รายงานฉบับสมบูรณ์

การโคลนจีนที่สร้างโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA) ของ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB8288 เข้าไปยัง *Escherichia coli*

*(*Cloning of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene(s) from *Rhodopseudomonas palustris* strain NCIB8288 gene(s) in *Escherichia coli*)

Abstract

The optimum conditions for extracting PHA synthase from the cell using a sonicator was in the range of 5 min with a 5 second pause every 15 seconds. The PHA synthase activity in this crude extract of *Rhodopseudomonas palustris* NCIB8288 or CH 72 was 24.57 units/mL. The PHA synthase gene was amplified by PCR with primers design according to the conserved region of the PHA synthase gene (class I) of related strains of *R. palustris* CH 72. The primers were complementary to the template chromosomal DNA of *R. palustris* CH 72 and produced a PCR product of 538 bp. At present we are analyzing its nucleotide sequence, and continuing our attempts to ligate and transform this PHA synthase gene.

บทคัดย่อ

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PHA synthase ออกจากเซลล์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์ คือการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยใช้ช่วงเวลา 5 นาที โดยให้หยุดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 วินาที ค่ากิจกรรมของ PHA synthase ในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Rhodopseudomonas palustris* NCIB8288 หรือ CH72 มีค่าเท่ากับ 24.57 units/ml การเพิ่มจำนวน PHA synthase gene ด้วยวิธี PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ PHA synthase gene โดยทำการเลือกบริเวณที่ conserve จาก PHA synthase gene (class I) ในแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodopseudomonas palustris* ที่สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถจับกับ chromosomal DNA ของ *Rhodopseudomonas palustris* CH72 เป็น template ได้โดยมีขนาดประมาณ 538 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับ PCR product ของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แต่อย่างไรก็ตาม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ตลอดจนการทำ ligation และ transformation ยังไม่สามารถได้ *E. coli* JM109 ที่มี PHA synthase gene ดังกล่าว

บทนำ

พลาสติกสังเคราะห์ เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นขยะ ถ้าไม่มีการจัดการที่ดี จะทำให้เกิดการกักขังของน้ำในดิน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้น้ำไม่ไหล เกิดน้ำท่วมได้ หรือก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนอย่างหนักในแหล่งแม่น้ำ ทะเลที่อยู่ใกล้เคียง (Rutkowska et al., 2003) นอกจากนี้ การสะสมของพลาสติกสังเคราะห์ในดิน ยังมีผลทำให้ผลผลิตการเกษตรลดลง สัตว์และปลาต่างๆ ตายได้ เนื่องจากกลืนเอาชิ้นส่วนของพลาสติกสังเคราะห์เข้าไป สิ่งต่างๆเหล่านี้มีผลต่อการทำลายระบบนิเวศน์เป็นอย่างมาก (Yang et al., 2004) การนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ มิใช่เป็นการประหยัดเนื่องจากสมบัติเดิมของพลาสติกด้อยลงกว่าเดิมและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติหรือไบโอพลาสติก (bioplastic) จะสามารถแก้ปัญหาการเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี โดยเราสามารถจำแนกขยะของพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติเป็นประเภทเดียวกับขยะที่เป็นอาหาร ซึ่งเป็นการลดปริมาณขยะที่เป็นของแข็ง (Yang et al., 2004)

Poly (hydroxyalkanoate(s)) (PHA(s)) เป็นพลาสติกที่ทนความร้อน (thermoplastic) ถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ ไบโอพลาสติกหรือโพลีเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันกับ PHA คือ polyhydroxybutyrate (PHB) (Lemoigne, 1926) PHA ถูกพบได้ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ทะเลสาบ (Esteve et al., 1996, Guerrero et al., 1985, Mas-Castella and Guerrero, 1995, Pedros-Alio et al., 1990; van Gemerden et al., 1985) แม่น้ำ (Freeman et al., 1993; Lopez *et al*., 1995) ปมของรากพืช (Karr et al., 1983; Ndoye et al., 1994) ตะกอนใต้ท้องทะเลลึกที่มีอุณหภูมิสูง (Guezennec et al., 1998) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ใน activated sludge (Mino et al., 1998; Wentzel et al., 1991) PHA ถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ในรูปของ inclusion bodies สามารถพบได้ถึง 90% ของน้ำหนักแห้ง (Jendrossek, 1998) กลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตส่วนใหญ่มักจะสะสม PHA และ PHB ในรูปที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในไซโตพลาสซึม และพบว่าการสะสม PHA ทำให้แบคทีเรียมีการอยู่รอดในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (Matin et al., 1979)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำและสภาพแวดล้อมที่มีสภาพแห้งตามธรรมชาติบางแห่ง สามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน มีเม็ดสีคล้ายกับที่พบในพืชสีเขียว ได้แก่ chlorophylls, phycobilins, แคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Eraso and Kaplan, 2001) สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความต้องการออกซิเจน คือ พวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน ในกระบวนการเมแทโบลิซึม (metabolic process) หรือ anoxygenic photosynthetic bacteria ได้แก่ purple bacteria (*Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* และ purple nonsulfur bacteria) และ green bacteria (green sulfur bacteria และ multicellular filamentous green bacteria) และพวกที่ต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมแทโบลิซึม หรือ oxygenic photosynthetic bacteria ได้แก่ cyanobacteria และ prochlorophytes (Imhoff and Truper, 1989) มีรายงานการค้นพบ PHA ใน cyanobacteria ที่เจริญอยู่ในทะเลและน้ำสะอาด (fresh water) (Capon et al., 1983) และพบใน *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*

(Zhang et al., 2004) และรายงานการค้นพบในแบคทีเรียชนิด purple nonsulfur ได้แก่ *Rhodopseudomonas palustris* (de Phillippis et al., 1992; Sawayama et al., 2000; Sawayama et al., 2001; Carlozzi and Sacchi, 2001) *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ SP5212 (Mukhopadhyay et al., 2005) รวมถึง *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 แต่มีการสร้าง PHA ที่ต่ำประมาณ 15% (w/w) ของน้ำหนักแห้ง (Tanskul et al., 2007) *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 นี้ถูกแยกได้จากมูลไก่ ซึ่งเป็นไปได้ที่จะเจริญในน้ำทิ้งที่ประกอบด้วยอินทรีย์สาร ประกอบกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเนสได้ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อชนิดนี้แต่ต่างสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ (Carlozzi and Sacchi, 2001) ซึ่งแก๊สไฮโดรเจนนี้ถูกคาดหวังให้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในอนาคต รวมถึงความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยยาก คือ chlorinated benzoic acids (Oda et al., 2004) ดังนั้น *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาด้านต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น

การควบคุมการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ PHA มีลักษณะซับซ้อน ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น การควบคุมการทำงานของ PHA synthesizing genes หรือ PHA synthase genes ที่เป็นผลจากการขาดแคลนอาหาร ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ หรือสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทโบลิซึม (metabolic intermediates) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHA ตลอดจนการยับยั้งของเอนไซม์ชนิดอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องหรือใช้สารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic intermediates) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHA ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้อาจเกิดร่วมกันได้ (Kessler and Witholt, 2001)

เป็นที่ทราบกันดีว่าการควบคุมการสร้าง PHA เป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ (Senior and Dawes, 1971) รวมถึงปริมาณความเข้มข้นของ acetyl-CoA และ coenzyme A ภายในเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการสร้างโพลีเมอร์ (Haywood et al., 1988; Mothes et al., 1997) ชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ β-ketothiolase และ acetoacetyl-CoA reductase โดยเฉพาะ β-ketothiolase ซึ่งมีบทบาทในการทำให้ acetyl-CoA รวมกัน นอกจากนี้ยังพบว่า PHA synthase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้เกิด polymerization ของ (R)-3-hydroxyacyl-CoA (Rehm, 2003) PHA synthase ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัย subunits และ substrate specificity ที่แตกต่างเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง มีการค้นพบ PHB synthase ที่ได้จาก extremely halophilic archaebacterium ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ตัวใหม่ในกลุ่ม synthase โดยสามารถคงตัวอยู่ได้ที่ 60°C โดยที่กิจกรรมยังคงอยู่ถึง 90% (Hezayen et al., 2002) PHA synthases เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่เร่งการเกิดโพลีเมอร์ (polymerization) ของ coenzyme A thioester derivatives ของ hydroxyalkanoic acids (HACoAs) ที่จะผลิต PHAs ต่อไป โดยจะปลดปล่อย CoA ออกมาในระหว่างการผลิต พบว่าปริมาณ PHA synthases มีผลต่อการผลิต PHA อย่างเป็นนัยสำคัญทั้งในสิ่งมีชีวิตหรือในหลอดทดลอง (Zhang et al., 2004) ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย PHA synthase genes

PHA synthase genes และยีนที่ถอดรหัสโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของ PHA มักอยู่ด้วยกันในจีโนมของแบคทีเรีย (Rehm and Steinbuchel, 1999; Rehm and Steinbuchel, 2001) ตัวอย่าง

ใน *Ralstonia eutropha* มียีนสำหรับ class I PHA synthase (*phaC*) β–ketothiolase (*phaA*) และ NADP-dependent acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) (Steinbuchel and Schlegel, 1991) ซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ใน *phaCAB* operon (Slater et al., 1988; Schubert *et al*., 1988; Peoples and Sinskey, 1989) ซึ่งอาจมีการเรียงลำดับของยีนต่างๆ แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด PHA synthases เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่เร่งการเกิดโพลีเมอร์ (polymerization) ของ coenzyme A thioester derivatives ของ hydroxyalkanoic acids (HACoAs) ที่จะผลิต PHAs ต่อไป โดยจะปลดปล่อย CoA ออกมาในระหว่างการผลิต พบว่าปริมาณ PHA synthases มีผลต่อการผลิต PHA อย่างเป็นนัยสำคัญทั้งในสิ่งมีชีวิตหรือในหลอดทดลอง (Zhang et al., 2004) ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย PHA synthase genes ซึ่งในการศึกษา PHA synthase genes นี้ มีรายงานการศึกษาใน purple nonsulfur bacteria ชนิด *Rhodobacter sphaeroides* FJ1 โดยทำให้ส่วนของ *phaC* gene ถูกเพิ่มจำนวนได้โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) conserved regions ของ *phbC* gene ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ กล่าวคือ forward primer เป็น UHCl, 5′-GGAATTCGTGGGT(C/G)AA(C/T)CC(C/G)GA-3′) และ reverse primer เป็น (LHCL), 5′-CGGGATCCA(C/G)GG(C/G)(A/G)CGATATGGTC-3′) (Yang et al., 2006)

