รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษายีนจำเพาะของ *Vibrio cholerae* El Tor biotype

ผศ. ดร. พรพรรณ ดีระพัฒน์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ สิงหาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG4980151

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษายีนจำเพาะของ *Vibrio cholerae* El Tor biotype

พรพรรณ ดีระพัฒน์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย รหัสโครงการ MRG4980151

ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภา สังกัดคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาเป็นนักวิจัยที่ปรึกษาที่ให้การสนับสนุน ส่งเสริม และให้คำแนะนำที่ดีทำให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปได้อย่างราบรื่น นอกจากนี้ยังเป็นแบบอย่างของนักวิจัยที่ดี มีวินัย มุ่งมั่น ขยัน และอดทน

ขอขอบคุณ Professor John J Mekalanos แห่งมหาวิทยาลัย Harvard, Boston, MA. ที่กรุณาให้การฝึกอบรมเทคนิคต่าง ๆในระดับโมเลกุล สนับสนุนเงินทุนวิจัยและเอื้อเฟื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ N16961 และ พลาสมิด pWM91 ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวณัฐภัสสร ศรีคง เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ช่วยเหลือจัดการงานพัสดุ จัดซื้อ จัดจ้าง ในโครงการวิจัย และนางสาวสุนิสา คำบุญศรี เจ้าหน้าที่พิมพ์ผลงานวิจัยและจัดทำบัญชีโครงการวิจัย ขอขอบคุณคุณบุปผา เนียมหอม คุณพูนสุข ศรีวรรัตน์ และคุณสืบพงศ์ นิรันดร์พันธ์ ที่ช่วยเหลือทำความสะอาดและนึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ อบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ ที่ช่วยเหลือและสนับสนุนให้งานวิจัยชิ้นนี้ลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณบุพการีผู้ให้กำเนิด อบรมเลี้ยงดูและเป็นกำลังใจตลอดมาจนโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พรพรรณ ดีระพัฒน์

Abstract

Project Code : MRG4980151

Project Title : A study of *Vibrio cholerae* El Tor biotype-specific genes

Investigator: Pornphan Diraphat
Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University
Professor Wanpen Chaicumpa
Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University

E-mail Address: phpdr@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, exhibits two distinctive lifestyles, one inside the milieu of the human intestine and the other in the aquatic environment. The factors that enhance the adaptation of *V. cholerae* to the changing parameters of its ecological niche are critical to its survival and chance to cause epidemics and pandemics. *V. cholerae* O1, the serogroup that associated with epidemics and pandemics, exist in two biotypes: classical and El Tor. The El Tor biotype undoubtedly evolved as better survivors in the aquatic environment and currently is prevailing strains of *V. cholerae* O1. The factors that led to the overwhelming of the El Tor biotype are not clearly known but believed to be differences in their environmental fitness. Comparative genomic microarray analysis of *V. cholerae* revealed a group of genes *i.e.* VCA0728-VCA0730 on the bacterial small chromosome specifically presented in O1 El Tor and O139 strains. Computational analysis of these 3 hypothetical protein sequences suggested that they belong to the same operon and working in concert to verify the successful transmission of the newly replicated chromosome during cell division. They also function in a range of chromosomal stability, including recombination, DNA repair and silencing of gene expression. To verify, we constructed 3 deletion mutants (ΔVCA0728, ΔVCA0729, and ΔVCA0730) from *V. cholerae* El Tor N16961 and compared the expression profiles to the parent strain by modified representational difference analysis. The differential expressed genes were clustered in the functional groups involved in DNA replication initiation, recombination, DNA repair and transcriptional regulation. The results agreed with the computational analysis, so we proposed here that the VCA0728, VCA0729 and VCA0730 functioned in chromosomal segregation during cell division, homologous recombination, DNA repair and transcription regulation.

Keywords : *Vibrio cholerae*, El Tor biotype, survival, DNA repair

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG4980151

ชื่อโครงการ โครงการการศึกษายีนจำเพาะของ *Vibrio cholerae* El Tor biotype

ชื่อนักวิจัย นางสาวพรพรรณ ดีระพัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภา

คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : phpdr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

Vibrio cholerae ซึ่งเป็นสาเหตุของอหิวาตกโรคสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในลำไส้ของมนุษย์และในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ปัจจัยที่ช่วยในการปรับตัวเพื่อรับการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมรอบตัวของเชื้อเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอดและมีโอกาสที่จะก่อให้เกิดการระบาดของโรค *V. cholerae* O1 ซึ่งเป็น serogroup ที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกจำแนกได้เป็น 2 biotypes คือ classical และ El Tor โดย El Tor biotype มีวิวัฒนาการในการปรับตัวที่ดีจนสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และปัจจุบันกลายเป็นสายพันธุ์หลักของ *V. cholerae* O1 สาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้ El Tor biotype กลายเป็นสายพันธุ์หลักยังไม่ทราบแน่นอนแต่เชื่อกันว่าเกิดจากความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม จากการวิเคราะห์จีโนมของ *V. cholerae* ด้วยวิธี microarray แสดงให้เห็นว่ากลุ่มของยีน VCA0728-VCA0730 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเล็กพบได้เฉพาะใน O1 El Tor และ O139 เท่านั้น จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ทั้งสามนี้ด้วยคอมพิวเตอร์ทำให้เชื่อว่ายีนทั้งสามน่าจะอยู่ในโอเปอรอนเดียวกัน และทำงานร่วมกันในการส่งถ่ายโครโมโซมที่เพิ่งเพิ่มจำนวนให้เซลล์ลูกในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการคงความเสถียรของโครโมโซม ซึ่งหน้าที่นี้รวมถึง recombination, DNA repair และการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น คณะผู้วิจัยได้สร้าง mutants ของ *V. cholerae* El Tor N16961 ขึ้นมา 3 ตัวคือ ΔVCA0728, ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่าง mutants และสายพันธุ์ตั้งต้นโดยวิธี modified representational difference analysis เพื่อพิสูจน์ผลของการทำนายหน้าที่ ผลที่ได้พบว่ายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันกระจุกอยู่ในกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ recombination, DNA repair และการควบคุมการแสดงออกของยีน ผลที่ได้นัยว่าไปด้วยกันกับการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ คณะผู้วิจัยจึงขอนำเสนอว่า VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 ทำหน้าที่จัดแบ่งโครโมโซมในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว, homologous recombination, DNA repair และควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น

คำหลัก: *Vibrio cholerae*, El Tor biotype, survival, DNA repair

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการดำเนินการเตรียม manuscript เพื่อส่งผลงานตีพิมพ์ในารสารวิชาการนานาชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
   - เชิงวิชาการ ได้นำความรู้และเทคนิคต่างๆที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดต่อไป รวมทั้งใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอนและงานวิจัยของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

บทนำ

อหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง จัดเป็นโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ (1) ที่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของไทย และประเทศต่างๆทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งมีระบบสุขาภิบาลที่ยังไม่ดีพอ ในแต่ละปีมีคนตายเนื่องจากอหิวาตกโรคถึง 120,000 ราย โดยส่วนใหญ่เป็นเด็ก (1, 2) อหิวาตกโรคจัดเป็นโรคที่ต้องเฝ้าระวังในระบบการรายงานของกระทรวงสาธารณสุข ภายหลังจากเริ่มโครงการประกันสุขภาพทั่วหน้าของกระทรวงสาธารณสุข แนวโน้มการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการในหลายโรคลดลง เนื่องจากปัญหาค่าใช้จ่ายในการตรวจ จึงอาจมีผลต่อการรายงานโรค ทำให้จำนวนผู้ป่วยอาจน้อยกว่าความเป็นจริง (3) แนวโน้มการระบาดของอหิวาตกโรคในประเทศไทยมีลักษณะปีเว้น 2 ปี คืออัตราป่วยเพิ่มสูงขึ้น 1 ปี จากนั้นจะลดลงใน 2 ปีถัดมา และจะเพิ่มสูงขึ้นใหม่ในปีต่อไป (4) การระบาดของอหิวาตกโรคเกิดได้ตลอดทั้งปี แต่ช่วงที่มีการระบาดสูง คือ ช่วงเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน ซึ่งเป็นฤดูฝน สภาพแวดล้อมที่เฉอะแฉะ ทำให้การสุขาภิบาลแย่ลง รวมถึงเป็นช่วงที่เกษตรกรทำการเพาะปลูก สภาพแวดล้อมและการงานทำให้ยากต่อการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหาร ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่กระจายโรค (4) ในปี พ.ศ.2550 การระบาดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและรุนแรงมากขึ้น โดยมีการรายงานผู้ป่วย 986 ราย จาก 50 จังหวัด โดยช่วงที่มีการระบาดรุนแรงที่สุดคือเดือนตุลาคม จำนวนผู้ป่วยในเดือนเดียวมีสูงถึง 399 ราย อัตราป่วยสูงที่สุดในกลุ่มเด็กเล็ก (0 - 4 ปี)

