UTI89	TGGGCTAATTTAAGTTTAGAAAATGAAAT TAAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTC	234
CFT073	TGGGCTAATTTAAGTTTAGAAAATGAAAT TAAATATCTTAATGATGTTACTTCATTAGTC	234

MNT08	GCAGAAGACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCCTTTCGGG	300
J96	GCAGAAGACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGCTGATTGCTCCTTTCGGG	294
UTI89	GCAGAAGACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCCTTTCGGG	294
CFT073	GCAGAAGACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCCTTTCGGG	294

MNT08	GATAACGGTGCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATCCCTGATGAACTATTCCGAGCC	360
J96	GATAACGGTGCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATCCCTGATGAACTATTCCGAGCC	354
UTI89	GATAACGGTGCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATCCCTGATGAACTATTCCGAGCC	354
CFT073	GATAACGGTGCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATCCCTGATGAACTATTCCGAGCC	354

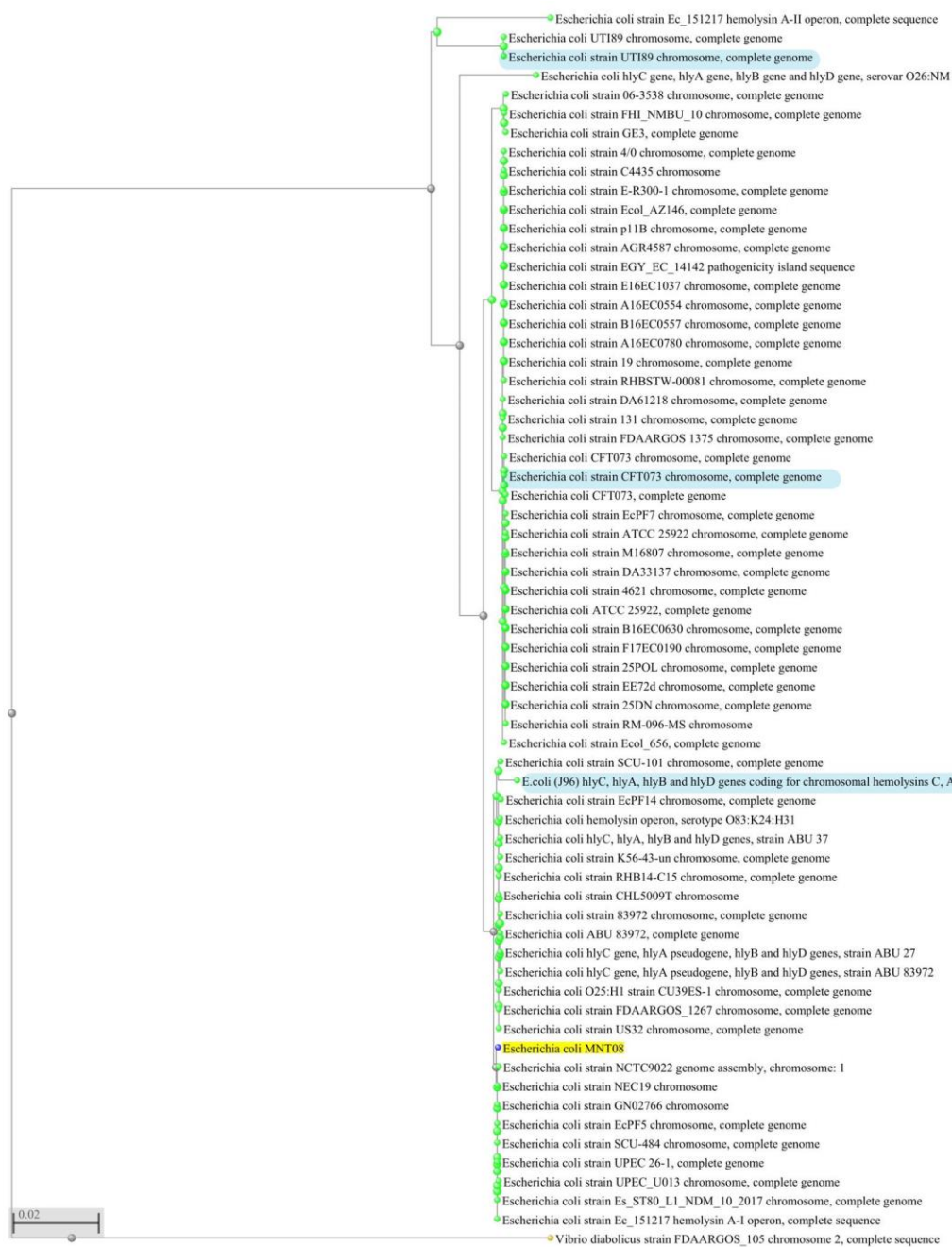
MNT08	ATCAGGGTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTAATAAT	420
J96	ATCAGGGTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTAATAAT	414
UTI89	ATCAGGGTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTAATAAT	414
CFT073	ATCAGGGTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTAATAAT	414

MNT08	GATAAACAGTTAGCGAATAAAAATTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTA	480
J96	GATAAACAGTTAGCGAATAAAAATTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTA	474
UTI89	GATAAACAGTTAGCGAATAAAAATTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTA	474
CFT073	GATAAACAGTTAGCGAATAAAAATTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTA	474

MNT08	AAAAACAAGATAGATTTCAATTTTTTCATTAACAGGTCATCATCACCATCACCAATAAGCGGCCG	545
J96	AAAAACAAGTACAGATTTCAATTTTTTCATTAACAGGTTAA-----6x His tag-----Stop codon	513
UTI89	AAAAACAAGACAGATTTCAATTTTTTCATTAACAGGTTA-----6x His tag-----Stop codon	512
CFT073	AAAAACAAGACAGATTTCAATTTTTTCATTAACAGGTTAA-----6x His tag-----Stop codon	513

รูปที่ 3.8 Nucleotide sequence alignment ของยีน *hlyC* ใน *E. coli* 4 สายพันธุ์

การเปรียบเทียบจำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ในพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งกำหนดให้ชื่อสายพันธุ์ MNT08 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ของ *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 UTI89 และ J96 กล่องสี่เหลี่ยมคือนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ *NheI* กล่องสี่เหลี่ยมคือนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ *NoI* กล่องสี่เหลี่ยมคือนิวคลีโอไทด์ของ 6x His tag และ TAA ในกล่องสี่เหลี่ยมคือนิวคลีโอไทด์ของ stop codon



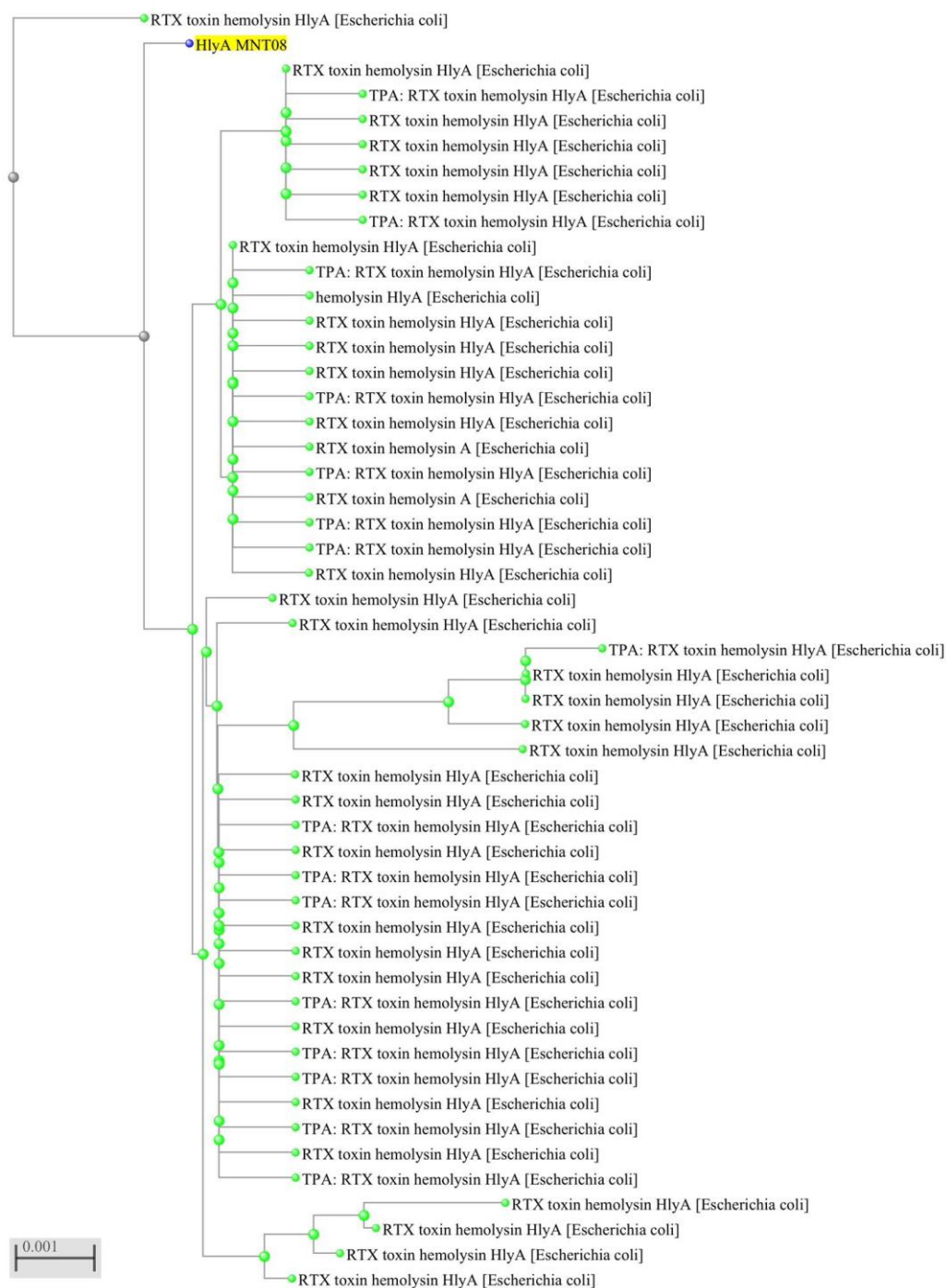
รูปที่ 3.9 แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *hlyA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง

การแสดงความสัมพันธ์ของยีน *hlyA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแถบสีเหลือง จะแสดงถึงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจากการทดลองนี้ ส่วนแถบสีฟ้าจะแสดงถึงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96, CFT073 และ UTI89



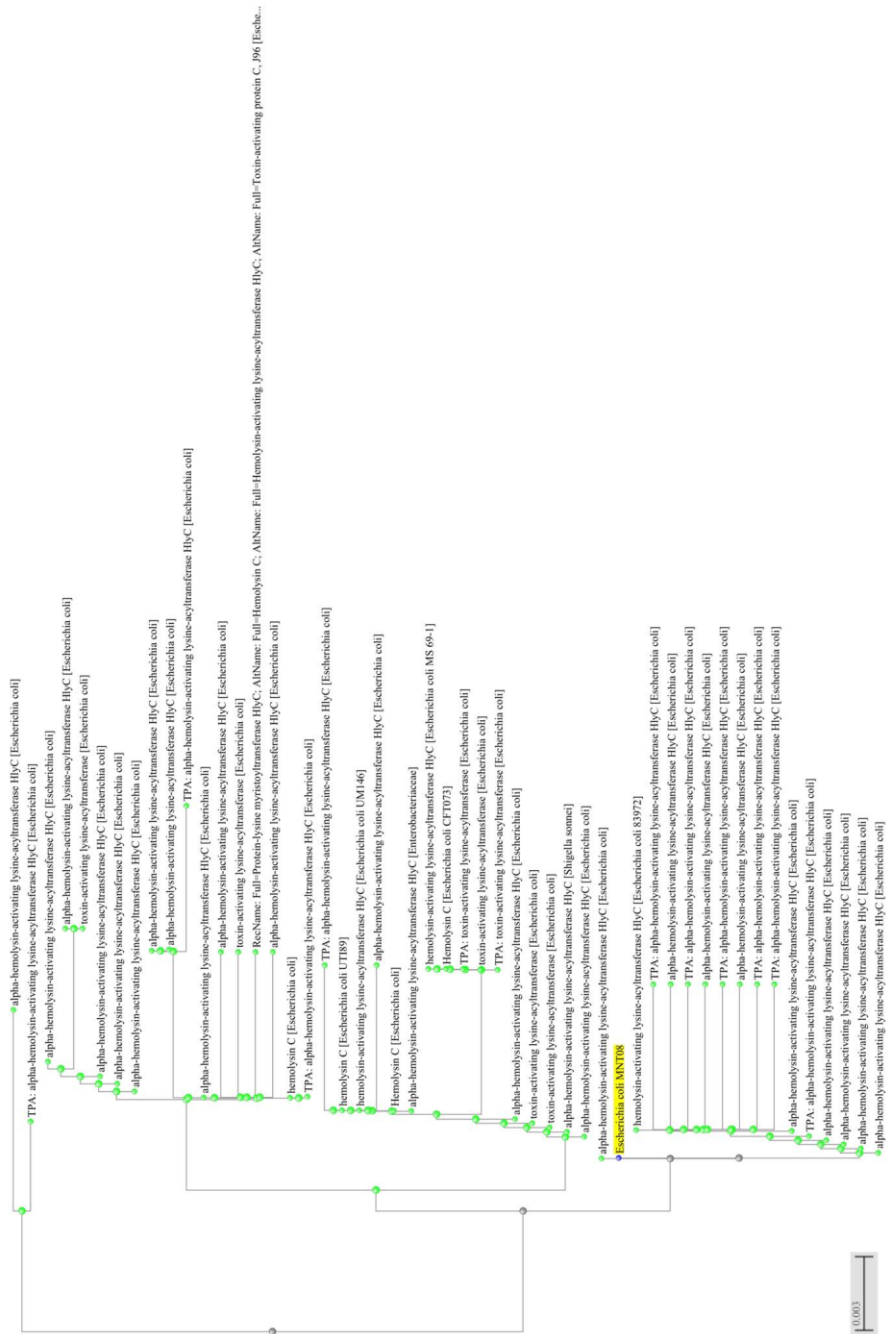
รูปที่ 3.10 แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง

การแสดงความสัมพันธ์ของยีน *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแถบสีเหลืองจะแสดงถึงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจากการทดลองนี้ ส่วนแถบสีฟ้าจะแสดงถึงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96, CFT073 และ UTI89



รูปที่ 3.11 แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง

การแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyA ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแถบสีเหลืองจะแสดงถึงโปรตีน HlyA ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจากการทดลองนี้



รูปที่ 3.12 แผนภูมิ phylogenetic tree ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง

การแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีน HlyC ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแถบสีเหลืองจะแสดงถึงโปรตีน HlyC ที่ผลิตแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะจากการทดลองนี้

เมื่อ nucleotide ของยีน *hlyA* และ *hlyC* ที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ไม่มีความเหมือนกับ nucleotide ทั้ง 3 strains (เทียบกับยีน *hlyA* เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* strain UTI89, J96 และ CFT073 คิดเป็น 97%, 99.3% และ 99.2% ตามลำดับ ยีน *hlyC* ของแบคทีเรีย *E. coli* strain UTI89, J96 และ CFT073 คิดเป็น 98.8%, 98.6% และ 98.8% ตามลำดับ) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองอาจเป็น strain ใหม่ จึงนำ nucleotide ที่ได้จากการทดลองนี้มาทำการ Blast ในเว็บไซต์ NCBI พบว่า nucleotide ของยีน *hlyA* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *E. coli* strain EcPF5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกมาได้จากผู้ป่วยเพศหญิงหลังหมดประจำเดือนที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (Sharon *et al.*, 2020) และแบคทีเรีย *E. coli* strain SCU-484 ซึ่งได้มาจากอาสาสมัครที่เป็นนักศึกษามหาวิทยาลัย Santa Clara ด้วยเก็บตัวอย่างจากการ swab ที่บริเวณทวารหนัก (Stephens *et al.*, 2020) โดยมี % identity เท่ากันที่ 99.93% (ดังแสดงในรูปที่ 3.9) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ % identity ของ *E. coli* strain J96, CFT073 และ UTI89 ในยีน *hlyA* พบว่ามีความแตกต่างกัน 0.68%, 0.71% และ 0.89% ตามลำดับ สำหรับ nucleotide ของยีน *hlyC* ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ nucleotide ของยีน *hlyA* โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *E. coli* strain EcPF5 และ SCU-484 เท่ากันถึง 100% (ดังแสดงในรูปที่ 3.10) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ % identity ของ *E. coli* strain J96, CFT073 และ UTI89 มีความแตกต่างกัน 1.36%, 0.6%, 0.6% ตามลำดับ จากนั้นนำ nucleotide ไป translate เป็นกรดอะมิโน แล้วไป Blast ในเว็บไซต์ NCBI พบว่ากรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ที่ได้จากการทดลองมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับโปรตีน HlyA ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในหลายสายพันธุ์ แต่ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียอื่น (รูปที่ 3.11) โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงมากที่สุดกับโปรตีน HlyA ที่ผลิตจาก *E. coli* strain SCU-101 คิดเป็น 99.80% และสำหรับโปรตีน HlyC ก็มีความสัมพันธ์เช่นเดียวกันกับโปรตีน HlyA (รูปที่ 3.12) โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับโปรตีน HlyC ที่ผลิตจาก *E. coli* strain SCU-101 คิดเป็น 100%

3.6 การผลิตโปรตีนลูกผสม

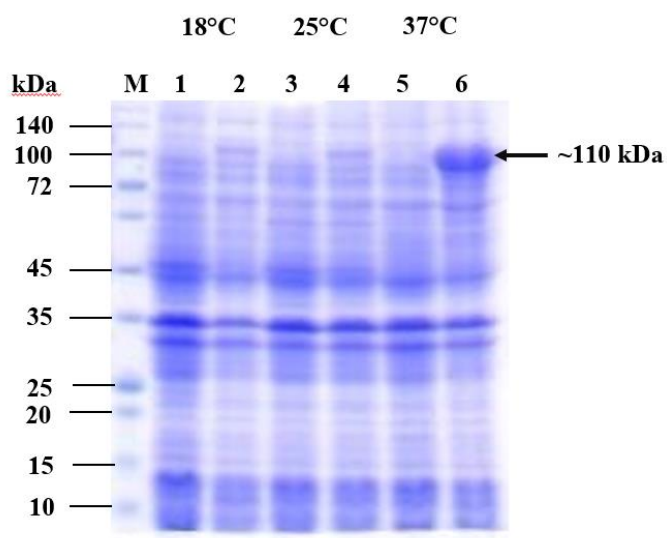
พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* หรือ pET17b-*hlyC* ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วถูกนำเข้าสู่ (transform) เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เมื่อถูกกระตุ้นแล้วสามารถผลิตโปรตีน HlyA หรือ HlyC ได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ในช่วงระหว่าง 0.4-0.6 จากนั้นแบ่งเซลล์ไว้สำหรับเป็นโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกกระตุ้นในการผลิตโปรตีน (non-induced cell) และนำเซลล์ส่วนที่เหลือมากระตุ้นการผลิตโปรตีน (induced cell) ด้วยสารละลาย IPTG แล้วนำเซลล์ทั้งสองส่วนไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 18 หรือ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีน หลังจากนั้นเก็บตะกอนเซลล์มาทำ whole cell lysate แล้ววิเคราะห์ผลการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyA หรือ HlyC ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.6.1 การผลิตโปรตีนลูกผสม HlyA

เมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* ตั้งต้น stock เดียวกัน และผลิตโปรตีนในระยะเวลาใกล้เคียงกัน พบว่าโปรตีนลูกผสม HlyA ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 110 kDa ไม่ถูกผลิตที่อุณหภูมิ 18 และ 25 องศาเซลเซียส แต่จะถูกผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ถูก induced cells ด้วย IPTG (รูปที่ 3.13)

3.6.2 การผลิตโปรตีนลูกผสม HlyC

โปรตีนลูกผสม HlyC ควรจะมีมวลโมเลกุลประมาณ 19 kDa แต่จากการตรวจสอบพบว่าปรากฏแถบโปรตีน HlyC ที่ประมาณ 15 kDa สามารถผลิตได้ที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แต่จะผลิตออกมามากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ถูก induced cells ด้วย IPTG ดังนั้นอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyC มากที่สุด (รูปที่ 3.14)



รูปที่ 3.13 ผลการตรวจสอบการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyA ที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 37 องศาเซลเซียส จากการทำ Whole cell lysate แล้วย่นย่นผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งโปรตีน HlyA มีมวลโมเลกุล ~110 kDa พบว่าปรากฏแถบโปรตีน HlyA ของการผลิตโปรตีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการถูก induce จาก IPTG

Lane M: Molecular weight marker

Lane 1: Non-induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส

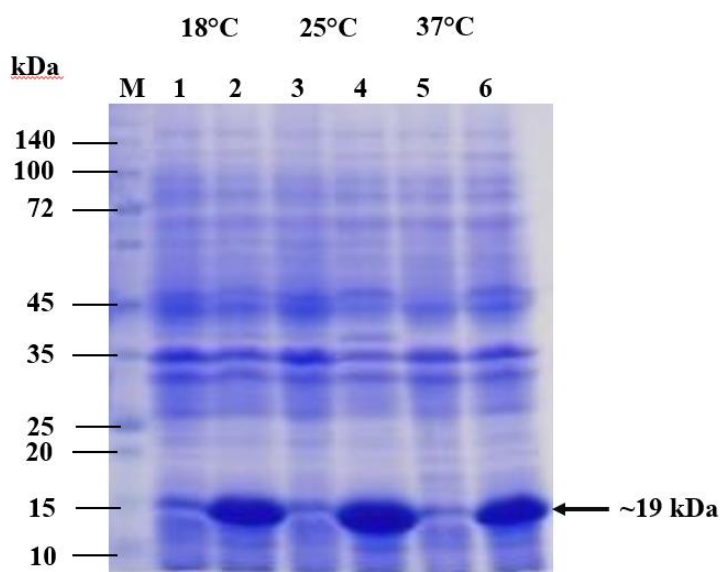
Lane 2: Induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส

Lane 3: Non-induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Lane 4: Induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Lane 5: Non-induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Lane 6: Induce cell ของโปรตีน HlyA ผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.14 ผลการตรวจสอบการผลิตโปรตีนลูกผสม HlyC ที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 37 องศาเซลเซียส จากการทำ Whole cell lysate แล้วยีนย่นผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งโปรตีน HlyC ควรจะมีมวลโมเลกุล ~19 kDa แต่พบแถบโปรตีน HlyC ที่ประมาณ 15 kDa ถูกผลิตได้ที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการถูก Induce จาก IPTG

Lane M: Whole Blue Range Prestained Protein Ladder

Lane 1: Non-induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส

Lane 2: Induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส

Lane 3: Non-induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Lane 4: Induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Lane 5: Non-induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Lane 6: Induced cell ของโปรตีน HlyC ผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein Purification)

นำโคโลนีของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth แล้ว induce ด้วย 0.1 mM IPTG บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน HlyA ส่วนโปรตีน HlyC บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ นำไปสกัดโปรตีนที่ต้องการโดยเบื้องต้นได้ทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีนว่าโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในส่วนของ soluble หรือ insoluble ก่อนที่จะนำโปรตีนที่ละลายอยู่ใน fraction ที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถทำบริสุทธิ์ได้ทั้งโปรตีน HlyA และ HlyC เนื่องจากโปรตีนทั้งสองถูกดัดแปลงโดยการเติม กรดอะมิโน histidine จำนวน 6 residues (His₆-tag) ตรง C-terminal เพื่อใช้ในการจับกับ ligand ของ Ni²⁺ NTA column ตั้งแต่ต้นในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค PCR ทั้งนี้ความสามารถในการละลายและความบริสุทธิ์ของโปรตีนสามารถถูกตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังนี้

3.7.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน HlyA

พบการละลายของโปรตีน HlyA ที่ผลิตจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) อยู่ในส่วนของ insoluble fraction (เรียกโปรตีนส่วนนี้ว่า inclusion bodies) (รูปที่ 3.15A) เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วย denaturing condition โดยใช้สารละลายที่มียูเรีย 8 M เป็นองค์ประกอบ (วิธีทดลองข้อ 2.3.4) พบว่าโปรตีน HlyA ไม่สามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ 100% ได้ เนื่องจากบริเวณ His-tag ของโปรตีน HlyA ไม่สามารถจับ resin ของ column ได้จึงทำให้โปรตีนหลุดออกมาตั้งแต่ flow through และถูกชะออกมาตั้งแต่แรกด้วย denaturing wash 1 buffer ที่มี 5 mM imidazole เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 3.15B) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่กระบวนการเตรียมคอลัมน์ทั้งแบบการ strip and recharge คอลัมน์เดิมด้วย Nickel หรือการเปลี่ยนไปใช้คอลัมน์อันใหม่ และการเตรียมสารละลาย inclusion bodies ของโปรตีน HlyA ใหม่ทั้งสิ้น 10 รอบ แต่ผลที่ได้ยังคงเหมือนเดิม จึงสันนิษฐานได้ว่า His-tag ที่มีอยู่บนโครงสร้างโปรตีน HlyA ไม่สามารถจับกับ ligand ของ Ni²⁺ NTA column ได้

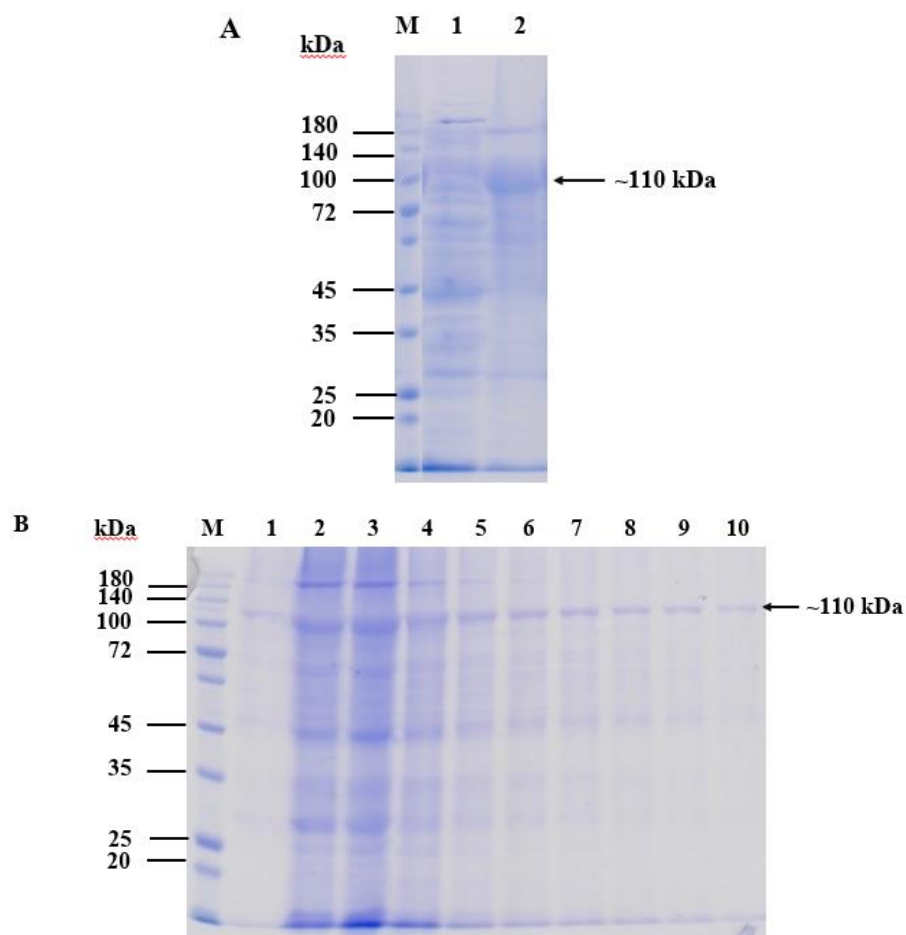
หากต้องการทำให้โปรตีน HlyA บริสุทธิ์ จะต้องเปลี่ยนเทคนิคการทำบริสุทธิ์ เช่น วิธี size exclusion chromatography แต่เนื่องด้วยภาควิชาขาดแคลนเครื่องมือและคอลัมน์ที่ใช้สำหรับเทคนิคนี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก fraction ของโปรตีน HlyA ที่ถูกชะออกมาในปริมาณมาก เพื่อให้มีความเข้มข้นสูง แล้วนำไปใช้ในการยืนยันว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE ที่มี

ขนาดประมาณ 110 kDa นั้นเป็นโปรตีน HlyA จริงด้วยวิธี mass spectrometry และเพื่อนำมาทดสอบการ refolding ของโปรตีน HlyA ด้วยวิธี tryptophan fluorescence ซึ่งจะอธิบายไว้ในข้อ 3.8

3.7.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีน HlyC

การวิเคราะห์สารละลายโปรตีนทั้ง soluble และ insoluble fractions ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏแถบโปรตีนที่หนาอย่างชัดเจน 2 ตำแหน่ง คือ แถบแรกมีขนาดประมาณ 45 kDa และแถบที่ 2 มีขนาดประมาณ 15 kDa ของสารละลายโปรตีนที่เป็น insoluble fraction (รูปที่ 3.16A) ซึ่งมีความแตกต่างกับผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการทำ whole cell lysate (รูปที่ 3.14) ดังอธิบายไว้ก่อนหน้านี้ใน 3.6.2 ว่าพบแถบโปรตีนที่เข้มเพียงแถบเดียวขนาดประมาณ 15 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีน HlyC เนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกับ 19 kDa ของมวลโมเลกุลโปรตีน HlyC ที่ได้จากการคำนวณ ความแตกต่างนี้สามารถอธิบายได้เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียม whole cell lysate นั้นสารละลายเซลล์ถูกนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เซลล์แตกและสามารถสกัดเอาสารละลายโปรตีนส่วนใหญ่ไปใช้โหลดบน SDS-PAGE ซึ่งโปรตีนที่ผ่านความร้อนดังกล่าวจึงถูกทำให้ denature อย่างสมบูรณ์ ดังเช่น โปรตีน HlyC ที่ถูกทำให้อยู่ในรูปของ monomer ทั้งหมดและปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ประมาณ 15-19 kDa ในขณะที่การเตรียม insoluble fraction นั้นโปรตีนถูกละลายอยู่ในสารละลายยูเรียแต่ไม่ได้ถูกนำไปต้ม ดังนั้นโปรตีน HlyC อาจถูก denature ได้ไม่สมบูรณ์ จึงปรากฏแถบโปรตีนเข้ม 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น monomer ที่ขนาดประมาณ 15-19 kDa และ dimer ที่ขนาดประมาณ 38 kDa (รูปที่ 3.16A)

เมื่อนำสารละลาย insoluble fraction ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ในสถานะ denaturing condition พบว่าโปรตีน HlyC ถูกชะออกจากคอลัมน์มากที่สุดด้วย denaturing elution buffer (8 M Urea, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) ใน fraction ที่ 3 และ 4 (รูปที่ 3.16B) มี purity ประมาณ 80% ดังนั้นเพื่อยืนยันความถูกต้องว่าแถบโปรตีนที่พบเป็นชนิด dimer และ monomer ของโปรตีน HlyC ผู้วิจัยจึงนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค mass spectrometry



รูปที่ 3.15 ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน และผลการตรวจสอบการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม HlyA โดยใช้ HisTrapTM FF column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีน HlyA อยู่ในส่วนของ Insoluble fraction และไม่สามารถจับ ligand ของ column ได้จึงถูกชะออกมาตั้งแต่แรกด้วย Denaturing wash 1 buffer

(A) ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน

Lane M: Whole Blue Range Prestained Protein Ladder

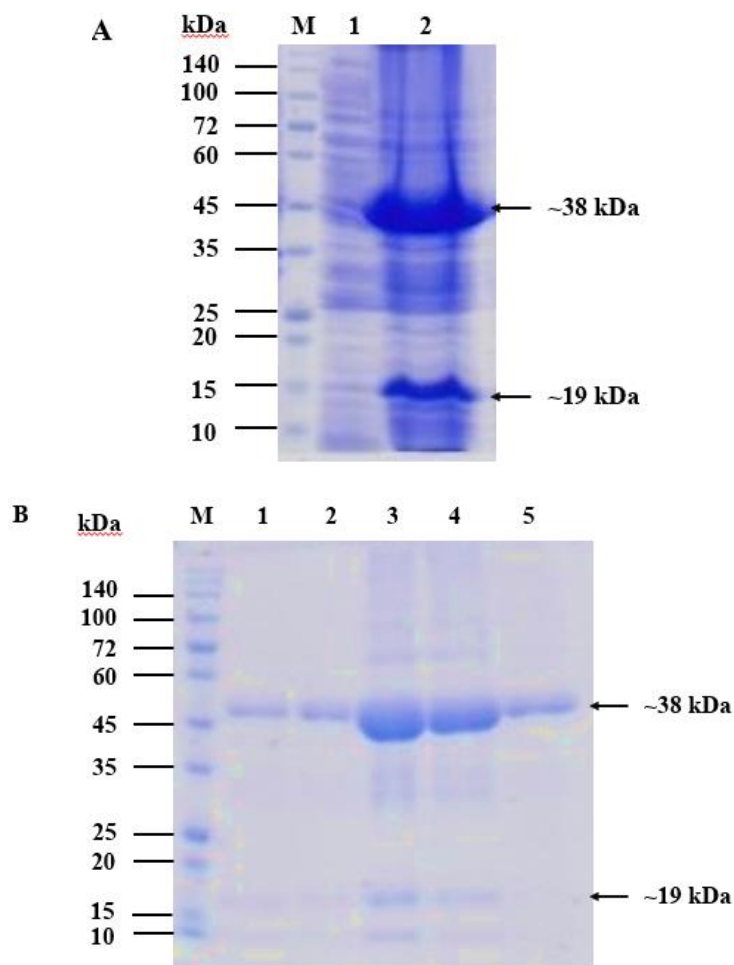
Lane 1: Soluble fraction

Lane 2: Insoluble fraction ที่มีโปรตีน HlyA ขนาดประมาณ 110 kDa ละลายอยู่

(B) ผลการตรวจสอบการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม HlyA โดยใช้ HisTrapTM FF column

Lane M: Whole Blue Range Prestained Protein Ladder

Lane 1-10: fraction ที่ 1-10 ของโปรตีน HlyA ที่ถูกชะด้วย denaturing wash 1 buffer โดยเก็บ fraction ละ 1 ml



รูปที่ 3.16 ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน และผลการตรวจสอบการทำริสุทซ์โปรตีนลูกผสม HlyC โดยใช้ HisTrap™ FF column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีน HlyC อยู่ในส่วนของ Insoluble ปรากฏแถบโปรตีนของ HlyC ขึ้นเข็ม 2 ตำแหน่ง โดยแถบแรกอยู่ที่ 45 kDa ซึ่งคาดว่าจะเป็นโปรตีน HlyC ที่เป็น dimer และแถบที่ 2 อยู่ที่ 15 kDa คาดว่าจะเป็น monomer และจะถูกชะออกมามากใน fraction 3 และ 4 ด้วย Denaturing elution buffer

(A) ผลการทดสอบความสามารถการละลายของโปรตีน

Lane M: Whole Blue Range Prestained Protein Ladder

Lane 1: Soluble fraction

Lane 2: Insoluble fraction ที่มีโปรตีน HlyC ละลายอยู่

(B) ผลการตรวจสอบการทำริสุทซ์โปรตีนลูกผสม HlyC โดยใช้ HisTrap™ FF column

Lane M: Whole Blue Range Prestained Protein Ladder

Lane 1-5: fraction ที่ 1-5 ของโปรตีน HlyC ที่ถูกชะด้วย denaturing elution buffer โดยเก็บ fraction ละ 1 ml

3.8 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีน

3.8.1 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrometry

การวิเคราะห์ทำโดยการนำโปรตีนที่สนใจซึ่งผ่านการแยกออกจากโปรตีนอื่นด้วยวิธี SDS-PAGE และถูกสกัดออกมาจาก acrylamide gel แล้ว มาตัดด้วยเอนไซม์ trypsin ตรงตำแหน่งกรดอะมิโน lysine (K) และ arginine (R) ให้เป็น peptide สายสั้นๆ แล้วนำไป spot บน matrix ที่เป็น α -cyano-4-hydroxycinnamic acid จากนั้นยิง laser ให้โมเลกุลกลายเป็นไอออน แล้วตรวจวัดด้วยเครื่อง mass spectrometer ซึ่งการทดลองนี้ทำเพื่อระบุชนิดของโปรตีน โดยนำลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีการรายงานไว้แล้วใน Swiss-Prot database

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลการระบุชนิดของโปรตีนจากแถบ SDS-PAGE ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

Name of Samples	Protein identification	Primary accession number	Theoretical mass (Da)	Protein score	No. of peptides matched	Sequence coverage (%)
HlyA	Hemolysin A, chromosomal	P09983	109,867	5237	13	55
HlyC dimer	Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC	P09984	19,726 *	1205	4	72
HlyC monomer	Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC	P09984	19,726	953	2	62

หมายเหตุ

- ข้อมูลของ Primary accession number และ Theoretical mass ได้มาจากฐานข้อมูล UniProt
- * คือมวลโมเลกุลของโปรตีน HlyC ที่คำนวณจาก polypeptide ของโปรตีน HlyC เพียงสายเดียว

3.8.1.1 การตรวจสอบโปรตีน HlyA ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrometry

การระบุชนิดของโปรตีน HlyA พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนลูกผสม HlyA ที่ผลิตได้ตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Hemolysin A ที่อยู่บน chromosomal จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Primary accession number: P09983) (รูปที่ 3.17) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค MS นี้คิดเป็น 55% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน Hemolysin A โดยมี peptide matched จำนวน 13 peptides, protein score เท่ากับ 5237 โดยค่า protein score เป็นค่าผลรวมของ peptide score ซึ่งถ้าค่านี้ยังมีค่ามากจะแสดงถึงความถูกต้องจากการ match กันระหว่าง sequence ของโปรตีนที่วิเคราะห์กับโปรตีนจาก database และมีมวลโมเลกุลที่คำนวณตามทฤษฎีเท่ากับ 109,867 Da (ตารางที่ 3.1)

3.8.1.2 การตรวจสอบโปรตีน HlyC ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrometry

สำหรับโปรตีนลูกผสม HlyC ที่ผลิตได้มีลำดับกรดอะมิโนตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC หรือมีอีกชื่อคือ Hemolysin C จากเชื้อ *E. coli* (Primary accession number: P09984) (รูปที่ 3.18) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค MS นี้คิดเป็น 56% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน Hemolysin C โดยมี peptide matched จำนวน 2 peptides, protein score เท่ากับ 953 สำหรับโปรตีน HlyC monomer (ตารางที่ 3.1) และสามารถยืนยันผลได้ว่าแถบโปรตีนที่อยู่ตรงบริเวณ 45 kDa จากการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE เป็นโปรตีน HlyC ที่มีโครงสร้างเป็น dimer โดยมีจำนวนของ peptide matched 4 peptides ซึ่งเป็น 2 เท่าของโปรตีน HlyC monomer, peptide score เท่ากับ 1205 และมีลำดับกรดอะมิโนตรงกันกับ P09984 คิดเป็น 72%

1 **MPTITAAQIK** STLQSAKQSA ANKLHSAGQS TKDALKKAAE QTRNAGNRLI
 51 **LLIPKDYKGQ GSSLNDLVRT ADELGIEVQY DEKNGTAITK QVFGTAEKLI**
 101 **GLTERGVTIF APQLDKLLQK YQKAGNKLGG SAENIGDNLG KAGSVLSTFQ**
 151 **NFLGTALSSM KIDELIKKQK** SGGNVSSSEL AKASIELINQ LVDTAASLNN
 201 VNSFSQQLNK **LGSVLSNTKH** LNGVGNKLQN LPNLDNIGAG LDTVSGILSA
 251 ISASFILSNA DADTGTKAAA **GVELTTKVLG** NVGKGISQYI **IAQRAAQGLS**
 301 TSAAAAGLIA SVVTLAISPL SFLSIADKFK **RANKIEEYSQ RFKKLG YDGD**
 351 **SLLA AFHKET** GAIDASLTRI STVLASVSSG ISAAATTSLV GAPVSALVGA
 401 VTGIISGILE ASK**QAMFEHV ASKMADVIAE WEKKGK NYF ENGYDARHAA**
 451 **FLEDNFKILS QYNKEYSVER SVLITQQHWD TLIGELAGVT RINGDKTILSGK**
 501 **SYIDYYEEGK RLEK KPDEFQ KQVFDPLKGN IDLSDSKSST LLKFVTPLLT**
 551 **PGEEIRERRQ SGKYEYITEL LVKGVDKWTV KGVQDKGSVY DYSNLIQHAS**
 601 VGNNQYREIR **IESHLGDGDD KVFLSAGSAN IYAGKGHDVV YYDKTDTGYL**
 651 **TIDGTKATEA GNYTVTRVLG GDVKVLQEVV KEQEVSVGKR** TEKTQYRSYE
 701 **FTHINGKNLT ETDNLYSVEE LIGTTRADKF FGSKFADIFH GADGDDHIEG**
 751 NDGNDRLYGD KGNDTLSSGN GDDQLYGGDG NDKLIGGAGN NYLNGGDGDD
 801 ELQVQGNSLA KNVLSGGKGN DKLYGSEGAD **LLDGGE GNDL LKGGYGNDIY**
 851 **RYLSGYGHHI IDDDGGKDDK LSLADIDFRD VAFRREGNDL IMYKAEGNVL**
 901 **SIGHKNGITF KNWFEKESGD ISNHQIEQIF DKDGRVITPD SLKKALEYQQ**
 951 **SNNKASYVYG NDALAYGSQG NLNPLINEIS KIISAAGNFD VKEERAAASL**
 1001 **LQLSGNASDF SYGRNSITLT** ASA

รูปที่ 3.17 การระบุชนิดโปรตีน HIYA ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยแสดง peptide sequence ของโปรตีน Hemolysin, chromosomal (P09983) จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งตัวหนังสือหนาสีแดง แสดงถึงตำแหน่ง peptides ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ตรงกับลำดับกรดอะมิโนในสาย polypeptide ของ Hemolysin, chromosomal

1 MNRNPLEVL GHVSWLWASS PLHRNWPVSL FAINVLP AIR ANQYALLTRD
 51 NYPVAYCSWA NLSLENEIKY LNDVTSLVAE DWTSGDRKWF IVWIAPFGDN
 101 GALYKYMRKK FPDELFAIR VDPKTHVGKV SEFHGGKIDK QLANKIFKQY
 151 HHELITEVKN KSDFNFSLTG

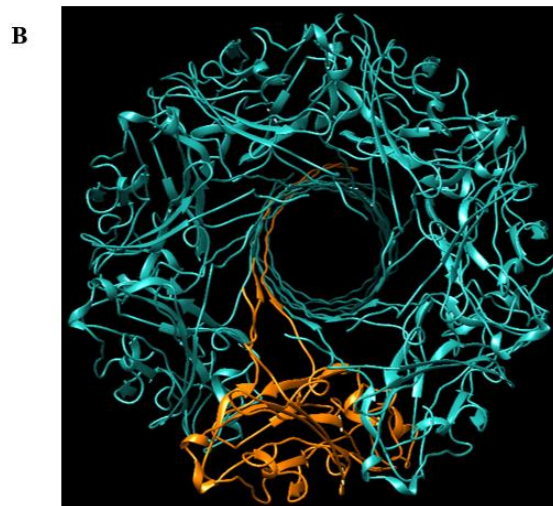
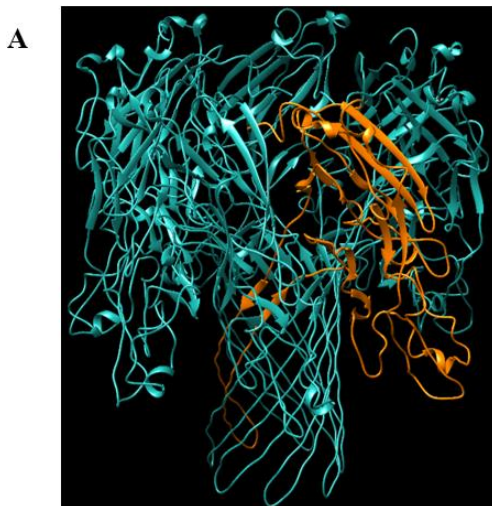
รูปที่ 3.18 การระบุชนิดโปรตีน HlyC ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยแสดง peptide sequence ของโปรตีน Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC (P09984) จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งตัวหนังสือหนาสีแดงแสดงถึงตำแหน่ง peptides ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MS ที่ตรงกับลำดับกรดอะมิโนในสาย polypeptide ของ Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC

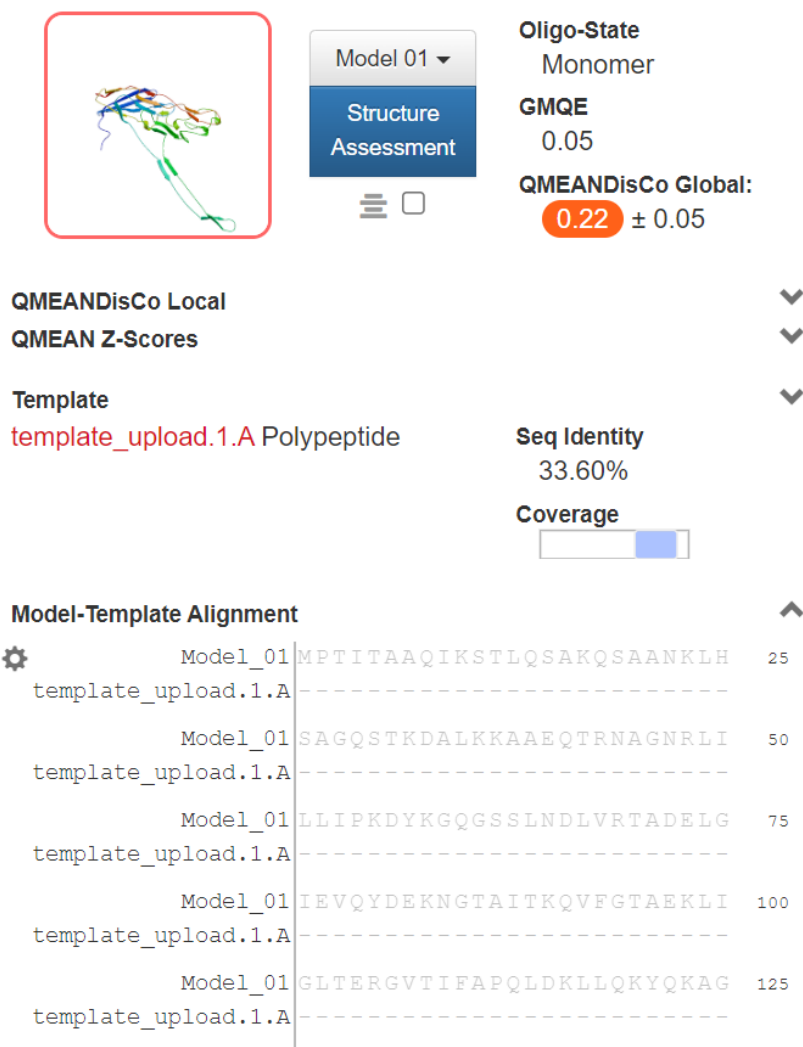
3.8.2 การสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน

การทดลองนี้เป็นการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA และ HlyC โดยใช้ซอฟต์แวร์ออนไลน์ SWISS-MODEL ด้วยการนำลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด (full length amino acid sequence) ที่ได้จากการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วของยีนสังเคราะห์ HlyA และ HlyC ในงานวิจัยนี้ และทำการค้นหาโครงสร้าง 3 มิติที่มีการเผยแพร่อยู่ในฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB) เพื่อใช้เป็นแม่แบบที่เหมาะสมในการสร้างแบบจำลอง ทั้งนี้แบบจำลองที่ถูกสร้างขึ้นมานั้นจะต้องมีค่า Global Model Quality Estimation (GMQE) บ่งบอกถึงความแม่นยำของ model ที่สร้างขึ้นด้วยการ alignment ของ sequence ระหว่าง target และ template ซึ่งจะแสดงเป็นตัวเลขระหว่าง 0 ถึง 1 โดยตัวเลขที่สูงบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือที่สูง, Quaternary Structure Quality Estimation (QSQE) บ่งบอกถึงความเป็นไปได้ที่จะสร้าง oligomer โดยแสดงเป็นตัวเลข 0 ถึง 1 หากค่านี้สูงกว่า 0.7 ถือว่าเชื่อถือได้, % Sequence identity และ % Coverage สูง จึงจะถือว่าเป็นแบบจำลองที่ดี สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างของแบบจำลองทำได้โดยการแสดงภาพ 3 มิติในโปรแกรม UCSF Chimera เวอร์ชัน 1.13.1

3.8.2.1 การสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA

โปรตีน alpha-hemolysin สามารถพบได้ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยยีนมีชื่อว่า *hlyA* และแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ยีนมีชื่อว่า *hly* หรือ *hla* เนื่องจากว่าโปรตีน alpha-hemolysin ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองจะมีชื่อเหมือนกัน และมีคุณสมบัติในการเกิด hemolytic activity เหมือนกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน alpha-hemolysin จากแบคทีเรีย *S. aureus* (PDB ID: 7AHL) ที่ได้รับการตีพิมพ์ (Song *et al.*, 1996) มาเป็นแม่แบบในการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 (รูปที่ 3.19A และ B) จากการทดลองนี้พบว่า แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA โดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของ 7AHL เป็นแม่แบบมีค่า GMQE สูงสุดที่ 0.05, Sequence identity 33.6% และมีโครงสร้างเป็น monomer ที่ครอบคลุมกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง C-terminal ของโปรตีน HlyA (รูปที่ 3.19C) จากโครงสร้างแบบจำลองของโปรตีน HlyA ทำให้โครงสร้าง 3 มิติของ 7AHL ที่นำมาใช้เป็นแม่แบบไม่เหมาะที่จะถูกเลือก เพราะเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จึงไม่มีบริเวณของ RTX domain และ polypeptide ของเชื้อมีสั้นกว่าของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ถึง 3 เท่า ซึ่งมีความเหมือนของ amino acid sequence เพียง 21.1% (รูปที่ 3.20)





รูปที่ 3.19 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA (HlyA model analysis) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน alpha-hemolysin (ยีน: *hly* หรือ *hla*) จากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 7AHL) เป็นแม่แบบ

- แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA จากมุมมองด้านหน้า
- แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA จากมุมมองด้านบน
- The template profile (PDB ID: 7AHL)

```

>>HlyA (1024 aa)
Waterman-Eggert score: 56; 18.7 bits; E(1) < 0.52
21.1% identity (48.7% similar) in 152 aa overlap (108-251:849-996)

      110      120      130      140      150      160
7AHL  DTKEYMSTLTYGFGNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHT-LKYVQPDFKTILESPTDKKVG
      : . . . : . . . : : : : : : . . . . . : . . . : . . . :
HlyA  DIYRYS---GYGHHIIDDGKDDKLSLADIDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGNVLISIG
      850      860      870      880      890      900

      170      180      190      200      210
7AHL  WK--VIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFDLPNKASSL-----
      : . . . : . . . : . . . . . : . . . : : . . . : : . . :
HlyA  HKNGITFRNWFEKESGDISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQSSNNKASYVYVGNDA
      910      920      930      940      950      960

      220      230      240      250
7AHL  LSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYER
      : . . . : . . . : . . . : : : : :
HlyA  LAYGSDNLNPLINEISKIISAAGNFDVKEER
      970      980      990

```

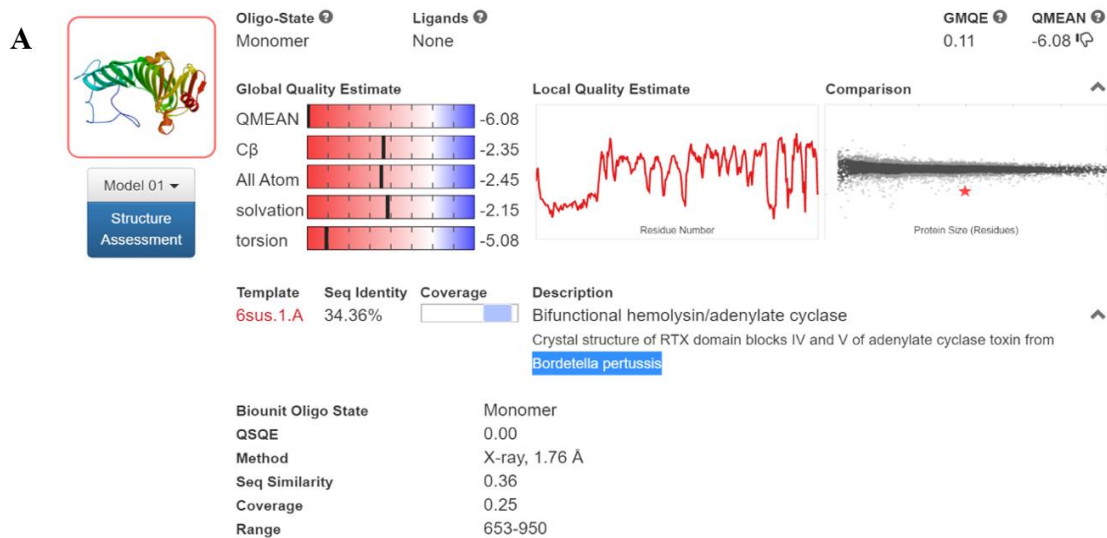
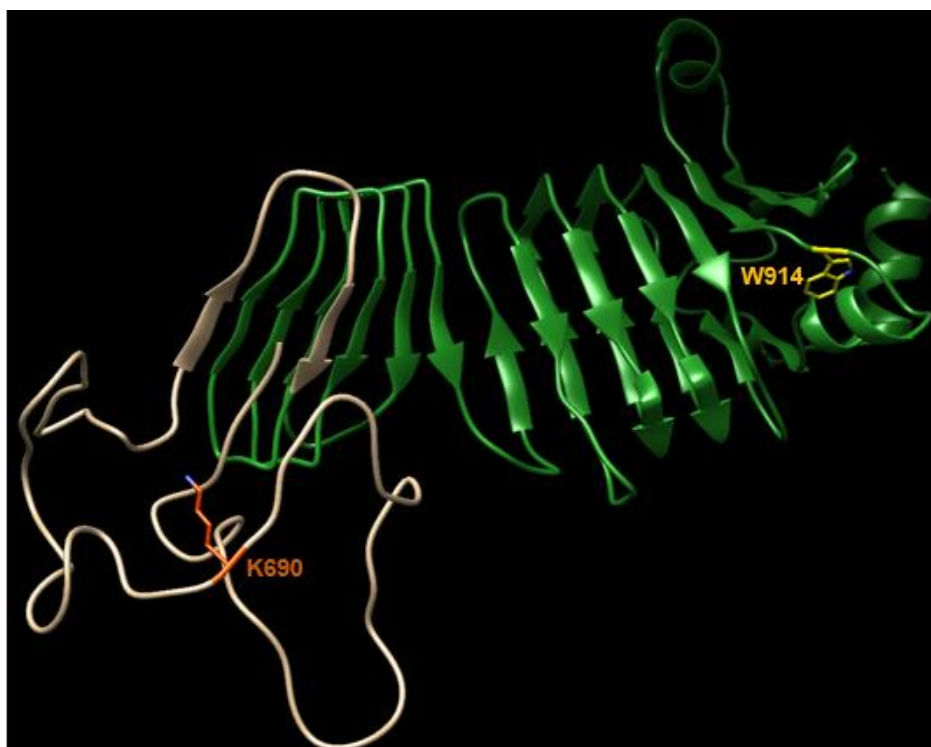
รูปที่ 3.20 Amino acid sequence alignment ของโปรตีน alpha-hemolysin

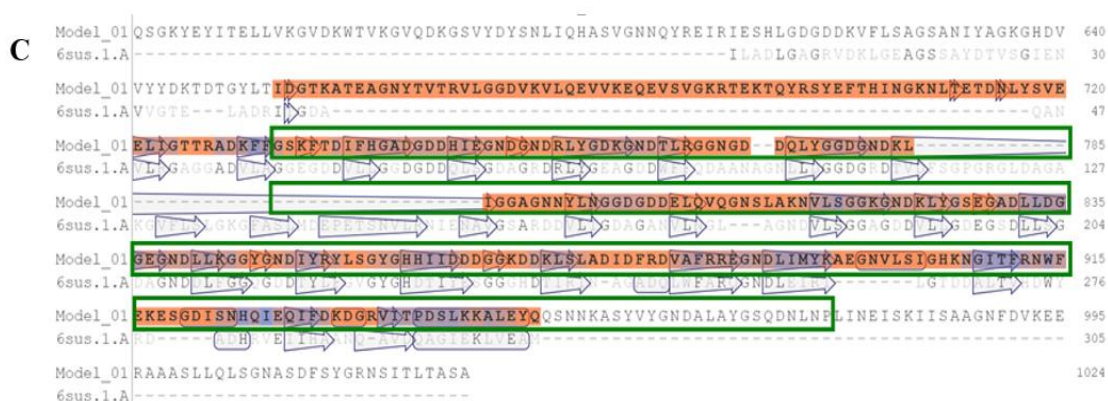
การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนของโปรตีน alpha-hemolysin จากแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* (HlyA) กับแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* (7AHL)

ดังนั้นแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 จึงถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน adenylate cyclase toxin (CyaA) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* (PDB ID: 6SUS) เป็นแม่แบบ (รูปที่ 3.21A) ซึ่ง chain A ของโครงสร้าง 6SUS (6SUS.1.A) (Motlova *et al.*, 2020) มีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแม่แบบ เพราะโปรตีน CyaA มีระบบการหลั่งออกนอกเซลล์แบบ T1SS ที่คล้ายกับโปรตีน HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งจะประกอบด้วย inner membrane ATPase (CyaB), membrane fusion protein (CyaD) และ outer membrane channel component (CyaE) (Bumba *et al.*, 2016) การกระตุ้นโปรตีน CyaA ให้อยู่ในรูป active form จะถูกกระตุ้นด้วยการเติม fatty-acyl ที่กรดอะมิโน lysine 2 residues และโปรตีน CyaA ยังมีบริเวณ RTX domain ตรงตำแหน่ง C-terminal ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญในการเป็นสัญญาณการหลั่งโปรตีน CyaA ที่ active แล้วออกนอกเซลล์ (Motlova *et al.*, 2020) ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน CyaA มีหน้าที่และองค์ประกอบของบริเวณที่สำคัญใกล้เคียงกับโปรตีน HlyA ทำให้โปรตีน CyaA เป็น template ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA ซึ่งแบบจำลองที่ได้มีค่า GMQE สูงสุดที่ 0.11, QSQE เป็น 0, Sequence identity 34.36% และ Coverage 25% มีโครงสร้างเป็น monomer ที่ครอบคลุมกรดอะมิโน 339

residues ตรงตำแหน่ง C-terminal (residues 612-950) ของโปรตีน HlyA (รูปที่ 3.21B) จากลำดับกรดอะมิโนของแบบจำลองโครงสร้างโปรตีน HlyA พบว่ากรดอะมิโน K690 สามารถพบได้ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะทั้งหมด ซึ่งเป็น 1 ใน 2 ของกรดอะมิโน lysine ที่ถูกคาดการณ์ว่าเป็นตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยา acylation โดยมี HlyC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้โปรตีน HlyA อยู่ในรูป active form ส่วน residues 733-975 (รูปที่ 3.21C) ถูกคาดการณ์ว่าเป็นบริเวณของ RTX domain (Bumba *et al.*, 2016) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับซ้ำของ nonapeptide (GGxGxDxUx) เกี่ยวข้องกับการเป็นสัญญาณการหลังโปรตีน HlyA ออกนอกเซลล์แบบ TISS และเมื่อมีการหลังโปรตีน HlyA ออกนอกเซลล์แล้ว Ca^{2+} ที่อยู่ภายนอกเซลล์จะมาจับที่บริเวณ RTX นี้เพื่อทำให้โปรตีน HlyA ที่ผลิตออกมาในตอนแรกเกิดการ folding แล้วเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน HlyA ที่อยู่ในรูป mature (Thomas, Bakkes *et al.*, 2014) และกรดอะมิโน W914 ที่อยู่ตรงบริเวณ RTX domain นี้มีความน่าสนใจ เพราะเป็นกรดอะมิโนที่มี side chain เป็นวงแหวน aromatic ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ จึงนำค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโน W914 มาเปรียบเทียบกับความแตกต่างกันระหว่างโปรตีนที่เป็น unfolded และ folded เมื่อมีการจับกับ Ca^{2+}

เนื่องจาก template ที่นำมาใช้สร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA มีข้อจำกัดของความยาว แบบจำลองในการศึกษานี้จึงสามารถทำนายโครงสร้างโปรตีน HlyA ได้เพียงหนึ่งในสามเท่านั้น ทำให้ไม่มีข้อมูลโครงสร้างสำหรับกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง 272-301 ซึ่งเป็นบริเวณที่โครงสร้างมีลักษณะเป็น amphipathic α -helix จำเป็นสำหรับการสร้างรูพรุน ตำแหน่ง 564-739 เกี่ยวข้องกับการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolytic) และตำแหน่ง 914-936 เป็นบริเวณที่จับกับโปรตีน Glycophorin ของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Ristow & Welch, 2016) ดังนั้น การศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA แบบเต็มความยาว จำเป็นต้องนำโปรตีน HlyA ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วและอยู่ในรูปของ soluble ไปทำการตกผลึกเพื่อวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค X-ray crystallography ต่อไป

**B**



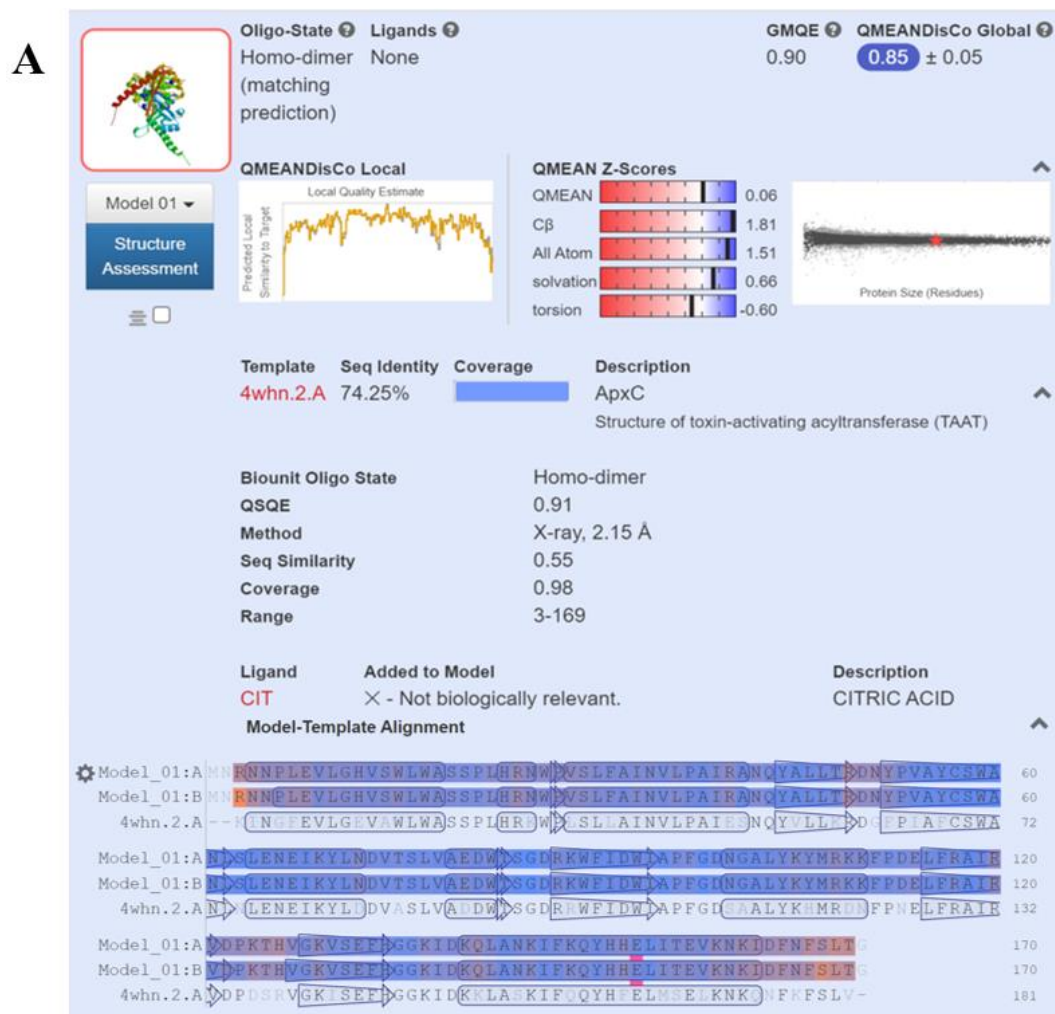
รูปที่ 3.21 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA (HlyA model analysis) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน adenylate cyclase toxin (CyaA) จากแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* (PDB ID: 6SUS.1.A) เป็นแม่แบบ

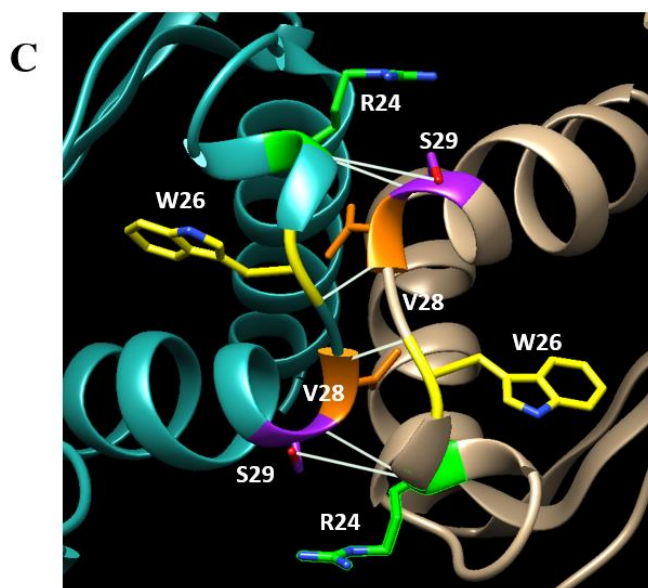
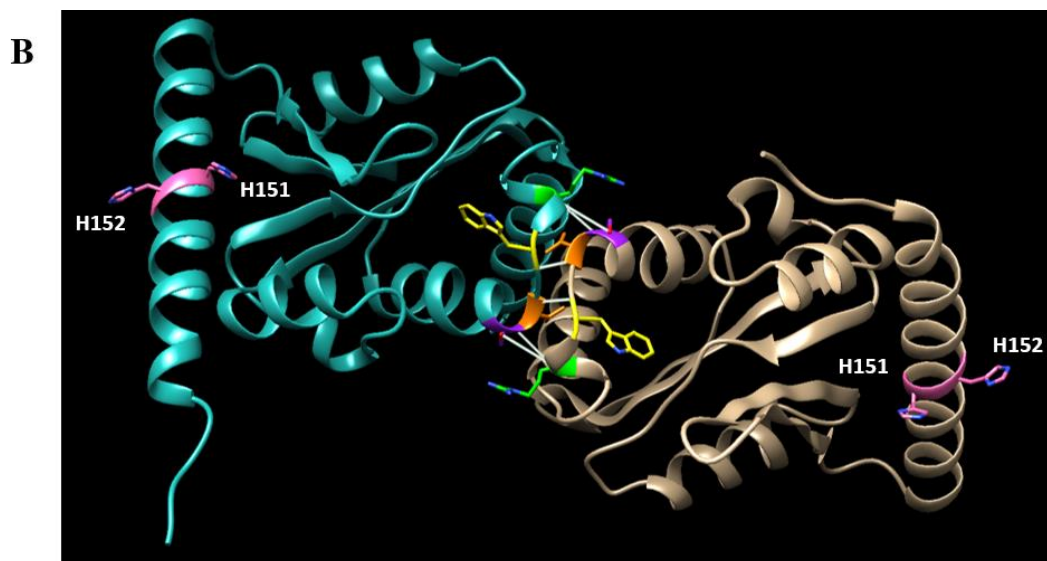
- (A) The template profile (PDB ID: 6SUS.1.A)
 (B) แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA โดยจะแสดงกรดอะมิโน K690 (สีส้ม), W914 (สีเหลือง) และบริเวณ RTX domain (residues 733-950) (ribbon สีเขียว)
 (C) Amino acid sequence alignment ของ HlyA (Model_01) และ CyaA (6SUS.1.A) แสดงบริเวณ RTX domain ของโปรตีน HlyA ในกล่องสีเขียว