การผลิต PHA โดยการลดค่าใช้จ่ายลง สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก ของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรม เป็นต้น ในการเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์สามารถทำได้โดยใช้ลูกผสมของ *E.coli* (recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005; Madison and Huisman, 1999) *E.coli* เป็นผู้อาศัยที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนที่แปลกปลอมเข้ามา กล่าวคือง่ายต่อการควบคุมและพัฒนาการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ *E.coli* ยังถูกเลี้ยงได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้มาก (Lee, 1996; Shiloach and Fass, 2005) และยังพบว่าถ้า *E.coli* มีการสะสม PHB จำนวนมากแล้วเซลล์จะแตกง่ายทำให้สะดวกต่อการแยก PHB ออกจากตัวเซลล์ และการทำให้ PHB บริสุทธิ์ นอกจากนี้ *E.coli* ไม่สร้างเอนไซม์ที่จะมาย่อย PHA ได้ มีรายงานการโคลนยีน *phbC* จาก *Alcaligenes eutrophus* เข้าไปใน *E. coli* พบว่า *E.coli* ลูกผสมนี้มีการสร้าง PHA มากและสร้างตลอด (constitutive expression) (Peoples and Sinskey, 1989; Schubert et al., 1988; Slater et al., 1988) รวมถึงรายงานการพัฒนาระบบของ ผู้ให้อาศัย-พลาสมิด (host-plasmid) และกลยุทธในการทำให้มีการผลิต PHB ในปริมาณที่มาก (Janes et al., 1990; Kim et al., 1992; Lee et al., 1994a; Lee et al., 1994b; Lee et al., 1994c) และมีรายงานการโคลนยีนที่สร้าง PHA synthase เข้าไปยังใน *Alcaligenes eutrophus* โดยนำยีนจากกลุ่ม purple sulfur bacteria คือ *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (Liebergesell *et al*., 1993) จากกลุ่ม purple non-sulfur bacteria ได้แก่ *Rhodobacter sphaeroides* (Hustede et al., 1992) *Rhodospirillum rubrum* (Hustede et al., 1992) แต่ไม่มีรายงานการโคลนยีนจาก *Rhodopseudomonas palustris* หรือ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 เข้าไปยังในเซลล์ผู้ให้อาศัยที่เป็น *E. coli*

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการทำเซลล์ *E. coli* BL21 ให้เป็นเซลล์ลูกผสมที่ประกอบด้วย PHA synthase gene (s) จาก *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 และศึกษาความสามารถในการสร้าง PHA ในสภาวะต่างๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อทำการโคลน PHA synthase gene(s) เข้าไปยังเซลล์ *E. coli* BL21
- เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PHA synthase gene
- เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของเซลล์ *E. coli* BL21 ลูกผสม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ทำการโคลน PHA synthase gene(s) จาก *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288
- หาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ PHA synthase gene (s)
- ถ่ายฝาก PHA synthase gene (s)เข้าไปยัง *E. coli* BL21
- ทดสอบการแสดงออกของ PHA synthase gene(s) และหาค่ากิจกรรมของ PHA synthase
- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

พลาสติกสังเคราะห์ ก่อให้เกิดเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานาน ดังนั้นทางเลือกใหม่ของการใช้พลาสติก คือ ควรเป็นพลาสติกที่ย่อยได้ตามธรรมชาติหรือ ไบโอพลาสติก ที่รู้จักกันดีคือ Poly (hydroxyalkanoate(s)) (PHA(s)) เป็นพลาสติกที่ทนความร้อน (thermoplastic) ถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ หรือโพลีเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันกับ PHA คือ polyhydroxybutyrate (PHB) (Lemoigne, 1926) PHA ถูกพบได้ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ มีรายงานการค้นพบในแบคทีเรียชนิด purple nonsulfur ได้แก่ *Rhodopseudomonas palustris* (de Phillippis et al., 1992; Sawayama et al., 2000; Sawayama et al., 2001; Carlozzi and Sacchi, 2001) *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ SP5212 (Mukhopadhyay et al., 2005) รวมถึง *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 แต่มีการสร้าง PHA ที่ต่ำประมาณ 15% (w/w) ของน้ำหนักแห้ง (Tanskul et al., 2007) ดังนั้น *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจต่อการปรับปรุงให้มีการผลิต PHA ที่สูงขึ้น

การควบคุมการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ PHA มีลักษณะซับซ้อน ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น การควบคุมการทำงานของ PHA synthesizing genes หรือ PHA synthase genes ยีนที่ถอดรหัสโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของ PHA มักอยู่ด้วยกันในจีโนมของแบคทีเรีย (Rehm and Steinbuchel, 1999; Rehm and Steinbuchel, 2001) การผลิต PHA โดยการลดค่าใช้จ่ายลง สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก ของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรม เป็นต้น ในการเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์ สามารถทำได้โดยใช้ลูกผสมของ *E.coli* (recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005; Madison and Huisman, 1999) *E.coli* เป็นผู้อาศัยที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนที่แปลกปลอมเข้ามา กล่าวคือง่ายต่อการควบคุมและพัฒนาการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ *E.coli* ยังถูกเลี้ยงได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้มาก (Lee, 1996; Shiloach and Fass, 2005) และยังพบว่าถ้า *E.coli* มีการสะสม PHB จำนวนมากแล้ว เซลล์จะแตกง่ายทำให้สะดวกต่อการแยก PHB ออกจากตัวเซลล์ และการทำให้ PHB บริสุทธิ์ นอกจากนี้ *E.coli* ไม่สร้างเอนไซม์ที่จะมาย่อย PHA ได้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ปี 1992 Hustede และคณะรายงานการโคลน poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes ของ *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodospirillum rubrum* เข้าไปใน *Alcaligenes euthrophus* PHB^{-}4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผ่าเหล่าที่ไม่มีการสร้าง PHB โดยยีนขนาด 15-kbp ที่ได้จากการตัดด้วย HindIII ของเชื้อ *R. rubrum* มีผลทำให้ สายพันธุ์ผ่าเหล่านี้สามารถสร้างแกรนูลของ PHB ที่มีขนาดใหญ่ ยาวถึง 3.5 μm (Hustede et al., 1992)

ในปี 1997 Kranz และคณะรายงานเกี่ยวกับยีน 3 ชนิด ที่จำเป็นในวิถีการสังเคราะห์ PHA ได้แก่ *phaA* (β-ketothiolase), *phaB* (acetoacetyo-coenzyme A reductase) และ *phaC* (PHA synthase) ซึ่งโคลนจาก *Rhodobacter capsulatus* โดยยีน *phaAB* ไม่อยู่ติดต่อกับ *phaC* ทั้ง *phaC* และ *phaA* แสดงออกโดยไม่ต้องอาศัยตัวกระตุ้น แต่เป็นการควบคุมที่ระดับของเอนไซม์ภายหลังการแปลรหัสแล้ว นอกจากนี้แหล่งอาหารไนโตรเจนไม่ได้มีผลต่อการสังเคราะห์ PHA แต่แหล่งอาหารคาร์บอนได้แก่ acetone, caproate หรือ heptanoate จะทำให้ *Rhodobacter capsulatus* สังเคราะห์ PHAs สูง ยกเว้นกรณีที่เชื้อนี้มีการขาดหายไปของ *phaC* กล่าวคือจะไม่สามารถสร้าง PHA แต่กรณีที่เชื้อมีการขาดหายไปของ *phaA* และ *phaAB* จะยังคงสามารถสร้าง PHA ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีวิถีอื่นในการใช้สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ synthase (Kranz et al., 1997)

ปี 2000 Clemete และคณะ รายงานชิ้นส่วนของยีนขนาด 3 kb ที่แยกได้จาก *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25903 ประกอบด้วย open reading fram (ORF) ที่มีความเหมือนสูงกับยีนต่างๆ ที่เป็น PHA synthase genes ที่เป็นที่รู้จักกันดี แต่ ORF นี้ มีความเหมือนต่ำกับ *R. rubrum* สายพันธุ์ HA แม้ว่าจะเป็นสปีชีส์เดียวกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ PHA synthase genes ของ *Rhodobacter sphaeroides, Ralstonia eutropha, Thiocystis violacea* และ *Nocardia corrallina* โดยใช้เซลล์ผู้ให้อาศัยที่ไม่มี PHA synthase genes คือ *R. eutropha* DSM541 และ *Pseudomonas putida* GpP104 พบว่าส่วนประกอบของ PHA ได้แก่โพลีเมอร์ที่เกิดจากโมโนเมอร์ต่อกันเป็นสายที่มีขนาดสั้น และขนาดกลาง ไม่จำเป็นต้องเป็นผลจากความจำเพาะเจาะจงของ PHA synthase ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Clemente et al. 2000)

ปี 2003 Mahishi และ คณะ ได้ทำการศึกษา *E. coli* (ATCC: PTA-1579) ลูกผสม ที่มียีนสังเคราะห์ PHB จาก *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209 พบว่า แหล่งคาร์บอนได้แก่ กลีเซอรอล กลูโคส น้ำมันปาล์ม และเอธานอล ช่วยส่งเสริมการสร้าง PHB แต่ถ้าเป็นซูโครส หรือโมลาส จะไม่มีการสะสม PHB และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโทน และส่วนผสมของสารสกัดยีสต์และเปปโทน โดย *E. coli* (ATCC: PTA-1579) ลูกผสมนี้จะสร้าง PHB ได้ดีที่สุดภายหลังการเจริญ 48 ชั่วโมง ที่ 37°C ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและส่วนผสมของสารสกัดยีสต์และเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน (Mahishi *et al*., 2003)

ปี 2004 มีรายงานจาก Zhang และคณะว่าแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ชนิด *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* สามารถสะสม PHB ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีไนโตรเจน กิจกรรมของ PHA synthase มีความสัมพันธ์กับการสะสม PHB ในเซลล์ ได้นำยีน PHA synthase ได้แก่ *phaC* และ *phaE* โคลนและคัดเลือก *E. coli* ลูกผสม แล้วสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์เป็น type III PHA synthase (Zhang *et al*., 2004)

