

การตรวจหายีน *phaC* จาก metagenomic DNA  
โดยวิธี PCR

นางสาวศศิณีย์ วันเย็น  
นายศุภกิตต์ บรรจงศักดิ์ดา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2558

DETECTION OF *PHAC* FROM  
METAGENOMIC DNA BY PCR METHOD

MISS SASINAREE WANYEN  
MR. SUPAKIT BANJONGSAKDA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY  
FACULTY OF PHARMACY  
MAHIDOL UNIVERSITY

2015

โครงการพิเศษ  
เรื่อง การตรวจหายีน *phaC* จาก metagenomic DNA  
โดยวิธี PCR

.....  
(นางสาวศศิณีร์ย์ วันเย็น)

.....  
(นายศุภกิตต์ บรรจงศักดิ์ดา)

.....  
(อ.ดร.มนตรี ยะสาวงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....  
(อ.ดร.คณิตส์ เสี่ยมสุนทร)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

### การตรวจหายีน *phaC* จาก metagenomic DNA โดยวิธี PCR

ศศิธรีย์ วันเย็น, ศุภกิตต์ บรรจงศักดิ์ดา

อาจารย์ที่ปรึกษา : มนต์รี ยะสาวงษ์, คณิสส์ เสงี่ยมสุนทร

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : *phaC*, PHA, bioplastic, PCR

เอนไซม์ PHA synthase class IV เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสร้างสาร polyhydroxyalkanoates (PHAs) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมการสังเคราะห์ด้วยยีน *phaC* โดยแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ PHA synthase class IV สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เช่น *B. megaterium* และ *B. cereus* ที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหายีน *phaC* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกได้จากดินแหล่งต่างๆ ขึ้นตอนการศึกษาเริ่มจากการคัดเลือกตัวอย่างดิน ได้แก่ ดินจากนาเกลือ จังหวัดจันทบุรี, ดินจาก solar lake (Inner Mongolia), ดินจากศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี, ดินจากวนอุทยานภูลังกา และดินจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นำตัวอย่างดินที่ได้มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Powersoil® DNA isolation kit หลังจากนั้นจึงนำ metagenomic DNA ที่แยกได้ มาตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *phaC* ซึ่งออกแบบจากตำแหน่งที่อนุรักษ์ (conserved region) ของยีน *phaC* (PHA synthase class IV) ของแบคทีเรียกลุ่ม bacillus สายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHAs ได้ และใช้ *B. megaterium* เป็น positive control แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่า มีเพียงตัวอย่างดินจาก วนอุทยานภูลังกา (จังหวัดพะเยา) และดินจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลเท่านั้นที่ตรวจพบยีน *phaC* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตัวอย่างดินจากวนอุทยานภูลังกา และดินจากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นตัวอย่างดินที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการสร้างพลาสติกชีวภาพอาศัยอยู่

**Abstract**  
**Detection of *phaC* from metagenomic DNA**  
**By PCR method**

Sasinaree Wanyen, Supakit Banjongsakda

**Project advisor :** Montri Yasawong, Khanit Sa-ngiamsuntorn

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Keyword :** *phaC*, PHA, bioplastic, PCR

Class IV PHA synthases are one of the key enzymes for polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis which are encoded by *phaC* gene. This gene can be found in some bacteria which are typically composed of *Bacillus* species such as *B. cereus* and *B. megaterium*. *Bacillus* species are ubiquitous organisms that can be generally isolated from normal soil. The major objective of this study was to investigate the *phaC* gene from soil-derived metagenomic DNA. The beginning of this study was to select the source of soil sample by gathering from salt-farm (Chanthaburi), solar lake sediment (Inner Mongolia), mangrove sediment (Chonburi), garden soil of Phulangka (Phayao) and soil from botany garden (Faculty of Pharmacy, Mahidol University). DNA was extracted from samples by using Powersoil<sup>®</sup> DNA isolation kit. The metagenomic DNA was amplified by PCR technique by *phaC* gene specific primers, which were designed from conserve region of *phaC* (Class IV PHA synthases) of PHA-producing *bacillus* strains, and *B. megaterium* serve as positive control. PCR productions were investigated by agarose gel electrophoresis. The results showed that there are only 2 soil samples positive for *phaC* gene, and these samples have highly possibility to be isolated PHA-producing *bacillus* strains.