3.8.2.2 การสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC

แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ApxC จากเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus pleuropneumoniae* (PDB ID: 4WHN) เป็นแม่แบบ (รูปที่ 3.22A) ซึ่ง chain A ของโครงสร้าง 4WHN (4WHN. 2. A) (Greene *et al.*, 2015) มีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแม่แบบ เพราะโปรตีนทั้งสองนี้เป็นสมาชิกในกลุ่ม toxin-activating acyltransferase (TAAT) โดยแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC มีค่า GMQE สูงสุดที่ 0.90, QSQE เป็น 0.91, Sequence identity 74.25% และ Coverage 98% ทั้งนี้โครงสร้างจำลองที่ได้เป็น homodimer (รูปที่ 3.22B) ที่ครอบคลุมกรดอะมิโน 167 residues (residues 3-169) ของโปรตีน HlyC จากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติ พบว่ามีพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทั้งหมด 6 พันธะที่เกิด interaction ระหว่างสอง monomer (รูปที่ 3.22C) โดยมี 4 พันธะไฮโดรเจนที่เกิดจาก interaction ระหว่าง backbone กับ backbone ของกรดอะมิโนระหว่างสอง monomer คือ Arg24.A กับ Ser29.B, Trp26.A กับ Val28.B, Val28.A กับ Trp26.B, Ser29.A กับ Arg24.B และมี 2 พันธะไฮโดรเจนที่เกิดจาก interaction ระหว่าง side chain กับ

backbone ของกรดอะมิโนระหว่างสอง monomer คือ Ser29.A กับ Arg24.B, Arg24.A กับ Ser29.B มีกรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับจับกับ heme คือ H151 และ H152 (รูปที่ 3.22B) ดังที่มีรายงานไว้ (Peherstorfer *et al.*, 2018)





รูปที่ 3.22 แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC (HlyC model analysis) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ApxC จากเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus pleuropneumoniae* (PDB ID: 4WHN.2.A)

- (A) The template profile (PDB ID: 4WHN.2.A)
- (B) แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyC ที่มีโครงสร้างเป็น homodimer โดยแสดง chain A ด้วย ribbon สีฟ้า และ chain B ด้วย ribbon สีทอง กรดอะมิโนที่สำคัญ H151 และ H152 สีชมพู
- (C) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) สีขาว ที่เกิด interaction ระหว่างสอง monomer

3.8.3 การม้วนตัวของโปรตีน HlyA (Protein folding)

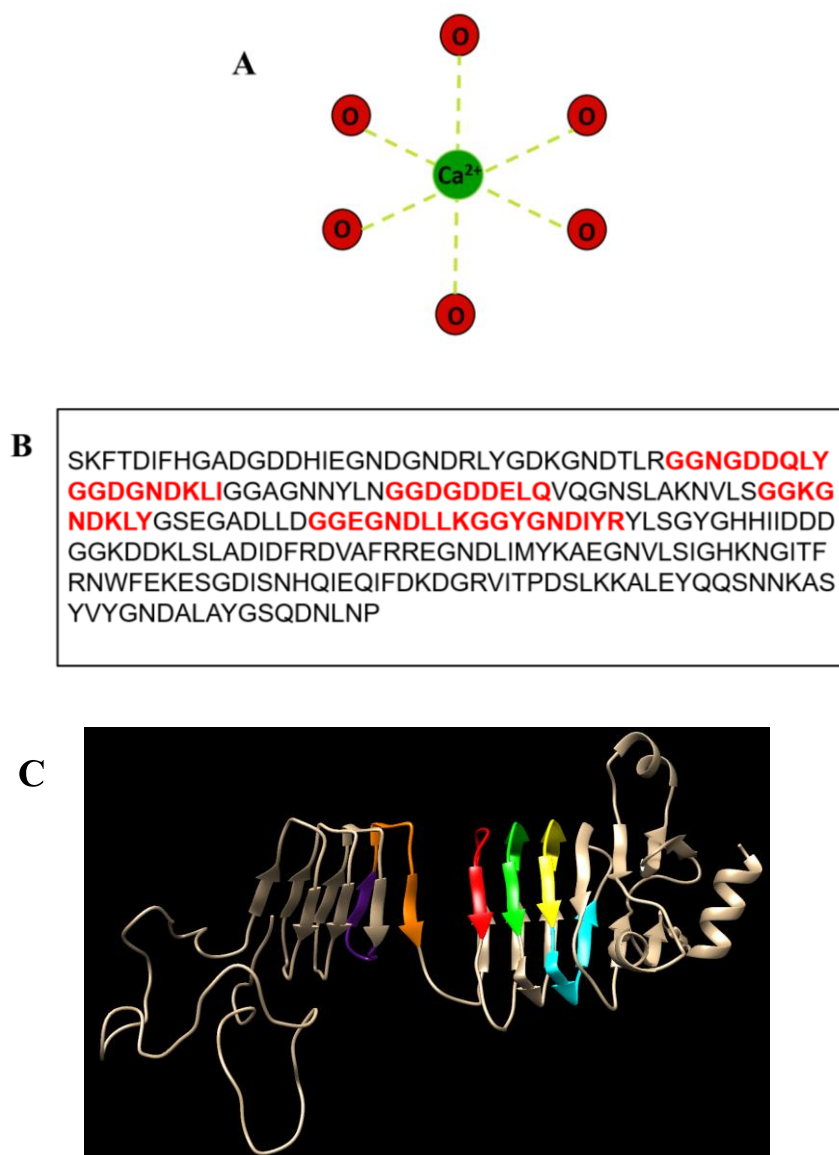
การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง unfolding และ folding ของโปรตีนจะทำโดยการวัด fluorescence ของกรดอะมิโน tryptophan (สัญลักษณ์ Trp หรือ W) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้เนื่องจาก side chain ของกรดอะมิโนนี้เป็นวงแหวน aromatic จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน HlyA ที่ผลิตได้ภายในเซลล์แบคทีเรียเป็นโปรตีน pro-HlyA ซึ่งเป็น inactive protein ที่อยู่ในรูปของ unfolded protein มีกรดอะมิโน Trp 4 ตัวในสาย polypeptide ที่ตำแหน่ง 432, 480, 579 และ 914 การที่โปรตีน pro-HlyA จะเกิดการ folding ได้จะต้องมี Ca^{2+} ที่อยู่ภายนอกเซลล์มาจับที่บริเวณ RTX domain (residues 733-975) (รูปที่ 3.23B และ C) (Thomas, Bakkes, *et al.*, 2014) โดย Ca^{2+} จะจับกับ oxygen ของกรดอะมิโนที่มี side chain เป็นลบ เช่น aspartic acid (สัญลักษณ์ Asp หรือ D), glutamic acid (สัญลักษณ์ Glu หรือ E) กรดอะมิโนที่มี hydroxyl groups (OH) อยู่ใน side chain เช่น serine (สัญลักษณ์ Ser หรือ S), threonine (สัญลักษณ์ Thr หรือ T) กรดอะมิโนที่มี carboxamide groups เช่น asparagine (สัญลักษณ์ Asn หรือ N), glutamine (สัญลักษณ์ Gln หรือ Q) carbonyl groups สายหลักของกรดอะมิโน และน้ำ ซึ่งจะจับกันเกิดโครงสร้างขนาดใหญ่ (รูปที่ 3.23A) ทำให้กรดอะมิโน W914 ที่อยู่ตรงบริเวณ RTX domain ถูกบดบัง (รูปที่ 3.20B) จากแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน Hly โดยใช้โครงสร้างของโปรตีน CyaA เป็นแม่แบบมาทำการคาดการณ์การจับกันระหว่าง Ca^{2+} กับโปรตีน HlyA ซึ่งน่าจะมีบริเวณที่ binding เหมือนกับของโปรตีน CyaA (รูปที่ 3.24A) เช่น บริเวณที่ Ca^{2+} จับกับกรดอะมิโน Asp, Glu, Gly, Gln ของโปรตีน HlyA (รูปที่ 3.24B และ C)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจสอบคุณสมบัติการ folding ของโปรตีนลูกผสม HlyA ที่ผลิตได้ว่าเป็นไปตามรายงานอื่นหรือไม่ ซึ่งจากการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีน HlyA โดยการสร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อ 3.8.3.1 พบว่า หากโปรตีน HlyA อยู่ในรูปที่เป็น folded protein ตำแหน่งของกรดอะมิโน W914 ควรอยู่ภายในของโครงสร้าง (interior of the folded 3D structure) จึงทำให้ W914 ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 295 nm (excitation wavelength) และ 331 nm (emission wavelength) สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความแตกต่างของค่า fluorescence intensity ระหว่าง folded และ unfolded protein ได้ กล่าวคือ W914 ถูกเปิดเผย (expose) ใน unfolded protein จึงควรมีค่า fluorescence intensity สูงกว่า folded protein ที่ W914 ถูกฝังอยู่ภายในโครงสร้างนั่นเอง

เนื่องด้วยโปรตีนลูกผสม HlyA ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้อยู่ในรูป inclusion bodies ที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็น denaturing wash 1 buffers ที่มี 8M Urea เป็นองค์ประกอบ แต่ไม่ละลายใน native buffers ดังนั้นในการศึกษาการ folding ของโปรตีน HlyA โดยอาศัย Ca^{2+} จึงทำ

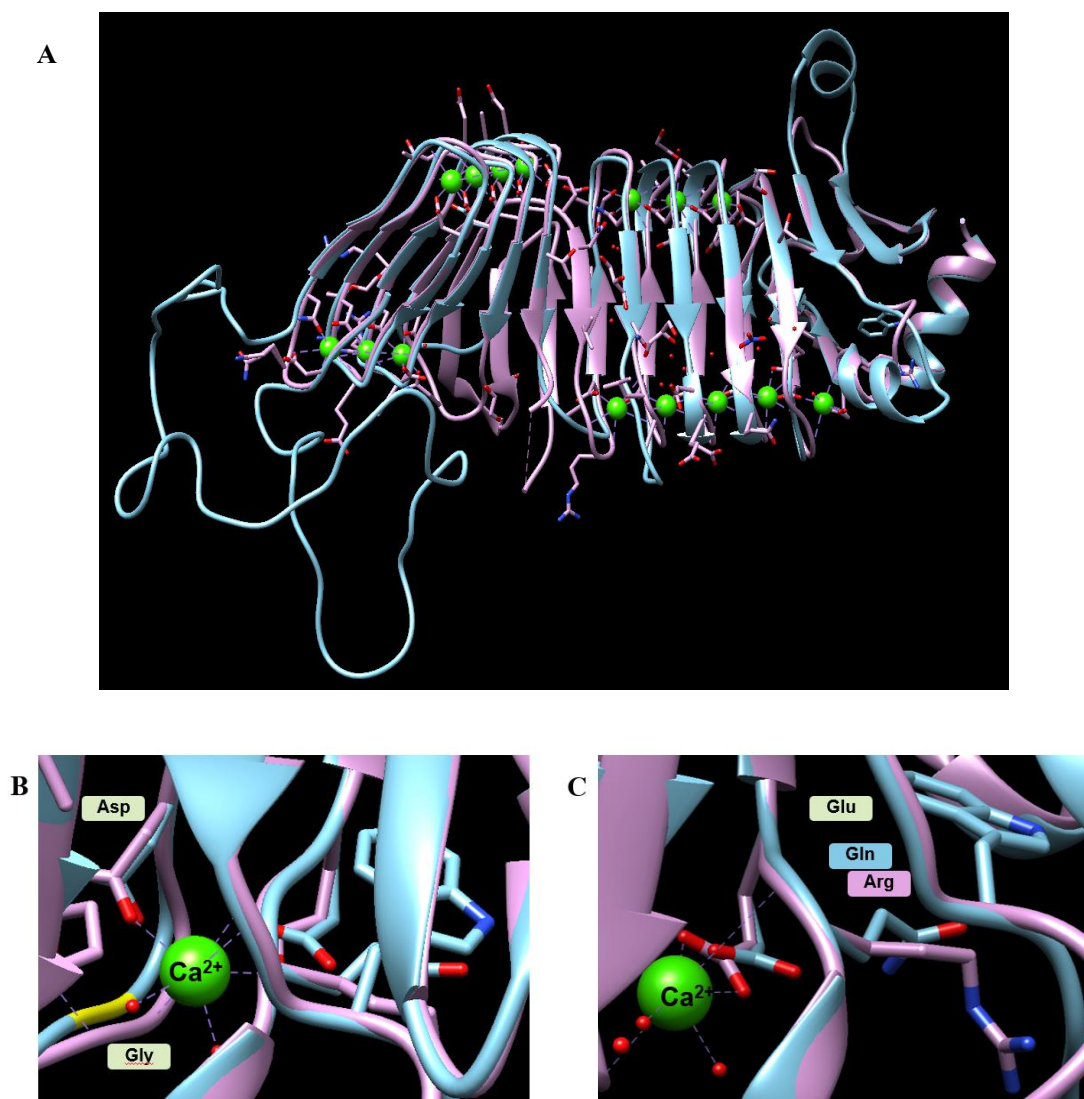
การเจือจางในสารละลายที่มี Ca^{2+} (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2) และ urea ที่ความเข้มข้นต่างๆ และการวัดค่า fluorescence intensity ของกรดอะมิโน Tryptophan โดยในขั้นตอนแรกโปรตีนถูกผสม HlyA ที่แสดงออกในรูปแบบ inclusion bodies ถูกทำให้เจือจาง โดยให้มีความเข้มข้น 20 mM ในสารละลาย 7 M Urea และ 20 mM EDTA ซึ่ง urea ที่ความเข้มข้นสูงนี้ทำให้โปรตีนเสียสภาพกลายเป็นสาย polypeptide เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนที่เกี่ยวข้องกับการฟอร์ม tertiary structure ถูกทำลาย ส่วน EDTA ทำหน้าที่เป็น chelator ทำให้ Ca^{2+} ไม่สามารถไปจับตรงบริเวณ RTX ของโปรตีน จึงไม่มีการฟอร์มเป็นโครงสร้างสามมิติ โปรตีนทั้งหมดในสารละลายจึงอยู่ในรูป unfolded protein อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำ unfolded protein นี้ไปตรวจสอบการ folding โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 2 mM ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 และ urea ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 ที่ไม่มี urea เป็นองค์ประกอบ (ความเข้มข้น urea ที่ 0 M) ไม่พบตะกอนโปรตีนในสารละลาย โดยมี emission wavelength สูงสุดที่ 335 nm ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ประมาณ 331 nm และมีค่า fluorescence intensity ประมาณ 40 AU ซึ่งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารละลายอื่นที่มี urea เป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 7 M urea ตามลำดับ (รูปที่ 3.25) ที่ emission wavelength สูงสุดที่ประมาณ 347 nm ดังนั้นค่า fluorescence intensity ที่ลดลงสามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนเกิดการ folding เมื่อไม่ได้ถูกทำให้เสียสภาพโดย urea ก็จะจับกับ Ca^{2+} แล้วเกิดการม้วนพับทำให้กรดอะมิโน Trp อยู่ภายในโปรตีน ส่วนโปรตีนที่ละลายอยู่ในสารละลาย 7 M urea และ 20 mM EDTA นั้นมีความแตกต่างจากสารละลายโปรตีนใน 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 และ 7M urea โดยพบว่า มีค่า fluorescence intensity ลดลงอยู่ที่ 60 RFU (เทียบกับ 90 RFU) ที่ emission wavelength สูงสุดตำแหน่งใกล้เคียงกันที่ประมาณ 348 nm ซึ่งเกิดจาก EDTA จับกับ Ca^{2+} แล้วเกิดโครงสร้างขนาดใหญ่ที่เป็น hexadentate ทำให้ไปบดบังการดูดกลืนแสง (Quenching) ของกรดอะมิโน W914

จึงสรุปได้ว่าโปรตีน HlyA ที่ละลายในสารละลายที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2-7 M urea โปรตีนจะเกิดการ unfolding และมีค่า fluorescence intensity เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้น เนื่องจากยูเรียไปทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในโปรตีน จึงเผยให้เห็นกรดอะมิโน Trp ชัดเจนมากขึ้น การดูดกลืนแสงจึงมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่โปรตีน HlyA จะเกิดการ folding ได้จำเป็นต้องมี Ca^{2+} และความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสม ด้วยการเจือจางในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 และ 0 M urea ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ในการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับการทำงานของโปรตีน HlyA ด้วยการทำ hemolytic assay ในสารละลายเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 3.23 การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ (coordinate covalent bond) ระหว่าง calcium ion กับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ตรงบริเวณ RTX domain

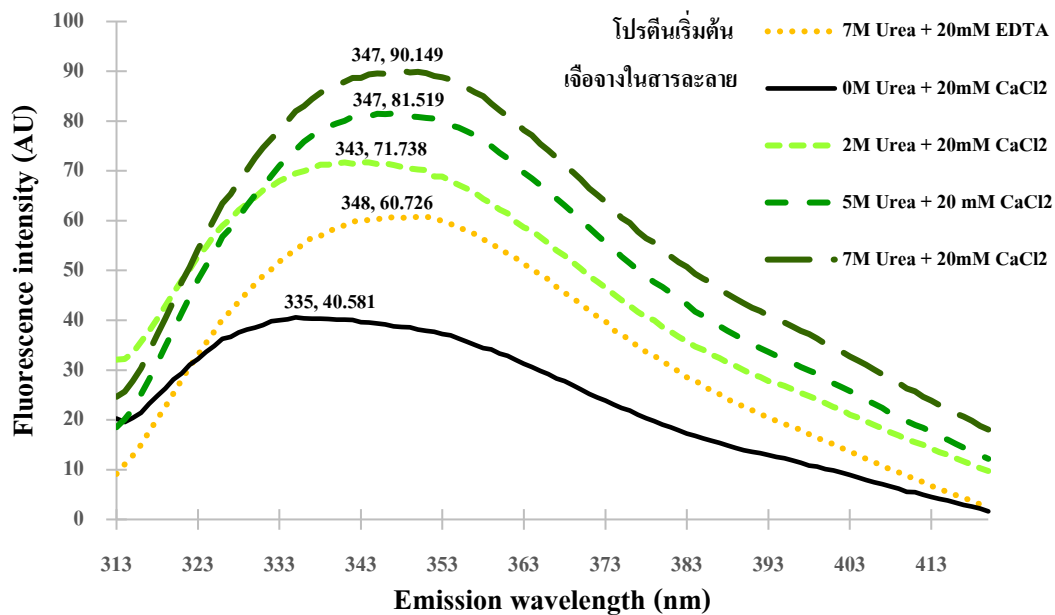
- (A) การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ระหว่าง calcium ion (สีเขียว) กับอะตอมออกซิเจน (สีแดง) ของกรดอะมิโนโปรตีน HlyA
- (B) Amino acid sequence ของโปรตีน HlyA ตรงบริเวณ RTX domain โดยมีลำดับซ้ำเป็น GGxGxDxUx (ตัวอักษรสีแดง)
- (C) แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA โดยจะแสดงลำดับซ้ำของกรดอะมิโน GGxGxDxUx ตรงบริเวณ RTX domain ซึ่งมีจำนวนซ้ำ 6 กลุ่ม (ribbon สีม่วง, สีส้ม, สีแดง, สีเขียว, สีเหลือง, สีฟ้า ตามลำดับ)



รูปที่ 3.24 การคาดการณ์การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ (coordinate covalent bond)

ระหว่าง calcium ion กับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ตรงบริเวณ RTX domain

- (A) การใช้แบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA ที่มีโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน CyaA เป็นแม่แบบ เพื่อคาดการณ์การเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ระหว่าง Ca^{2+} กับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA (ribbon สีฟ้า คือ โปรตีน HlyA, ribbon สีชมพู คือ โปรตีน CyaA)
- (B) ตัวอย่างบริเวณที่คาดว่าโปรตีน HlyA น่าจะจับกับ Ca^{2+} โดยมีกรดอะมิโน Asp, Gly, Glu, Gln ที่คาดว่าจะจับ Ca^{2+} ซึ่งมีกรดอะมิโนที่จับกันเหมือนกับของโปรตีน CyaA



รูปที่ 3.25 Fluorescence emission spectra ของโปรตีน HlyA ในสารละลายต่างๆ ดังนี้ ซึ่งในสารละลายที่มีและไม่มี 20 mM Ca^{2+} มีการดูคลื่นแสงของ excitation wavelength ที่ 295 nm โดยโปรตีน HlyA ที่อยู่ในสารละลาย 0 M urea, 20 mM Ca^{2+} เป็น folded protein ที่มี emission wavelength 335 nm ส่วนโปรตีนที่อยู่ในสารละลายอื่น ค่า emission wavelength จะไม่เท่ากับ 335 nm จึงจัดเป็น unfolded protein

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโปรตีนสารพิษ HlyA ที่ผลิตจากยีน *hlyA* ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญที่สามารถบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ และโปรตีน HlyA นี้จะพบได้เฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเท่านั้น แต่เนื่องด้วยโปรตีน HlyA จะอยู่ในรูป active form ได้ต้องถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องทำการผลิตโปรตีน HlyC ที่มาจากยีน *hlyC* ด้วย

สำหรับการผลิตโปรตีน HlyA ผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน *hlyA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ที่เป็น template ได้สำเร็จ ซึ่งได้ยีน *hlyA* ที่มีขนาด 3,107 bp จากนั้นนำผลผลิต PCR มาทำการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyA* (pET17b-*hlyA*) แล้วนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอื่นๆ ที่ได้มีการรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* ที่ได้ไม่เหมือนกับ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะใดเลย โดยมีค่าความเหมือน (% identity) กับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 ในระดับ 97%, 99.3% และ 99.2% ตามลำดับ เมื่อ translate ไปเป็นสายโพลีเปปไทด์จะมีความเหมือนกับ amino acid ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 ในระดับ 98%, 99.2%, 99.4% ตามลำดับ ผู้วิจัยจึงตั้งชื่อ *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยให้เป็นสายพันธุ์ MNT08 เมื่อนำพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyA* ไปผลิตโปรตีนลูกผสม HlyA ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) พบการแสดงออกของโปรตีนขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 110 kDa ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอยู่ในรูปของ inclusion bodies หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีน HlyA ไปทำบริสุทธิ์และตรวจสอบด้วยวิธี mass spectroscopy พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนลูกผสม HlyA ที่ผลิตได้มีความตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Hemolysin ที่ถูกแปลรหัสจากยีนที่อยู่บน chromosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยลำดับกรดอะมิโนที่ตรวจวัดจากสายเปปไทด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี trypsin digestion – MS คิดเป็น 55% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน Hemolysin เนื่องจากโปรตีน HlyA ที่ผลิตได้เป็นโปรตีน pro-

HlyA ที่ถูกผลิตในสถานะ denaturing condition และอยู่ในรูปของ unfolded protein จึงต้องนำโปรตีนที่ได้ไปทำให้เกิดการ folding ซึ่งต้องอาศัย Ca^{2+} เพื่อมาจับที่บริเวณ RTX domain จากการทดลองนี้ โปรตีนจะเกิดการ folding ด้วยการเจือจางในสารละลาย 0 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl และ 20 mM $CaCl_2$ เนื่องจากยังขาดข้อมูลทางโครงสร้างสำหรับโปรตีน HlyA ของเชื้อ *E. coli* และเพื่อช่วยให้เข้าใจการทำงานของโปรตีนได้ดีขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือกการทำ modelling โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน HlyA ด้วยการเปรียบเทียบกับโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ RTX อื่น ๆ พบว่าโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน CyaA จากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* เป็นแม่แบบที่เหมาะสมที่สุด เพราะโปรตีน CyaA มีระบบการหลั่งออกนอกเซลล์แบบ T1SS ที่คล้ายกับ HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งแบบจำลองโครงสร้างของโปรตีน HlyA มีโครงสร้างเป็น monomer ที่ครอบคลุมกรดอะมิโนเพียง 339 residues ตรงตำแหน่ง C-terminal (residues 612-950) ของ HlyA จากข้อจำกัดความยาวของ template ทำให้แบบจำลองในการศึกษานี้สามารถทำนายโครงสร้างของ HlyA ได้เพียงหนึ่งในสามเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างที่แท้จริงของโปรตีน HlyA แบบเต็มความยาว โดยใช้เทคนิค X-ray crystallography จึงมีความจำเป็นสำหรับความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับการก่อตัวของโปรตีน HlyA ให้เป็นรูพรุนบริเวณเซลล์เป้าหมาย

