



การโคลนยีนและศึกษาคุณลักษณะของยีน *tolQ* และ *motA* จากแบคทีเรีย

Zymomonas mobilis

Cloning and Characterization of *tolQ* and *motA* Genes from *Zymomonas mobilis*

ธนวัฒน์ เตื่อประโคน^{1*}, ปรียกมล กลั่นฤทธิ์², สударัตน์ ถนนแก้ว³ และ พรเทพ ถนนแก้ว⁴

Thanawat Teauprakon^{1*}, Preekamol Klanrit², Sudarat Thanonkeo³ and Pornthap Thanonkeo⁴

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹ Graduate student, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University

^{2,4} รองศาสตราจารย์, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

^{2,4} Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University

³ ผู้ช่วยศาสตราจารย์, สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

³ Assistance Professor, Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University

*Corresponding author, E-mail: portha@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การรักษาเสถียรภาพของผนังเซลล์เป็นกลไกสำคัญที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวและดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยกระบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน ในจำนวนยีนเหล่านั้น พบว่า ยีน *motA* และ *tolQ* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญ ในกระบวนการดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อโคลนยีนและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *motA* และ *tolQ* จากแบคทีเรียผลิตเอทานอล *Zymomonas mobilis* จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) ร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค TA cloning และนำพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing ผลการศึกษาพบว่า ยีน *motA* และ *tolQ* มีขนาด 696 และ 711 คู่เบส ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 231 และ 236 กรดอะมิโน และมีค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 25.35 และ 25.32 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากการศึกษาบริเวณจำเพาะของโปรตีนทั้งสองชนิด พบว่า โปรตีนเหล่านี้มีบริเวณจำเพาะหรือโดเมนที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (post-translational modification; PTM) ซึ่งข้อมูลพื้นฐานที่ได้รับจากการวิจัยครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับการออกแบบการทดลอง เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ *Z. mobilis* ให้มีคุณสมบัติที่ต้องการได้ในอนาคต

คำสำคัญ: การโคลนยีน, การผลิตเอทานอล, จุลินทรีย์ทนร้อน



Abstract

Cell wall stability maintenance is a crucial mechanism that helps microorganisms adapt and survive under unfavorable environmental conditions. This process involves multiple genes. Among these genes, *motA* and *tolQ* play significant roles in this process. This research aims to clone and study the genetic characteristics of the *motA* and *tolQ* genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*. The genes were amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with specific primers. The PCR products were then inserted into DNA plasmids using the TA cloning technique, and the recombinant plasmids were analyzed for nucleotide sequences using Sanger sequencing. The results showed that the *motA* and *tolQ* genes are 696 and 711 base pairs in size, which can be translated into 231 and 236 amino acids, with predicted molecular weights of 25.35 and 25.32 kilodaltons, respectively. The study of specific regions of both proteins revealed that these proteins contain specific regions or domains related to post-translational modification (PTM). The basic information obtained from this research will be beneficial for designing experiments to improve *Z. mobilis* strains with desired properties in the future.

Keywords: gene cloning, ethanol production, thermotolerant microorganisms

บทนำ

Zymomonas mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งที่มีส่วนปลายกลมมน ไม่ก่อโรค ไม่สร้างสปอร์ สามารถตัดแยกได้จากน้ำผลไม้หรือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์องุ่น ไวน์พลัม น้ำอ้อย หรือจากไซเดอร์และเบียร์ที่เน่าเสีย (Weir, 2016) *Z. mobilis* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) นอกจากนี้ ยังเป็นหนึ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถและประสิทธิภาพในการผลิตพลังงานชีวภาพอย่างเอทานอล โดยผ่านวิถีเอ็นดี-เนอร์ ดูโดรอฟฟ์ (Entner-Doudoroff pathway) (Braga, Gomes, Rainha, Amorim, Cardoso, Gudiña, Sivéio, Rodrigues, & Rodrigues, 2021) ในการเปลี่ยนโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น *Z. mobilis* จึงเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