การระบาดของอหิวาตกโรคมักเกิดตามชายฝั่งทะเล เนื่องจากการทิ้งของเสียและถ่ายลงน้ำทะเลและน้ำกร่อยซึ่งเป็นแหล่งโรคตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในชุมชนของคนงานต่างด้าวที่อาศัยอยู่อย่างแออัด และมีห้องน้ำไม่เพียงพอ ทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้ออยู่ในอาหารและแหล่งน้ำของชุมชน จึงเกิดการระบาดของโรค สิ่งที่น่าเป็นห่วงคือคนเหล่านี้มักมีภูมิคุ้มกันต่อโรคสูงเนื่องจากได้รับเชื้อซ้ำซาก เมื่อมีการติดเชื้ออหิวาตกโรคทำให้อาการไม่รุนแรง จึงไม่ได้ไปพบแพทย์ เพียงแต่รับประทานยาแก้ท้องเสียหรือเกลือแร่เท่านั้น แต่เชื้ออหิวาตกโรคยังคงมีอยู่ในร่างกายและสามารถแพร่ออกไปสู่สิ่งแวดล้อมและเชื้อไปสะสมอยู่ในสัตว์ที่ชาวประมงเลี้ยงตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะหอยสองฝา เช่น หอยแครง หอยแมลงภู่ หรือไปเกาะตามแพลงตอนที่ชาวประมงใช้เป็นอาหารเลี้ยงกุ้ง หอย ปู ปลา จากการสอบสวนโรคในปี พ.ศ. 2550 พบว่าผู้ป่วยเป็นจำนวนมากได้รับเชื้ออหิวาตกโรคจากการรับประทานหอยแครง (4)

เชื้อที่เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรค คือ *Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปโค้ง เคลื่อนที่ โดยอาศัยแฟลกเจลลาซึ่งมีอยู่เพียงเส้นเดียวที่ปลายของตัวเชื้อ จัดอยู่ในกลุ่ม gamma-Proteobacteria พบได้ในน้ำเค็มและน้ำกร่อย แบ่งออกได้กว่า 200 serogroups ตามความแตกต่างของ O-antigen ที่อยู่บนผนังเซลล์ serogroup O1 สามารถแบ่งได้เป็น 3 serotypes คือ Ogawa, Inaba และ

ที่พบน้อยที่สุดคือ Hikojima นอกจากนี้แต่ละ serotype ยังสามารถแบ่งได้อีกเป็น 2 biotypes คือ classical และ El Tor โดยแบ่งตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและความไวต่อ bacteriophage ของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกมีเพียง serogroups O1 และ O139 เท่านั้น (2) แบคทีเรีย serogroups อื่นๆนอกเหนือจาก serogroup O1 และ O139 เรียกว่า non-O1, non-O139 serogroups ซึ่งมีรูปร่างและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ serogroup O1 เพียงแต่ไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ polyvalent O1 และ O139 antiserum เท่านั้น non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* สามารถก่อให้เกิดอุจจาระร่วงและการติดเชื้อภายนอกลำไส้ และอาจก่อให้เกิดการระบาดได้ แต่ไม่เคยก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลก

นับแต่ปี พ.ศ. 2360 เป็นต้นมา มีการระบาดของอหิวาตกโรคที่ครอบคลุมพื้นที่เกือบทั่วโลกมาแล้วถึง 7 ครั้ง โดยมีสาเหตุจาก serogroup O1 ทั้งสิ้น จากหลักฐานพบว่า การระบาดครั้งที่ 5 และ 6 และคาดว่ารวมถึงครั้งที่ 1-4 ด้วย มีสาเหตุจาก classical biotype ส่วนครั้งที่ 7 ซึ่งนับว่าเป็นการระบาดครั้งใหญ่ ยาวนานที่สุด และคงสืบเนื่องจนถึงปัจจุบัน เกิดจาก El Tor biotype (5) อาการของโรคที่เกิดจาก *V. cholerae* classical biotype จะรุนแรงกว่า ในขณะที่ El Tor biotype สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า (6) เนื่องจากพบว่า biotype นี้เข้ามาแทนที่ จนขณะนี้เป็นที่เชื่อกันว่า classical biotype ได้สูญพันธุ์ไปแล้ว (6) ในปี พ.ศ. 2535 มีการระบาดของอหิวาตกโรคที่เกิดจาก *Vibrio cholerae* serogroup O139 ซึ่งนับเป็นครั้งแรกที่สาเหตุของการระบาดไม่ใช่ serogroup O1 แต่ต่อมามีหลักฐานให้เชื่อได้ว่า serogroup O139 มีต้นกำเนิดมาจาก El Tor biotype โดยได้รับยีนที่ควบคุมการสร้าง LPS O-antigen จาก *V. cholerae* serogroups อื่นโดยมี bacteriophage เป็นตัวนำ (7) ในปี พ.ศ. 2550 มีการวิเคราะห์ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดที่ประเทศโมแซมบิกพบว่ายีนส่วนใหญ่เหมือนกับ El Tor biotype แต่มี CTX prophage ของ classical biotype ซึ่งเชื้อนี้สามารถก่อโรคได้รุนแรงเช่นเดียวกับ classical biotype และทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีเหมือน El Tor biotype (8)

Vibrio cholerae มีสองโครโมโซม คือโครโมโซมใหญ่และโครโมโซมเล็ก ยีนที่จำเป็นในการดำรงชีวิต เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ขบวนการ transcription, translation และการสร้างผนังเซลล์ รวมไปถึงยีนที่ใช้ในการก่อพยาธิสภาพ เช่น สารพิษ แอนติเจนบนผิวเซลล์ และโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติดเซลล์ของโฮสต์ ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมใหญ่ ในขณะที่โครโมโซมเล็กประกอบด้วยยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ถึงร้อยละ 59 นอกจากนี้ยังพบยีนจำนวนมากที่ไม่ได้มีต้นกำเนิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม gamma-Proteobacteria รวมถึง integron island ขนาดใหญ่ที่มีคุณสมบัติในการจับยีนอื่น (gene capture) และยีนที่จัดเป็น host addiction genes อีกด้วย (9) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบจีโนมของ *V. cholerae* ทั้ง 2 biotypes โดยวิธี DNA microarrays พบว่ายีนส่วนใหญ่เหมือนกัน มีเพียง 29 ยีนเท่านั้นที่พบใน El Tor แต่ไม่พบใน classical biotype (5) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มของยีนที่เรียกว่า

Vibrio seventh pandemic island-I (VSP-I) และ VSP-II ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคพบได้เฉพาะในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7 ยีนกลุ่มนี้มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวางแล้ว (10-13) แต่ยังมียีนอีกกลุ่มหนึ่งที่อยู่บนโครโมโซมเล็กและพบเฉพาะในสายพันธุ์ที่เป็น serogroups O1, El Tor biotype และ O139 แต่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา ยีนกลุ่มดังกล่าวคือ VCA0728-VCA0730 ซึ่งยีนกลุ่มนี้ควบคุมการสร้างโปรตีนซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ การศึกษาหน้าที่ของยีนกลุ่มนี้น่าจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการก่อโรคและการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของ El Tor biotype ได้ดียิ่งขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่ของ VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 โดยการตัดแต่ละยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของ deletion mutants กับสายพันธุ์ต้นแบบ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ VCA0728, VCA0729 และ VCA0730

วิธีทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ

Vibrio cholerae

N16961 ATCC 39315 El Tor Inaba serogroup O1 เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7

Escherichia coli

DH5α λ *pir* *supE44* Δ*lacU169* (Φ80 *lacZ* Δ*M15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

SM10 λ *pir* *thi thr leu tonA lacY supE recA*::RP4-2-Tc::Muλ*pir*; OriT of RP4 Km^r; conjugational donor (14)

พลาสมิด

pWM91 f1(+)*ori lacZ*α of pBluescript II (SK^+); unique polylinker sites: *Apa*I, *Bam*HI, *Not*I, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xho*I; *sacB*, Suc^R (15)

pUC18

การวิเคราะห์ยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730

การศึกษายีนทั้งสามเริ่มจากการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยเริ่มจากการวิเคราะห์หาความคล้ายคลึงของยีนทั้งสามกับยีนหรือโปรตีนอื่นทำโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลสากล (National Center for Biotechnology Information: NCBI) โดยการทำ BLASTN และ BLASTX และวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนทั้งสามโดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้ SMART (simple modular architecture research tool) เพื่อหา signaling domain (16, 17), TMHMM v. 2.0 เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็น transmembrane protein (18), SignalP v. 3.0 เพื่อหา signal peptide (19), Coils v. 2 เพื่อทำนายส่วนที่มีโครงสร้างเป็น coiled coil (20), SEG เพื่อหาโครงสร้างส่วนที่มีแนวโน้มจะมีเบสหรือกรดอมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่าปกติ (21), Prospero เพื่อหาบริเวณที่มี repeats (22), DisEMBL เพื่อทำนายบริเวณที่มีความผิดปกติของโครงสร้างหรือโดเมนซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน (23)

การสกัด genomic DNA

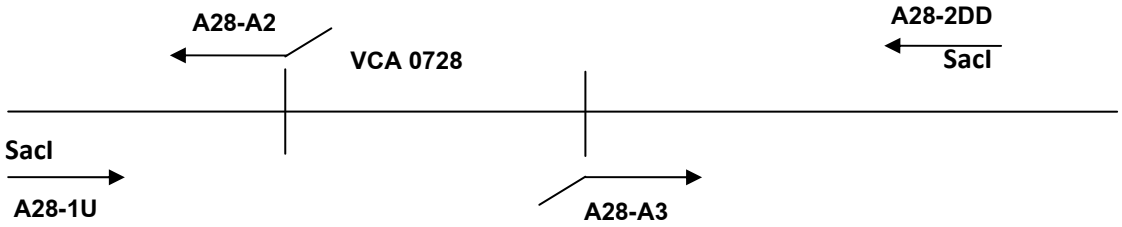
สกัด genomic DNA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (NucleoSpin® Tissue Kits, Macherey Nagal, Germany) ตามคู่มือแนะนำของบริษัท ตามขั้นตอนดังนี้ เลี้ยง *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 ใน Luria-Bertani (LB) broth 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปปั่นตกที่ 8,000 x *g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งให้หมด เติม suspension buffer (T1) 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม proteinase K (35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร บ่มที่ 56°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม lysis buffer (B3) 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 70°ซ เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ 210 ไมโครลิตร นำส่วนผสมใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำยา BW 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วย washing buffer B4 600 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนผสมที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นซ้ำอีกรอบเพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่ผสมอยู่ใน washing buffer ให้หมด จากนั้นเก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยเติม elution buffer 50 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้งจะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์รวม 100 ไมโครลิตร