ในส่วนของการผลิตโปรตีน HlyC มีกระบวนการผลิตคล้ายกันกับโปรตีน HlyA ดังนี้ การเพิ่มจำนวนยีน โดยใช้ genomic DNA ของ *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 ทำให้ได้ยีน *hlyC* ที่มีขนาด 545 bp จากนั้นนำผลผลิต PCR มาทำการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET17b ที่มียีน *hlyC* (pET17b-*hlyC*) แล้วนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอื่น ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่ได้ไม่เหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 โดยมีค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98.8%, 98.6% และ 98.8% ตามลำดับ เมื่อ translate ไปเป็นสายโพลีเปปไทด์จะมีความเหมือนกับ amino acid ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89, J96 และ CFT073 ในระดับ 98.8%, 98.8%, 98.2% ตามลำดับ จึงเป็นการยืนยันความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ genomic DNA (โดยเฉพาะยีน *hlyA* และ *hlyC*) ระหว่างสายพันธุ์ที่นำมาศึกษากับสายพันธุ์อื่นที่มีการรายงานไว้แล้ว ขั้นตอนต่อมาของการวิจัยนี้ คือ การนำพลาสมิดลูกผสม pET17b-*hlyC* ไปผลิต

โปรตีนลูกผสม HlyC ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) พบว่าโปรตีนมีมวลโมเลกุลประมาณ 19 kDa ถูกผลิตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอยู่ในส่วนของ inclusion bodies เมื่อนำโปรตีน HlyC ไปทำบริสุทธิ์ พบว่ามีแถบโปรตีนของ HlyC ขึ้นเข็ม 2 ตำแหน่ง โดยแถบแรกมีขนาดประมาณ 45 kDa ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน HlyC ที่เป็น dimer และแถบที่ 2 มีขนาดประมาณ 15 kDa คาดว่าน่าจะเป็น monomer เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี mass spectroscopy พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ปรากฏทั้งสองแถบมีความตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Hemolysin-activating lysine-acyltransferase HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ถูกตรวจวัดได้จากสายเปปไทด์ที่สกัดได้จากวิธี trypsin digestion – MS คิดเป็น 56% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน HlyC จึงสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าแถบที่มีขนาดประมาณ 45 kDa เป็นโปรตีน HlyC ที่เป็น dimer และบ่งชี้ว่าพันธะไฮโดรเจนทั้งหมด 6 พันธะ ที่เกิด interaction ระหว่างสอง monomer ค่อนข้างแข็งแรง ทำให้ SDS-PAGE ซึ่งเป็น denaturing condition ไม่รุนแรงพอที่จะทำลายพันธะดังกล่าวได้สมบูรณ์ จึงทำให้พบแถบโปรตีนทั้งแบบ monomer และ dimer บนเจล SDS-PAGE

ยื่น พลาสมิดลูกผสม โปรตีน และข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับใช้ในการผลิตโปรตีน HlyA และ HlyC เพื่อใช้ศึกษาเกี่ยวกับการทำงาน การสร้างรูพรุนของโปรตีน HlyA ต่อเซลล์เป้าหมายได้ในอนาคต เช่น การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (ดังอธิบายไว้ในบทที่ 5) การศึกษาทางโครงสร้างแบบเต็มความยาว และการผลิต antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HlyA เพื่อนำไปพัฒนาชุดตรวจการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะอย่างง่ายและให้ผลถูกต้องแม่นยำได้

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะในการศึกษาครั้งต่อไป

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyA* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET17b-*hlyC* ที่สังเคราะห์มาจากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นแม่แบบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนไม่เหมือน 100% กับยีนที่มีรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลซึ่งเป็นการศึกษายีนดังกล่าวจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะสายพันธุ์ใดเลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตั้งชื่อแบคทีเรีย *E. coli* ที่แยกมาได้จากผู้ป่วยที่ถูกนำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ว่าเป็นสายพันธุ์ MNT08 อย่างไรก็ดีตามเพื่อพิสูจน์ความแตกต่างทางสายพันธุ์ให้ชัดเจนมากขึ้น จึงควรทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมในอนาคตโดยใช้เทคนิค genome sequencing

สำหรับการต่อยอดความรู้จากการงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อศึกษาโปรตีนสารพิษ HlyA ในอนาคตทำได้โดย การผลิตและการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน HlyA และ HlyC ให้อยู่ในรูปของ soluble form และมี purity ที่สูง เพื่อใช้สำหรับการศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค x-ray crystallography เนื่องจากการศึกษาดูด้วยเทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้โปรตีนที่อยู่ในรูปของ soluble จึงต้องปรับ condition ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม เช่น การเลือกใช้ vector สำหรับการ expression ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น pCold DNA vector ซึ่งจะให้ผลผลิตโปรตีนลูกผสมที่เพิ่มขึ้นและมีการแสดงออกของโปรตีนในรูป soluble โดยใช้เทคนิคลอย “cold shock” คือ vector จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมายที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 15 °C ซึ่งที่สภาวะนี้ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของของโปรตีนเจ้าบ้าน และลดการทำงานของ protease ได้อีกด้วย ส่งผลให้ได้โปรตีนเป้าหมายปริมาณสูง (Kobayashi *et al.*, 2009)

นอกจากนี้ควรสร้าง recombinant plasmid ที่มียีน *hlyB* และ *hlyD* (plasmid-*hlyBD*) เพื่อใช้สังเคราะห์โปรตีนลูกผสม HlyA ที่ถูกหั่นออกมาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มี plasmid-*hlyA* และ plasmid-*hlyBD* เพื่อให้โปรตีน HlyA ที่สังเคราะห์อยู่ในรูป soluble แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ตามด้วยการกระตุ้นด้วยโปรตีน HlyC และสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม HlyA ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มี plasmid-*hlyA* และ plasmid-*hlyC* จากนั้นศึกษาการทำงานของโปรตีน HlyA ที่ผลิตจากทั้งสองวิธีนี้ซึ่งคาดว่าอยู่ในรูป active form ด้วยวิธี hemolytic

assay หรือ การแตกของเซลล์เป้าหมาย เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น โดยทำการเปรียบเทียบว่า โปรตีน HlyA ที่ผลิตจากทั้งสองวิธีนี้มีการทำงานที่แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะระบุได้ว่าวิธีการผลิตโปรตีน HlyA แบบใดทำให้ได้โปรตีนที่เป็น active HlyA

จากการทำนายแบบจำลองโครงสร้างของ HlyA ซึ่งได้เพียงหนึ่งในสามเท่านั้น ดังนั้นควรมีการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติที่แท้จริงของโปรตีน HlyA แบบเต็มความยาว โดยใช้เทคนิค X-ray crystallography เพื่อทำความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้นเกี่ยวกับการก่อตัวของโปรตีน HlyA ให้เป็นรูพรุนบริเวณเซลล์เป้าหมาย ส่วนแบบจำลองโครงสร้างของ HlyC ควรศึกษาเพิ่มเติมโดยการทำ *in silico* docking เพื่อศึกษาว่าโปรตีน ACP จับตรงบริเวณไหนของโปรตีน HlyC หรือ เพื่อศึกษาว่าโปรตีน HlyC กับ HlyA จะเกิด interaction กันอย่างไร

เอกสารอ้างอิง

- Angkawidjaja, C., & Kanaya, S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 2006* 63:23, 63(23), 2804–2817. <https://doi.org/10.1007/S00018-006-6172-X>
- Barber, A. E., Norton, J. P., Wiles, T. J., & Mulvey, M. A. (2016). Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80 (2), 351. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00067-15>
- Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., Svergun, D. I., Barinka, C., & Sebo, P. (2016). Calcium-driven folding of RTX domain β -rolls ratchets translocation of RTX proteins through Type I secretion ducts. *Molecular Cell*, 62(1), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.018>
- Cortajarena, A. L., Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (2003). A receptor-binding region in *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19159–19163. <https://doi.org/10.1074/JBC.M208552200>
- Etefía, E. (2021). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99891>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 269–284). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Forestier, C., & Welch, R. A. (1991). Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infection and Immunity*, 59(11), 4212–4220. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.11.4212-4220.1991>
- Gentschev, I., Dietrich, G., & Goebel, W. (2002). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends in Microbiology*, 10(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02259-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02259-4)

- Greene, N. P., Crow, A., Hughes, C., & Koronakis, V. (2015). Structure of a bacterial toxin-activating acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(23), E3058–E3066. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1503832112>
- Holland, I. B., Schmitt, L., & Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Molecular Membrane Biology*, *22*(1–2), 29–39. <https://doi.org/10.1080/09687860500042013>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kerényi, M., Allison, H. E., Bártai, I., Sonnevend, Á., Emödy, L., Plaveczy, N., & Pál, T. (2005). Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(6), 2965. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2965-2968.2005>
- Kim, J. S., Song, S., Lee, M., Lee, S., Lee, K., & Ha, N. C. (2016). Crystal structure of a soluble fragment of the membrane fusion protein HlyD in a type I secretion system of Gram-Negative bacteria. *Structure*, *24*(3), 477–485. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2015.12.012/ATTACHMENT/CEEAF8F-A81E-42C5-8C03-2C671CD557FE/MMC1.PDF>
- Kobayashi, H., Yoshida, T., & Inouye, M. (2009). Significant enhanced expression and solubility of human proteins in *Escherichia coli* by fusion with protein S from *Myxococcus xanthus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5356. <https://doi.org/10.1128/AEM.00691-09>
- Lecher, J., Schwarz, C. K. W., Stoldt, M., Smits, S. H. J., Willbold, D., & Schmitt, L. (2012). An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure*, *20*(10), 1778–1787. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2012.08.005>
- Lenders, M. H. H., Reimann, S., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2013). Molecular insights into type I secretion systems. *Biological Chemistry*, *394*(11), 1371–1384. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2013-0171>

- Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R., & Goebel, W. (1991). Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 226(1–2), 198–208. <https://doi.org/10.1007/BF00273604>
- Mehnert-Kay, S. (2005). Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *American Family Physician*. 72, 451-456.
- Mody, L., & Juthani-Mehta, M. (2014). Urinary tract infections in older women: A clinical review. *JAMA*, 311(8), 844. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.303>
- Motlova, L., Klimova, N., Fiser, R., Sebo, P., & Bumba, L. (2020). Continuous assembly of β -roll structures is implicated in the type I-dependent secretion of large repeat-in-toxins (RTX) proteins. *Journal of Molecular Biology*, 432(20), 5696–5710. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2020.08.020>
- Nagy, G., Altenhoefer, A., Knapp, O., Maier, E., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Benz, R., Emody, L., & Hacker, J. (2006). Both α -haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes and Infection*, 8(8), 2006–2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.029>
- O'Hanley, P., Lalonde, G., & Ji, G. (1991). Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infection and Immunity*, 59(3), 1153–1161. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.3.1153-1161.1991>
- Parvez, S. A., & Rahman, D. (2018). Virulence factors of uropathogenic *E. coli*. *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79557>
- Peherstorfer, S., Brewitz, H. H., Paul George, A. A., Wißbrock, A., Adam, J. M., Schmitt, L., & Imhof, D. (2018). Insights into mechanism and functional consequences of heme binding to hemolysin-activating lysine acyltransferase HlyC from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862(9), 1964–1972. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.06.012>

- Pei, X. Y., Hinchliffe, P., Symmons, M. F., Koronakis, E., Benz, R., Hughes, C., & Koronakis, V. (2011). Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(5), 2112–2117. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1012588108>
- Ristow, L. C., & Welch, R. A. (2016). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1858, Issue 3, pp. 538–545). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.015>
- Rowe, G. E., Pellett, S., & Welch, R. A. (1994). Analysis of toxinogenic functions associated with the RTX repeat region and monoclonal antibody D12 epitope of *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and Immunity*, *62*(2), 579–588. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.2.579-588.1994>
- Seed, B. (1987). An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature*, *329*(6142), 840–842. <https://doi.org/10.1038/329840a0>
- Sharon, B. M., Nguyen, A., Arute, A. P., Hulyalkar, N. v., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & de Nisco, N. J. (2020). Complete genome sequences of seven uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from postmenopausal women with recurrent urinary tract infection. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(33). <https://doi.org/10.1128/MRA.00700-20>
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., & Gouaux, J. E. (1996). Structure of *Staphylococcal* α -hemolysin, a heptameric transmembrane Pore. *Science*, *274*(5294), 1859–1866. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5294.1859>
- Stephens, C., Arismendi, T., Wright, M., Hartman, A., Gonzalez, A., Gill, M., Pandori, M., & Hess, D. (2020). F plasmids are the major carriers of antibiotic resistance genes in human-associated commensal *Escherichia coli*. *MSphere*, *5*(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00709-20>
- Sukhumungoon, P., Themphachana, M., Kongpheng, S., Rattanachuy, P., Khianggam, S., & Singkhamanan, K. (2015). Molecular characterization of virulence and antimicrobial susceptibility profiles of uropathogenic *Escherichia coli* from patients in a tertiary hospital, Southern Thailand. In *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. (Vol. 46, Issue 6).

- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Thomas, S., Bakkes, P. J., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2014). Equilibrium folding of pro-HlyA from *Escherichia coli* reveals a stable calcium ion dependent folding intermediate. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(9), 1500–1510. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.05.006>
- Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The Type 1 secretion pathway - The hemolysin system and beyond. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 8, pp. 1629–1641). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.017>
- Valeva, A., Siegel, I., Wylenzek, M., Wassenaar, T. M., Weis, S., Heinz, N., Schmitt, R., Fischer, C., Reinartz, R., Bhakdi, S., & Walev, I. (2008). Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation. *Biological Chemistry*, 389(9), 1201–1207. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.136>
- Vázquez, R. F., Maté, S. M., Bakás, L. S., Muñoz-Garay, C., & Herlax, V. S. (2016). Relationship between intracellular calcium and morphologic changes in rabbit erythrocytes: Effects of the acylated and unacylated forms of *E. coli* alpha-hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(8), 1944–1953. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2016.05.013>
- Welch, R. A. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* associated exotoxins. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.UTI-0011-2012>
- Wiles, T. J., & Mulvey, M. A. (2013). The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: Progress and perspectives. In *Future Microbiology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 73–84). <https://doi.org/10.2217/fmb.12.131>

Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2005). H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *The EMBO Journal*, 24(11), 1901. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600657>

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* และ *hlyC* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอื่น ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลของ NCBI เช่น CFT073 (NC_004431.1), J96 (M10133) และ UTI89 (NC_007946.1) เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ดังนี้

1. ยีน *hlyA*

1.1 CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 ดังแสดงรูปที่ 1

```
>>A_MNT08 3075 bp (3075 nt)
Waterman-Eggert score: 15150; 616.3 bits; E(1) < 2.8e-179
99.2% identity (99.2% similar) in 3075 nt overlap (1-3075:1-3075)

Start codon
A_CFT0 ATGCCAACAAATAACCACTGCACAAATTTAAAAGCACACTACAGTCTGCAAAGCAATCCTCT
      10      20      30      40      50      60
A_MNT0 ATGCCAACAAATAACCGCTGCACAAATTTAAAAGCACACTACAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
      10      20      30      40      50      60

A_CFT0 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAATAAGCAGCAGAG
      70      80      90     100     110     120
A_MNT0 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAATAAGCAGCAGAG
      70      80      90     100     110     120

A_CFT0 CAAACCCGCAATGCGGGAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGACAG
      130     140     150     160     170     180
A_MNT0 CAAACCCGCAATGCGGGAACAGACTCATTTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGACAG
      130     140     150     160     170     180

A_CFT0 GGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTCAGGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTCCAGTAT
      190     200     210     220     230     240
A_MNT0 GGTTCAAGCCTTAATGACCTTGTCAGGACGGCAGATGAACTGGGAATTGAAGTCCAGTAT
      190     200     210     220     230     240

A_CFT0 GATGAAAAGAATGGCACGGCGATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAACTCATT
      250     260     270     280     290     300
A_MNT0 GATGAAAAGAATGGCACGGCGATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAACTCATT
      250     260     270     280     290     300
```

```

          310      320      330      340      350      360
A_CFT0 GGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAAATTACTGCAAAAAG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAAATTACTGCAAAAAG
          310      320      330      340      350      360

          370      380      390      400      410      420
A_CFT0 TATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGCGGGCAGTGCTGAAAAATATAGGTGATAACTTAGGA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 TATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGCGGGCAGTGCTGAAAAATATAGGTGATAACTTAGGA
          370      380      390      400      410      420

          430      440      450      460      470      480
A_CFT0 AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTTCCTCAATG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTTCCTCAATG
          430      440      450      460      470      480

          490      500      510      520      530      540
A_CFT0 AAAATAGACGAACTGATAAAGAGCAAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTTCCTTCTGAAC TG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AAAATAGACGAACTGATAAAGAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTTCCTTCTGAAC TG
          490      500      510      520      530      540

          550      560      570      580      590      600
A_CFT0 GCAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATTAAATAAT
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GCAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATTAAATAAT
          550      560      570      580      590      600

          610      620      630      640      650      660
A_CFT0 AATGTAACTCATTTTCTCAACAACCAATAAGCTGGGAAGTGATTATCCAATACAAAG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AATGTAACTCATTTTCTCAACAACCAATAAGCTGGGAAGTGATTATCCAATACAAAG
          610      620      630      640      650      660

          670      680      690      700      710      720
A_CFT0 CACCTGACCGGTGTTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CACCTGACCGGTGTTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
          670      680      690      700      710      720

          730      740      750      760      770      780
A_CFT0 GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTTATCTGCGATTTAGCAAGCTTCATTCTGAGCAAT
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTTATCTGCGATTTAGCAAGCTTCATTCTGAGCAAT
          730      740      750      760      770      780

          790      800      810      820      830      840
A_CFT0 GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
          790      800      810      820      830      840

          850      860      870      880      890      900
A_CFT0 GGTAATGTTGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAGGGATT A
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGTAATGTTGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAGGGGGTT A
          850      860      870      880      890      900

```

```

          910      920      930      940      950      960
A_CFT0 TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGTTTAAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATTAGTCCC
          :
A_MNT0 TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGTTTAAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATTAGTCCC
          910      920      930      940      950      960

          970      980      990      1000     1010     1020
A_CFT0 CTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAATAGAGGAGTATTCA
          :
A_MNT0 CTCTCATTCTGTCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAATAGAGGAGTATTCA
          970      980      990      1000     1010     1020

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
A_CFT0 CAACGATTCAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCACAAAGAA
          :
A_MNT0 CAACGATTCAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCACAAAGAA
          1030     1040     1050     1060     1070     1080

          1090     1100     1110     1120     1130     1140
A_CFT0 ACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAACAACGATAAGCACTGTTCTGGCTTCAGTATCTTCA
          :
A_MNT0 ACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAACAACGATAAGCACTGTTCTGGCTTCAGTATCTTCA
          1090     1100     1110     1120     1130     1140

          1150     1160     1170     1180     1190     1200
A_CFT0 GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTGGTAGGG
          :
A_MNT0 GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTGGTAGGG
          1150     1160     1170     1180     1190     1200

          1210     1220     1230     1240     1250     1260
A_CFT0 GCTGTTACGGGGATAATTTAGGCATCCTTGAGGCTTCAAACAGGCAATGTTTGAACAT
          :
A_MNT0 GCTGTTACGGGGATAATTTAGGCATCCTTGAGGCTTCAAACAGGCAATGTTTGAACAT
          1210     1220     1230     1240     1250     1260

          1270     1280     1290     1300     1310     1320
A_CFT0 GTCGCCAGTAAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAAAATTAC
          :
A_MNT0 GTCGCCAGTAAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAAAATTAC
          1270     1280     1290     1300     1310     1320

          1330     1340     1350     1360     1370     1380
A_CFT0 TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCATGCTGCATTTTAGAAGATAACTTTAAAATATTA
          :
A_MNT0 TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCATGCTGCATTTTAGAAGATAACTTTAAAATATTA
          1330     1340     1350     1360     1370     1380

          1390     1400     1410     1420     1430     1440
A_CFT0 TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCAGCAACATTGG
          :
A_MNT0 TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCAGCAACATTGG
          1390     1400     1410     1420     1430     1440

          1450     1460     1470     1480     1490     1500
A_CFT0 GATACGCTGATAGGTGAGTTAGCGGGTGTACCAGAAATGGAGACAAAACACTCAGTGGT
          :
A_MNT0 GATACGCTGATAGGTGAGTTAGCGGGTGTACCAGAAATGGAGACAAAACACTCAGTGGT
          1450     1460     1470     1480     1490     1500

```



```

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
A_CFT0 AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGAAAACGTCTGGAGAAAAAACCGGATGAATTC
      :
A_MNT0 AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGAAAACGTCTGGAGAAAAAACCGGATGAATTC
      1510      1520      1530      1540      1550      1560

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
A_CFT0 CAGAAGCAAGTCTTTGACCCATTGAAAGGAAATATTGACCTTTCTGACAGCAAATCTTCT
      :
A_MNT0 CAGAAGCAAGTCTTTGACCCATTGAAAGGAAATATTGACCTTTCTGACAGCAAATCTTCT
      1570      1580      1590      1600      1610      1620

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
A_CFT0 ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      :
A_MNT0 ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      1630      1640      1650      1660      1670      1680

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
A_CFT0 CAGTCCGGAAAAATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      :
A_MNT0 CAGTCCGGAAAAATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      1690      1700      1710      1720      1730      1740

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
A_CFT0 GTGAAGGGGGTTCAGGACAAGGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTTCAGCATGCA
      :
A_MNT0 GTGAAGGGGGTTCAGGACAAGGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTTCAGCATGCA
      1750      1760      1770      1780      1790      1800

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
A_CFT0 TCAGTCGGTAATAACCAAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      :
A_MNT0 TCAGTCGGTAATAACCAAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      1810      1820      1830      1840      1850      1860

      1870      1880      1890      1900      1910      1920
A_CFT0 GATAAGGTCTTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAGGACATGATGTT
      :
A_MNT0 GATAAGGTCTTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAGGACATGATGTT
      1870      1880      1890      1900      1910      1920

      1930      1940      1950      1960      1970      1980
A_CFT0 GTTTATTATGATAAAACAGACACCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      :
A_MNT0 GTTTATTATGATAAAACAGACACCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      1930      1940      1950      1960      1970      1980

      1990      2000      2010      2020      2030      2040
A_CFT0 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGATTTTACAGGAAGTT
      :
A_MNT0 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGGTTTTACAGGAAGTT
      1990      2000      2010      2020      2030      2040

      2050      2060      2070      2080      2090      2100
A_CFT0 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGAAAAAGAAGTAAAAACGCAATATCGGAGTTAT
      :
A_MNT0 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGAAAAAGAAGTAAAAACGCAATATCGGAGTTAT
      2050      2060      2070      2080      2090      2100