ในปี 2006 Agus และคณะพบว่ายีน Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase (*PhaC*) จากแบคทีเรียแกรมลบคือ *Wautersia eutropha* ได้แสดงออกในเซลล์ *E. coli* XL 1-Blue ในระดับต่างๆ กัน โดย *PhaC* ถูกควบคุมโดยปริมาณของสารเคมีที่เป็นตัวกระตุ้น คือ isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside, IPTG) ที่ใส่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการถูกควบคุมโดยจำนวนชุดที่แตกต่างของพลาสมิดในการทดลองในขวดรูปชมพู่ กิจกรรมของ *phaC* ก็เพิ่มขึ้นในขณะที่ความเข้มข้นของ *phaC* ต่ำ และกิจกรรมของ *phaC* ไม่เพิ่มขึ้นแม้ว่าจะมีความเข้มข้นของ *phaC* สูง อาจเนื่องจากการสร้าง inclusion body ในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้พลาสมิดที่มีจำนวนชุดที่ต่ำ จะมีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของ *phaC* อย่างมาก กล่าวคือ ให้ผลผลิต PHB ที่สูง และน้ำหนักโมเลกุลสูง (Agus *et al*., 2006)

วิธีการทดลอง

การเลี้ยง *Rhodopseudomonas palustris* strain CH72 เพื่อผลิต PHA

นำแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas palustris* strain CH72 (strain NCIB8288) มาเลี้ยงในอาหาร Glutamate-malate (GM) medium ต่อ 1 ลิตร ประกอบด้วย 3.8 g sodium glutamate, 2.7 g DL-malic acid, 2.0 g yeast extract, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g KH_2PO_4, 0.8 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.053 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mg nicotinic acid, 1 mg thiamine-HCl, 0.01 mg biotin, 1.2 mg $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.0 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.5 mg ferric citrate แล้วปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 1 N NaOH สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA คือ เลี้ยง *Rps. palustris* CH12 ใน micro-aerobic condition ที่มีแสง (2,000-2,500 Lux) ในอาหาร GM ที่ใช้ butyrate แทน sodium glutamate, pH 9.0 ที่ 35°C เป็นเวลา 3 วัน

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์

ภายหลังจากเลี้ยง *Rps. palustris* CH72 เป็นเวลา 3 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (เซลล์เปียก 0.62 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล.) แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 และปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที วางตะกอนเซลล์ที่ได้บนน้ำแข็ง แล้วเติม extraction buffer (10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 10 mM EDTA, and 1 mM DTT) 1.5 มล. ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex mixer และทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยปรับเปลี่ยนช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 1, 3, 4, 5, 6 และ 10 นาที โดยให้หยุดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นจึงนำเซลล์แตกเหล่านี้ไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ 4°C เพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase ต่อไป

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase (PHA synthase assay)

วิธีการวิเคราะห์ PHA synthase เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Dai and Reusch (2008) สารตั้งต้นที่ใช้คือ 0.88 mM DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A โดยละลายใน 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.088 mM DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A, 100 mM KCl, และ 100 μl ของสารละลายส่วนใสของเซลล์ที่ได้ภายหลังการทำให้เซลล์แตก บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.44 M TCA 20 μl ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 102 μl ลงใน eppendorf tube และเติม 1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ปริมาตร 573 μl วัดปริมาณหรือความเข้มข้นของ coenzyme A concentration ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำซ้ำ 2 ครั้งและมีแบลงค์เป็นตัวเปรียบเทียบ สำหรับการเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อาศัยกราฟมาตรฐานที่ทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยเทียบ 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยน 1 μmol DL-β-hydroxybutyryl coenzyme A ไปเป็น coenzyme A ในเวลา 1 นาที

การเพิ่มจำนวน PHA synthase gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การออกแบบไพรเมอร์

เพื่อเพิ่มจำนวนของ phaC gene ใน *Rhodopseudomonas palustris* CH72 จึงทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของ phaC gene โดยการหาลำดับส่วนที่เป็น conserve sequence จากกลุ่มเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* CH72 ที่สายพันธุ์ใกล้เคียงกันโดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X

การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ phaC gene จาก *Rhodopseudomonas palustris* CH72

ส่วนผสมต่างๆ ในปฏิกิริยาการทำ PCR เป็นดังนี้ คือ

Reaction		
10x (PCR buffer + MgCl2)	5.0	ul
10 mM dNTP mix	1.0	ul
10 mM Forward primer	1.5	ul
10 mM Reverse primer	1.5	ul
250 ug/ul template (cDNA)	5.0	ul
Taq polymerase 5 U/ul	0.4	ul
DI	35.6	ul
Total	50	ul

สิ่งที่ปรับเปลี่ยน คืออุณหภูมิที่ใช้ในการทำ annealing โดยปรับเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิที่ 50, 52.5, 55, 60 $^{\circ}$C ในช่วงเวลา 30 นาที

การวิเคราะห์ phaC gene ที่เพิ่มจำนวน (PCR product) ด้วย electrophoresis เทียบกับ marker (1 kb ladder)

นำ PCR product ที่ได้ภายหลังการทำ PCR ไปทำการวิเคราะห์ บน 1% agarose gel ที่มี marker เป็น 1 kb ladder

การทำบริสุทธิ์ PCR product

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ phaC gene ที่เพิ่มจำนวนข้างต้น ได้ทำการเพิ่มเวลาในการ run gel เพื่อแยกชิ้นส่วน 538 bp ออกมาโดยใช้ใบมีดตัด แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย PureLinkTM Quick Gel Extration Kit (Invitrogen) แล้วนำมาตรวจสอบบน 1.0% agarose gel electrophoresis

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้วยวิธี dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) โดยใช้ Pfu DNA polymerase ด้วยเครื่อง automated sequencer และใช้โปรแกรมของ PC/GENE package (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA) ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน แล้วหา sequence identities โดย CLUSTAL W ผ่านเข้าไปยัง GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) ซึ่งวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเชื่อมชิ้นส่วน PHA synthase gene(s) เข้าสู่ดีเอนเอพาหะ pGEM T-easy vector (Ligation)

ligation reaction

pGEM-T easy vector (50 ng)	0.5	□l
PHA synthase gene	2.0	□l
2x rapid ligation buffer	5.0	□l
T4 DNA ligase	1	□l
DI	1.5	□l
Total	10.0	□l

บ่มที่ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การนำ recombinant pGEM T-easy containing PHA synthase gene เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM109 competent cell (Transformation)

นำ ligation mixture ย้ายเข้าสู่ *E. coli* JM109 competent cell ด้วยวิธี heat shock โดยนำ *E. coli* JM109 competent cell 100 □l จาก deep freezer -70°C จากนั้นเติม ligate mixture ปริมาตร 10 □l ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที บ่มต่อที่ 42°C เป็นเวลา 1นาที และบนน้ำแข็งอีก 2 นาที เติม LB broth ปริมาตร 800 □l บ่ม 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป spread plate บน SOC medium ที่มี ampicillin, IPTG และ X-gal ปริมาตร 1000 มล. โดยเติม 25 mg/ml ampicillin ปริมาตร 1 มล. 23 mg/ml IPTG ปริมาตร 1 มล. และ 2% X-gal ปริมาตร 2 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น pick colony ที่เป็นสีขาวที่เจริญได้มาบ่มบนในอาหารดังกล่าว

การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109

เลือกโคโลนี จากการ transformation แล้วสกัด plasmid ด้วย STET buffer (5% (w/v) glucose, 5% (v/v) Triton x-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) โดยนำ E. coli JM109 ที่คาดว่าได้รับ pGEM-T-Easy containing PHA synthase gene(s) แล้วมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 100 □g/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็น

เวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย STET buffer ปริมาตร 350-400 µl ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปตั้งในน้ำเดือด 40 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที ปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนออกจาก eppendorf โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้ว และตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol ปริมาตร 350-400 µl ผสมให้เข้ากันแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 25 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสออกโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง นำ recombinant vector ที่สกัดได้ ไปเปรียบเทียบกับ vector ก่อนที่จะทำ ligation โดยเปรียบเทียบบน 1% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์

ภายหลังการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator พบว่า ช่วงเวลา 1, 3 และ 4 นาที เป็นช่วงเวลาที่ไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์แตก และช่วงเวลา 5 นาที ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase ที่มากกว่าที่ช่วงเวลา 6 นาที และที่ช่วงเวลา 10 นาที ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ PHA synthase

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase

ภายหลังการสกัด PHA synthase ออกจากเซลล์ *Rps. palustris* CH72 และนำไปหากิจกรรมของ PHA synthase พบว่าสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.111 หรือคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 24.57 unit/ml เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานข้างล่างนี้ (Fig. 1)

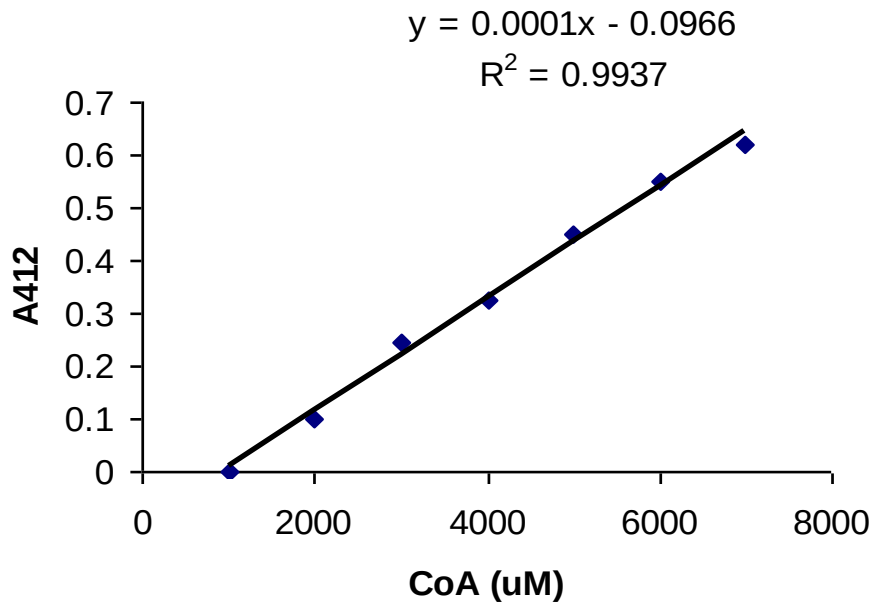

Fig. 1. Standard curve of coenzyme A (CoA)

การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์โดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณ conserve sequence มากที่สุดได้แก่ 5 กลุ่ม ดังนี้

- hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* BisA53]
- hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* TIE-1]
- phbC Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* CGA009]
- Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* HaA2]
- Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [*Rhodopseudomonas palustris* BisB18]

โดยนำ sequences ข้างต้นไป alignment เพื่อหาบริเวณ conserve sequence โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นเลือกบริเวณที่ conserve ที่เหมาะสมที่สุดในการออกแบบไพรมอร์ เมื่อได้ตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบเรียบร้อยแล้วนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Vector NTI เพื่อตรวจสอบค่า Tm , %GC และ ค่า primer dimer

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากเชื้อแต่ละตัวแสดงให้เห็นดังนี้

```
>gi|115522030:3292637-3294439 Rhodopseudomonas palustris BisA53, complete genome
ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGGAACTTCAATCCAGACGCCTTCGCGTTGAATTTGG
CGAAGGCGATGGAGGCATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCCTATCTCAATCGCAACAAGATCGAGACGCCCGA
CAAGCCGCCCCCGGAAATTGCCGAGGTGGTGAAGACTTTTTCGAGCGTCGCCGAGTACTGGCTGTCGGAC
CAGAAGCGGGCCGCCGACGTGCAGATGAAGCTCGGAAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACCAGGCGACGC
GGCGGTTGGCCGGGGAAAAGACCGAACCCACCATCGAGCCGCCGGCCCGCGACAAGCGCTTTGCCGATCC
GGAATGGAAGTCGAACCAGTTTTTCGATTTCCTGCTGCAGGCCTATCTCTTGACCACGCAATGGGCCCAG
GCGCTGGTGCGCGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCACACCCGCAAGAAGGCGGAGTTCTACGTCCAGCAGA
TCACCAACGCCTTGGCGCCGTCGAATTTCGTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTC
CAACGGCGACAATCTGGCGCGCGGCATGAAAATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAGGGCATGCTG
AAGATCCGGCAATCCGACCCGGGCAATCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGGCAAGGTGA
TCTTCCAGAACGAGCTGATGCAGCTCATCCAGTATCACCCGACCACCGAAACCGTGCTGCGCACGCCACT
GCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCCTTCATCAAA
TGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCGGACGAGGCGCTGCGGCACA
AATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCCGCTGACCGCGATGGATGTGATCGAAACGATCACCGGCGA
GATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTCGGCGGCACCCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGGCTGGCC
GACAAGCGCCGGGTGCGGGTCACCTCCGCGACCTTCCTGACCACGCAAGTCGACTTCACCCATGCCGGCG
ACTTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATCGCGGCGCTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGGCGTGCT
CGAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCCTACGTCGTC
AATAACTACCTGAAGGGCAAGTCGCCCTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACTCGACGCGGA
TGCCGGCGGCCAACCATTCCTATTATCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTCGGAAGGCAGCAT
GGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCCAAGGTCAAGGTGCCGGTCTACAACCTCGCCACCCGCGAG
GACCACATCGCCCCGGCGCAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATTCGTAC
TGTCCGGCTCCGGCCATATTGCCGGCGTGGTCAACCCGCCGGCCGCCGGCAAGTATCAATATTGGACCCG
CGACAGCATCGCGGCTGACAATCTCGAACAATGGCTGCAGGGGGCCGAGGAAAATCCGGGGTCGTGGTGG
CCGGACTGGCGGGCCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTCGCGGCCCGCAACGTCGGCAGCGAGG
CGATGCCGCCGATCGAGGATGCGCCCGGCAGCTATGTGCGAGTCCGCGCCTGA
```

ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/115522030/?from=3292637&to=3294439&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

```
>gi|192288433:c3024368-3022563 Rhodopseudomonas palustris TIE-1, complete genome
ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCCCGCAATCTCG
CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCGCAAAACGGTGCCGTGCCACC
GGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCGAGCGTCGCCAATTACTGGCTA
TCCGACCAGGCCCGTTCTCATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGG
CCTCCAAGCGCCTCGCCGGCGAACAGGCCGAGCCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGCGACAAGCGGTTCGC
CTCACCGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTACCTGCTGACGACGCAGTGG
GCCGACGAACTGGTCAAGAACGCCGAGATCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCCGCGTTCTACGTCCAGC
AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
GGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAGTCAGGCCGCGGCCAT
CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCCGGGCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
GCTGCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCGGACAAGAGCCTCGCCG
ACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCGATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAGCGCCGCCGGGTCCGCGTTACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCG
GCGACCTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCCTACGTC
GTCAATAACTACCTGAAGGGCCAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAAGATCACATCGCGCCGGCGGAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGTGGCGAACAAGTACCTATTCTGGAC
CAACCCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGCGCCGAAGAGCACAAGGGGTCGTGG
TGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAGGTTCCCGCCCGCGCCATCGGCAACG
AAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTCAAAGTGCGATCCTGA
```

ที่มา:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/192288433/?from=3022563&to=3024368&strand=true&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

```
>gi|86747127:3380804-3382609 Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genome
ATGAGCGACATGCTACCAGAAACCAGCACGGCGAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCGCGTAATCTGG
CGCAGGCGATGGAGTGCGGCAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCGAGCGAGCCGATCGACGGTGT
CAAGCCGCCGACCGAACTGACGGAGATCGTCAAGACGCTCACCAGCGTCGCCACCTACTGGATGTCCGAC
CAGACCCGCGCCGCGGAGCTGCAGACGAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCCTCCA
AGAAGCTCGCCGGCGAGACGGCCGTCGCCCCGACCATCGAGCCGCCGGCGCGCGACAAGCGTTTCGCCGA
TCCGGACTGGCGAAAGAACCAGTTCTACGAATTCATCATGCAGGCCTATCTGTTGACCTCGCAATGGGCC
AACGAGCTGGTCGAGAAGGCCGACGGCCTCGACCCGCACACCAAGCGAAAGGCCGCATTCTACATCCAGC
AGATCACCAACGCGATGGCGCCGTCGAACTTCGTGCCGACCAATCCGGAATTGACCCGGCTGACGCTCGA
GAACAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAGATGCTCGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAAGGCCAT
CTCAAGATTCGCCAGTCCGACCCGTCCAATCTGGAAGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAACTGATCCAGTACACGCCCGCGACCGAGACGGTGCTGCGCACGCC
TCTGCTGATCGTGCCGCCATGGATCAACAAGTTCTACATTCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATACTGCGTCGACCAGGGTCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCCGACAAGCGCCTCGCCG
ACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGGCCGCTGACCGCGATGGACGTGATCGAGAAGGTCACCGG
CGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTG
GCCGAGCGCCGCCGCCAGCGCGTCACCTCGGCGACCTTCCTGACCACCCAGGTCGATTTCACCCATGCCG
GCGACCTCAGCGTGTTCGTCGACGAGGGCCAGATCTCGGCGCTGGAGCGCGACATGCAGACGACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAGGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGGTCGAACGACCTGATCTGGTCCTATGTG
GTCAGCAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCCGCCGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCTTACTATCTGCGCAACTGTTATCTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTCGAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAGGACCACATCGCGCCGGCGGAATCCGTGCTGTACGGTTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAATATCAGTACTGGAC
CAGCGAGACCATCCGCGCCGGCTCGGTCGCCGAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGTTCGTGG
TGGCCGGACTGGCGCGAATGGGTCGGCAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCCTGCCCGCGGCATCGGCAACG
AGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCCCCCGGCAGCTACGTCCGGGTGCGATCCTGA
```

ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/86747127/?from=3380804&to=3382609&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

```
>gi|39933080:c2844051-2842246 Rhodopseudomonas palustris CGA009, complete genome
ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCGCCCGCAATCTGG
CGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCGCAGAACGGTGCCGTGCCACC
GGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAGAGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTA
TCCGACCAGGCTCGTTCCAATGAGCTGCAGCAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGG
CCTCCAAGCGGCTCGCCGGCGAACAGGCCGAGCCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTCGC
CTCACCGGAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTATCTGCTGACGACGCAGTGG
GCGGACGAGCTGGTCAAGAACGCCGAGATCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCCGCGTTCTACGTCCAGC
AGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAATCCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGA
GGCCAGCGGCGACAATCTGGTTCGCGGCATGAAGATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCAC
CTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCGGCCGGCCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCC
GCTGCTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCGTTCATC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCGGACAAGAGCCTCGCCG
ACAAGGATTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCGATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAGCGCCGCCGGGTGCGCGTCACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCG
GCGACTTGATGGTGTTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGT
GCTCGAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCCTACGTC
GTCAACAACTACCTGAAGGGACAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGGAATTCCGACGCCACCC
GGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTATCTCGACAACAAGCTGTCCGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAAGACCACATCGCGCCGGCGGAGTCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCG
TGCTGTCCGGCTCCGGTCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAGTACCAATTCTGGAC
CAACCCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGTGCCGAAGAGCACAAGGGGTCGTGG
TGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAAGTTCCCGCCCGCGCCATCGGCAACG
AAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTTAAAGTGCGATCCTGA
```