การสร้าง Depleted sequences

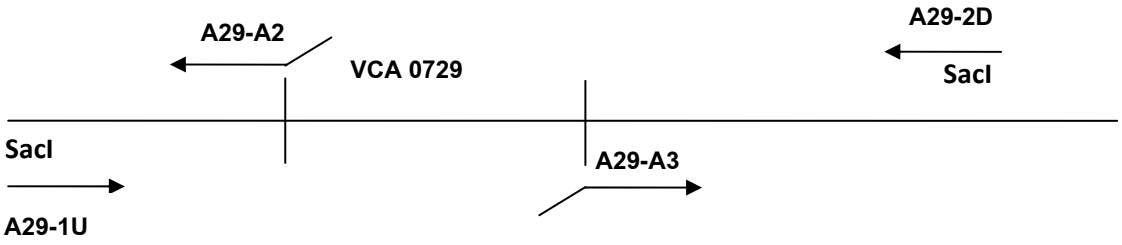
การตัดยีนทั้งสามได้กำหนดให้เป็น in frame deletion โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีลำดับก่อนและหลังตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต้องการตัดออก จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองเป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR ลำดับเบสของ primers ที่ใช้และตำแหน่งของ primers ดังรูปที่ 1

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่จะใช้สำหรับทำ depleted VCA0728 ทำโดยผสมส่วนผสมต่าง ๆลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร 2 หลอด แต่ละหลอดมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer (1.5 mM $MgCl_2$), 200 μM ของ dNTP แต่ละชนิด, 25 μM ของ primer A28-1U และ A28-A2 หรือ 25 μM ของ primer A28-A3 และ A28-2DD, 1 U Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) และดีเอ็นเอต้นแบบ (N16961) ประมาณ 200 นาโนกรัม การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 30 วินาที ตามด้วย 98°ซ 10 วินาที, 59°ซ 30 วินาที, 72°ซ 30 วินาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที ส่วนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่จะใช้สำหรับทำ depleted VCA0729 และ VCA0730 ก็ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing เป็น 63°ซ และ 64°ซ ตามลำดับ

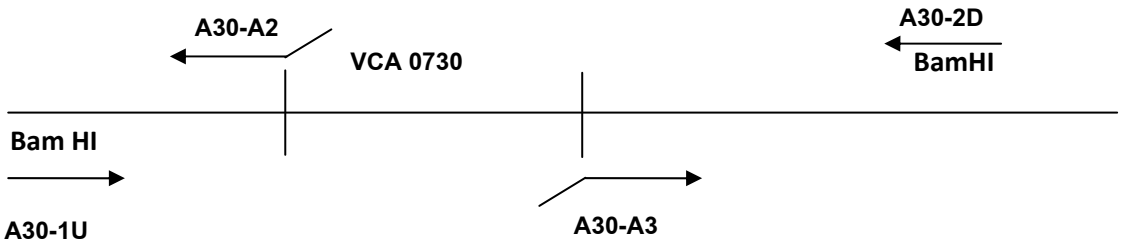
A28-1U	TGTTGAGCTCCATGTTCTG	SacI
A28-A2	**TGGAGGTAACTTCTC**CGTGTTGCAATCACT	
A28-A3	**AGTGATTGCAACACG**GAGAAGTTACCTCCA	
A28-2DD	AGCTAAAGAGCTCTGTTGCC	SacI



A29-1U	TGGAGCTCGAAAGGTTGCGG	SacI
A29-A2	**ACGAGAAGCTTAAGA**CAATATCGATACTAT	
A29-A3	**ATAGTATCGATATTG**TCTTAAGCTTCTCGT	
A29-2D	TGCACTGCGAGAGCTCCCTGGC	SacI



A30-1U	CACCAGGATCCACAGAAACCT	BamHI
A30-A2	**GGAGCCCTGTAAGAA**GAATGGAATCATTAT	
A30-A3	**ATAATGATTCCATTC**TTCTTACAGGGCTCC	
A30-2D	CCTGCCCAATGGATCCAGAA	BamHI



รูปที่ 1 แสดงลำดับเบส และตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการทำ depleted sequences

การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้น agarose

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ว่ามีขนาดตามที่ต้องการหรือไม่โดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้น agarose ตามขั้นตอนดังนี้ ละลายวุ้น agarose ใน 1 x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ในเตาไมโครเวฟ เติม ethidium bromide ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เทวุ้นลงบนแบบพิมพ์ เสียบหวีลงในวุ้น เพื่อสร้างร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้วุ้นแข็ง ดึงหวีออกจากวุ้น นำแบบพิมพ์วุ้นไปวางในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เติม TBE buffer ให้ท่วมวุ้น ผสมผลผลิตดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder plus, Fermentas, USA) 5 ไมโครลิตร กับ 10 x gel loading dye (50% glycerol, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25% bromphenol blue) ในอัตราส่วน 10:1 หยอดลงในร่องวุ้นตัวอย่างละหลุม ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์นาน 50 นาที นำวุ้นไปส่องด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bis 303 PC, DNR Bio-Imaging Systems, Israel) และบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ

Overlapped PCR

เมื่อได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำผลผลิตดีเอ็นเอทั้งสองส่วนมาอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เพื่อเป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR โดยผสมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer (1.5 mM $MgCl_2$), 200 μM ของ dNTP แต่ละชนิด และ 1 U Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) นำไปเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, CA, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 98°ซ 30 วินาที ตามด้วย 98°ซ 10 วินาที, 40°ซ 1 นาที, 72°ซ 1 นาที จำนวน 10 รอบ จากนั้นเติม 25 μM ของ primer A28-1U และ A28-2DD (ΔVCA0728) แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่ 98°ซ 10 วินาที, 59°ซ 30 วินาที, 72°ซ 30 วินาที อีก 30 รอบ ตามด้วย 72°ซ 5 นาที ส่วนการทำ ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 ก็ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยน primers เป็น A29-1U และ A29-2D (ΔVCA0729) หรือ A30-1U และ A30-2D (ΔVCA0730) และเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing เป็น 63°ซ และ 64°ซ ตามลำดับ

การสกัด Depleted DNA sequences จากวุ้น agarose

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา overlapped PCR ที่ได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้น agarose ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน 1 x TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์นาน 50 นาที ตัดวุ้นบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAquick Gel Extraction Kit

(QIAGEN GmbH, Germany) ตามคู่มือของบริษัท ตามขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำยา QG ในปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักวุ้น นำไปบ่มที่ 50°ซ 10 นาที จนวุ้นละลาย จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักวุ้น นำส่วนผสมเติมลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ปั่น 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำยา QG 500 ไมโครลิตร ปั่น 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างซ้ำด้วย washing buffer PE 750 ไมโครลิตร ปั่น 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนผสมที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นซ้ำอีกรอบเพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่ผสมอยู่ใน washing buffer ให้หมด จากนั้นเก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยเติม elution buffer EB 50 ไมโครลิตร ปั่นที่ 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที

การสกัด Conjugative suicide plasmid (pWM91)

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey Nagal, Germany) ตามคู่มือของบริษัท ตามขั้นตอนดังนี้ เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BW25142 ที่บรรจุพลาสมิด pWM91 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth 5 มิลลิลิตร โดยผสมแอมพิซิลลินให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ปั่นตกที่ 8,000 x *g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งให้หมด เติม suspension buffer (A1) ที่มี RNase ผสมอยู่ลงในหลอด 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม lysis buffer (A2) 250 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Neutralization buffer (A3) 300 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสเติมลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำยา AW 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างซ้ำด้วย washing buffer A4 600 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนผสมที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นซ้ำอีกรอบเพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่ผสมอยู่ใน washing buffer ให้หมด จากนั้นเก็บ พลาสมิดดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยเติม elution buffer 25 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้งจะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร

การตัดชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากวุ้น และพลาสมิด pWM91 ไปตัดด้วย *Sac*I (ΔVCA0728 และ ΔVCA0729) หรือ *Bam*HI (ΔVCA0730) ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยให้ส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นดังนี้ ดีเอ็นเอ 800-1,000 นาโนกรัม, 1x NEBuffer 1 (10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol) สำหรับการตัดด้วย *Sac*I หรือ 1x NEBuffer *Bam*HI (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol) สำหรับการตัดด้วย *Bam*HI, BSA 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, เอนไซม์ *Sac*I หรือ *Bam*HI (New England BioLabs, USA) 20 U เติม

deionized water ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การกำจัดฟอสเฟตออกจากพลาสมิด

การกำจัดหมู่ฟอสเฟสออกจากปลายด้าน 5' ของพลาสมิดเพื่อป้องกันไม่ให้ปลายทั้งสองด้านกลับมาเชื่อมติดกัน ทำได้โดยเติมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยให้ส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นดังนี้ พลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 800-1,000 นาโนกรัม, 1x NEBuffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol), calf intestinal phosphatase (CIP: New England BioLabs, USA) 10 ยูนิต เติม deionized water ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับชิ้นดีเอ็นเอและการเชื่อมต่อกับพลาสมิด