```

```

                2110      2120      2130      2140      2150      2160
A_CFT0 GAATTCACATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATCCGTGGAA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GAATTCACATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATCCGTGGAA
                2110      2120      2130      2140      2150      2160

                2170      2180      2190      2200      2210      2220
A_CFT0 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGATATCTTC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGATATCTTC
                2170      2180      2190      2200      2210      2220

                2230      2240      2250      2260      2270      2280
A_CFT0 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTATATGGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTATATGGT
                2230      2240      2250      2260      2270      2280

                2290      2300      2310      2320      2330      2340
A_CFT0 GATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
                2290      2300      2310      2320      2330      2340

                2350      2360      2370      2380      2390      2400
A_CFT0 GGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGACGGAGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGACGGAGAT
                2350      2360      2370      2380      2390      2400

                2410      2420      2430      2440      2450      2460
A_CFT0 GATGAGCTTCAGGTTCAAGGGAAATTCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATGAGCTTCAGGTTCAAGGGAAATTCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
                2410      2420      2430      2440      2450      2460

                2470      2480      2490      2500      2510      2520
A_CFT0 AATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGATCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGATCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
                2470      2480      2490      2500      2510      2520

                2530      2540      2550      2560      2570      2580
A_CFT0 CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCATCAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCATCAT
                2530      2540      2550      2560      2570      2580

                2590      2600      2610      2620      2630      2640
A_CFT0 ATTATTGACGATGATGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGATTTCCGG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 ATTATTGACGATGATGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGATTTCCGG
                2590      2600      2610      2620      2630      2640

                2650      2660      2670      2680      2690      2700
A_CFT0 GATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
                2650      2660      2670      2680      2690      2700

```

```

                2710      2720      2730      2740      2750      2760
A_CFT0 CTTTCCATTGGTCATAAAAATGGTATTACATTTCAGGAACTGGTTTGAAAAAGAGTCAGGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CTTTCCATTGGTCATAAAAATGGTATTACATTTCAGGAACTGGTTTGAAAAAGAGTCAGGT
                2710      2720      2730      2740      2750      2760

                2770      2780      2790      2800      2810      2820
A_CFT0 GATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
                2770      2780      2790      2800      2810      2820

                2830      2840      2850      2860      2870      2880
A_CFT0 GATTCCTTAAAAAGGCACCTTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTATGTGTAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATTCCTTAAAAAGGCACCTTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTATGTGTAT
                2830      2840      2850      2860      2870      2880

                2890      2900      2910      2920      2930      2940
A_CFT0 GGGAAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGGAAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
                2890      2900      2910      2920      2930      2940

                2950      2960      2970      2980      2990      3000
A_CFT0 AGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAATTTTGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGCAGCTTCT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAATTTTGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGCAGCTTCT
                2950      2960      2970      2980      2990      3000

                3010      3020      3030      3040      3050      3060
A_CFT0 TTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCAATAACTTTG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 TTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCAATAACTTTG
                3010      3020      3030      3040      3050      3060

                3070
A_CFT0 ACAGCATCAGCATAA
          ::::::::::::::::::::
A_MNT0 ACAGCATCAGCATAA
                3070

```

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08 ซึ่งมี identity 99.3% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบสีเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีความแตกต่างกัน 25 เบส (กรอบแดง)

1.2 J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 ดังแสดงรูปที่ 2

```
>>A_MNT08 3075 bp (3075 nt)
Waterman-Eggert score: 15162; 647.5 bits; E(1) < 1.1e-188
99.3% identity (99.3% similar) in 3075 nt overlap (1-3072:1-3075)

      Start codon
A_J96  ATGCCAACAAATAACCGCTGCACAAATTAAGCACAAGTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
      10      20      30      40      50      60
A_MNT0 ATGCCAACAAATAACCGCTGCACAAATTAAGCACAAGTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
A_J96  GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGGAAAGCAGCAGAG
      70      80      90      100     110     120
A_MNT0 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAAGGAAAGCAGCAGAG
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
A_J96  CAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTCTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGCGCAG
      130     140     150     160     170     180
A_MNT0 CAAACCCGCAATGCGGGAAACAGACTCATTCTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGACAG
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
A_J96  GGTTC AAGCCTTAATGACCTTGT CAGGACGGCAGATGAAGTGGGAATTGAAGTCCAGTAT
      190     200     210     220     230     240
A_MNT0 GGTTC AAGCCTTAATGACCTTGT CAGGACGGCAGATGAAGTGGGAATTGAAGTCCAGTAT
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
A_J96  GATGAAAAGAATGGCACGGCAATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAACTCATT
      250     260     270     280     290     300
A_MNT0 GATGAAAAGAATGGCACGGCGATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAAACTCATT
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
A_J96  GGCCTCACCGAACGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTACTGCAAAG
      310     320     330     340     350     360
A_MNT0 GGCCTCACCGAACGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTACTGCAAAG
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
A_J96  TATCAAAAAGCGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGCTGAAAATATAGGTGATAACTTAGGA
      370     380     390     400     410     420
A_MNT0 TATCAAAAAGCGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGCTGAAAATATAGGTGATAACTTAGGA
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
A_J96  AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTTCCTCAATG
      430     440     450     460     470     480
A_MNT0 AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTTCCTCAATG
      430     440     450     460     470     480
```

```

      490      500      510      520      530      540
A_J96  AAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAAATCTGGTGGCAATGTCAGTTCTTCTGAACTG
      :
A_MNT0  AAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTTCTTCTGAACTG
      490      500      510      520      530      540

      550      560      570      580      590      600
A_J96  GCAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCCTTAATAAT
      :
A_MNT0  GCAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCCTTAATAAT
      550      560      570      580      590      600

      610      620      630      640      650
A_J96  ---GTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAATACAAAG
      :
A_MNT0  AATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGTATTATCCAATACAAAG
      610      620      630      640      650      660

      660      670      680      690      700      710
A_J96  CACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
      :
A_MNT0  CACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
      670      680      690      700      710      720

      720      730      740      750      760      770
A_J96  GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTTCAGCAAGTTTCATTCTGAGCAAT
      :
A_MNT0  GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTTCAGCAAGTTTCATTCTGAGCAAT
      730      740      750      760      770      780

      780      790      800      810      820      830
A_J96  GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
      :
A_MNT0  GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
      790      800      810      820      830      840

      840      850      860      870      880      890
A_J96  GGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGTGCAGCACAGGGGTTA
      :
A_MNT0  GGTAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGTGCAGCACAGGGGTTA
      850      860      870      880      890      900

      900      910      920      930      940      950
A_J96  TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTTGTGACTGGCAATTAGTCCC
      :
A_MNT0  TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTTGTGACTGGCAATTAGTCCC
      910      920      930      940      950      960

      960      970      980      990      1000      1010
A_J96  CTCTCATTCTGTCCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAAATAGAGGAGTATTCA
      :
A_MNT0  CTCTCATTCTGTCCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAAATAGAGGAGTATTCA
      970      980      990      1000      1010      1020

      1020      1030      1040      1050      1060      1070
A_J96  CAACGATTCAAAAAAGTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCACAAAGAA
      :
A_MNT0  CAACGATTCAAAAAAGTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCACAAAGAA
      1030      1040      1050      1060      1070      1080

      1080      1090      1100      1110      1120      1130
A_J96  ACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCTTCAGTATCTTCA
      :
A_MNT0  ACAGGAGCTATTGATGCATCGTTAACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCTTCAGTATCTTCA
      1090      1100      1110      1120      1130      1140

```

```

1140      1150      1160      1170      1180      1190
A_J96  GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTGGTAGGG
      .....
A_MNT0 GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTGGTAGGG
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

1200      1210      1220      1230      1240      1250
A_J96  GCTGTTACGGGGATAATTTTCAGGCATCCTTGAGGCTTCAAAACAGGCAATGTTTGAACAT
      .....
A_MNT0 GCTGTTACGGGGATAATTTTCAGGCATCCTTGAGGCTTCAAAACAGGCAATGTTTGAACAT
      1210      1220      1230      1240      1250      1260

1260      1270      1280      1290      1300      1310
A_J96  GTCGCCAGTAAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAAACACGGCAAAAATTAC
      .....
A_MNT0 GTCGCCAGTAAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAAACACGGCAAAAATTAC
      1270      1280      1290      1300      1310      1320

1320      1330      1340      1350      1360      1370
A_J96  TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCCATGCTGCATTTTTAGAAAGATAACTTTAAAATATTA
      .....
A_MNT0 TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCCATGCTGCATTTTTAGAAAGATAACTTTAAAATATTA
      1330      1340      1350      1360      1370      1380

1380      1390      1400      1410      1420      1430
A_J96  TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCAGCAACATTGG
      .....
A_MNT0 TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCAGCAACATTGG
      1390      1400      1410      1420      1430      1440

1440      1450      1460      1470      1480      1490
A_J96  GATACGCTGATAGGTGAGTTAGCTGGTGTACCAGAAATGGAGACAAAACACTCAGTGGT
      .....
A_MNT0 GATACGCTGATAGGTGAGTTAGCTGGTGTACCAGAAATGGAGACAAAACACTCAGTGGT
      1450      1460      1470      1480      1490      1500

1500      1510      1520      1530      1540      1550
A_J96  AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGAAAACGCTGGAGAAAAACCGGATGAATTC
      .....
A_MNT0 AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGAAAACGCTGGAGAAAAACCGGATGAATTC
      1510      1520      1530      1540      1550      1560

1560      1570      1580      1590      1600      1610
A_J96  CAGAAGCAAGTCTTTGACCCATTGAAAGGAAATATTGACCTTTCTGACAGCAAATCTTCT
      .....
A_MNT0 CAGAAGCAAGTCTTTGACCCATTGAAAGGAAATATTGACCTTTCTGACAGCAAATCTTCT
      1570      1580      1590      1600      1610      1620

1620      1630      1640      1650      1660      1670
A_J96  ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      .....
A_MNT0 ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      1630      1640      1650      1660      1670      1680

1680      1690      1700      1710      1720      1730
A_J96  CAGTCCGAAAATATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      .....
A_MNT0 CAGTCCGAAAATATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      1690      1700      1710      1720      1730      1740

1740      1750      1760      1770      1780      1790
A_J96  GTGAAGGGGGTTTCAGGACAAGGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTACGATGCA
      .....
A_MNT0 GTGAAGGGGGTTTCAGGACAAGGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTACGATGCA
      1750      1760      1770      1780      1790      1800

```

```

1800      1810      1820      1830      1840      1850
A_J96 TCAGTCGGTAATAACCCAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      .....
A_MNT0 TCAGTCGGTAATAACCCAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      1810      1820      1830      1840      1850      1860

1860      1870      1880      1890      1900      1910
A_J96 GATAAGGTCTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAGGACATGATGTT
      .....
A_MNT0 GATAAGGTCTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAGGACATGATGTT
      1870      1880      1890      1900      1910      1920

1920      1930      1940      1950      1960      1970
A_J96 GTTTATTATGATAAAACAGACACCCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      .....
A_MNT0 GTTTATTATGATAAAACAGACACCCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      1930      1940      1950      1960      1970      1980

1980      1990      2000      2010      2020      2030
A_J96 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGGTTTTACAGGAAGTT
      .....
A_MNT0 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGGTTTTACAGGAAGTT
      1990      2000      2010      2020      2030      2040

2040      2050      2060      2070      2080      2090
A_J96 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGGAGTTAT
      .....
A_MNT0 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTGGAAAAAGAACTGAAAAACGCAATATCGGAGTTAT
      2050      2060      2070      2080      2090      2100

2100      2110      2120      2130      2140      2150
A_J96 GAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATTCGGTGGAA
      .....
A_MNT0 GAATTCACCTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATTCGGTGGAA
      2110      2120      2130      2140      2150      2160

2160      2170      2180      2190      2200      2210
A_J96 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTGCTGATATCTTC
      .....
A_MNT0 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGATATCTTC
      2170      2180      2190      2200      2210      2220

2220      2230      2240      2250      2260      2270
A_J96 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGACGGGAATGACCGCTTATATGGT
      .....
A_MNT0 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGACGGGAATGACCGCTTATATGGT
      2230      2240      2250      2260      2270      2280

2280      2290      2300      2310      2320      2330
A_J96 GATAAAGGTAATGACACACTGACTGCTGGAAACGGAGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
      .....
A_MNT0 GATAAAGGTAATGATACCTGAGGGCGGAAACGGAGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
      2290      2300      2310      2320      2330      2340

2340      2350      2360      2370      2380      2390
A_J96 GGCAACGATAAGTTAATTGGGGGAGCAGGTAATAATTACCTGAACGGCGGAGATGGCGAT
      .....
A_MNT0 GGCAACGATAAGTTAATTGGGGGAGCAGGTAATAATTACCTGAACGGCGGAGATGGCGAT
      2350      2360      2370      2380      2390      2400

2400      2410      2420      2430      2440      2450
A_J96 GATGAGCTTCAGGTTACAGGAAATTCCTTGCAAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
      .....
A_MNT0 GATGAGCTTCAGGTTACAGGAAATTCCTTGCAAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
      2410      2420      2430      2440      2450      2460

```

```

2460      2470      2480      2490      2500      2510
A_J96  AATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGATCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
      .....
A_MNT0 AATGACAAGCTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGATCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
      2470      2480      2490      2500      2510      2520

2520      2530      2540      2550      2560      2570
A_J96  CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCATCAT
      .....
A_MNT0 CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCATCAT
      2530      2540      2550      2560      2570      2580

2580      2590      2600      2610      2620      2630
A_J96  ATTATTGACGATGATGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGATTTCCGG
      .....
A_MNT0 ATTATTGACGATGATGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTGGCTGATATTGATTTCCGG
      2590      2600      2610      2620      2630      2640

2640      2650      2660      2670      2680      2690
A_J96  GATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
      .....
A_MNT0 GATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATCATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
      2650      2660      2670      2680      2690      2700

2700      2710      2720      2730      2740      2750
A_J96  CTTTCCATTGCCCAAAAAATGGTATTACATTTAAAACTGGTTTGAAAAAGAGTCAGGT
      .....
A_MNT0 CTTTCCATTGCTCATAAAAAATGGTATTACATTCGGAAGTGGTTTGAAAAAGAGTCAGGT
      2710      2720      2730      2740      2750      2760

2760      2770      2780      2790      2800      2810
A_J96  GATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTGGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
      .....
A_MNT0 GATATCTCTAATCACCAGATAGAGCAGATTTTGGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
      2770      2780      2790      2800      2810      2820

2820      2830      2840      2850      2860      2870
A_J96  GATTCCCTTAAAAAGGCACTTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTATGTGTAT
      .....
A_MNT0 GATTCCCTTAAAAAGGCACTTGAGTATCAACAGAGTAATAATAAGGCAAGTTATGTGTAT
      2830      2840      2850      2860      2870      2880

2880      2890      2900      2910      2920      2930
A_J96  GGAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGTAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
      .....
A_MNT0 GGAATGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
      2890      2900      2910      2920      2930      2940

2940      2950      2960      2970      2980      2990
A_J96  AGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAATTTTGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGCAGCTTCT
      .....
A_MNT0 AGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAATTTTGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGCAGCTTCT
      2950      2960      2970      2980      2990      3000

3000      3010      3020      3030      3040      3050
A_J96  TTATTGCAGTTGTCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGTCAATAACTTTG
      .....
A_MNT0 TTATTGCAGTTGTCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGTCAATAACTTTG
      3010      3020      3030      3040      3050      3060

```



```

      3060      3070
A_J96  ACAGCATCAGCATAA
      ::::::::::::::
A_MNT0 ACAGCATCAGCATAA
      3070

```

รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08 ซึ่งมี identity 99.2% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 21 เบส (กรอบแดง)

1.3 UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 ดังแสดงรูปที่ 3

```

>>A_MNT08 3075 bp (3075 nt)
Waterman-Eggert score: 14556; 576.0 bits; E(1) < 3.9e-167
97.0% identity (97.0% similar) in 3075 nt overlap (1-3075:1-3075)
Start codon
      10      20      30      40      50      60
A_UTI8 ATGCCAACAAATAACCACTGCACAAATTTAAAAGCACACTACAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
      ::::::::::::::
A_MNT0 ATGCCAACAAATAACCGCTGCACAAATTTAAAAGCACACTACAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
A_UTI8 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAATAAGGACAGAG
      ::::::::::::::
A_MNT0 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAATAAGGACAGAG
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
A_UTI8 CAAACCCGCAATGCGGGAACAGACTCATTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGACAG
      ::::::::::::::
A_MNT0 CAAACCCGCAATGCGGGAACAGACTCATTTACTTATCCCTAAAGATTATAAAGGACAG
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
A_UTI8 GGTTC AAGCCTTAATGACCTTGT CAGGACGGCAGATGAACTGGGAATTG AAGTCCAGTAT
      ::::::::::::::
A_MNT0 GGTTC AAGCCTTAATGACCTTGT CAGGACGGCAGATGAACTGGGAATTG AAGTCCAGTAT
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
A_UTI8 GATGAAAAGAATGGCACGGCGATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAACTCATT
      ::::::::::::::
A_MNT0 GATGAAAAGAATGGCACGGCGATTACTAAACAGGTATTCGGCACAGCAGAGAACTCATT
      250     260     270     280     290     300

```

```

          310      320      330      340      350      360
A_UTI8 GGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTACTGCAAAAAG
      .....
A_MNT0 GGCCTCACCGAACGGGGAGTGACTATCTTTGCACCACAATTAGACAAATTACTGCAAAAAG
          310      320      330      340      350      360

          370      380      390      400      410      420
A_UTI8 TATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGCTGAAAATATAGGTGATAAECTTAGGA
      .....
A_MNT0 TATCAAAAAGCGGGTAATAAATTAGGCGGCAGTGCTGAAAATATAGGTGATAAECTTAGGA
          370      380      390      400      410      420

          430      440      450      460      470      480
A_UTI8 AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTCTCTCAATG
      .....
A_MNT0 AAGGCAGGCAGTGTACTGTCAACGTTTCAAATTTCTGGGTACTGCACTTCTCTCAATG
          430      440      450      460      470      480

          490      500      510      520      530      540
A_UTI8 AAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTCTCTGAACTG
      .....
A_MNT0 AAAATAGACGAACTGATAAAGAAACAAAATCTGGTAGCAATGTCAGTCTCTCTGAACTG
          490      500      510      520      530      540

          550      560      570      580      590      600
A_UTI8 GCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATTAAATAAT
      .....
A_MNT0 GCAAAAAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCATTAAATAAT
          550      560      570      580      590      600

          610      620      630      640      650      660
A_UTI8 AATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGATTATCCAATACAAAG
      .....
A_MNT0 AATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGATTATCCAATACAAAG
          610      620      630      640      650      660

          670      680      690      700      710      720
A_UTI8 CACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
      .....
A_MNT0 CACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATTTACCTAACCTTGATAATATCGGTGCA
          670      680      690      700      710      720

          730      740      750      760      770      780
A_UTI8 GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTTACGCAAGCTTCATTCTGAGCAAT
      .....
A_MNT0 GGGTTAGATACTGTATCGGGTATTTATCTGCGATTTTACGCAAGCTTCATTCTGAGCAAT
          730      740      750      760      770      780

          790      800      810      820      830      840
A_UTI8 GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
      .....
A_MNT0 GCAGATGCAGATACCGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTG
          790      800      810      820      830      840

          850      860      870      880      890      900
A_UTI8 GGTAAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGCGTGCACAGGGGTTA
      .....
A_MNT0 GGTAAATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGTGCACAGGGGTTA
          850      860      870      880      890      900

          910      920      930      940      950      960
A_UTI8 TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATTAGTCCC
      .....
A_MNT0 TCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTAATTGCTTCTGTAGTGACATTAGCAATTAGTCCC
          910      920      930      940      950      960

```

```

          970      980      990      1000      1010      1020
A_UTI8 CTCTATTCTGTCCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAAATAGAGGAGTATTCA
:::
A_MNT0 CTCTATTCTGTCCATTGCCGATAAGTTTAAACGTGCCAATAAAAATAGAGGAGTATTCA
          970      980      990      1000      1010      1020

          1030      1040      1050      1060      1070      1080
A_UTI8 CAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCACAAAGAA
:::
A_MNT0 CAACGATTCAAAAAACTTGGATACGATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCACAAAGAA
          1030      1040      1050      1060      1070      1080

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
A_UTI8 ACAGGAGCTATTGATGCATCATTTAACAACGATAAGCACTGTACTGGCTTCAGTATCTTCA
:::
A_MNT0 ACAGGAGCTATTGATGCATCATTTAACAACGATAAGCACTGTACTGGCTTCAGTATCTTCA
          1090      1100      1110      1120      1130      1140

          1150      1160      1170      1180      1190      1200
A_UTI8 GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCACTGGTAGGTAG
:::
A_MNT0 GGTATTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTGGTAGGGAG
          1150      1160      1170      1180      1190      1200

          1210      1220      1230      1240      1250      1260
A_UTI8 GCTGTTACGGGGATAATTTCAAGTATCCTTGAGGCTTCAAAGCAGGCAATGTTTGAACAT
:::
A_MNT0 GCTGTTACGGGGATAATTTCAAGTATCCTTGAGGCTTCAAAGCAGGCAATGTTTGAACAT
          1210      1220      1230      1240      1250      1260

          1270      1280      1290      1300      1310      1320
A_UTI8 GTTGCCAGTAAAAATGGCTGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAAACCGGTAAAAATTAC
:::
A_MNT0 GTTGCCAGTAAAAATGGCCGATGTTATTGCTGAATGGGAGAAAAAACCGGTAAAAATTAC
          1270      1280      1290      1300      1310      1320

          1330      1340      1350      1360      1370      1380
A_UTI8 TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCCATGCTGCATTTTTAGAAGATAACTTTAAAATATTA
:::
A_MNT0 TTTGAAAATGGATATGATGCCCGCCATGCTGCATTTTTAGAAGATAACTTTAAAATATTA
          1330      1340      1350      1360      1370      1380

          1390      1400      1410      1420      1430      1440
A_UTI8 TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACTCACAACATTGG
:::
A_MNT0 TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCCAGCAACATTGG
          1390      1400      1410      1420      1430      1440

          1450      1460      1470      1480      1490      1500
A_UTI8 GATATGCTGATAGGTGAGTTAGCTAGTGTCCACCAGAAATGGAGACAAAGACTCAGTGGT
:::
A_MNT0 GATATGCTGATAGGTGAGTTAGCTAGTGTCCACCAGAAATGGAGACAAAGACTCAGTGGT
          1450      1460      1470      1480      1490      1500

          1510      1520      1530      1540      1550      1560
A_UTI8 AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAGGGAAAGCGGCTGGAAAGAAAGCCAAAGAGTTC
:::
A_MNT0 AAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAAGAAAGCGTCTGGAGAAAAAACCGGATGAATTC
          1510      1520      1530      1540      1550      1560

          1570      1580      1590      1600      1610      1620
A_UTI8 CAGCAACAAATCTTTGATCCATTAAAGGAAATATTGACCTTCTGACAGCAAACTTCT
:::
A_MNT0 CAGCAACAAATCTTTGATCCATTAAAGGAAATATTGACCTTCTGACAGCAAACTTCT
          1570      1580      1590      1600      1610      1620