ที่มา:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/39933080/?from=2842246&to=2844051&strand=true&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

```
>gi|90421528:3061264-3063069 Rhodopseudomonas palustris BisB18, complete genome
ATGAGTGAGATGATCACCGAAACCAAGCCTGCCCCGGGCTTCGACCCCGAGGCTTTCGCGCTCAATCTGG
CGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGGCGCTGGCAACTTATTTAAAGCCGCGTGACAGCGCCGAGCCGCT
CGACAAGCCGCCGGCGGAACTCACCGAAGTGGTGAAGACGCTGTCGGCGGTGGCGAACTACTGGTTGTCC
GACAAGGACCGCGCCACCGAGATCCAGACCAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGATCTGTGGGGCGTCGCGA
TGCGGCGGATGGCCGGCGAAGACGCCGCCGCCGTCATCGAAGTGCCGCCGCGCGACAAGCGCTTCAGCGC
CCCGGAATGGAAGTCCAGCCCGTTGTTCGATTTCCTGGTGCAGGCCTATCTGTTGACCACGCAATGGGCC
TACCAGCTGGTGCGCGACGCCGAAGACATCGACCCGCATACCAAGAAGAAGGCCGAGTTCTACATCCAGC
AGATCACCAACGCGCTGGCACCGTCGAATTTCGTGCTGACCAATCCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGC
CTGCAACGCCGACAATCTGGTGCGCGGCATGACCATGCTGGCCGAGGACATCGCGGCGGGCAACGGCCAG
TTGCGGATCCGGCAGTCCGACCCGGCCAATCTGGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGG
TGATCTTCCAGAACGAATTGATGCAGCTGATCCAATATCAGCCGACCACCGAGAACGTGCTGCGCACGCC
GCTGTTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAAAATCCTTCGTC
AAATGGTGCGTCGACCAGGGCGTCACGGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCCGACAAGAGCCTCGGCC
ACAAGACCTTCGACGACTACATGAAACAGGGTCCGCTGACCGCGATGGACGTCATCGAACAGGTCACCGG
CGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTCGGCGGCACCCTGCTCGCCGCGACGCTGGCCTGGCTC
GCCGAAAAGCGCCGGGTCCGCGTCACCTCGGCGACGCTGCTCACCACCCAGGTGGATTTCACCAATGCCG
GCGATCTCTTGGTGTTCGTCGACGAGGATCAGATCGCCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAGGCCAGCGGCGT
GCTGGAAGGCTCGAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCCTATGTG
GTCAATAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCGTCGGCGTTCGACCTGTTGCACTGGAACTCCGATTCGACGC
GGATGCCGGCGGCGAACCATTCCTATTATTTGCGCAACTGCTATCTCGACAACCGGCTGTCGGCCGGCAC
CATGGTGCTGGACAACACCCTGCTCGACCTTTCCAAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGC
GAGGACCACATCGCGCCGGCGGACTCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACG
TGCTGTCCGGCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGATCAACCCGCCGGCCGCGGGCAAGTATCAATATTGGAC
CAACGAGGCCAGCACGGCGTCGACCGTCGCCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGCTCGTGG
TGGCCGGACTGGCGGCAATGGCTGACCGGCATCGACCCCGAAGAAGTCCCGGCGCGCAGCGTCGGCACCG
AGGCCCTGCCGCCGCTCGAGGATGCGCCGGGCAGCTACGTCCGGGTGCGGGCCTGA
```

ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/90421528/?from=3061264&to=3063069&report=fasta

