

บทคัดย่อ

เนื่องจากปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีทางด้านอณูพันธุศาสตร์มาใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านการผลิตเภสัชภัณฑ์ เช่น การผลิตวัคซีน และฮอร์โมนชนิดต่างๆ รวมทั้งในด้านการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค โดยใช้ DNA probe เป็นต้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียม DNA probe สำหรับตรวจสอบหาเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในเภสัชภัณฑ์ โดยนำ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน มาสกัดแยกเอา chromosomal DNA แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ให้ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 3-20 kb แล้วนำไปเชื่อมกับ plasmid

vector pBlue Script KS II ที่ถูกตัดแล้ว โดยใช้เอนไซม์ T_4 DNA ligase จากนั้นนำ

recombinant plasmid ที่ได้เข้าเซลล์ *E. coli* DH 5 α โดยการ transformation เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนของ recombinant plasmid เป็น DNA library คัดเลือก clones โดยอาศัยคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะ และหลักการ Blue - White selection บน LB agar ผสม ampicillin 100 μ g/ml และ X - gal ได้จำนวน 140 clones

ซึ่งน่าจะทำการ screen ว่า clone ใดใน DNA library ของเราที่มีความสามารถจับกับ genomic DNA ของ *P. aeruginosa* ได้ดี เพื่อทำการคัดเลือก clones เหล่านี้ เพื่อนำไปพัฒนาให้ได้เป็น DNA probe ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อไป

ABSTRACT

In present , various technologies in Molecular Biology have been used widely in many applications , not only in manufacturing of some pharmaceutical product such as hormones and vaccines , but also in identification of pathogen by using a DNA probe . The objective of this special project is to produce a DNA probe for detection of *P. aeruginosa* in pharmaceutical products . The first step of this experiment process was extraction and purification of *P. aeruginosa*'s genomic DNA . Subsequently , DNA were partially digested by restriction enzyme to generate numerous DNA fragments at appropriate size (approximately 3 – 20 kb) . The further step was to set up ligation reactions between DNA fragments and plasmid vector , pBlue Script KS II , which had already been cut , in presence of enzyme T₄ DNA ligase . The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH 5 α . After that 140 colonies of the transformants which were grown on LB agar containing Ampicillin and X – gal were selected by using their antibiotic resistance activity and Blue – White selection principle . The transformants were picked and transferred to LB agar containing tetracycline /or chloramphenicol for detection their drug resistant properties . It appeared to be that

nine clones resisted to chloramphenicol , nine clones resist to tetracycline .

Nine clones were picked at random to extract plasmid DNA and demonstrated the recombinant DNA by agarose gel electrophoresis .

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงการพิเศษครั้งนี้ สำเร็จลงได้จนถึงจุดนี้ ก็โดยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของหลายบุคคล และหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้จัดทำจึงมีความประสงค์ที่จะกล่าวแสดงความขอบคุณแก่บุคคลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ขอขอบคุณท่านรศ. ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้ สำหรับคำสั่งสอนที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาที่ช่วยทำให้สามารถผ่านปัญหาเหล่านั้นได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ นาย อภินันท์ สิริรัตนาร นักศึกษาปริญญาโทปีที่ 3 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำที่มีประโยชน์ การถ่ายทอดความรู้และเทคนิคต่างๆ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้านอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดจนเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการจัดทำโครงการพิเศษนี้ จนสำเร็จไปได้ด้วยดี