ในกระบวนการผลิตหรือการหมักเอทานอลนั้น มีสภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ มากมาย ที่อาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ โดยสภาวะเครียดต่าง ๆ ที่สามารถเกิดขึ้น ได้แก่ อุณหภูมิที่สูง ความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง แรงดันออสโมติก เป็นต้น ซึ่งสภาวะเครียดเหล่านี้ นอกจากจะส่งผลต่อความสามารถในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์แล้ว ยังส่งผลต่อความสามารถในการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ด้วย (Sahana, Balasuramanian, Sebastian, Pappuswamy, Liu, Meyyazhagan, Kamyab, Chelliapan, & Joseph, 2024) ซึ่งผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นจะมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยบางประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ รูปแบบการผลิต สภาวะในการหมัก เป็นต้น อย่างไรก็ตาม



ก็ตามในบรรดาสภาวะเครียดต่าง ๆ นั้น พบว่าสภาวะเครียด เนื่องจากอุณหภูมิสูงจัดได้ว่าเป็นมีความสำคัญ ทั้งนี้ เพราะนอกจากความร้อนที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์แล้ว สภาพแวดล้อมภายนอก โดยเฉพาะอุณหภูมิของสภาพบรรยากาศที่สูงขึ้นในแต่ละปี อันเนื่องมาจากสภาวะโลกร้อน ยังส่งผลให้อุณหภูมิในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นมากด้วยเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ทางโรงงานอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องทำการติดตั้งระบบหล่อเย็นเข้าไปกระบวนการผลิต เพื่อควบคุมสภาวะอุณหภูมิในกระบวนการผลิตให้คงที่และเหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการเพิ่มกระบวนการดังกล่าวทำให้มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ส่งผลให้สูญเสียค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตมากขึ้น ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวและลดต้นทุนการผลิต จึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนความร้อนมาใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนการผลิตลง นอกจากการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนร้อนแล้ว การปรับปรุงหรือการดัดแปลงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น ทนอุณหภูมิสูงได้ดี ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีความสนใจในปัจจุบัน ถึงแม้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์จะมีหลากหลายรูปแบบ เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีหรือรังสี การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ต้องการหรือที่เรียกว่า adaptive laboratory evolution (ALE) หรือวิธีการตัดต่อยีน เป็นต้น ในบรรดาเทคนิคเหล่านี้พบว่าวิธีการตัดต่อยีนถือได้ว่าเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงในการได้มาซึ่งจุลินทรีย์ที่ต้องการ

จากการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนใน *Z. mobilis* TISTR 548 พบว่ากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาเสถียรภาพของผนังเซลล์ (membrane stabilization) มีส่วนสำคัญที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถทนสภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ได้ (Charoensuk, Sukurada, Tokiyama, Murata, Kosaka, Thanonkeo, & Yamada, 2017) หนึ่งในยีนที่มีบทบาทสำคัญและมีการศึกษากันมาก โดยเฉพาะในแบคทีเรีย *Escherichia coli* คือ *tolQ* และ *motA* ซึ่งยีนทั้งสองนี้กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม Tol/pal system ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและการส่งถ่ายพลังงาน รักษาสมดุลและเสถียรภาพของผนังเซลล์แบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความร้อน เป็นต้น (Cascales, Lloubès, & Sturgis, 2001) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีการศึกษาใน *tolQ* และ *motA* ใน *Z. mobilis* มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาถึงการโคลนยีน และศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีน โดยคาดหวังว่าข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยให้เข้าใจบทบาทของยีน *tolQ* และ *motA* ใน *Z. mobilis* เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในการออกแบบเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Z. mobilis* ให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อโคลนยีน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน *tolQ* และยีน *motA* จากแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องและการออกแบบไพรเมอร์



สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tolQ* และ *motA* จากฐานข้อมูล The National center for biotechnology information (NCBI) เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ให้อยู่บริเวณตำแหน่งเริ่มต้นการสังเคราะห์ (Start codon) และตำแหน่งหยุดการสังเคราะห์ (Stop codon) และตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Netprimer จากเว็บไซต์ www.premierbiosoft.com/netprime

2. การเตรียมกล้ำเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 548 และการแยกสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction)

เพาะเลี้ยง *Z. mobilis* TISTR 548 ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในอาหารเหลวสูตร Yeast extract-peptone glucose broth (YPG broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบบไม่เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPG อีกครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและนำไปแยกสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 nucleic acid extraction kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) แล้วนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction: PCR) และการทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ (PCR product purification)

นำดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกสกัดได้จากข้อ 2 และไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 1 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *tolQ* และ *motA* ด้วย UltraRun LongRange (Qiagen, Germany) นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง C1000 Touch™ cycler ของบริษัท Biorad, USA โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด GF-1 Ambiclean kit (PCR & Gel) (Vivantis, Malaysia) แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง BioDrop Duo และนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปใช้ในการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป

ตารางที่ 1 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C) (สำหรับยีน <i>motA</i>)	อุณหภูมิ (°C) (สำหรับยีน <i>tolQ</i>)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	93	93	3 นาที	1
Denaturation	93	93	30 วินาที	34 รอบ
Annealing	53	60	30 วินาที	
Extension	72	72	1 นาที	
Final extension	72	72	1 นาที	



ตารางที่ 1 (ต่อ)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C) (สำหรับยีน <i>motA</i>)	อุณหภูมิ (°C) (สำหรับยีน <i>tolQ</i>)	เวลา	จำนวนรอบ
Final hold	12	12	จนกว่าจะนำหลอด ออกจากเครื่อง	Final hold

4. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจกับดีเอ็นเอพาหะ และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (bacterial transformation)

ทำการโคลนนิ่งโดยอาศัยหลักการ TA cloning โดยการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มี A-overhang ที่ปลาย 3' ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM® -T easy vector (Promega Corporation, USA) ที่มี T-overhang ที่ปลาย 3' โดยการเติมสารละลายลงในหลอดไมโครทิวป์ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α และบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไป heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-50 วินาที และนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร LB broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5. การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีนที่สนใจ (screening of recombinants) และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing)

ทำการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีนที่สนใจโดยใช้อาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG ร่วมกับเทคนิค PCR (colony screening by PCR) โดยการนำโคลนีที่เกิดขึ้นบน master plate มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ USB® Taq PCR Master Mix (2X) (Affymetrix, USA) หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนที่สนใจแล้ว นำเซลล์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB และทำการแยกสกัดพลาสมิด ดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

ผลการวิจัย

1. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ

จากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *motA* และ *tolQ* ในฐานข้อมูล NCBI พบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวในแบคทีเรีย *Z. mobilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *Z. mobilis* ATCC

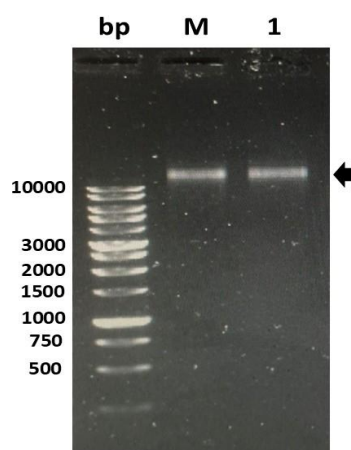
29191, ATCC 10988 และ CP4 เป็นต้น จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยกำหนดตำแหน่งของไพรเมอร์ให้อยู่บริเวณตำแหน่งเริ่มต้น และตำแหน่งหยุดการสังเคราะห์ จากนั้น ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Netprimer พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง คุณสมบัติของไพรเมอร์ และขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ชื่อยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (base)	อุณหภูมิ T_m (°C)	ขนาด (bp)
<i>motA</i>	MTE1-F	5'ATGTATCTTCTGACGTCAGTTAGTC'3	25	57.2	696
	MTE1-R	5'TTAGTCCTCTATTATACTGGTTTTG'3	25	53.0	
<i>tolQ</i>	MTE2-F	5'ATGCCTTCTTTGGAAATGTCCGGCA'3	25	65.6	711
	MTE2-R	5'TCAGTGGCGAGCGTCCATGGC'3	21	69.7	

2. การแยกสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction) จาก *Z. mobilis* TISTR 548

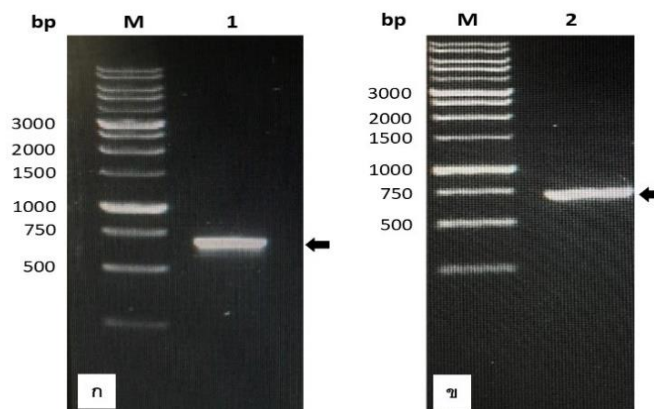
จากการแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 548 และตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่มากกว่า 10,000 คู่เบส (ภาพที่ 1) โดยไม่ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอนอกจากนี้แล้ว จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 พบว่า มีค่าสัดส่วนอยู่ที่ 1.80 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ในครั้งนี้ มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้



ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis M คือ 1 Kb DNA ladder ; 1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ตำแหน่งลูกศร คือ ตำแหน่งของดีเอ็นเอบนเจล

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่สนใจด้วยเทคนิค PCR และการทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะและสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 2 และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่ายีน *motA* และ *tolQ* มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *motA* (ก) และ *tolQ* (ข) ของแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis M คือ 1 Kb DNA ladder ; 1 และ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *motA* และ *tolQ* ตำแหน่งลูกศร แสดงตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอของยีน

4. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *motA* และ *tolQ*

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *motA* และ *tolQ* ด้วยวิธี Sanger sequencing พบว่ายีน *motA* มีขนาด 696 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 231 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3) และมีค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 25.35 กิโลดาลตัน ในขณะที่ *tolQ* มีขนาด 711 คู่เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 236 กรดอะมิโน มีค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 25.32 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งโดเมนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (post-translational modification; PTM) (ภาพที่ 4) ซึ่งช่วยในการรักษาโครงสร้างของโปรตีน โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างหรือการทำงานของโปรตีน เพื่อให้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *motA* และ *tolQ* ใน *Z. mobilis* TISTR 548 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 98-100% กับยีน *motA* และ *tolQ* ในแบคทีเรีย *Z. mobilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

```

atg tat ctt ctg acg tca gtt agt cat ttt ttt gac gcc gcc gcc ttt ctg ctg gtg ctt
M Y L L T S V S H F F D A A A F L L V L
gtg gga agt ttt ctt att gcc cta ttc cga tca aca gcg gct gac att ctg cgg gca ttt
V G S F L I A L F R S T A A D I L R A F
aaa gcc ttc cag cct tta ctg acg gcc aag cca gaa cat gat ggc gaa gtt gcc gat cgg
K A F Q P L L T A K P E H D G E V A D R
gca ttg cag gcg gta tta cag caa acc aag gca aaa ggt atc gcg acc gct gat cgg ata
A L Q A V L Q Q T K A K G I A T A D R I
gat att act ttt gcg cct ctc ttt tta caa aag gcg gta ggt cgg ctg act gat tgc cgt
D I T F A P L F L Q K A V G R L T D C R
gac cct gat gat ttc cgg caa tgg ata acg gga caa ttg gaa aaa cgg aag aat cgg cat
D P D D F R Q W I T G Q L E K R K N R H
caa ggg gca atc aat ttt tgg tat atc gtg ggt gat gtt gcc ccc tct gtc gcc atg att
Q G A I N F W Y I V G D V A P S V A M I
ggg acg gtt gtc ggg ttg gtc aac atg ttt tcc cat cta agc gac gtc aac agt ctg ggg
G T V V G L V N M F S H L S D V N S L G
cct tct atg gcg atg gct att tta acc acg ctt tat ggc tta tgc ctt tca acc ttg att
P S M A M A I L T T L Y G L C L S T L I
gct gcc ccg atc gcc gga cgg ttg gaa tat cta tgc gac atg gaa ggg caa tgg tgg aca
A A P I A G R L E Y L S D M E G Q W W T
aga gtg gcg gac act ctg att tct tct gtt aca gat gaa ttg aag ccg ccg gtt atc aaa
R V A D T L I S S V T D E L K P P V I K
ctg ccc ccc gtc aaa acc agt ata ata gag gac taa
L P P V K T S I I E D -