วันที่สืบค้น : 14 ธันวาคม 2552

ผลการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X

ส่วนที่แสดงเป็น * คือบริเวณ conserve sequence

```
A53             ATGAGTGACATGATCGCCGAACCGCAGGCTGCCCGGAACTTCAATCCAGACGCCTTCGCG 60
BisB18          ATGAGTGAGATGATCACCGAAACCAAGCCTGCCCCGGGCTTCGACCCCGAGGCTTTCGCG 60
TIE-1           ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGACGCGTTCGCC 60
CGA009          ATGACCGACATGCTCGCAGAACCCCAGGCGGCCCCGAAGTTCGATCCTGATGCGTTCGCC 60
HaA2            ATGAGCGACATGCTACCAGAAACCAGCACGGCGAAGAAGTTCGATCCCGAGGCTTTCGCG 60
                ****  ** *** *  * *** *     * **   *   *** * ** ** ** *****

A53             TTGAATTTGGCGAAGGCGATGGAGGCATCCGGCCAGGCGCTCGCCGCCTATCTCAATC-- 118
BisB18          CTCAATCTGGCGCGCGCCATGGAGAACAGCGGCAAGGCGCTGGCAACTTATTTAAAGCCG 120
TIE-1           CGCAATCTCGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG 120
CGA009          CGCAATCTGGCGCAGGCGATGGAGACCGGTAGCCAGGCCTTAGCGACGATGATGAAGTCG 120
HaA2            CGTAATCTGGCGCAGGCGATGGAGTGCGGCAGCCAGGCGCTGGCGACGATGCTGAAGCCG 120
                   *** * ***   ** ******       ** ****  * **  *     * **

A53             -GCAACAAGATCGAGACGCC---CGACAAGCCGCCCCCGGAAATTGCCGAGGTGGTGAAG 174
BisB18          CGTGACAGCGCCGAGCCGCT---CGACAAGCCGCCGGCGGAACTCACCGAAGTGGTGAAG 177
TIE-1           CAAAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG 180
CGA009          CAGAACGGTGCCGTGCCACCGGACGGTCATCCGCCCGCCGGTCTGACCGAAATGGTGAAG 180
HaA2            ---AGCGA-GCCGATCGAC--GGTGTCAAGCCGCCGACCGAACTGACGGAGATCGTCAAG 174
                     *     **     *     *   * *****  * *   *  * **  * ** ***

A53             ACTTTTTCGAGCGTCGCCGAGTACTGGCTGTCGGACCAGAAGCGGGCCGCCGACGTGCAG 234
BisB18          ACGCTGTCGGCGGTGGCGAACTACTGGTTGTCCGACAAGGACCGCGCCACCGAGATCCAG 237
TIE-1           AGCTTCTCGAGCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACCAGGCCCGTTCTCATGAGCTGCAG 240
CGA009          AGCTTCTCCACCGTCGCCAATTACTGGCTATCCGACCAGGCTCGTTCCAATGAGCTGCAG 240
HaA2            ACGCTCACCAGCGTCGCCACCTACTGGATGTCCGACCAGACCCGCGCCGCGGAGCTGCAG 234
                *   *  *    ** **    ****** * ** *** **   **  *    **  * ***

A53             ATGAAGCTCGGAAAATCCTATCTCGATCTGTGGAACCAGGCGACGCGGCGGTTGGCCGGG 294
BisB18          ACCAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGATCTGTGGGGCGTCGCGATGCGGCGGATGGCCGGC 297
TIE-1           CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCTCCAAGCGCCTCGCCGGC 300
CGA009          CAGCGGCTCGGCAAGTCGTATCTCGAACTCTGGGGCGCGGCCTCCAAGCGGCTCGCCGGC 300
HaA2            ACGAAGCTCGGCAAATCCTATCTCGAGCTGTGGGGCAACGCCTCCAAGAAGCTCGCCGGC 294
                     ****** ** ** ******** ** ***  *   **      *    * *****

A53             GAAAAGACCGAA---CCCACCATCGAGCCGCCGGCCCGCGACAAGCGCTTTGCCGATCCG 351
BisB18          GAAGACGCCGCC---GCCGTCATCGAAGTGCCGCCGCGCGACAAGCGCTTCAGCGCCCCG 354
TIE-1           GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTCGCCTCACCG 357
CGA009          GAACAGGCCGAG---CCGGCGATCGCCCCCTCGCCGCGTGACAAGCGGTTCGCCTCACCG 357
HaA2            GAGACGGCCGTCGCCCCGACCATCGAGCCGCCGGCGCGCGACAAGCGTTTCGCCGATCCG 354
                **     ***      *    ****      ** * ** ******** **   *   ***

A53             GAATGGAAGTCGAACCAGTTTTTCGATTTCCTGCTGCAGGCCTATCTCTTGACCACGCAA 411
BisB18          GAATGGAAGTCCAGCCCGTTGTTCGATTTCCTGGTGCAGGCCTATCTGTTGACCACGCAA 414
TIE-1           GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTACCTGCTGACGACGCAG 417
CGA009          GAATGGAAGGCCAACGCGTTCTACGATTTCCTGATGCAGGCCTATCTGCTGACGACGCAG 417
HaA2            GACTGGCGAAAGAACCAGTTCTACGAATTCATCATGCAGGCCTATCTGTTGACCTCGCAA 414
                ** ***      * *  *** * *** *** *  ********** **  ****  ****

A53             TGGGCCCAGGCGCTGGTGCGCGACGCCGAAGGGCTCGATCCGCACACCCGCAAGAAGGCG 471
BisB18          TGGGCCTACCAGCTGGTGCGCGACGCCGAAGACATCGACCCGCATACCAAGAAGAAGGCC 474
TIE-1           TGGGCCGACGAACTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCC 474
CGA009          TGGGCGGACGAGCTGGTCAAGAACGCCGAGA---TCGACCCGCACACCAAGCGCAAGGCC 474
HaA2            TGGGCCAACGAGCTGGTCGAGAAGGCCGACGGCCTCGACCCGCACACCAAGCGAAAGGCC 474
                *****  *    *****     * *****     **** ***** ***      *****

A53             GAGTTCTACGTCCAGCAGATCACCAACGCCTTGGCGCCGTCGAATTTCGTGCTGACCAAT 531
BisB18          GAGTTCTACATCCAGCAGATCACCAACGCGCTGGCACCGTCGAATTTCGTGCTGACCAAT 534
TIE-1           GCGTTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAAT 534
CGA009          GCGTTCTACGTCCAGCAGCTCACCACCGCTTTGGCGCCCTCCAACTTCGTGATGACCAAT 534
HaA2            GCATTCTACATCCAGCAGATCACCAACGCGATGGCGCCGTCGAACTTCGTGCCGACCAAT 534
                *  ****** ******** ****** ***  **** ** ** ** ******  *******

A53             CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTCCAACGGCGACAATCTGGCGCGCGGCATGAAA 591
BisB18          CCGGAGGTGCTGCGCGAGACGCTGGCCTGCAACGCCGACAATCTGGTGCGCGGCATGACC 594
TIE-1           CCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG 594
CGA009          CCGGAGCTGACGCGCCAGACGCTGGAGGCCAGCGGCGACAATCTGGTTCGCGGCATGAAG 594
HaA2            CCGGAATTGACCCGGCTGACGCTCGAGAACAGCGGCGACAATCTGGTGCGCGGCATGAAG 594
                *****  **   **   ****** *    ** ** ***********  **********

A53             ATGCTGGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAGGGCATGCTGAAGATCCGGCAATCCGACCCG 651
BisB18          ATGCTGGCCGAGGACATCGCGGCGGGCAACGGCCAGTTGCGGATCCGGCAGTCCGACCCG 654
TIE-1           ATGCTGGCCGACGACATCCAGTCAGGCCGCGGCCATCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG 654
```

```
CGA009          ATGCTGGCCGACGACATCCAATCCGGCCGCGGCCACCTGAAGATCCGGCAGTCCGATCCG 654
HaA2            ATGCTCGCCGAGGACATCGCCGCCGGCAAAGGCCATCTCAAGATTCGCCAGTCCGACCCG 654
                ***** ***** ******    * ***   ***    *   *** ** ** ***** ***

A53             GGCAATCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACCACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 711
BisB18          GCCAATCTGGAGGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
TIE-1           GCCGGGCTCGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
CGA009          GCCGGCCTTGAGGTCGGCGTCAACATGGCGGTCACCCCGGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
HaA2            TCCAATCTGGAAGTCGGCGTCAACATGGCGACGACGCCCGGCAAGGTGATCTTCCAGAAC 714
                  *   ** ** ******************   ** ** **********************

A53             GAGCTGATGCAGCTCATCCAGTATCACCCGACCACCGAAACCGTGCTGCGCACGCCACTG 771
BisB18          GAATTGATGCAGCTGATCCAATATCAGCCGACCACCGAGAACGTGCTGCGCACGCCGCTG 774
TIE-1           GAAATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCCGCTG 774
CGA009          GAGATCATGCAGCTCATCCAGTATGAGCCCGCCACCGCGACGGTGCAGCGCACGCCGCTG 774
HaA2            GAGATCATGCAACTGATCCAGTACACGCCCGCGACCGAGACGGTGCTGCGCACGCCTCTG 774
                **  * ***** ** ***** **    **  * ****  *  **** ********* ***

A53             CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAATACTACATCCTCGATTTGAAGCCGGAAAAATCC 831
BisB18          TTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTATTACATTCTCGACCTCAAGCCGGAAAAATCC 834
TIE-1           CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGATCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
CGA009          CTGATCGTGCCGCCGTGGATCAACAAGTACTACATTCTCGACCTGAAGCCCGAGAAGTCG 834
HaA2            CTGATCGTGCCGCCATGGATCAACAAGTTCTACATTCTCGATCTCAAGCCCGAGAAGTCG 834
                 ************* *********** *  ***** *****  * ***** ** ** **

A53             TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGGCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCG 891
BisB18          TTCGTCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCGTCACGGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
TIE-1           TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCG 894
CGA009          TTCATCAAATGGTGCGTCGACCAGGGCCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAACCCG 894
HaA2            TTCATCAAATACTGCGTCGACCAGGGTCTCACCGTGTTCGTGATCTCCTGGGTCAATCCC 894
                *** ******  **************  **** ********************** **

A53             GACGAGGCGCTGCGGCACAAATCCTTCGACGACTACATGAAGCAAGGCCCGCTGACCGCG 951
BisB18          GACAAGAGCCTCGGCCACAAGACCTTCGACGACTACATGAAACAGGGTCCGCTGACCGCG 954
TIE-1           GACAAGAGCCTCGCCGACAAGGACTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCG 954
CGA009          GACAAGAGCCTCGCCGACAAGGATTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGCCCGCTGACCGCG 954
HaA2            GACAAGCGCCTCGCCGACAAGAGCTTCGCCGACTACATGAAGCTCGGGCCGCTGACCGCG 954
                *** **   **     ****    **** ************ *  ** ************

A53             ATGGATGTGATCGAAACGATCACCGGCGAGATGAAGGTGCACACGCTCGGCTATTGCGTC 1011
BisB18          ATGGACGTCATCGAACAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTGCACACCATCGGCTACTGCGTC 1014
TIE-1           ATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
CGA009          ATGGACGTCGTCGAGAAGGTCACCGGCGAGATGAAGGTCCACACGCTGGGCTACTGCGTC 1014
HaA2            ATGGACGTGATCGAGAAGGTCACCGGCGAGCTGAAGGTGCACACCATCGGCTATTGCGTC 1014
                ***** **  ****   * *********** ******* *****  * ***** ******

A53             GGCGGCACCCTGCTGGCAACGACGCTGGCGTGGCTGGCCGACAAGCGCCGGGTGCGGGTC 1071
BisB18          GGCGGCACCCTGCTCGCCGCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAAAAGCGCCGGGTCCGCGTC 1074
TIE-1           GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCCGGGTCCGCGTT 1074
CGA009          GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTCGCCGAGCGCCGCCGGGTGCGCGTC 1074
HaA2            GGCGGCACCCTGCTCGCCTCGACGCTGGCCTGGCTGGCCGAGCGCCGCCGCCAGCGCGTC 1074
                ************** **  ********** ***** *****    *****    ** **

A53             ACCTCCGCGACCTTCCTGACCACGCAAGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1131
BisB18          ACCTCGGCGACGCTGCTCACCACCCAGGTGGATTTCACCAATGCCGGCGATCTCTTGGTG 1134
TIE-1           ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACCTGATGGTG 1134
CGA009          ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACGCAGGTCGACTTCACCCATGCCGGCGACTTGATGGTG 1134
HaA2            ACCTCGGCGACCTTCCTGACCACCCAGGTCGATTTCACCCATGCCGGCGACCTCAGCGTG 1134
                ***** *****  * ** ***** ** ** ** ****** **********  *    ***

A53             TTCGTCGACGAGGAGCAGATCGCGGCGCTGGAGCAGGAGATGAAGTCTGTCGGCGTGCTC 1191
BisB18          TTCGTCGACGAGGATCAGATCGCCGCGTTGGAGCGCGAGATGCAGGCCAGCGGCGTGCTG 1194
TIE-1           TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGTGCTC 1194
CGA009          TTCGTCGACGAGGAGCAGATTTCCGCGGTCGAACGCGAGATGAAGGTCACCGGCGTGCTC 1194
HaA2            TTCGTCGACGAGGGCCAGATCTCGGCGCTGGAGCGCGACATGCAGACGACCGGCGTGCTC 1194
                *************  *****  * *** * ** *  ** *** **     *********

A53             GAGGGCTCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCGAACGACCTGATCTGGTCC 1251
BisB18          GAAGGCTCGAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGCTCCAACGACCTGATCTGGTCC 1254
TIE-1           GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
CGA009          GAAGGCGCCAAGATGGCGATGGCCTTCAACATGCTGCGGCCGAACGATCTGATCTGGTCC 1254
HaA2            GAAGGCGCCAGGATGGCGATGGCGTTCAACATGCTGCGGTCGAACGACCTGATCTGGTCC 1254
                ** *** * * ************ **************  * ***** ************

A53             TACGTCGTCAATAACTACCTGAAGGGCAAGTCGCCCTCGCCCTTCGACCTGCTGCACTGG 1311
BisB18          TATGTGGTCAATAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCGTCGGCGTTCGACCTGTTGCACTGG 1314
TIE-1           TACGTCGTCAATAACTACCTGAAGGGCCAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
CGA009          TACGTCGTCAACAACTACCTGAAGGGACAGCCGCCGCAGGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
HaA2            TATGTGGTCAGCAACTATCTGAAGGGCCAGCCGCCCGCCGCGTTCGACCTGCTGCACTGG 1314
                ** ** ****  ***** ********  ** ****     * ********* ********

A53             AATTCCGACTCGACGCGGATGCCGGCGGCCAACCATTCCTATTATCTGCGCAACTGCTAT 1371
BisB18          AACTCCGATTCGACGCGGATGCCGGCGGCGAACCATTCCTATTATTTGCGCAACTGCTAT 1374
TIE-1           AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTAT 1374
```

```
CGA009          AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCCTACTACCTGCGCAACTGCTAT 1374
HaA2            AATTCCGACGCCACCCGGATGCCGGCGGCGAACCACTCTTACTATCTGCGCAACTGTTAT 1374
                ** *****  * ** ************** ***** ** ** **  ********** ***

A53             CTCGACAACCGGCTGTCGGAAGGCAGCATGGTGCTCGATAACACAAGGCTCGACCTCGCC 1431
BisB18          CTCGACAACCGGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCCTGCTCGACCTTTCC 1434
TIE-1           CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC 1434
CGA009          CTCGACAACAAGCTGTCCGCCGGCACCATGGTGCTGGACAACACCACGCTCGACCTCACC 1434
HaA2            CTCGACAACAAGCTGTCGGCCGGCACCATGGTGCTCGACGACACCCCGCTCGATCTGTCG 1434
                *********  ****** *  **** ********* **  ****   ****** **  *
A53             AAGGTCAAGGTGCCGGTCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCCCCGGCGCAG 1491
BisB18          AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAC 1494
TIE-1           AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGATCACATCGCGCCGGCGGAG 1494
CGA009          AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAAGACCACATCGCGCCGGCGGAG 1494
HaA2            AAGGTCAAGGTGCCGATCTACAACCTCGCCACCCGCGAGGACCACATCGCGCCGGCGGAA 1494
                *************** ********************** ** ******** ****** *

A53             TCGGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATTCGTACTGTCCGGCTCC 1551
BisB18          TCCGTGCTGTACGGCTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC 1554
TIE-1           TCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCGTGCTGTCCGGCTCC 1554
CGA009          TCGGTGCTGTACGGCTCGCAGTTCTTCGGCGGTCCGGTGAAATTCGTGCTGTCCGGCTCC 1554
HaA2            TCCGTGCTGTACGGTTCGCAATTCTTCGGCGGCCCGGTGAAATACGTGCTGTCCGGCTCC 1554
                ** *********** ***** *********** ********** *** ************

A53             GGCCATATTGCCGGCGTGGTCAACCCGCCGGCCGCCGGCAAGTATCAATATTGGACCCGC 1611
BisB18          GGCCACATCGCCGGCGTGATCAACCCGCCGGCCGCGGGCAAGTATCAATATTGGACCAAC 1614
TIE-1           GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGTGGCGAACAAGTACCTATTCTGGACCAAC 1614
CGA009          GGTCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAGTACCAATTCTGGACCAAC 1614
HaA2            GGCCACATCGCCGGCGTGATCAATCCGCCGGCGGCGAACAAATATCAGTACTGGACCAGC 1614
                ** ** ** ********* **** *******  **   *** ** *  *  ******  *

A53             GACAGCATCGCGGCTGACAATCTCGAACAATGGCTGCAGGGGGCCGAGGAAAATCCGGGG 1671
BisB18          GAGGCCAGCACGGCGTCGACCGTCGCCGAATGGATCAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGC 1674
TIE-1           CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGCGCCGAAGAGCACAAGGGG 1674
CGA009          CCCGACATCTTCGCCGGCTCGGTCGCCAATTGGCTGAACGGTGCCGAAGAGCACAAGGGG 1674
HaA2            GAGACCATCCGCGCCGGCTCGGTCGCCGAATGGCTGAAGGGCGCGCAGGAGCACAAGGGT 1674
                     ** *   **        ***   * *** *  * ** **  * **  *   ***

A53             TCGTGGTGGCCGGACTGGCGGGCCTGGATCGAAAGCCACGACGCCGAGCAGGTCGCGGCC 1731
BisB18          TCGTGGTGGCCGGACTGGCGGCAATGGCTGACCGGCATCGACCCCGAAGAAGTCCCGGCG 1734
TIE-1           TCGTGGTGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAGGTTCCCGCC 1734
CGA009          TCGTGGTGGCCGGATTGGCGCGCTTGGATCGGCCAGTTCGACGACGAACAAGTTCCCGCC 1734
HaA2            TCGTGGTGGCCGGACTGGCGCGAATGGGTCGGCAGTTTCGATCCCGAACAGGTCCCTGCC 1734
                ************** *****    *** *         ***   ***  * **  * **

A53             CGCAACGTCGGCAGCGAGGCGATGCCGCCGATCGAGGATGCGCCCGGCAGCTATGTGCGA 1791
BisB18          CGCAGCGTCGGCACCGAGGCCCTGCCGCCGCTCGAGGATGCGCCGGGCAGCTACGTCCGG 1794
TIE-1           CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTCAAA 1794
CGA009          CGCGCCATCGGCAACGAAGCCTACCCGCCGCTGGAAGATGCGCCGGGCAGCTACGTTAAA 1794
HaA2            CGCGGCATCGGCAACGAGACCTATCAGCCGATCGAGGACGCCCCCGGCAGCTACGTCCGG 1794
                ***  * ****** ***  *    * **** * ** ** ** ** ******** **

A53               GTCCGCGCCTGA 1803
BisB18            GTGCGGGCCTGA 1806
TIE-1             GTGCGATCCTGA 1806
CGA009            GTGCGATCCTGA 1806
HaA2              GTGCGATCCTGA 1806
                  ** **  *****
```