```

```

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
A_UTI8 ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      .....
A_MNT0 ACGTTATTGAAATTTGTTACGCCATTGTTAACTCCCGGTGAGGAAATTCGTGAAAGGAGG
      1630      1640      1650      1660      1670      1680

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
A_UTI8 CAGTCCGGAAAAATATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      .....
A_MNT0 CAGTCCGGAAAAATATGAATATATTACCGAGTTATTAGTCAAGGGTGTGATAAATGGACG
      1690      1700      1710      1720      1730      1740

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
A_UTI8 GTGAAGGGGGTTCAGGACAAGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTCAGCATGCA
      .....
A_MNT0 GTGAAGGGGGTTCAGGACAAGGGTCTGTATATGATTACTCTAACCTGATTCAGCATGCA
      1750      1760      1770      1780      1790      1800

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
A_UTI8 TCAGTCGGTAATAACCCAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      .....
A_MNT0 TCAGTCGGTAATAACCCAGTATCGGGAAATTCGTATTGAGTCACACCTGGGAGACGGGGAT
      1810      1820      1830      1840      1850      1860

      1870      1880      1890      1900      1910      1920
A_UTI8 GATAAGGTCTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAAGGACATGATGTT
      .....
A_MNT0 GATAAGGTCTTTTATCTGCCGGCTCAGCCAATATCTACGCAGGTAAAGGACATGATGTT
      1870      1880      1890      1900      1910      1920

      1930      1940      1950      1960      1970      1980
A_UTI8 GTTTATTATGATAAAACAGACACCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      .....
A_MNT0 GTTTATTATGATAAAACAGACACCGGTTATCTGACCATTGATGGCACAAAAGCAACCGAA
      1930      1940      1950      1960      1970      1980

      1990      2000      2010      2020      2030      2040
A_UTI8 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGGTTTACAGGAAGTT
      .....
A_MNT0 GCGGGTAATTACACGGTAACACGTGTACTTGGTGGTGATGTTAAGGTTTACAGGAAGTT
      1990      2000      2010      2020      2030      2040

      2050      2060      2070      2080      2090      2100
A_UTI8 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTCGAAAAAGAAGTGAAGAAACGCAATATCGGAGTTAT
      .....
A_MNT0 GTGAAGGAGCAGGAGGTTTCAGTTCGAAAAAGAAGTGAAGAAACGCAATATCGGAGTTAT
      2050      2060      2070      2080      2090      2100

      2110      2120      2130      2140      2150      2160
A_UTI8 GAATTCACTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATCCGTGGAA
      .....
A_MNT0 GAATTCACTCATATCAATGGTAAAAATTTAACAGAGACTGATAACTTATATCCGTGGAA
      2110      2120      2130      2140      2150      2160

      2170      2180      2190      2200      2210      2220
A_UTI8 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGATATCTTC
      .....
A_MNT0 GAACTTATTGGGACCACGCGTGCCGACAAGTTTTTTGGCAGTAAATTTACTGATATCTTC
      2170      2180      2190      2200      2210      2220

      2230      2240      2250      2260      2270      2280
A_UTI8 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTATATGGT
      .....
A_MNT0 CATGGCGCGGATGGTGATGACCATATAGAAGGAAATGATGGGAATGACCGCTTATATGGT
      2230      2240      2250      2260      2270      2280

```

```

                2290      2300      2310      2320      2330      2340
A_UTI8 GATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATAAAGGTAATGATACGCTGAGGGGCGGAAACGGGATGACCAGCTCTATGGCGGTGAT
                2290      2300      2310      2320      2330      2340

                2350      2360      2370      2380      2390      2400
A_UTI8 GGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGACGGAGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGCAATGATAAGTTAATTGGGGGACAGGTAATAATTACCTTAACGGCGGTGACGGAGAT
                2350      2360      2370      2380      2390      2400

                2410      2420      2430      2440      2450      2460
A_UTI8 GATGAGCTTCAGGTTCAAGGGGAATTCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATGAGCTTCAGGTTCAAGGGGAATTCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGAAAAGGT
                2410      2420      2430      2440      2450      2460

                2470      2480      2490      2500      2510      2520
A_UTI8 AATGACAAGCTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AATGACAAGCTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGAT
                2470      2480      2490      2500      2510      2520

                2530      2540      2550      2560      2570      2580
A_UTI8 CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAAGGATATGGCCATCAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAAGGATATGGCCATCAT
                2530      2540      2550      2560      2570      2580

                2590      2600      2610      2620      2630      2640
A_UTI8 ATTATTGACGATGAAAGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTAGCTGATATGATTCCGG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 ATTATTGACGATGAAAGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTAGCTGATATGATTCCGG
                2590      2600      2610      2620      2630      2640

                2650      2660      2670      2680      2690      2700
A_UTI8 GACGTTGCCTTTAAGCGAGAAGGGAATGACCTCATTTATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATGTGGCCTTCAGGCGAGAAGGTAATGACCTCATTCATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTT
                2650      2660      2670      2680      2690      2700

                2710      2720      2730      2740      2750      2760
A_UTI8 CTTTCTATTGGCCACAAAAATGGTATTACATTTAAAACTGGTTTGAAAAAGAGTCAAGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 CTTTCTATTGGTCATAAAAAATGGTATTACATTCAGGAACGGTTTGAAAAAGAGTCAAGT
                2710      2720      2730      2740      2750      2760

                2770      2780      2790      2800      2810      2820
A_UTI8 GATCTCTCTAATCATCAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATCTCTCTAATCACAGATAGAGCAGATTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCA
                2770      2780      2790      2800      2810      2820

                2830      2840      2850      2860      2870      2880
A_UTI8 GATTCTCTTAAAAAAGCATTGGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTATGTGTAT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GATTCTCTTAAAAAAGCATTGGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTATGTGTAT
                2830      2840      2850      2860      2870      2880

                2890      2900      2910      2920      2930      2940
A_UTI8 GGACATGATGCATCAATTATGGGAGCCAGGACAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 GGGAATGATGCATTAGCTATGGAAGTCAGGATAATCTTAATCCATTAATTAATGAAATC
                2890      2900      2910      2920      2930      2940

```

```

                2950      2960      2970      2980      2990      3000
A_UTI8 AGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAACCTTCGATGTTAAGGAGGAAAGATCTGCCGCTTCT
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 AGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAATTTTGATGTTAAGGAGGAAAGAGCTGCAGCTTCT
                2950      2960      2970      2980      2990      3000

                3010      3020      3030      3040      3050      3060
A_UTI8 TTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCAATAACTTTG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
A_MNT0 TTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCAATAACTTTG
                3010      3020      3030      3040      3050      3060

                3070
A_UTI8 ACAGCATCAGCATAA
      ::::::::::::::::::::
A_MNT0 ACAGCATCAGCATAA
                3070

```

รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08 ซึ่งมี identity 97% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 88 เบส (กรอบแดง)

2. ยีน *hlyC*

2.1 CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 ดังแสดงรูปที่ 4

```

>>C-MNT08 513 bp (513 nt)
Waterman-Eggert score: 2511; 248.1 bits; E(1) < 5.3e-70
98.8% identity (98.8% similar) in 513 nt overlap (1-513:1-513)

Start codon
      10      20      30      40      50      60
C-CFT0 ATGAATATGAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTGGCTCTGGGCCAGTTCC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 ATGAACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTGGCTCTGGGCCAGTTCC
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
C-CFT0 CCATTACACAGAAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 CCATTACACAGAAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
      70      80      90      100     110     120

```

```

      130      140      150      160      170      180
C-CFT0 GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
      .....
C-MNT0 GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
      130      140      150      160      170      180

      190      200      210      220      230      240
C-CFT0 AATTTAAGTTTAGAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTCGCAGAA
      .....
C-MNT0 AATTTAAGTTTAGAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTCGCAGAA
      190      200      210      220      230      240

      250      260      270      280      290      300
C-CFT0 GACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCCTTTTCGGGGATAAC
      .....
C-MNT0 GACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCCTTTTCGGGGATAAC
      250      260      270      280      290      300

      310      320      330      340      350      360
C-CFT0 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGATGAACATTCCGAGCCATCAGG
      .....
C-MNT0 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGATGAACATTCCGAGCCATCAGG
      310      320      330      340      350      360

      370      380      390      400      410      420
C-CFT0 GTGGATCCCAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTTAAAATTGATAAA
      .....
C-MNT0 GTGGATCCCAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGAGGTTAAAATTGATAAA
      370      380      390      400      410      420

      430      440      450      460      470      480
C-CFT0 CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAC
      .....
C-MNT0 CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAC
      430      440      450      460      470      480

      490      500      510
C-CFT0 AAGACAGATTTCAATTTTCATTAACAGGTAA
      .....
C-MNT0 AAGATAGATTTCAATTTTCATTAACAGGTAA
      490      500      510

```

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98.8% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 6 เบส (กรอบแดง)

2.2 J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 ดังแสดงรูปที่ 5

>>C-MNT08 513 bp (513 nt)
 Waterman-Eggert score: 2502; 238.9 bits; E(1) < 3.3e-67
 98.6% identity (98.6% similar) in 513 nt overlap (1-513:1-513)

```

Start codon
      10      20      30      40      50      60
C-J96 ATGAACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTGGCTCTGGGCCAGTTCC
      .....
C-MNT0 ATGAACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTGGCTCTGGGCCAGTTCC
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
C-J96 CCATTACACAGAAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGCAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
      .....
C-MNT0 CCATTACACAGAAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGCAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
C-J96 GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
      .....
C-MNT0 GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
C-J96 AATTTAAGTTTAGAAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACTTCATTAGTCGCAGAA
      .....
C-MNT0 AATTTAAGTTTAGAAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACTTCATTAGTCGCAGAA
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
C-J96 GACTGGACTTCTGGTGATCGTAAATGGTTCATTGCTGGATTGCTCCTTTCGGGGATAAC
      .....
C-MNT0 GACTGGACTTCTGGTGATCGTAAATGGTTCATTGCTGGATTGCTCCTTTCGGGGATAAC
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
C-J96 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGTATGAACTATTCAGAGCCATCAGG
      .....
C-MNT0 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGTATGAACTATTCAGAGCCATCAGG
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
C-J96 GTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGGAGGTAAAATTGATAAA
      .....
C-MNT0 GTGGATCCCAAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGGAGGTAAAATTGATAAA
      370     380     390     400     410     420
  
```



```

          430      440      450      460      470      480
C-J96  CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAAC
      .....
C-MNT0 CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAAC
          430      440      450      460      470      480

          490      500      510
C-J96  AAGTCAGATTTC AATTTTCATTAACAGGTTAA
      .....
C-MNT0 AAGATAGATTTC AATTTTCATTAACAGGTTAA
          490      500      510

```

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98.6% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 7 เบส (กรอบแดง)

2.3 UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นยีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyC* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 ดังแสดงรูปที่ 6

```

>>C-MNT08 513 bp (513 nt)
Waterman-Eggert score: 2506; 246.3 bits; E(1) < 1.9e-69
98.8% identity (98.8% similar) in 512 nt overlap (1-512:1-512)

Start codon
          10      20      30      40      50      60
C-UTI8  ATGAATATGAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCCTGGCTCTGGGCCAGTTCC
      .....
C-MNT0  ATGAACAGAAACAATCCATTAGAGGTTCTTGGGCATGTATCTTGGCTCTGGGCCAGTTCC
          10      20      30      40      50      60

          70      80      90      100     110     120
C-UTI8  CCATTACACAGAAACTGGCCAGTTTCTTTGTTTGCAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
      .....
C-MNT0  CCATTACACAGAAACTGGCCAGTCTCTTTGTTTGCAATAAATGTATTACCTGCAATACGG
          70      80      90      100     110     120

          130     140     150     160     170     180
C-UTI8  GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
      .....
C-MNT0  GCTAACCAATATGCTTTATTAACCCGGGATAATTACCCTGTTGCATATTGTAGTTGGGCT
          130     140     150     160     170     180

```

```

          190      200      210      220      230      240
C-UTI8 AATTTAAGTTTAGAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTCGCAGAA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 AATTTAAGTTTAGAAAATGAAATTAATATCTTAATGATGTTACCTCATTAGTCGCAGAA
          190      200      210      220      230      240

          250      260      270      280      290      300
C-UTI8 GACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCTTTTCGGGGATAAC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 GACTGGACTTCAGGTGATCGTAAATGGTTCATTGACTGGATTGCTCTTTTCGGGGATAAC
          250      260      270      280      290      300

          310      320      330      340      350      360
C-UTI8 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGATGAACTATTCCGAGCCATCAGG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 GGTGCCCTGTACAAATATATGCGAAAAAATTCCTGATGAACTATTCCGAGCCATCAGG
          310      320      330      340      350      360

          370      380      390      400      410      420
C-UTI8 GTGGATCCCAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGGAGGTAAAATTGATAAA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 GTGGATCCCAAACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAATTTACGGAGGTAAAATTGATAAA
          370      380      390      400      410      420

          430      440      450      460      470      480
C-UTI8 CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAAC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 CAGTTAGCGAATAAAATTTTTAAACAATATCACCACGAGTTAATAACTGAAGTAAAAAAC
          430      440      450      460      470      480

          490      500      510
C-UTI8 AAGACAGATTTC AATTTTCATTAACAGGTTA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C-MNT0 AAGATAGATTTC AATTTTCATTAACAGGTTA
          490      500      510

```

รูปที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98.8% แสดงตำแหน่ง start codon (กรอบเขียว), และแสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของเบสระหว่างยีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 6 เบส (กรอบแดง)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequencing)

การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA และ HlyC โดยการนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA และ HlyC ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอื่น ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลของ NCBI เช่น CFT073 (NC_004431.1), J96 (M10133) และ UTI89 (NC_007946.1) เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* หรือ *hlyC* ดังนี้

1. โปรตีน HlyA

1.1 CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 ดังแสดงรูปที่ 7

```
>>MNT08 1024 bp (1024 aa)
Waterman-Eggert score: 6480; 979.7 bits; E(1) < 0
99.4% identity (100.0% similar) in 1024 aa overlap (1-1024:1-1024)

      10      20      30      40      50      60
cft073 MPTITAAQIKSTLQSAKQSSANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKQG
      .....
MNT08 MPTITAAQIKSTLQSAKQSSANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKQG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
cft073 GSSLNDLVRTADELQIEVQYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIGLTERGVTFIFAPQLDKLLQK
      .....
MNT08 GSSLNDLVRTADELQIEVQYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIGLTERGVTFIFAPQLDKLLQK
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
cft073 YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKRQKSGSNVSSSEL
      .....
MNT08 YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKRQKSGSNVSSSEL
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
cft073 AKASIELINQLVDTAASINNNVNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLTVGVGNKLQNLPLNDNIGA
      .....
MNT08 AKASIELINQLVDTAASINNNVNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLTVGVGNKLQNLPLNDNIGA
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
cft073 GLDTVSGILSAISASFILSNADADTGTKAAAGVELTTKVLGNVKGKISQYIIAQRAAQGL
      .....
MNT08 GLDTVSGILSAISASFILSNADADTGTKAAAGVELTTKVLGNVKGKISQYIIAQRAAQGL
      250     260     270     280     290     300
```

```

cft073 STSAAAAGLIASVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKKLGYDGDSSLAAAFHKE
:
MNT08 STSAAAAGLIASVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKKLGYDGDSSLAAAFHKE
      310      320      330      340      350      360

      370      380      390      400      410      420
cft073 TGAIIDASLTISTVLASVSSGISAAATTSLVGAPVSALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
:
MNT08 TGAIIDASLTISTVLASVSSGISAAATTSLVGAPVSALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
      370      380      390      400      410      420

      430      440      450      460      470      480
cft073 VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLEDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
:
MNT08 VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLEDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
      430      440      450      460      470      480

      490      500      510      520      530      540
cft073 DTLIGELAGVTRNGDKTSLGKSYIDYEEGKRLEKKPDEFQKQVFDPLKGNIDLSKSKSS
:
MNT08 DTLIGELAGVTRNGDKTSLGKSYIDYEEGKRLEKKPDEFQKQVFDPLKGNIDLSKSKSS
      490      500      510      520      530      540

      550      560      570      580      590      600
cft073 TLLKFVTPLLTPGEEIRRRQSGKYEYITELLVKGVDKWTVKGVQDKGSVVDYSNLIQHA
:
MNT08 TLLKFVTPLLTPGEEIRRRQSGKYEYITELLVKGVDKWTVKGVQDKGSVVDYSNLIQHA
      550      560      570      580      590      600

      610      620      630      640      650      660
cft073 SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVFLSAGSANIYAGKGDHVVVYDKTDTGYLTIDGTKATE
:
MNT08 SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVFLSAGSANIYAGKGDHVVVYDKTDTGYLTIDGTKATE
      610      620      630      640      650      660

      670      680      690      700      710      720
cft073 AGNYTVTRVLGGDVKILQEWVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
:
MNT08 AGNYTVTRVLGGDVKILQEWVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
      670      680      690      700      710      720

      730      740      750      760      770      780
cft073 ELIGTTRADKFFGSKFTDIFHGADGDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
:
MNT08 ELIGTTRADKFFGSKFTDIFHGADGDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
      730      740      750      760      770      780

      790      800      810      820      830      840
cft073 GNDKLIGGAGNNYLNGGDGDELQVQGNLAKNVLSGGKGNKLYGSEGADLLDGGEGND
:
MNT08 GNDKLIGGAGNNYLNGGDGDELQVQGNLAKNVLSGGKGNKLYGSEGADLLDGGEGND
      790      800      810      820      830      840

      850      860      870      880      890      900
cft073 LLKGGYGNDIYRYLSGYGHHIIDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGNV
:
MNT08 LLKGGYGNDIYRYLSGYGHHIIDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGNV
      850      860      870      880      890      900

      910      920      930      940      950      960
cft073 LSIGHKNGITFRNWFEEKESGDISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQSSNNKASYVY
:
MNT08 LSIGHKNGITFRNWFEEKESGDISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQSSNNKASYVY
      910      920      930      940      950      960
    
```

```

          970      980      990      1000      1010      1020
cft073 GNDALAYGSQDNLNPLINEISKIISAAGNFVKEERAAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08  GNDALAYGSQDNLNPLINEISKIISAAGNFVKEERAAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL
          970      980      990      1000      1010      1020

cft073 TASA
      ::::
MNT08  TASA

```

รูปที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08 ซึ่งมี identity 99.4% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 6 residues (กรอบแดง)

1.2 J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 ดังแสดงรูปที่ 8

```

>>MNT08 1024 bp (1024 aa)
Waterman-Eggert score: 6444; 959.9 bits; E(1) < 0
99.2% identity (99.6% similar) in 1024 aa overlap (1-1023:1-1024)

          10      20      30      40      50      60
j96      MPTITAAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKGGQ
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08    MPTITAAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKGGQ
          10      20      30      40      50      60

          70      80      90      100     110     120
j96      GSSLNDLVRTADELGIQYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIQLTERGVTFIFAPQLDKLLQK
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08    GSSLNDLVRTADELGIQYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIQLTERGVTFIFAPQLDKLLQK
          70      80      90      100     110     120

          130     140     150     160     170     180
j96      YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKKQKSGSNVSSSEL
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08    YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKKQKSGSNVSSSEL
          130     140     150     160     170     180

          190     200     210     220     230
j96      AKASIELINQLVDTAASLNN-VNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLNGVGNKLNLPNLDNIGA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08    AKASIELINQLVDTAASINN-VNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLNGVGNKLNLPNLDNIGA
          190     200     210     220     230     240

          240     250     260     270     280     290
j96      GLDVTSGILSAISASFILSNADADTGTCAAAGVELTTKVLGNVGVKGISQYIIAQRAAQGL
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MNT08    GLDVTSGILSAISASFILSNADADTGTCAAAGVELTTKVLGNVGVKGISQYIIAQRAAQGL
          250     260     270     280     290     300

```

```

j96 STSAAAAGLIASVVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKFLGYDGSLLAAHFKE
MNT08 STSAAAAGLIASVVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKFLGYDGSLLAAHFKE
      310      320      330      340      350      360

j96 360 370 380 390 400 410
     TGAI DASL TR ESTVLASVSSGISAAATTSLVGAPV SALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
MNT08 TGAI DASL TR ESTVLASVSSGISAAATTSLVGAPV SALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
      370      380      390      400      410      420

j96 420 430 440 450 460 470
     VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLEDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
MNT08 VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLEDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
      430      440      450      460      470      480

j96 480 490 500 510 520 530
     DTLIGELAGVTRNGDKT LSGKSYIDYEEGKRLEKKPDEFQKQVFDPLKGNIDLSDSKSS
MNT08 DTLIGELAGVTRNGDKT LSGKSYIDYEEGKRLEKKPDEFQKQVFDPLKGNIDLSDSKSS
      490      500      510      520      530      540

j96 540 550 560 570 580 590
     TLLKFVTPLLTPGEEIRERRQSGKYEYITELLVKGVDKNTVKGVDKGSVYDYSNLIQHA
MNT08 TLLKFVTPLLTPGEEIRERRQSGKYEYITELLVKGVDKNTVKGVDKGSVYDYSNLIQHA
      550      560      570      580      590      600

j96 600 610 620 630 640 650
     SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVF L SAGSANIYAGKGDV VVYDKTDTGYLTIDGTKATE
MNT08 SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVF L SAGSANIYAGKGDV VVYDKTDTGYLTIDGTKATE
      610      620      630      640      650      660

j96 660 670 680 690 700 710
     AGNYTVTRVLGGDVKVLQEVVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
MNT08 AGNYTVTRVLGGDVKVLQEVVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
      670      680      690      700      710      720

j96 720 730 740 750 760 770
     ELIGTTRADKFFGSKFDIFHGADGDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
MNT08 ELIGTTRADKFFGSKFDIFHGADGDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
      730      740      750      760      770      780

j96 780 790 800 810 820 830
     GNDKLIGGAGNNYLNNGDGDDELQVQGNLAKNVL SGGKGNKLYGSEGADLLDGGEGND
MNT08 GNDKLIGGAGNNYLNNGDGDDELQVQGNLAKNVL SGGKGNKLYGSEGADLLDGGEGND
      790      800      810      820      830      840

j96 840 850 860 870 880 890
     LLKGGYGNDIYRYLSGYGHII DDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGNV
MNT08 LLKGGYGNDIYRYLSGYGHII DDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGNV
      850      860      870      880      890      900

j96 900 910 920 930 940 950
     LSIGHKNGITFRNWFEEKESGDISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQOSNNKASYVY
MNT08 LSIGHKNGITFRNWFEEKESGDISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQOSNNKASYVY
      910      920      930      940      950      960

j96 960 970 980 990 1000 1010
     GNDALAYGSDNLNPLINEISKIISAAGNFVKEERAAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL
MNT08 GNDALAYGSDNLNPLINEISKIISAAGNFVKEERAAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL
      970      980      990      1000      1010

1020
j96 TASA
MNT08 TASA

```

รูปที่ 8 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08 ซึ่งมี identity 99.2% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 6 residues (กรอบแดง)