นำ depleted DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP) และ T4 DNA kinase (New England BioLabs, USA) 10 ยูนิต นำไปบ่มที่ 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติมพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว ลงในหลอดในอัตราส่วน depleted DNA:พลาสมิดเท่ากับ 3:1 บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเตรียม electrocompetent cells

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5α λ *pir* ใน LB broth 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 50 ไมโครลิตรไปใส่ใน LB broth 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือมี OD_{600} เท่ากับ 0.4 ดูดแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกที่ 4°ซ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งให้หมด ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง หลังจากล้างเซลล์ครั้งสุดท้าย เติม 10% glycerol ที่แช่เย็น 40 ไมโครลิตร ดูดขึ้นดูดลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี competent cells นี้พร้อมที่จะนำไปใช้ในการ transformation หรือสามารถเก็บที่ -80°ซ จนกว่าจะใช้

การทำ Electroporation

เติมดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมไว้ 100 นาโนกรัม ลงในหลอด electrocompetent cells ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมเติมลงใน electroporation cuvette ขนาด 0.1 เซนติเมตร ที่แช่เย็น นำไปใส่เครื่อง electroporator (MicroPulser™, Bio-Rad, USA) ผ่านกระแสไฟที่ 1.8 kV จากนั้นดูดส่วนผสมไปใส่ LB broth 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนผสม 200 ไมโครลิตรมา spread บน LB agar ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal: 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การคัดเลือกโคโลนีที่มี Depleted sequence

โคโลนีที่มี depleted sequence แทรกอยู่จะไม่ให้สีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี X-gal นำโคโลนีที่คาดว่ามี depleted sequence ไปเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปสกัดพลาสมิดตามวิธีที่กล่าวข้างต้น และยืนยันว่ามี depleted sequence ที่ต้องการโดยวิธี PCR โดยใช้วิธีการ และ primers เช่นเดียวกับการทำ overlapped PCR เมื่อได้พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำพลาสมิดนี้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ SM10 λ *pir* โดยวิธี electroporation ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

Conjugation

เลี้ยง *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 (ดื้อยาสเตรปโตมัยซิน) และ *E. coli* สายพันธุ์ SM10 λ *pir* ที่มี depleted VCA0728 (หรือ VCA0729 หรือ VCA0730) อยู่บนพลาสมิด pWM91 (ดื้อยาแอมพิซิลลิน) บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นขูดโคโลนีของแบคทีเรียทั้งสองอย่างละ 1 loop มาผสมกันบน LB agar ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ให้มีขนาดประมาณเหรียญบาท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ขูดแบคทีเรียใส่ใน LB broth 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดูด 50 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสเตรปโตมัยซิน และแอมพิซิลลิน นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การคัดเลือก VCA0728 (หรือ VCA0729 หรือ VCA0730) deletion mutants

เลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสเตรปโตมัยซิน และแอมพิซิลลิน 16 โคโลนี ไป restreak บน TCBS agar นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวแทนของแต่ละโคโลนีไปเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มีมีสเตรปโตมัยซิน บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปสกัด

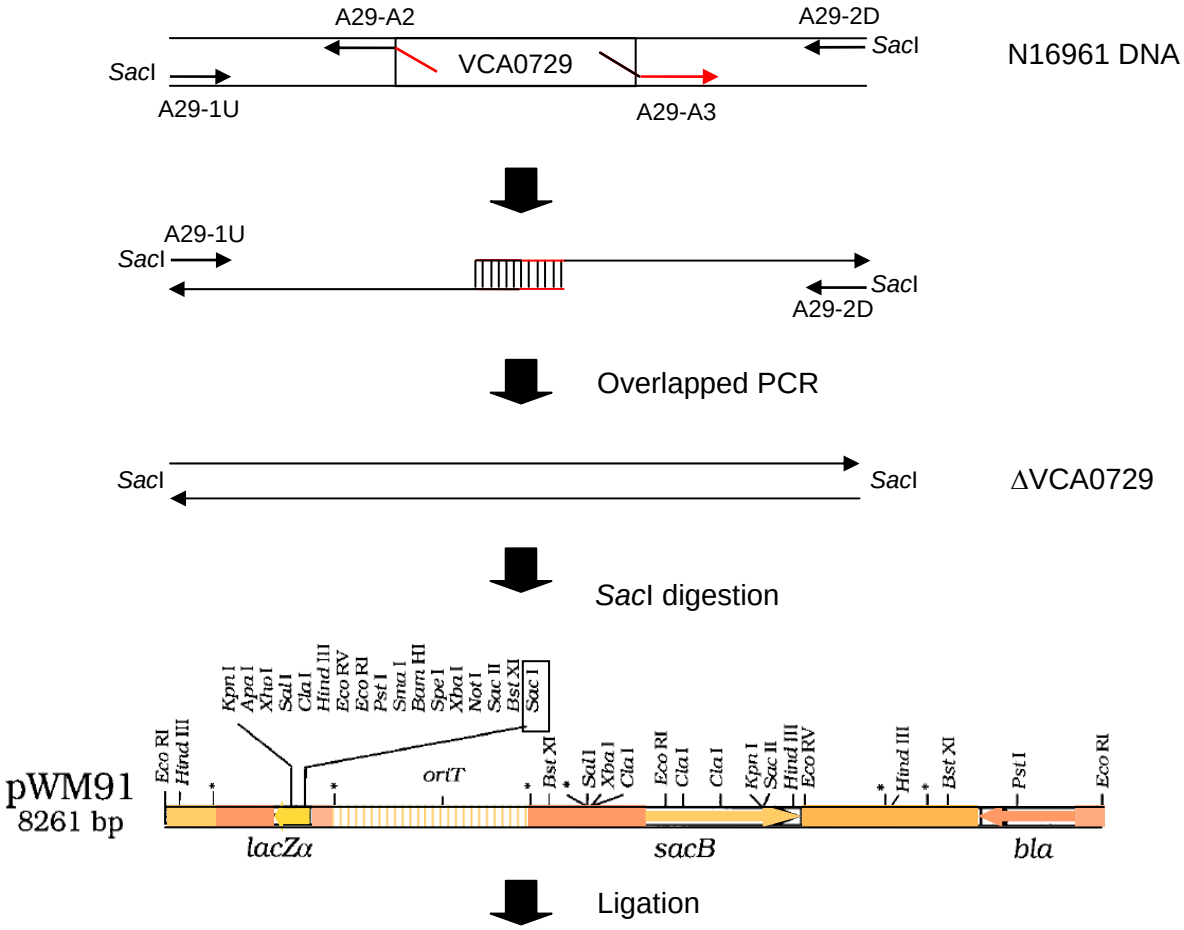
genomic DNA ดังวิธีข้างต้น และคัดเลือกโคลนที่ถูกกำจัดยีน VCA0728 (หรือ VCA0729 หรือ VCA0730) ด้วยวิธี PCR โดยวิธีการ และ primers เช่นเดียวกับการทำ overlapped PCR และยืนยันโดยการทำ DNA sequencing (1^{st} Base, Malaysia) เก็บ stock deletion mutants ใน LB broth ที่มี glycerol ผสมอยู่ร้อยละ 20 ที่ -80° ซ ขั้นตอนการสร้าง deletion mutant สรุปได้ดังรูปที่ 2

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่าง N16961 และ deletion mutants

การศึกษาหน้าที่ของยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 ทำได้โดยการเปรียบเทียบเปลี่ยนแปลงของ gene expression profiles ระหว่าง *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants โดยวิธี modified representational difference analysis โดยดัดแปลงจากวิธีของ O'Hara (2005) (24) สรุปได้ดังรูปที่ 3

การสกัดอาร์เอ็นเอจาก N16961 และ deletion mutants

การสกัดอาร์เอ็นเอทำโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามคู่มือแนะนำของบริษัท ตามวิธีดังนี้ เลี้ยง *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ใน LB broth 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 50 ไมโครลิตร ใส่ใน LB broth 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือมี OD_{600} เท่ากับ 0.4 ดูดแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกที่ 4°ซ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งให้หมด เติม lysozyme 100 ไมโครลิตร (400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน TE buffer) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติมน้ำยา RLT (ที่มี β-Mercaptoethanol) 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ปั่นที่ 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำยา RW1 700 ไมโครลิตร ปั่นที่ 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วย washing buffer RPE 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 13,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนผสมที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นซ้ำอีกรอบเพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่ผสมอยู่ใน washing buffer ให้หมด จากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์โดยเติมน้ำกลั่นปราศจาก RNase 25 ไมโครลิตร ปั่นที่ 11,000 x *g* เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้งจะได้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์รวม 50 ไมโครลิตร เติม DNase I (Invitrogen, USA: 50-375 ยูนิต/ไมโครลิตร) และ RNaseOUT™ (Invitrogen, USA: 40 ยูนิต/ไมโครลิตร) อย่างละ 1 µl เก็บอาร์เอ็นเอที่ -80°ซ จนกว่าจะใช้