```

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และตำแหน่งโดเมนของยีน *motA* ในแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยตำแหน่งของโดเมนอยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม

```

atg cct tct ttg gaa atg tcc ggc aat gcc gat ttg gcg agt tct gtt cta tgc ccg gtg
M P S L E M S G N A D L A S S V L S P V
acg tta ttt ctt cat gcc gat atg gtt ggc cgt ttg gtc atg ata ttg ttg ctt tgc gcc
T L F L H A D M V G R L V M I L L L C A
agt ata ggc agt tgg gcg ctt att ttc ggg cag ttt ttc cgt tcc tct gct gct aat cgg
S I G S W A L I F G Q F F R S S A A N R
gca agc cgt aat ttt gaa aaa gcc tat agc aaa gcc gaa tca atg ggt gag ctg gag cgc
A S R N F E K A Y S K A E S M G E L E R
ttt tat gat cgc tat ttc ggt agc aat gat cct tct gcc cgt atc ttt ctg gct ggg atg
F Y D R Y F G S N D P S A R I F L A G M
cag acc gcc aaa tgc gct gga aaa gtc att gac cat gaa ggg gag cgt gat cgc ctt tct
Q T A K S A G K V I D H E G E R D R L S
tta tcc ctt gag gat gct gtt gcg gca gcg gtt gag gat atg tct tcc ccg ttg agt agt
L S L E D A V A A A V E D M S S P L S S
ctg gca acg att gga tct gtc tct ccc ttt gtg ggg ttg ggg acg gtt tgg ggc att
L A T I G S V S P F V G L F G T V W G I
atg cat agt ttt agc cag att gcc gca ggc gga aat acc gcc atg gcg att gtg ggc ccc
M H S F S Q I A A G G N T A M A I V G P
ggg att gct gaa gcg ctt ttc tca acg gca ttg ggg ctg ttc gca gct att ccg gcg agc
G I A E A L F S T A L G L F A A I P A S
atc gcc tat aac ccg atg tgc cat acc att ggg cat ttt gaa tgc cgc ctg acc cgt ttt
I A Y N R M S H T I G H F E S R L T R F
tot gac cgc atc tat atc acc tta agc cgc gcc atg gac gct cgc cac tga
S D R I Y I T L S R A M D A R H -

```

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และตำแหน่งโดเมนของยีน *tolQ* ในแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยตำแหน่งของโดเมนอยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม



ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความเหมือนของยีน *motA* และ *tolQ* ในแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 เมื่อเทียบกับยีนดังกล่าวในฐานข้อมูลพันธุกรรม

Organism	<i>motA</i>		<i>tolQ</i>	
	Identity (%)	Query Coverage (%)	Identity (%)	Query Coverage (%)
<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	100	100	100	100
<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	98.56	100	99.02	100
<i>Z. mobilis</i> ATCC 31821	97.70	100	98.87	100
<i>Z. mobilis</i> CP4	98.13	100	98.87	100
<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	97.84	100	98.73	100

สรุปและอภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ ได้มุ่งเน้นการโคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tolQ* และ *motA* จากแบคทีเรียผลิตเอทานอล *Z. mobilis* TISTR 548 ซึ่งทั้งสองยีนเกี่ยวข้องกับกลไกการรักษาเสถียรภาพของผนังเซลล์ และการเคลื่อนไหวของเซลล์ ผ่านการใช้พลังงานจาก proton motive force (PMF) ในระบบ Tol-Pal และ MotA/TolQ/ExbB complex ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* (Ratliff, Buchanan, & Celia, 2021) โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค TA cloning และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) หลังจากเพิ่มปริมาณยีนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing พบว่า ยีน *motA* และ *tolQ* มีขนาด 696 และ 711 คู่เบส ตามลำดับ สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 231 และ 236 กรดอะมิโน โดยมีค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 25.35 และ 25.32 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งหากเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *motA* และ *tolQ* ในแบคทีเรีย *Z. mobilis* กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่า มีขนาดที่แตกต่างกัน จากการรายงานของ Blattner (1997) พบขนาดของทั้งสองยีนใน *E. coli* K-12 มีขนาด 888 และ 693 คู่เบส ในทางเดียวกันจากรายงานของ Dennis, Lafontaine, & Sokol (1996) และ Doyle, Hawkins, & McCarter (2004) พบขนาดของทั้งสองยีนใน *P. aeruginosa* PAO1 มีขนาด 852 และ 693 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนและมีค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยความแตกต่างของขนาดโปรตีนนี้อาจสะท้อนให้เห็นถึงการปรับตัวของแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน รวมถึงความแตกต่างของระบบเมแทบอลิซึมและโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

จากการวิเคราะห์โดเมนของโปรตีน พบว่า มีตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (post-translational modification; PTM) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nisar, Gongye, Huang, Khan,