1.3 UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 ดังแสดงรูปที่ 9

```

>>MNT08 1024 bp (1024 aa)
Waterman-Eggert score: 6403; 1002.2 bits; E(1) < 0
98.0% identity (99.6% similar) in 1024 aa overlap (1-1024:1-1024)

      10      20      30      40      50      60
UTI89 MPTITTAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKQGQ
      .....
MNT08 MPTITTAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLILLIPKDYKQGQ
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
UTI89 GSSLNDLVRTADELGIQVYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIQLTERGVTIFAPQLDKLLQK
      .....
MNT08 GSSLNDLVRTADELGIQVYDEKNGTAITKQVFGTAEKLIQLTERGVTIFAPQLDKLLQK
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
UTI89 YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKKQKSGSNVSSSEL
      .....
MNT08 YQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQNFLGTALSSMKIDELIKKQKSGSNVSSSEL
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
UTI89 AKASIELINQLVDTAASINNNVNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLNGVGNKLQNLPLNDNIGA
      .....
MNT08 AKASIELINQLVDTAASINNNVNSFSQQLNKLGSVLSNTKHLNGVGNKLQNLPLNDNIGA
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
UTI89 GLDVTSGILSAISASFILSNADADTGTCAAAGVELTTKVLGNVKGKISQYIIAQRAAQGL
      .....
MNT08 GLDVTSGILSAISASFILSNADADTGTCAAAGVELTTKVLGNVKGKISQYIIAQRAAQGL
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
UTI89 STSAAAAGLIASVVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKKLGYDGDSSLAAAFHKE
      .....
MNT08 STSAAAAGLIASVVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKKLGYDGDSSLAAAFHKE
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
UTI89 TGAIDASLTTISTVLASVSSGISAAATTSLVGAPVSALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
      .....
MNT08 TGAIDASLTTISTVLASVSSGISAAATTSLVGAPVSALVGAVTGIISGILEASKQAMFEH
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
UTI89 VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
      .....
MNT08 VASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDARHAAFLDNFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHW
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530     540
UTI89 DMLIGELASVTRNGDKTLSGKSYIDYEEGKRLEKPKDEFQKQVFDPLKGNIDLSDSKSS
      .....
MNT08 DMLIGELASVTRNGDKTLSGKSYIDYEEGKRLEKPKDEFQKQVFDPLKGNIDLSDSKSS
      490     500     510     520     530     540

```

```

      550      560      570      580      590      600
UTI89 TLLKFVTPLLTPGEEIRRRQSGKYEYITELLVKGVDKWTVKGVQDKGSVVDYDNLIQHA
      .....
MNT08 TLLKFVTPLLTPGEEIRRRQSGKYEYITELLVKGVDKWTVKGVQDKGSVVDYDNLIQHA
      550      560      570      580      590      600

      610      620      630      640      650      660
UTI89 SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVFLSAGSANIYAGKGHDVVYYDKTDTGYLTIDGTKATE
      .....
MNT08 SVGNNQYREIRIESHLGDGDDKVFLSAGSANIYAGKGHDVVYYDKTDTGYLTIDGTKATE
      610      620      630      640      650      660

      670      680      690      700      710      720
UTI89 AGNYTVTRVLGGDVKVLQEVVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
      .....
MNT08 AGNYTVTRVLGGDVKVLQEVVKEQEVSVGKRTEKTQYRSYEFTHINGKNLTETDNLYSVE
      670      680      690      700      710      720

      730      740      750      760      770      780
UTI89 ELIGTTRADKFFGSKFTDIFHGADGDDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
      .....
MNT08 ELIGTTRADKFFGSKFTDIFHGADGDDHIEGNDGNDRLYGDKGNDTLRGGNGDDQLYGGD
      730      740      750      760      770      780

      790      800      810      820      830      840
UTI89 GNDKLIGGGAGNNYLNGGDGDELQVQGNSLAKNVLSGGKGNDLYGSEGADLLDGGEGND
      .....
MNT08 GNDKLIGGGAGNNYLNGGDGDELQVQGNSLAKNVLSGGKGNDLYGSEGADLLDGGEGND
      790      800      810      820      830      840

      850      860      870      880      890      900
UTI89 LLKGGYGNDIYRYLSGYGHIIDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFREGNDLIMYKAEGNV
      .....
MNT08 LLKGGYGNDIYRYLSGYGHIIDDGGKDDKLSLADIDFRDVAFREGNDLIMYKAEGNV
      850      860      870      880      890      900

      910      920      930      940      950      960
UTI89 LSIGHKNGITFRNWFEKESDLSNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKAFEYQQSNNKVSYVY
      .....
MNT08 LSIGHKNGITFRNWFEKESDLSNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKAFEYQQSNNKVSYVY
      910      920      930      940      950      960

      970      980      990      1000      1010      1020
UTI89 GHDASTYGSQDNLNPLINEISKIISAAGNFDVKEERSAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL
      .....
MNT08 GNDALAYGSQDNLNPLINEISKIISAAGNFDVKEERSAASLLQLSGNASDFSYGRNSITL

UTI89 TASA
      ....
MNT08 TASA

```

รูปที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyA จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 20 residues (กรอบแดง)

2. โปรตีน HlyC

2.1 CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 ดังแสดงรูปที่ 10

```

>>C_MNT08 170 bp (170 aa)
Waterman-Eggert score: 1152; 320.3 bits; E(1) < 1.1e-92
98.2% identity (98.8% similar) in 170 aa overlap (1-170:1-170)

      10      20      30      40      50      60
C_CFT0 MNNNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLP AIRANQYALLTRDNYPVAYCSWA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 MNRNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLP AIRANQYALLTRDNYPVAYCSWA
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
C_CFT0 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIDWIAPFGDNGALYKYMRKKFPDELFAIR
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIDWIAPFGDNGALYKYMRKKFPDELFAIR
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170
C_CFT0 VDPKTHVGKVFSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHELVKKNKIDFNFSLTG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 VDPKTHVGKVFSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHELVKKNKIDFNFSLTG
      130     140     150     160     170
  
```

รูปที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ CFT073 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 3 residues (กรอบแดง)

2.1 J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 ดังแสดงรูปที่ 11

```
>>C_MNT08 170 bp (170 aa)
Waterman-Eggert score: 1155; 317.3 bits; E(1) < 8.8e-92
98.8% identity (98.8% similar) in 170 aa overlap (1-170:1-170)

      10      20      30      40      50      60
C_J96 MNRNNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLPAIRANQYALLTRDNPVAYCSWA
      .....
C_MNT0 MNRNNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLPAIRANQYALLTRDNPVAYCSWA
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
C_J96 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIVWIAPFGDNGALYKYMRRKFPDELFRAIR
      .....
C_MNT0 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIDWIAPFGDNGALYKYMRRKFPDELFRAIR
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170
C_J96 VDPKTHVGKVSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHHELITEVKNKIDFNFSLTG
      .....
C_MNT0 VDPKTHVGKVSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHHELITEVKNKIDFNFSLTG
      130     140     150     160     170
```

รูปที่ 11 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HlyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ J96 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98.8% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 2 residues (กรอบแดง)

2.3 UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HIyC ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งกำหนดให้เป็นโปรตีนที่มาจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MNT08 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HIyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 ดังแสดงรูปที่ 12

```

>>C_MNT08 170 bp (170 aa)
Waterman-Eggert score: 1152; 315.6 bits; E(1) < 2.8e-91
98.8% identity (98.8% similar) in 169 aa overlap (1-169:1-169)

      10      20      30      40      50      60
C_UTI8 MNMNNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLPAIRANQYALLTRDNPVAYCSWA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 MNMNNPLEVLGHVSWLWASSPLHRNWPVSLFAINVLPAIRANQYALLTRDNPVAYCSWA
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
C_UTI8 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIDWIAPFGDNGALYKYMRKKFPDELFRAIR
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 NLSLENEIKYLNDVTSLVAEDWTSGDRKWFIDWIAPFGDNGALYKYMRKKFPDELFRAIR
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160
C_UTI8 VDPKTHVGKVSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHHELITEVKNKIDFNFSLT
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
C_MNT0 VDPKTHVGKVSEFHGGKIDKQLANKIFKQYHHELITEVKNKIDFNFSLT
      130     140     150     160

```

รูปที่ 12 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HIyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HIyC จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ UTI89 และ MNT08 ซึ่งมี identity 98.8% แสดงตำแหน่งความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนที่มาจาก *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งแตกต่างกัน 2 residues (กรอบแดง)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

246

PP062

Characterization of Hemolysin A from uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from patients admitted to hospital in southern Thailand

Kanokporn Pantong¹, Wanita Pantong², and Wanisa Salaemae^{1,*}

¹ Division of Health and Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University, Narathiwat 96000, Thailand

*Email: wanisa.sa@psu.ac.th

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main causative agent of urinary tract infections (UTIs) worldwide. Hemolysin A (HlyA) was reported to play a major role in the mechanism of infections by inducing the pore formation in the membrane of the host cells. In this study, the *hlyA* gene encoding HlyA of the UPEC isolated from UTI patients admitted to the hospital in southern Thailand was amplified and cloned into pET17b expression system. The HlyA from UPEC, designated as strain MNT08 in this study, is unexpectedly different from other strains, i.e. UTI89, J96, and CFT073. The sequence alignment of *hlyA* gene showed a genetic variation at several nucleotides, leading to the diversity at the positions of 29 amino acids. The MNT08 showed the most similarity to UPEC strain CFT073. To aid the structure and function analysis, a homology model of HlyA was generated using the structure of CyaA from *Bordetella pertussis* as a template. The model was predicted to obtain the acylation site by HlyC at K690 and the RTX domain, both required for the activation of HlyA. Although the model can provide a tentative explanation of the structure-function relationship, further study in crystallography is still required for a better understanding of the HlyA pore formation.

Keywords: hemolysin A, RTX domain, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)

INTRODUCTION

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is a Gram-negative bacterium that causes urinary tract infections (UTIs). The mechanism of infections is associated with several virulence factors e.g. adhesins and toxins like hemolysin A (HlyA) and cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) [1,2]. Adhesins like Type 1 and P fimbriae play a role in adherence of UPEC to the uroepithelial cells in the bladder that causes lower UTI (cystitis). The adherence activates exfoliation and apoptosis of bladder epithelial cells. UPEC from bladder epithelial cells climbs through ureters toward kidneys. The bacteria express P fimbriae again in order to colonize in the kidneys, leading to upper UTI (pyelonephritis). At this stage of infection, hemolysin A (HlyA) is expressed, causing the damage of renal epithelial cells. In some cases, bacteria can permeate the endothelial cells into the bloodstream [3,4].

The recent study of important virulence genes of UPEC isolated from patients admitted to Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, southern Thailand reported that 33.5% of patients obtained at least one of virulence genes i.e. *pap*, *cnf1*, *hlyA*, *sfaDE*, and *afa*. The majority of isolated UPEC carried *hlyA* gene encoding hemolysin A (HlyA) [5]. This has drawn an attention to the biochemical and structural studies of HlyA. The exotoxin HlyA (MW = 110 kDa) is a member of repeats in toxin (RTX) protein family. It is secreted from

bacterial cell via Type 1 secretion system (TISS), composing of the inner membrane ABC transporter hemolysin B (HlyB), the inner membrane fusion protein HlyD, and the outer membrane factor TolC [6,7]. HlyA is expressed as an unfolded protein called proHlyA, which is a non-toxic precursor protein. The intracellular hemolysin-activating lysine-acyltransferase (HlyC) catalyzes the activation of HlyA by transferring two acyl groups from acyl carrier protein (ACP) to two lysine residues in proHlyA [8]. When the acylated HlyA is secreted out of the cells, it binds to extracellular calcium ions leading to protein folding [9]. This active HlyA can cause the cell lysis of various host cells such as erythrocytes, natural killer (NK) cells, renal epithelial cells by inducing pore formation at the membrane [3,8,10]. However, the mechanism of pore formation is still unclear and the crystal structure of HlyA from UPEC has not been solved. To address these issues, this study intends to construct the recombinant plasmid obtaining *hlyA* gene that can be used to produce the recombinant HlyA protein for further studies in crystallography.

MATERIALS AND METHODS

Hemolysis on blood agar

A blood agar plate consisting of Columbia blood agar base medium and 5% (v/v) sheep erythrocyte was prepared as previously described [11]. UPEC sample was streaked on the blood agar and incubated aerobically at 37°C overnight. The pattern of medium, surrounding the colonies on the plate, was observed.

Genomic DNA extraction

The UPEC obtained from patients admitted to Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, southern Thailand [5] is designated as UPEC strain MNT08 in this report. A single colony of UPEC was inoculated in soybean casein digest medium at 37°C and 200 rpm shaking for overnight culture. Cells were harvested by centrifugation at 14,000 rpm for 1 min at room temperature. Genomic DNA was extracted from UPEC using Presto™ Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid). The extracted genomic DNA was verified by 1.5% agarose gel electrophoresis. The concentration was measured using a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific™) based on absorbance at 260 nm while the purity was determined by the 260/280 ratio.

Construction of the hlyA gene

The *hlyA* gene was amplified by PCR using genomic DNA as template. The forward primer 5'-ATGGCTAGCCCAACAATAACCGCTGC-3' consists of *NheI* restriction site while the reverse primer 5'-GCGGCCGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGTGCTGATGCTGTC-3' contains *NotI* restriction site and a hexa-histidine coding sequence. The 50 µl PCR reaction mixture comprises of 1 U Phusion DNA polymerase (New England Biolabs), 1X Phusion GC buffer, 0.5 µM forward and reverse primers, 0.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 5% DMSO, and genomic DNA (<250ng). The *NheI* and *NotI* treated PCR product was ligated into the same treated pET17b vector. The recombinant plasmid was transformed to *E. coli* DH5α. The presence of *hlyA* gene in these plasmids was confirmed by DNA sequencing using Macrogen's sequencing service, Humanizing Genomics Macrogen (Macrogen Inc.). The alignments were performed using the Clustal Omega [12] and the ExPasy online software [13].

Homology modeling of HlyA

The model of HlyA was predicted using the SWISS-MODEL online software [14]. The target (or input) sequence was the full length HlyA (1,024 amino acids). The searched template possessing the highest scores of GMQE (Global model Quality Estimation) and %

identity was selected to build the model. The model structure was visualized using UCSF Chimera ver. 1.13.1 [15].

RESULTS

Alpha hemolysis

The hemolytic activity of UPEC strain MNT08 revealed the same pattern with classified alpha hemolysis (**Fig. 1**). The UPEC caused partial or incomplete lysis of the red blood cell (RBC) membrane and induced the reduction of RBC hemoglobin to methemoglobin [16]. Thus, the medium around the colonies was shown a green or brown discoloration [11].

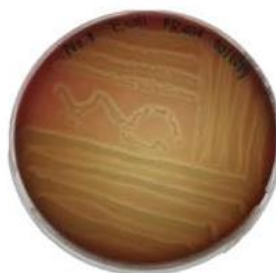


Figure 1 Alpha hemolytic activity of UPEC strain MNT08 on blood agar.

Genomic DNA extraction

The genomic DNA of UPEC sample was extracted, giving about 182 ng per 50 ml starting cell culture. By using agarose gel electrophoresis, the genomic DNA was shown at the band of approximately 10 kb (**Fig. 2**) with >95% purity and the 260/280 ratio at 1.92. A 260/280 absorbance ratio of 1.7-2.0 is considered as pure for DNA [17].

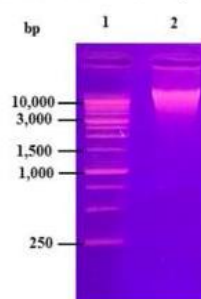


Figure 2 Genomic DNA of UPEC strain MNT08 on agarose gel. Lane 1, OneMarkB molecular mass marker (GeneDirex); lane 2, genomic DNA extracted from UPEC strain MNT08 sample.

Construction of the recombinant plasmid

The *hlyA* gene encoding HlyA from UPEC strain MNT08 was synthesized with the approximate size of 3,099 bp and cloned into the pET17b expression vector. The DNA sequence alignment revealed that UPEC strain MNT08 is similar to other strains i.e. UTI89 (NC_007946.1), J96 (M10133.1) and CFT073 (NC_004431.1) with 97%, 99.3% and 99.2% identities, respectively. The variations of 110 nucleotides were found in these strains. These causes the diversity at the positions of 29 amino acids, resulting in different sequence identities which are 98%, 99.2% and 99.4% compared to the amino acid sequences of HlyA from UPEC strains UTI89, J96 and CFT073, respectively.

Homology modeling of HlyA

The model structure of HlyA from UPEC strain MNT08 was generated using CyaA of *Bordetella pertussis* (PDB ID: 6SUS) as a template (**Fig 3A**). The chain A of this 6SUS structure (6sus.1.A) was identified as the best hit template, with the highest GMQE score of 0.11, 34.36% identity, and 25% sequence coverage. The model was built as a monomer covering the C-terminus 339 amino acids (residues 612-950) of HlyA (**Fig 3B**). In comparison to the CyaA structure [18], K690 of HlyA was predicted to be one of the two acylation sites by HlyC. The RTX domain was also predicted to form by residues 733-975 (**Fig 3C**).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The HlyA of UPEC obtained from patients admitted to Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, Thailand [9], which is designated as strain MNT08 in this study, was revealed to be different from the published strains i.e. UTI89, J96 and CFT073. It showed the most similarity to UPEC strain CFT073 with 99.2% DNA sequence identity and 99.4% amino acid sequence identity. This variation has raised the suspicion in the structural differences of the HlyA proteins. To aid the structural analysis, homology model of HlyA of UPEC strain MNT08 was generated. The crystal structure of HlyA from *Staphylococcus aureus* had been published [19]; however, this was not selected as a template for modelling. Its amino acid sequence does not obtain RTX domain and distinguishes from that of HlyA of UPEC strain MNT08 with 3-fold shorter polypeptide length, resulting in only 26.5% identity. Alternatively, adenylate cyclase toxin (CyaA) from *Bordetella pertussis* (PDB ID: 6SUS) was identified as the best hit template. The CyaA protein has a secretion system which is similar to HlyA from *E. coli*. The CyaA is secreted via the T1SS, composed of the inner membrane ATPase (CyaB), the membrane fusion protein (CyaD) and the outer membrane channel component (CyaE). The activation of CyaA is catalyzed by transferring fatty-acyl to two lysine residues. The receptor-binding RTX domain found at the C-terminus precedes the secretion signal of the active CyaA out of the cell [20]. These suggests the close related functional protein to HlyA, making CyaA an appropriate template for modeling. The model structure possessed 339 amino acid residues (residues 612-950) of the C-terminus of HlyA. The K690, which was found in all UPEC strains, was predicted to be the position of acylation by HlyC in the HlyA activation process. The RTX domain was predicted to accommodate residues 733-975 with the presence of nonapeptide repeat sequence (GGxGxDxUx) [21]. Within this domain, HlyA from UPEC strain MNT08 is almost identical to that of strain CFT073. Only at position 790, the amino acid was threonine (in CFT073) or alanine (in MNT08). Meanwhile, four residues and nine residues were different when compared the RTX domains of HlyA from UPEC MNT08 to J96 and UTI89, respectively. The RTX proteins was reported to be a non-cleavable secretion signal that permits the secretion by T1SS. The Ca²⁺-binding to the RTX repeats was suggested to induce the protein folding of proHlyA into its mature form upon secretion [6].

Due to the limitation of long length template availability, the model in this study could only predict one-third portion of HlyA structure. There is no structural information available for the amino acids 272-301, 564-739, 914-936, which are the regions identified as essential amphipathic alpha-helix for pore formation, involved in hemolytic activity, and glycophorin binding region catalyzing the interaction to red blood cell, respectively [7]. Therefore, the structural study of the full length HlyA from either UPEC strains using X-ray crystallography is still required for a better understanding of the pore formation. The recombinant plasmid containing HlyA generated in this study is useful for the production of HlyA that will be used as a material for crystallography.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Assoc. Prof. Dr. Pharanai Sukhumungoon, Department of Microbiology, Division of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand for providing the UPEC isolated from patients admitted to Maharaj Nakhon Si Thammarat Hospital, Thailand. This study was supported by the Excellent Scholarships in Biochemistry, Department of Biochemistry, Division of Health and Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand and the Research Grant for Thesis in the Fiscal Year 2019 Scholarships, Graduate School of Prince of Songkla University, Thailand.

REFERENCES

1. Lühje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Advances in Microbial Physiology*. 2014; 65: 337-372.
2. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 1566.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2: 123-131.
4. Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host & Microbe*. 2012; 11: 58-69
5. Themphachana M, Kongpheng S, Rattanachuy P, Khianggam S, Singkhamanan K, Sukhumungoon P. Molecular characterization of virulence and antimicrobial susceptibility profiles of uropathogenic *Escherichia coli* from patients in a tertiary hospital, southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2015; 4: 1021-1030.
6. Thomas S, Holland IB, Schmitt L. The Type 1 secretion pathway-the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1843: 1629-1641.
7. Ristow L, Welch R. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: a cloak or a dagger? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1858: 538-545.
8. Peherstorfer S, Brewitz HH, George AAP, Wißbrock A, Adam JM, Schmitt L, Imhof D. Insights into mechanism and functional consequences of heme binding to hemolysin-activating lysine acyltransferase HlyC from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*. 2018; 1862: 1964-1972.
9. Vázquez RF, Maté SM, Bakás LS, Muñoz-Garay C, Herlax VS. Relationship between intracellular calcium and morphologic changes in rabbit erythrocytes: effects of the acylated and unacylated forms of *E. coli* alpha-hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1858: 1944-1953.
10. Gur C, Copenhagen-Glazer S, Rosenberg S, Yamin R, Enk J, Glasner A, et al. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* Is Counteracted by

- bacterial hemolysin A-dependent killing of NK cells. *Cell Host & Microbe*. 2013; 14: 664-674.
11. Buston R. Blood agar plate and hemolysis protocols. American Society for Microbiology. 2005.
 12. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*. 2018; 27(1): 135-145.
 13. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, Castro ED. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: W597-W603.
 14. Guex N, Peitsch M, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. 2009; 30: S162-S173.
 15. Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE. Software Extensions to UCSF Chimera for Interactive Visualization of Large Molecular Assemblies. *Structure*. 2005; 13: 473-482.
 16. Savardi M, Ferrari A, Signoroni A. Automatic hemolysis identification on aligned dual-lighting images of cultured blood agar plates. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2018; 156: 13-24.
 17. O'Neill M, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, McMillan ND. Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*. 2011; 307: 012047 (6pp.)
 18. Motlova L, Klimova N, Fiser R, Sebo P, Bumba L. Continuous assembly of beta-roll structure is implicated in the type I-dependent secretion of large repeat-in-toxins (RTX) proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2020; 432: 5696-5710.
 19. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of *Staphylococcal* alpha - Hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 1996; 274: 1859-1865.
 20. Masin J, Osicka R, Bumba L, Sebo P, Loch C. *Bordetella* protein toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. 2015; 4: 161-194.
 21. Bumba L, Masin J, Macek P, Wald T, Motlova L, Bibova I, et al. Calcium-driven folding of RTX domain beta-rolls ratchets translocation of RTX proteins through type I secretion ducts. *Molecular Cell*. 2016; 62: 47-62.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวกนกพร ปานทอง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6110220006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2561

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับปริญญาโทจากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาชีวเคมี พ.ศ. 2561 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2563 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kanokporn Pantong, Wanita Pantong, Wanisa Salaemae. 2020. Characterization of Hemolysin A from uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from patients admitted to hospital in southern Thailand. The 15th International Symposium of the Protein Society of Thailand (PST). Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand. Nov 4-6, 2020. pp. 246-252