จากข้อมูลเบื้องต้น นำมาออกแบบ primer ผลที่ได้แสดงดังตารางข้างล่าง

Table 1 primer design of *phaC* gene

Primer Name	Primer Sequence	Tm (°C)	Length (bases)	Product Region	Product Length (bases)
Forward	GGCAAGGTGATCTTCCAGAACG	51.6	22	766 -1304	538
Reverse	CGCAGCATGTTGAASGCCATCG	53.4	22		

การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR **เพื่อเพิ่มปริมาณ** phaC gene **จาก** *Rhodopseudomonas palustris* CH72

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR มีการทดลองใช้อุณหภูมิของ PCR Condition : Steps Temperature Time โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ขั้นตอนของ annealing ได้แก่ 50, 52.5, 55, 60 °C ในช่วงเวลา 30 วินาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ 52.5°C ในช่วงเวลา 30 นาที เนื่องจากที่อุณหภูมินอกเหนือจากนี้ จะไม่พบแถบดีเอนเอภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

Initial denaturing	95.0 °C	5 min	
Denaturing	95.0 °C	2 min …….	
Annealing	52.5 °C	30 sec	35X
Extension	72.0 °C	2 min ……..	
Cool and hold	72.0 °C	10 min	
	8.0 °C	∞	

การวิเคราะห์ phaC gene ที่เพิ่มจำนวน (PCR product) ด้วย Electrophoresis เทียบกับ marker (1 kb ladder)

ชิ้นส่วนของ PCR product ที่ได้ มี 2 ชิ้น ปรากฏบน agarose gel กล่าวคือได้ชิ้นส่วนขนาด 538 bp และขนาดที่ต่ำกว่า 538 bp (Fig. 2)

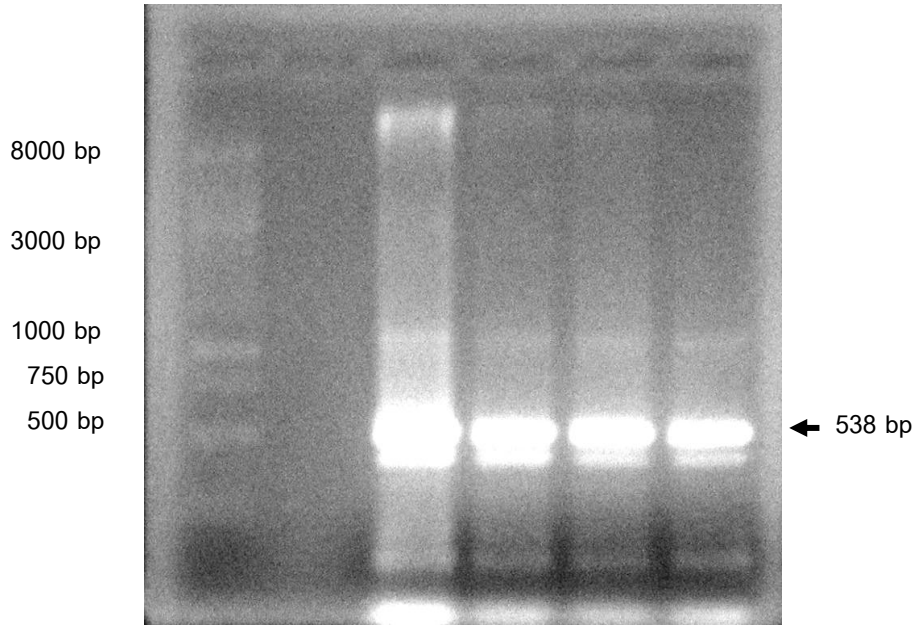

Fig. 2 *phaC* gene amplified by PCR

การทำบริสุทธิ์ PCR product

ภายหลังการทำ agarose gel electrophoresis พบว่าชิ้นส่วนที่แยกได้และภายหลังการทำให้บริสุทธิ์มีขนาด 538 bp โดยไม่มีชิ้นส่วนอื่นปนเปื้อน ดังรูปข้างล่าง (Fig. 3)

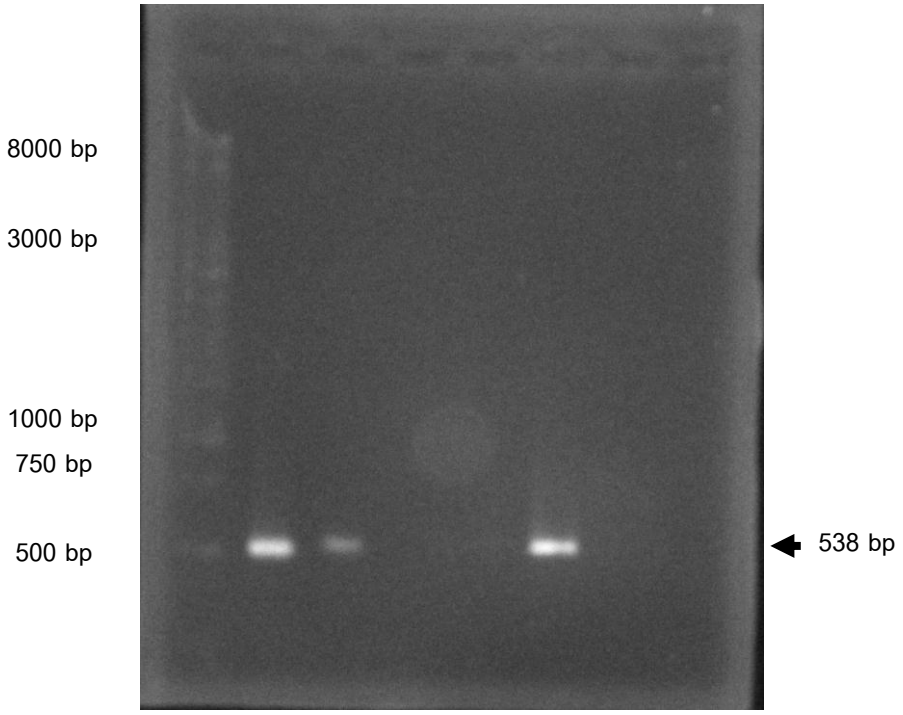

Fig. 3 amplified *phaC* gene after purification by PureLinkTM Quick Gel Extration Kit (Invitrogen)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

พบว่าไม่สามารถอ่านนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวได้ชัดเจน แต่ไม่แน่ใจว่าเกิดจากความผิดพลาดของการทดลองหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองต่อ เพื่อจะตัดชิ้นส่วนภายหลังการ ligation และ transformation มาทดลองซ้ำในขั้นตอนนี้

การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109 ภายหลังการทำ ligation และ transformation

ภายหลังจากการทำ ligation และ transformation ได้ทำการ pick colony ที่เป็นสีขาวทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่หลายโคโลนีที่เจริญ มาแยกเลี้ยงเพื่อสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109 พบว่า ไม่ปรากฏความแตกต่างของชิ้นส่วนของ vectors ทั้งหมดดังกล่าว

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PHA synthase ออกจากเซลล์และการวิเคราะห์ PHA synthase ทำให้ทราบค่ากิจกรรมของ PHA synthase ใน *Rhodopseudomonas palustris* CH72 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองที่สามารถผลิตเม็ดแกรนูลขึ้นภายในเซลล์ได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์ คือการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยใช้ช่วงเวลา 5 นาที โดยให้หยุดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นจึงนำเซลล์แตกเหล่านี้ไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ 4°C เพื่อหาค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ มีค่ากิจกรรมภายหลังการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.111 หรือ 24.57 unit/ml เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งช่วงเวลาที่น้อยกว่า 5 นาทีอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์แตกและขับเอนไซม์ออกมา และที่ช่วงเวลามากกว่า 5 นาที อาจมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังทำการเพิ่มจำนวน PHA synthase gene ด้วยวิธี PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ PHA synthase gene โดยทำการเลือกบริเวณที่ conserve จาก PHA synthase gene (class I) ในแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodopseudomonas palustris* ที่สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวโดยการใช้ chromosomal DNA ของ *Rhodopseudomonas palustris* CH72 เป็น template พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถจับกับ chromosomal DNA ได้โดยมีขนาดประมาณ 538 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับ PCR product ของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แต่อย่างไรก็ตาม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตลอดจนการทำ ligation และ transformation ยังไม่สามารถได้ *E. coli* JM109 ที่มี PHA synthase gene ดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

1. **Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y. and Tsuge, T.** (2006) Altered expression of polyhydroxyalkanoate synthase gene and its effect on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis in recombinant *Escherichia coli*. Polym. Degrade. Stab. 91(8): 1645-1650.
2. **Carlozzi, P. and Sacchi, A.** (2001) Biomass production and studies on *Rhodopseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. J. Biotechnol. 239-249.
3. **Capon, R. J., Dunlop, R. W., Ghisalberti, E. L. and Jefferies, P. R.** (1983) Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria. Phytochemistry. 22, 1181-1184.
4. **Clemente, T., Shah, D., Tran, M., Stark, D., Padgette, S., Dennis, D., Bruckener, K., Steinbuchel, A. and Mitsky, T.** (2000) Sequence of PHA synthase gene from two strains of *Rhodospirillum rubrum* and in vivo substrate specificity of four PHA synthases across two heterologous expression. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(4): 420-429.
5. **Dai, D., and Reusch, R. N.** 2008. Poly-3-hydroxybutyrate synthase from the periplasm of *Escherichia coli*. BBRC. 374: 485-489.
6. **de Philippis, R., Ena, A., Guastiini, M., Sili, C. and Vincenzini, M.** (1992) Factors affecting poly-β-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 103, 187-194.
7. **Eraso, J.M. and Kaplan, S.** (2001) Photoautotrophy Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group/www.els.net.
8. **Esteve, I., Mas, J., Gaju, N. and Guerrero, R.** (1996) Cellular content of storage inclusions in purple sulfur bacteria determined by ultrathin sections. Microbiologia. 12, 563-570.
9. **Freeman, C., Lock, M. A. and Marxsen, J.** (1993) Poly-beta-hydroxyalkanoates and the support of river biofilm metabolism following radical changes in environmental conditions. Hydrobiologia. 271, 159-164.
10. **Fukui, T., Yoshimoto, A., Matsumoto, M., Hosokawa, S., Saito, T., Nishikawa, H. and Tomita, K.** (1976) Enzymatic synthesis of poly-β-hydroxybutyrate in *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol*. **110**: 149-156.