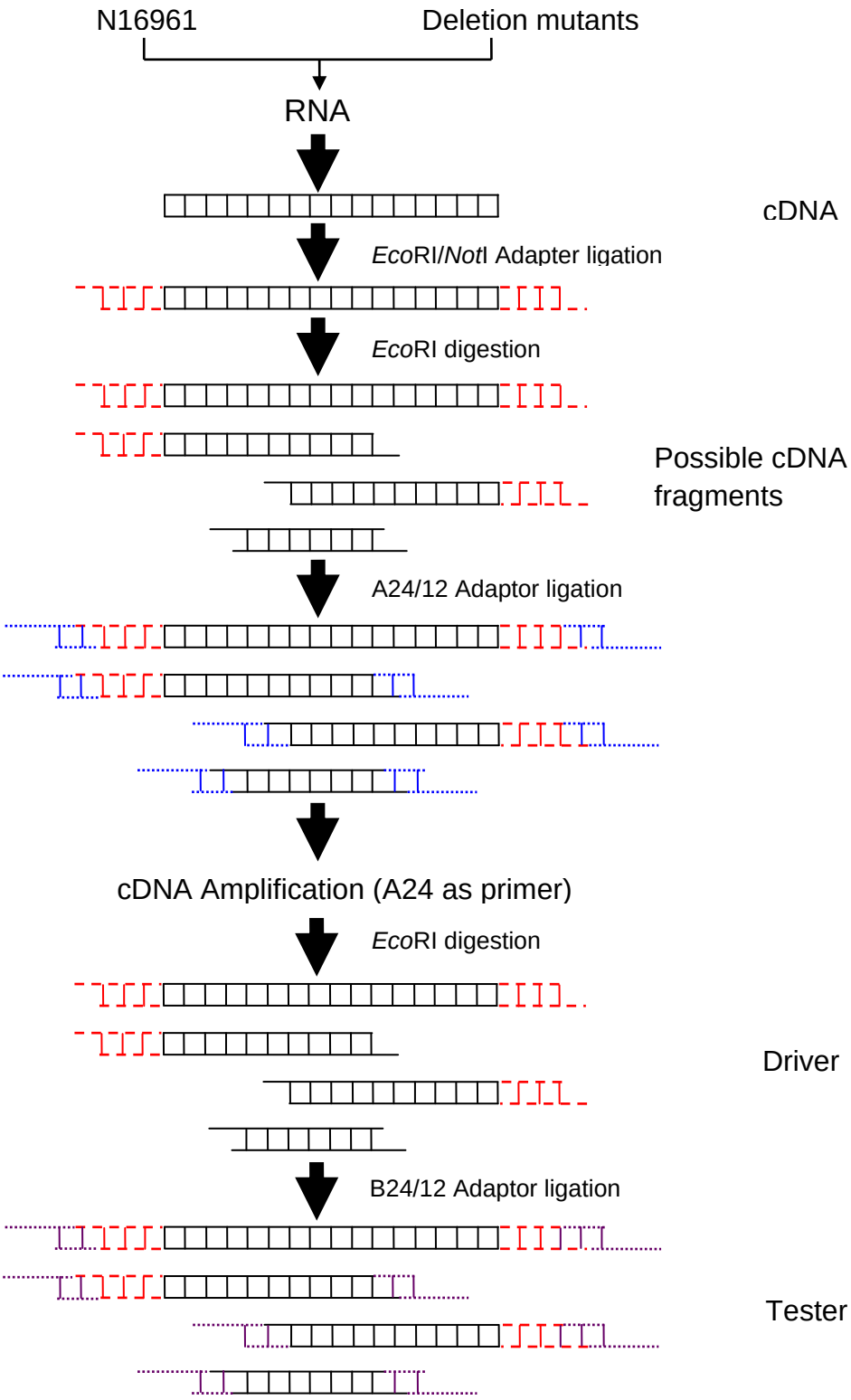
Electroporation to *E. coli*

Conjugation with N16961

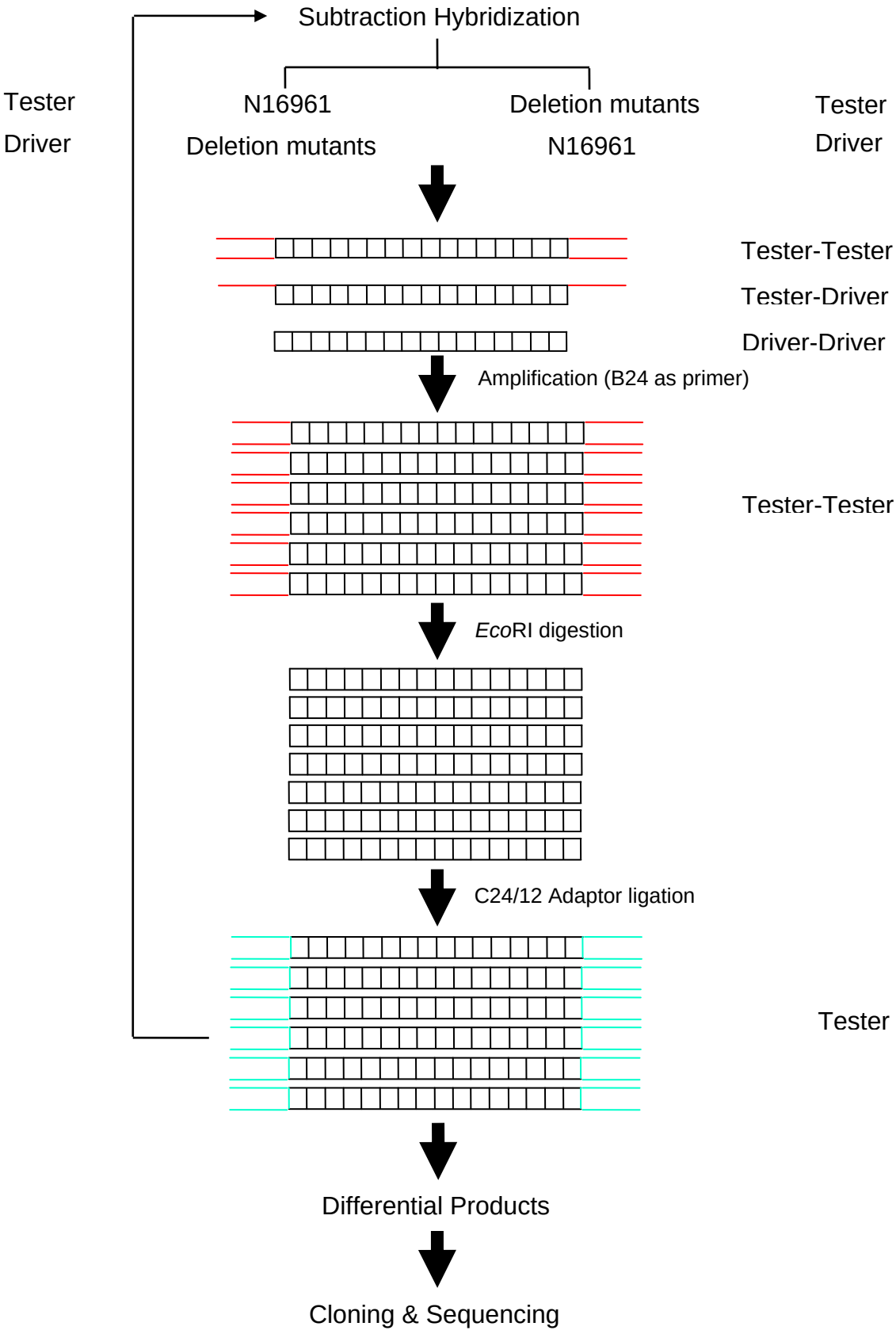
Selection

N16961ΔVCA0729 mutant

รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสร้าง N16961ΔVCA0729 (หรือ ΔVCA0728 หรือ ΔVCA0730) mutants



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอน Modified cDNA Representational Difference Analysis (1)



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอน Modified cDNA Representational Difference Analysis (2)

การสังเคราะห์ cDNA สายแรก

อาร์เอ็นเอที่ได้จะใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ที่จะเป็นตัวแทนของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961, ΔVCA0728, ΔVCA0729 และΔVCA0730 mutants การสังเคราะห์ cDNA สายแรกใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) ตามคู่มือแนะนำของบริษัท ตามขั้นตอนดังนี้ ผสม total RNA 8 ไมโครลิตร (ไม่เกิน 5 ไมโครกรัม), random hexamers 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และ 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 5 นาที นำไปวางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที จากนั้นเตรียม cDNA Synthesis Mix โดยเติมส่วนผสมต่อไปนี้ตามลำดับ 10X RT buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร, 0.1 M DTT 2 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ (40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ SuperScript III RT (200 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร เติม cDNA Synthesis Mix ลงไปใน RNA/primer mixture หลอดละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ 10 นาที, 50°ซ 50 นาที ตามด้วย 85°ซ 5 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็ง และเติม *E. coli* RNase H (2 ยูนิต/ไมโครลิตร) ลงไป 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 20 นาที cDNA นี้สามารถนำไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA สายที่สอง หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะใช้

การสังเคราะห์ cDNA สายที่สอง

เตรียม Second Strand Pre-Mix โดยเติมส่วนผสมต่อไปนี้ ลงในหลอดทดลองที่วางบนน้ำแข็งตามลำดับ (ต่อหนึ่งตัวอย่าง) น้ำ 106 ไมโครลิตร, 10X *E. coli* DNA ligase Buffer 15 ไมโครลิตร, 25 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, *E. coli* ligase (New England BioLabs, USA: 10 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, Klenow (New England BioLabs, USA: 5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร, RNase H (New England BioLabs, USA: 5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นเติม Second Strand Pre-Mix ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุ cDNA สายแรกของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 ΔVCA0728, ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 mutants หลอดละ 130 μl บ่มที่ 16° ซ 2 ชั่วโมง เติม T4 DNA polymerase (New England BioLabs, USA: 3 ยูนิต/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 16° ซ 5 นาที จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 17 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้ cDNA และการเชื่อมต่อกับ *Eco*RI-*Not*I Blunt-end Adaptor

เติมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองที่บรรจุ cDNA ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961, ΔVCA0728, ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) และ T4 DNA kinase (New England BioLabs, USA: 10 ยูนิต/ไมโครลิตร) 10 ยูนิตนำไปบ่มที่ 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติม *Eco*RI-*Not*I Blunt-end Adaptor (New England BioLabs, USA 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครกรัม และ T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA: 6 ยูนิต/ไมโครลิตร) 9 ยูนิตบ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 17 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การตัด cDNA ด้วย *Eco*RI

เติมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองที่บรรจุ cDNA ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961, ΔVCA0728, ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x NEBuffer *Eco*RI (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100) และ เอนไซม์ *Eco*RI (New England BioLabs, USA: 20 ยูนิต/ไมโครลิตร) 20 ยูนิตเติม deionized water ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆ ออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 17 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเตรียม A24/12 Adapter

ผสมโอลิโกนิวคลิโอไทด์ A24 (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ใน 10 mM Tris pH 8.0) และ A12 (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 2:1 นำไปบ่มที่ 70°ซ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมง Adaptor นี้สามารถนำไปเชื่อมต่อกับ cDNA ได้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะใช้ ลำดับเบสของโอลิโกนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็น adaptors แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของโอลิโกนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็น Adaptors

S1186 (*Eco*RI-*Not*I Blunt-end Adaptor) (Invitrogen, USA)	AATTCGCGGCCGCT
S1185 (Blunt-end Adaptor Complement Phosphorylated) (Invitrogen, USA)	pAGCGGCCGCG
A24 (A24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	AGGACGCTTTACTCCTTACGACGG
A12 (A24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	AATTCCGTCGTA
B24 (B24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	TTCCGGGATACTAACGCGATCAGG
B12 (B24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	AATTCCTGATCG
C24 (C24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	GCATACGACCTGACTAGGCTATTG
C12 (C24/12 Adaptor) (Bio Basic Inc., Canada)	AATTCAATAGCC

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้ cDNA และการเชื่อมต่อกับ A24/12 Adaptor

เติมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองที่บรรจุ cDNA ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 ΔVCA0728, ΔVCA0729 และ ΔVCA0730 mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) และ T4 DNA kinase (New England BioLabs, USA: 10 ยูนิต/ไมโครลิตร) 10 ยูนิต นำไปบ่มที่ 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติม annealed A24/12 Adaptor (Bio Basic Inc., Canada: 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 3 ไมโครกรัม และ T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA: 6 ยูนิต/ไมโครลิตร) 6 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีปริมาตรสุดท้าย 800 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของส่วนผสมแต่ละชนิดเป็นดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer, 4 mM ของ $MgCl_2$, 313 μM ของ dNTP แต่ละชนิด บ่มที่ 72°ซ 3 นาที เติม Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) 4 ยูนิต บ่มที่ 72°ซ 5 นาที เติม A24 primer 2 ไมโครกรัม แบ่งส่วนผสมใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 10 วินาที 72°ซ 2 นาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นกำจัด primer และสารต่างๆด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany) โดยใช้ 200 ไมโครลิตร/คอลัมน์ แต่ละคอลัมน์ทำให้เหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

cDNA ที่ได้ ยังไม่เพียงพอสำหรับใช้จนจบการศึกษา ต้องเพิ่มจำนวน cDNA ให้ได้อย่างน้อย 100 ไมโครกรัม โดยนำผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนข้างต้นเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเตรียม Driver โดยการกำจัด A24/12 Adaptor ออกจาก cDNA

นำ cDNA ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 15 ไมโครกรัม เติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x NEBuffer *Eco*RI (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100), เอนไซม์ *Eco*RI (New England BioLabs, USA) 40 ยูนิต เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง 30 นาที เติมเอนไซม์ *Eco*RI 40 ยูนิต บ่มที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ปริมาณของ Driver ที่ต้องการขึ้นกับจำนวนรอบที่ทำ subtraction ถ้าทำ subtraction 2 รอบ ต้องใช้ Driver อย่างน้อย 75 ไมโครกรัม ถ้าทำ subtraction 3 รอบ ต้องใช้ Driver อย่างน้อย 100 ไมโครกรัม

การเตรียม Tester โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตและเชื่อมต่อกับ B24/12 Adaptor

นำ Driver ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 500 นาโนกรัม จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) และ T4 DNA kinase (New England BioLabs, USA) 10 ยูนิต นำไปบ่มที่ 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติม B24/12 Adaptor (Bio Basic Inc., Canada) 3 ไมโครกรัม และ T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA) 100 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การทดสอบการเชื่อมต่อของ Tester กับ B24/12 Adaptor

นำ Tester ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของส่วนผสมแต่ละชนิดเป็นดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer, 4 mM ของ $MgCl_2$, 313 μM ของ dNTP แต่ละชนิด บ่มที่ 72°ซ 3 นาที เติม Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) 1 ยูนิต บ่มที่ 72°ซ 5 นาที เติม B24 primer 500 นาโนกรัม แบ่งส่วนผสมใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร

หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 10 วินาที 72°ซ 2 นาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นกำจัด primer และสารต่างๆด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

Subtraction Hybridization

เปรียบเทียบ expression profiles ระหว่าง *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants โดยการทำ subtraction hybridization ทีละคู่ ในหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดที่ 1 ให้ N16961 เป็น Tester และ mutant (ΔVCA0728 หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) เป็น Driver ส่วนหลอดที่ 2 ให้ mutant (ΔVCA0728 หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) เป็น Tester และ N16961 เป็น Driver โดยการเติมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังนี้ Tester 250 นาโนกรัม, Driver 25 ไมโครกรัม, เติม 10 mM Tris pH 8.0 ให้ได้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร, 5 M Ammonium acetate 75 ไมโครลิตร และ Absolute Ethanol 375 ไมโครลิตร บ่มที่ -80°ซ 10 นาที 37°ซ 2 นาที ปั่นที่ 17,900 x *g* ที่ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 400 ไมโครลิตร ตากที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม 3 X EE Buffer (30 mM EPPS pH8.2, 3 mM EDTA) 4 ไมโครลิตร ดูดขึ้นดูดลงให้ดีเอ็นเอละลายดี จากนั้นถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) บ่มที่ 98°ซ 5 นาที และปรับอุณหภูมิเป็น 67°ซ ทันที เติม 5 M NaCl 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 67°ซ 24 ชั่วโมง วางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 2 นาที เจือจาง subtraction mixes ด้วย 10 mM Tris pH 8.0 ทีละขั้น โดยครั้งแรกเติม 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 25 ไมโครลิตร และ 162 ไมโครลิตร ตามลำดับ

การกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วย T4 DNA Polymerase

นำ subtraction mixes ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอด หลอดละ 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-Hcl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT), 250 μM dNTP, T4 DNA polymerase (New England BioLabs, USA) 6 ยูนิต เติมน้ำให้ครบ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 12°ซ 15 นาที จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเพิ่มจำนวน Differential product ขั้นต้น

นำ subtraction mixes ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ถูกกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้วจากขั้นตอนข้างต้น เติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีปริมาตรสุดท้าย 400 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของส่วนผสมแต่ละชนิดเป็นดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer, 2 mM ของ $MgCl_2$, 200 μM ของ dNTP แต่ละชนิด บ่มที่ 72°ซ 3 นาที เติม Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) 4 ยูนิต บ่มที่ 72°ซ 5 นาที เติม B24 primer 500 นาโนกรัม แบ่งส่วนผสมใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 10 วินาที 72°ซ 2 นาที 10 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นกำจัด primer และสารต่างๆด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 60 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เหลือด้วย T4 DNA Polymerase

นำผลผลิตดีเอ็นเอของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้ เติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอด หลอดละ 60 ไมโครลิตร จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ยังคงเหลืออยู่ด้วย T4 DNA polymerase ให้เหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเพิ่มจำนวน Differential product-1 (DP-1)

นำ differential products ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ถูกกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้วจากขั้นตอนข้างต้น เติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของส่วนผสมแต่ละชนิดเป็นดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer, 4 mM ของ $MgCl_2$, 250 μM ของ dNTP แต่ละชนิด, B24 primer 2 ไมโครกรัม, Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) 4 ยูนิต แบ่งส่วนผสมใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 10 วินาที 72°ซ 2 นาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นกำจัด primer และสารต่างๆด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การกำจัด B24/12 Adaptor ออกจาก Differential product-1

นำ DP-1 ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x NEBuffer *Eco*RI (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100), เอนไซม์ *Eco*RI (New England BioLabs, USA) 40 ยูนิต เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเตรียม Tester สำหรับ subtraction hybridization รอบสอง

นำ DP-1 ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่กำจัด B24/12 Adaptor แล้ว เติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 500 นาโนกรัม จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP), C24/12 Adaptor (Bio Basic Inc., Canada) 3 ไมโครกรัม และ T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA) 100 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

เมื่อเตรียม Tester สำหรับ subtraction hybridization รอบสองเสร็จแล้ว ทดสอบการเชื่อมต่อของ Tester กับ C24/12 Adaptor โดยการเพิ่มจำนวน Tester ด้วย C24 primer และทำ subtraction hybridization รอบที่ 2 เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แต่ปรับปริมาณดีเอ็นเอของ Tester ให้เป็น 25 นาโนกรัม และ Driver 25 ไมโครกรัม (อัตราส่วน 1:1,000) จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วย T4 DNA Polymerase และเพิ่มจำนวน DP-2 ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การตัด pUC18 และ Differential product-2 ด้วย *Eco*RI

สกัดพลาสมิด pUC18 ด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey Nagal, Germany) ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น นำพลาสมิด pUC18 และ DP-2 ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร แยกเติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x NEBuffer *Eco*RI (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100) และ เอนไซม์ *Eco*RI (New England BioLabs, USA) 40 ยูนิต เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100

ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ให้เหลือปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Differential product-2 และการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC18