Chen, Wu, & He (2021) ที่พบโดเมนของโปรตีนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัสโดยเฉพาะกระบวนการเติมหมู่ acetyl group (acetylation) ให้กับโปรตีนในแบคทีเรีย *Z. mobilis* ZM4 ซึ่งมีผลต่อการทำงานของโปรตีนในสภาวะต่าง ๆ นอกจากนี้การมีอยู่ของยีน *motA* และ *tolQ* ใน *Z. mobilis* มีความจำเป็นต่อการรักษาความแข็งแรงของโครงสร้างของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อสภาวะความเครียดต่าง ๆ ได้ เช่น ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้น จากการรายงานของ Asefi, Nouri, H., Pourmohammadi, & Moghimi (2024) พบว่า เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลสูง *Z. mobilis* มีการแสดงออกของโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโครงสร้างเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของ *motA* และ *tolQ* ในการรักษาเสถียรภาพของผนังเซลล์ นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างของระบบ MotA/TolQ/ExbB complex ในแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่า โปรตีนเหล่านี้มีลักษณะโครงสร้าง และกลไกการใช้พลังงานที่คล้ายคลึงกัน (Lai, Ridone, Peralta, Tanaka, & Baker, 2019) ดังนั้นข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน *motA* และ *tolQ* ใน *Z. mobilis* จากการวิจัยในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ *Z. mobilis* ให้มีความสามารถและคุณสมบัติที่ต้องการได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาในครั้งนี้ เป็นเพียงส่วนหนึ่งในการศึกษาการโคลนยีนและคุณลักษณะของโปรตีน อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือใน *Zymomonas mobilis* เพื่อให้เข้าใจกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีน และบทบาทของโปรตีนภายใต้สภาวะเครียดต่าง ๆ มากยิ่งขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสำหรับการนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ

เอกสารอ้างอิง

- Blattner, F. R. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Braga, A., Gomes, D., Rainha, J., Amorim, C., Cardoso, B. B., Gudiña, E. J., Silvério, S. C., Rodrigues, J. L., & Rodrigues, L. R. (2021). *Zymomonas mobilis* as an emerging biotechnological chassis for the production of industrially relevant compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00483-2>
- Cascales, E., Lloubès, R., & Sturgis, J. N. (2001). The TolQ–TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA–MotB. *Molecular Microbiology*, 42(3), 795–807. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02673.x>



- Charoensuk, K., Sakurada, T., Tokiyama, A., Murata, M., Kosaka, T., Thanonkeo, P., & Yamada, M. (2017). Thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in thermotolerant ethanologenic *Zymomonas mobilis* TISTR 548. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0891-0>
- Dennis, J. J., Lafontaine, E. R., & Sokol, P. A. (1996). Identification and characterization of the tolQRA genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7059–7068. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7059-7068.1996>
- Doyle, T. B., Hawkins, A. C., & McCarter, L. L. (2004). The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6341–6350. <https://doi.org/10.1128/jb.186.19.6341-6350.2004>
- Lai, Y.-W., Ridone, P., Peralta, G., Tanaka, M. M., & Baker, M. A. B. (2019). Evolution of the stator elements of rotary prokaryote motors. *Journal of Bacteriology*, 202(3), 12. <https://doi.org/10.1128/jb.00557-19>
- Nisar, A., Gongye, X., Huang, Y., Khan, S., Chen, M., Wu, B., & He, M. (2021). Genome-wide analyses of proteome and acetylome in *Zymomonas mobilis* under N₂-fixing condition. *Frontiers in Microbiology*, 12, 740555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740555>
- Ratliff, A. C., Buchanan, S. K., & Celia, H. (2021). Ton motor complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 67, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.09.014>
- Sahana, G. R., Balasubramanian, B., Sebastian, J. K., Pappuswamy, M., Liu, W.-C., Meyyazhagan, A., Kamyab, H., Chelliapan, S., & Joseph, B. V. (2024). A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: Current knowledge in biotechnological applications and future directions. *Process Biochemistry*, 138, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.12.024>
- Asefi, S., Nouri, H., Pourmohammadi, G., & Moghimi, H. (2024). Comprehensive network of stress-induced responses in *Zymomonas mobilis* during bioethanol production: from physiological and molecular responses to the effects of system metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02459-1>
- Weir, P. M. (2016). The ecology of *Zymomonas*: a review. *Folia Microbiologica*, 61(5), 385–392. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0447-x>