11. **Guerrero, R., Montesinos, E., Pedros-Alio, C., Esteve, I., Mas, J., van Gemerden, H., Hofman, P. A. G. and Bakker, J. F.** (1985) Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish Lakes: vertical distribution and limiting factors. Limnol. Oceanogr. 30, 919-931.
12. **Guezennec, J., Rocchiccioli, F., Maccaron-Gomez, B., Khelifa, N., Dussauze, J. and Rimbault, A.** (1998) Occurrence of 3-hydroxyalkanoic acids in sediments from the Guaymas basin (Gulf of California). FEMS Microbiol. Ecol. 26, 335-344.
13. **Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L. and Dawes, E. A.** (1988) The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 52, 259-264.
14. **Hezayen, F. F., Steinbuchel, A. and Rehm, B. H. A.** (2002) Biochemical and enzymological properties of the polyhydroxybutyrate synthase from the extremely halophilic archaeon strain 56. Arch. Biochem. Biophys. 403, 284-291.
15. **Hustede, E., Steinbuchel, A. and Schlegel, H. G.** (1992) Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodococcus sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrun* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 93, 73-80.
16. **Imhoff, J. F. and Truper, H. G.** (1989) Anoxygenic phototrophic bacteria. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. and Holt, J. G.(Eds.)), Vol. 3, pp. 1678-1682, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
17. **Janes, B., Hollar. J. and Dennis, D.** (1990) Molecular characterization of the poly-hydroxybutyrate biosynthetic pathway of Alcaligenes eutrophus. In: Novel biodegradable microbial polymers (Dawes, E. A. (Ed.)),. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
18. **Jendrossek, D.** (1998) Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. Polym. Degrad. Stab.59, 317-325.
19. **Karr, D. B., Waters, J. K. and Emerich, D. W.** (1983) Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1339-1344.
20. **Kessler, B. and Witholt, B.** (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. J. Biotechnol. 86, 97-104.
21. **Khanna, S. and Srivastava, A. K.** (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem. 40, 607-619.
22. **Kim, B. S., Lee, S. Y. and Chang, H. N.** (1992) Production of poly-β-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 14, 811-816.

23. **Kranz, R. G., Gabbert, K. K., Locke, T. A. and Madigan, M. T.** (1997) Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. Appl. Environ. Microbiol. 63(8) 3003-3009.
24. **Lee, S. Y.** (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. 14, 98-105.
25. **Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K.** (1994a) Production of poly(β-hydroxybutyrate) by recombinant *Escherichia coli*. Ann. NY Acad. Sci. 721, 43-53.
26. **Lee, S. Y., Lee, K. M., Chang, H. N. and Steinbuchel, A.** (1994b) Comparison of *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes. Biotechnol. Bioeng. 44, 1337-1347.
27. **Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N. and Chang, Y. K.** (1994c) Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 32, 203-211.
28. **Lemoigne, M.** (1926) Products of dehydration and of polymerization of hydroxybytyric acid. Bull Soc Chem Biol. 8, 770-782.
29. **Liebergesell, M., Mayer, F. and Steinbuchel, A.** (1993) Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-bioxynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40(2-3), 292-300.
30. **Lopez, N. I., Floccari, M. E., Steinbuchel, A., Garcia, A. F. and Mendez, B. S.** (1995) Effect of poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. FEMS Microbiol. Ecol. 16, 95-102.
31. **Madison, L. L. and Huisman, G. W.** (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Rev. 63, 21-53.
32. **Mahishi, L. H., Tripathi, G. and Rawal, S. K.** (2003) Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant Escherichia coli harbouring Streptomyces aureofaciens PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. Microbiol. Res. 158(1) 19-27.
33. **Mas-Castella, J. and Guerrero, R.** (1995) Poly(β-hydroxyalkanoate) accumulation in bacterioplankton from Lake Ciso (Spain) Can. J. Microbiol. 41(Suppl. 1), 80-83.
34. **Matin, A., Veldhuis, C., Stegeman, V. and Veenhuis, M.** (1979) Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly-β-hydroxybutyric acid and its role in starvation. J. Gen. Microbiol. 112, 349-355.

35. **Mino T., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J.** (1998) "Review : Microbiology andBiochemistry of Enhanced Biological Phosphate Removal Process", Water Research, Vol.32, No.11, 3193-3207.

36. **Mothes, G., Rivera, I. S. and Babel, W.** (1997) Competition between β-ketothiolase and citrate synthase during poly(β-hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*. Arch. Microbiol. 166, 405-410.

37. **Mukhopadhyay, M., Patra, A. and Paul, A. K.** (2005) Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodopseudomonas palustris* SP5212. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 765-769.

38. **Ndoye, I., Debilly, S. F., Vasse, J., Dreyfus, B. and Truchet, G.** (1994) Root nodulation of *Sesbania rostrata*. J. Bacteriol. 176, 1060-1068.

39. **Nicholas, K. B. and Nicholas, H. B.** (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Available from: URL:http://www.psu.edu/biomed/genedoc.

40. **Oda, Y., Meijer, W. G., Gibson, J. L., Gottschal, J. C. and Forney, L. J.** (2004) Analysis of diversity among 3-chlorobenzoate-degrading strains of *Rhodopseudomonas palustris*. Microb. Ecol. 47(1), 68-79.

41. **Pedros-Alio, C., Mas-Castella, J., Mas, J. and Guerrero, R.** (1990) Polyhydroxyalkanoate accumulation in planktonic and anaerobic environments. pp. 263-274. In: Novel biodegradable microbial polymers (Dawes, E. A. (Ed.)). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

42. **Peoples, O. P. and Sinskey, A. J.** (1989) Poly-β- hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). J. Biol. Chem. 264, 15298-15303.

43. **Rehm, B. H. A.** (2003) Polyester synthases: natural catalysis for plastics. Biochem. J. 376, 15-33.

44. **Rehm, B. H. A. and Steinbuchel, A.** (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. Int. J. Biol. Macromol. 25, 3-19.

45. **Rehm, B. H. A. and Steinbuchel, A.** (2001) PHA synthases: key enzymes of PHA biosynthesis. In: Biopolymers (Steinbuchel, A. and Doi, Y. (Eds)) Polyesters I. 3a. pp. 173-215. Wiley-VCH, Weinheim.

46. **Rutkowska, M., Krasowska, K., Heimowska, A. and Kowalczuk, M.** (2003) Degradation of the blends of natural and synthetic copolyesters in different natural environments. Macromol Symp. 197, 421-429.

47. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
48. **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.
49. **Sawayama, S., Hanada, S. and Kamagata, Y.** (2000) Isolation and characterization of phototrophic bacteria growing in lighted upflow anaerobic sludge blanket reactor. J. Biosci. Bioeng. 89 (4), 396-399.
50. **Sawayama, S., Tsukahara, K., Yagishita, T. and Hanada, S.** (2001) Characterization of lighted upflow anaerobic sludge blanket (LUASB) method under sulfate-rich conditions. J. Biosci. Bioeng. 91 (2), 195-201.
51. **Schubert, P., Steinbuchel, A. and Schlegel, H. G.** (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* poly-β -hydroxybutyrate synthetic pathway and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 5837-5847.
52. **Senior, P. J. and Dawes, E. A.** (1971) Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 125, 55-66.
53. **Shiloach, J. and Fass, R.** (2005) Growing *E. coli* to high cell density-a historical perspective on method development. Biotechnol. Adv. 23, 345-357.
54. **Slater, S. C., Voige, W. H. and Dennis, D. E.** (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 170, 4431-4436.
55. **Steinbuchel, A. and Schlegel, H. G.** (1991) Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. Mol. Microbiol. 5, 535-542.
56. **Tanskul, S., Janpet, A. and Talek, A.** (2007) Screening of photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* NCIB 8288 producing polyhydroxybutyrate under microaerobic condition. (in preparation)
57. **van Gemerden, H., Montesinos, E., Mas, J. and Guerrero, R.** (1985) Diel cycle of metabolism of phototrophic purple sulfur bacteria in Lake Ciso (Spain). Limnol. Oceanogr. 30, 932-943.
58. **Wentzel, M.C., Lotter, L.H., Ekama, G.A., Loewenthal, R.E. and Marais, G.v.R.** (1991)
59. Evaluation of biochemical modelsfor biological excess phosphorus removal. Wat. Sci. Tech. 23, 567-581.

60. **Yang, M. –K., Lin, Y. –C and Shen, C. –H.** (2006) Identification of two gene loci involved in poly-beta-hydroxybutyrate production in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. J. Microbiol. Immunol. Infect. 39, 18-27.

61. **Yang, H, S., Yoon, J. S. and Kim, M. N.** (2004) Effects of storage of a mature compost on its potential for biodegradation of plastics. Polymer Degradation and Stability. 84, 411-417.

62. **Zhang, S., Kolvek, S., Goodwin, S. and Lenz, R. W.** (2004) Poly(hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*: Characterization and Reactivity of a Type III PHA Synthase. Biomacromolecules. 5, 40-48.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2551 และ 2553 มา ณ ที่นี้