นำ DP-2 ของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เติมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 15 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) และ T4 DNA kinase (New England BioLabs, USA) 10 ยูนิต นำไปบ่มที่ 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติมพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว ลงในหลอดในอัตราส่วน DP-2:พลาสมิดเท่ากับ 3:1 บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดเอนไซม์และสารต่างๆออกด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การทำ Transformation

เติมดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมไว้ 100 นาโนกรัม ลงในหลอด electrocompetent cells ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมเติมลงใน electroporation cuvette ขนาด 0.1 เซนติเมตร ที่แช่เย็น นำไปใส่เครื่อง electroporation (MicroPulser™, Bio-Rad, USA) ผ่านกระแสไฟที่ 1.8 kV จากนั้นดูดส่วนผสมไปใส่ LB broth 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดส่วนผสม 200 ไมโครลิตรมา spread บน LB agar ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal: 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การคัดเลือกโคโลนีที่มี DP-2 inserts

โคโลนีที่มี DP-2 แทรกอยู่จะไม่ให้สีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี X-gal นำโคโลนีที่คาดว่ามี DP-2 inserts ไปเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีที่กล่าวข้างต้น และยืนยันว่ามี DP-2 insert โดยวิธี PCR โดยใช้ M13/pUC forward (M13F) และ reverse (M13R) sequencing primers (ตารางที่ 2) ตามขั้นตอนดังนี้ ผสมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x Phusion™ HF Buffer (1.5 mM $MgCl_2$), 200 μM ของ dNTP แต่ละชนิด, 20 μM ของ primer M13F และM13R, 1 U Phusion™ DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) และดีเอ็นเอต้นแบบ (pUC18-DP2) ประมาณ 20 นาโนกรัม เติมน้ำให้

ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 98°ซ 30 วินาที ตามด้วย 98°ซ 10 วินาที, 50°ซ 30 วินาที, 72°ซ 30 วินาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้น agarose ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การหาลำดับเบสของยีนที่แสดงออกต่างกันและการวิเคราะห์ผล

เลือกพลาสมิดที่มี DP-2 inserts ขนาดต่างๆส่ง sequencing (1st Base, Malaysia) เพื่อหาลำดับเบสของยีนที่แสดงออกต่างกันใน *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 และ ΔVCA0728 (หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) mutants โดยส่งหาลำดับเบสเป็นจำนวนทั้งสิ้น 169 ตัวอย่าง จากนั้นนำผลของการหาลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูลสากล (National Center for Biotechnology Information: NCBI) โดยการทำ BLASTN และ BLASTX (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อวิเคราะห์ว่ามียีนใดบ้างที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไป และหาความสัมพันธ์รวมถึงกลไกการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกกำหนดโดยยีนเหล่านั้นโดยโปรแกรม STRING v. 8.3 (25) และ Prodonet v. 9.12 (26)

การยืนยันผลโดยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การยืนยันผลการวิเคราะห์ยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไปทำได้โดยวิธี RT-PCR ตัวแทนของยีนที่ใช้ในการทดสอบยืนยันได้แก่ VC2197 (*flgE*) และ VC1367 (*cdgE*) นอกจากนี้ยังมียีนซึ่งไม่ปรากฏในผลการทดลองแต่เนื่องจากยีนนี้มีความสำคัญคือเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนใน GGDEF family ซึ่งควบคุมการ transcription ของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ปัจจัยก่อโรค และการเคลื่อนที่อีกด้วย (6) ยีนนั้นคือ VCA0956 ขั้นตอนในการทำเริ่มจากการเติมอาร์เอ็นเอของ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 หรือ ΔVCA0728 หรือ ΔVCA0729 หรือΔVCA0730 mutants 1 ไมโครลิตร, primer flgE-F หรือ VC1367-F 1 ไมโครลิตร และน้ำ 9 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 5 นาที นำไปวางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมต่อไปนี้ตามลำดับ 5X RT reaction buffer (Fermentas, USA) 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, RiboLock Ribonuclease inhibitor™ (Fermentas, USA: 40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร, น้ำ 1.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ 5 นาที เติม RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, USA: 200 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ 60 นาที ตามด้วย 70°ซ 10 นาที จากนั้นนำไปทำ PCR ตามขั้นตอนดังนี้ ผสมส่วนผสมต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้ส่วนผสมแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 1x ThermoPol Buffer (NEB,

USA: 2 mM $MgCl_2$), 200 μM ของ dNTP แต่ละชนิด, 25 μM ของ primer flgE-F และ flgE-R หรือ VC1367-F และ VC1367-R, Taq DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) 1 ยูนิต และ RT reaction 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเครื่อง PTC 100 Thermal cycler (MJ Research, USA) และใช้ cycles ดังต่อไปนี้ 95°ซ 2 นาที ตามด้วย 95°ซ 15 วินาที, 55°ซ 30 วินาที, 72°ซ 1 นาที 35 รอบ และตามด้วย 72°ซ 5 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้น agarose ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของโอลิโกนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็น Primers

M13/pUC forward sequencing primers (M13F) (Bio Basic Inc., Canada)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13/pUC reverse sequencing primers (M13R) (Bio Basic Inc., Canada)	CAGGAAACAGCTATGAC
flgE-F (Bio Basic Inc., Canada)	CCGTTCAGATCGACTGGATT
flgE-R (Bio Basic Inc., Canada)	TCGGTAAACCGAAACAGACC
VC1367-F (Bio Basic Inc., Canada)	TGGGCAGAATCAGTGCAA
VC1367-R (Bio Basic Inc., Canada)	TTGAACAAGCGAAAGCCC

ผลการทดลอง

การสร้าง Depleted sequences

การสร้าง Depleted sequences ของ VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอชิ้นที่อยู่ก่อนและหลังตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต้องการตัดออก (รูปที่ 4, 5 และ 6) และตรวจสอบผลด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้น agarose ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่ 738 และ 474 basepairs (VCA0728), 647 และ 608 bp (VCA0729), 528 และ 692 bp (VCA0730) (รูปที่ 7) เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอแต่ละคู่เป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบ ทั้งแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับต้นแบบและแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของ overlapped PCR ที่ต้องการ ดังนี้ 1,212 bp (ΔVCA0728), 1,255 bp (ΔVCA0729), และ 1,220 bp (ΔVCA0730) (รูปที่ 8)

การ Cloning depleted sequences เข้าสู่ conjugative host (SM10 λ *pir*) และการคัดเลือก

นำ Depleted DNA sequences ที่สกัดจากวุ้น agarose ไปตัดด้วย *Sac*I (ΔVCA0728 และ ΔVCA0729) หรือ *Bam*HI (ΔVCA0730) และเชื่อมเข้ากับ suicide plasmid pWM91 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน นำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ DH5α λ *pir* โดยวิธี electroporation จากนั้นคัดเลือกโคโลนีไม่มีสีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมพิซิลลินและ X-gal ไปสกัดพลาสมิดและทดสอบว่ามี depleted DNA sequence ที่ต้องการด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่ใช้ทำ overlapped PCR โคโลนีที่มี depleted DNA sequence ที่ต้องการ ให้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 1,212 bp (ΔVCA0728), 1,255 bp (ΔVCA0729), และ 1,220 bp (ΔVCA0730) (รูปที่ 9) จากนั้นสกัดพลาสมิดและนำพลาสมิดที่มี depleted DNA sequence ที่ต้องการนี้เข้าสู่ conjugative host (SM10 λ *pir*) แล้ว ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มี depleted DNA sequence เช่นเดิม

TGTTGAGCtCCATGTTCTGCGGCTTGAAAGGGCAAACTTGAATGCCGCGGCGCGCCAATACTCGGCACAAGCCGG
CAACCAACACGCTTTTTCCCGCATCTGAGGTGGTGCCTTGCACCATTAACCATTTTTTCATGCAATCACTTAATG
ATGGATTGGAGTGCGCCAGTGTCGGCCACTCCGCAACCACGTTAACCAGAGGAGCAACCTCGCCCCTCGAAAACC
AAGAGGCGTTAGCATACCTCAATACGGTCTGCGTCTGGTACTTTGCTGTTTTTAATGGGAAAGCGTTTTATACAG
GTTTCGTTGCCCCTCCCCCTTCTAGGGGGAGGATGGGTGGGGGTATTTCGCGCCAGATGTGTTAAACGTGGAAAA
TACAAACTTCAGCGAAAACTAAAATACCCCACCCTAACCCTCCCCTAAAAGGGGAGGGAACTGGATTTGTGTTCA
CTTGGAGTTTATTGCAGATTGTTGAGGGATAACGTGTTTATAGACATTTTAGAGTTAAAGCCTTAACTCTAAATC
ATTCGTTTCGGATTAAATTTTCTATGATTTAGCGCACTCACCGCATATTGCGAGCGCAGCGAGTAATTTATCCTA
ATAAAGCAACTTGTTATACGTGAACAGAGCATCGTATCTATGCCCAGAACCGGCCATTAGCGGACGTTTGGCGTA
TTTACTCCACCCCAAGCCTCACACCCTATACGAGCTTACTGAATATTCAGTGATTGCAACACG**TTAAGTGGTTTG**
AACAATACGCTTAACCGCGTCTTGTAGGCCGTCTTCTTTCACCTTACCCATATCCACGTTATAGCACTTAAAAAT
CGGCCCTGATTCTGGTTGCCAGTCTTCAAACTGGATTACTTTCATTAACTTGCCTTGAGGGGGAAGCAAAAAGTC
AAGCATCCGGTTCGTCAAATCTTCATGGTGACTGGTCACAATGACCTGCCTTTTCCAGCTATCGTTAGCATCGGC
GTACGCCAGCTTGCGAAGCAGTACGGCAGCAGGAATTAGCTGGTTCATATCAAGAGAAGTAGTAAAGTCATCAAA
TCCAATAACCCTATGGCCTAATTGTTCTGACAAGGCCAAGTTTAAGTTTATTGTCCAACAAATTGCTAGCTGGGA
TTTTTGACCAGTTGATAGATCGTCGAACTGTACACCAGACTTCGTCTTAAAACCCCACTTTGGTATTTTCGGAGT
GCCATCGTTTTTAAGCTCGATAGGCAGAAAATCATCGGGAAAATGGAAGCTTGCAAGAAGCTGATTCATGTTTTT
TAACAATTGATCAAGTTCAGCTTGCGGTATTACCTCAACAGCTGATAGCAACTGACTTTTTGCACTCGATTCCTG
TTTACTTATAGCCAGAGCATCGGTGATCATTTTCTCTGCGTGCTCTAAACCATCCCAATCAATTGCGTTGGCTTC
GTCTTCTACCTTCTGGATCTCTAAAGCTGACCAGTTAGTAAACACCCTGCCAAGCTGATGAATAATATCGGTTTC
AGAAACGACTGAAGCACCCTCTGCAACTGGAGTTTTTATCGTTTCAAGATAATTACTAACATAGTCAGTTAACCC
CTCAACAGTAAGGTTAGGTTCATTTAGAAGTTGTGAAAGCTGATTTGAATGAGCATTTATATCTCTCACAACCAC
CTGAGAGCGCTTTATCTGATTGAGACTAGCGGTAACAACTTGCCCTCTTTCGATAACCTTCTCTATCTTCCCTCT
GATTTCAACAGAACGTGCAGTCGTCAATGTCGACAATTTTTCCAATTGAACCTGTAACCCCTGTTTCAAATCAAT
AACATCTGAAATATCAGGATGCTCGTCCCAAGCCTCTAACCAGCTACTAACATTGTCAGTAAAGCCATCAATCCA
AGTTAAGATCGAGTTTTCGTCTCCTTGCAGCTGCGCTTGTAGTTTATTAAGCCTTTGGTATTCGTTGGTTAACTC
AATCCGTTGTTTCTCTAGTTCATCTACTTTATCAGCGTAAATGTCAGTATCAGAGCCTACGAACAAAGTATTCTC
GAGTTCAGAGGGGGCCAAGATAGTATCTTCTGACAACTTTTTTATGACCAATTCTGCTGGTAAAGACTGAATAGT
AGATAAGAATTCTTTGGTAAAGGCAGGTAGTTCATTTCCTTTCTCAGAAAAATCGACCTGACGGCCTCGATACTC
CAACAAACTATGCCCAATATGGCTCAACTGGTCAGGAAGTTGTGATCCTATCGGTTCAGCCAAGTTACTGAAGTT
TCCGATGGAGCTAGAAAGGTTGCGGATTTGAGAATCCCATTTATTTTGTAGGTTGCCATTCTTTAAGGTCAACGT
ACTATCGACTAACAACTGACGAAACGGCAGATCGTGAGGGAGCTTATCGACAAGCTCATTAACTCTTCCAGCGAG
AGTTTTTCTTTCTTCGTCATAGTTTTTTCTATACTTCAGCGTATGTAGCTGGCGCTGCCAGTCTTCTAACTTTGC
TTGTAACGCCTTCAAGCTCCGCTTAATCTCTTCGCCCGGCTTGTTTTCAGGCTCTAATAGTTGAATGATTTCGTC
ACATGCAAGCCCAGCAATATTTTCTTGATAAAAAAATGAGGCTATTGTACTGAGTTTCTTATGGTCAGTTTTAGC
CTTACCGTTAAGCTCAAACCTCTTGCCATTTATAGATACCGCACCCTTGCTCTCCTTAGTGGTTATAAAACCACC
TGCACCAACATTAGACTGATTAAGTACCCAGTCCATTGCTTCTAACAAAGAAGTTTTACCTACCCCGTTTTTACC
CGTCACCAAAATAAGGTCGGCAGCTTGACCTGCTATCGTAAAATCAAGCTCTTTGGGGCCCCCATCTTCTAAAGC
TCGGTAGCCTTTGAAATTTTCCAGTCCTATAGACTGAATAGTATCGATATTGTTACCCAA**GAGAAGTTACCTCCA**
AAACTGGTTTACCTAATAGGTCATTGATGTCCTTAACAAGTTCATCCTGCCAGCTTTGAGCAACGCTATCATTTT
CACCAGCATCCACAGAAACCTTTAAAATATCCGTAAATCGAGTAAATAGCTGCGGCTCAACGCCTCTGGGAGGTT
TAGCGTTTTTAACAGCTTCAGAAAGTACACAAGAAAAATCTTGGGCTGTTATTCTCCTAGGAGTATATTCACTTG
AGGCCAGCTCCCCTAACCAACGCTTCTTTGCATCTTCTACTGATTTTCCTTCAAATGATTTTACGGCTTGAAGAA
CAAAACGTCCCCGGTGCCAATCTTGATCACCCATAAGCTGTAACCAAGAATCGGATTTCTTATGCATATCAATAA
GAGCAACTAAAGGCGCAAACTTCTGGTAGTCATGCATCAGGTCTGTGAGGCGATCCATCAGGCGGGCAACAgagc
TCTTTAGCT

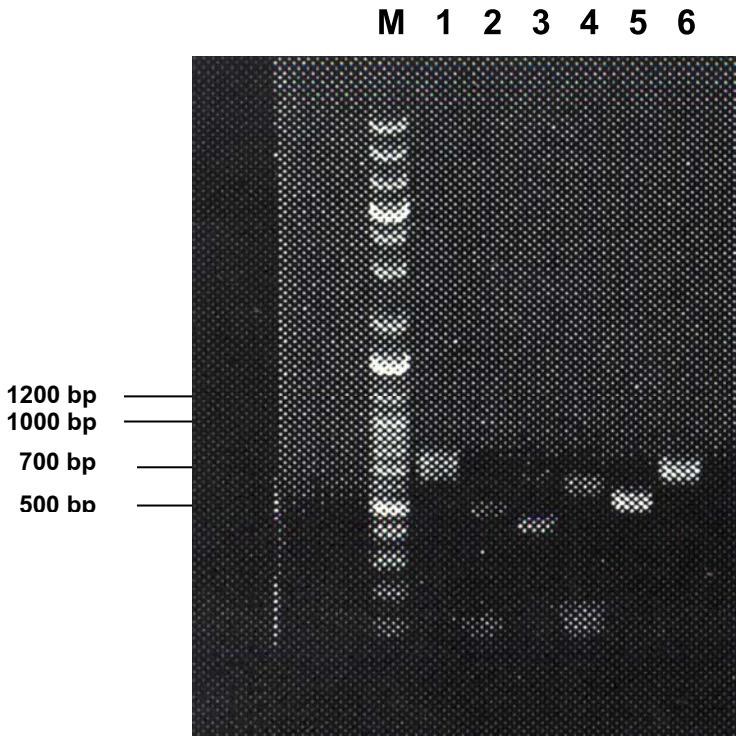
รูปที่ 4 ลำดับเบสที่ใช้ในการสร้าง VCA0728 deletion mutant ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือลำดับเบสของ primers ส่วนตัวอักษรเข้มคือผลผลิตของ PCR ที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR ตัวอักษรปกติคือลำดับเบสของ VCA0728 ที่ถูกตัดออก

TGGAGCTcGAAAGGTTGCGGATTTGAGAATCCCATTTATTTTGTAGGTTGCCATTCTTTAAGGTCAACGTACTAT
CGACTAACAACTGACGAAACGGCAGATCGTGAGGGAGCTTATCGACAAGCTCATTAACTCTTCCAGCGAGAGTTT
TTCTTTCTTCGTCATAGTTTTTTCTATACTTCAGCGTATGTAGCTGGCGCTGCCAGTCTTCTAACTTTGCTTGTA
ACGCCTTCAAGCTCCGCTTAATCTCTTCGCCCGGCTTGTTTTCAGGCTCTAATAGTTGAATGATTTCGTCACATG
CAAGCCCAGCAATATTTTCTTGATAAAAAAATGAGGCTATTGTACTGAGTTTCTTATGGTCAGTTTTAGCCTTAC
CGTTAAGCTCAAACCTCTTGCCATTTATAGATACCGCACCCTTGCTCTCCTTAGTGGTTATAAAACCACCTGCAC
CAACATTAGACTGATTAAGTACCCAGTCCATTGCTTCTAACAAAGAAGTTTTACCTACCCCGTTTTTACCCGTCA
CCAAAATAAGGTCGGCAGCTTGACCTGCTATCGTAAAATCAAGCTCTTTGGGGCCCCCATCTTCTAAAGCTCGGT
AGCCTTTGAAATTTTCCAGTCCTATAGACTGAATAGTATCGATATTGTTACCCAAGAGAAGTTACCTgCAgAACT
GGTTTACCTAATAGGTCATTGATGTCCTTAACAAGTTCATCCTGCCAGCTTTGAGCAACGCTATCATTTTCACCA
GCATCCACAGAAACCTTTAAAATATCCGTAAATCGAGTAAATAGCTGCGGCTCAACGCCTCTGGGAGGTTTAGCG
TTTTTAACAGCTTCAGAAAGTACACAAGAAAAATCTTGGGCTGTTATTCTCCTAGGAGTATATTCACTTGAGGCC
AGCTCCCCTAACCAACGCTTCTTTGCATCTTCTACTGATTTTCCTTCAAATGATTTTACGGCTTGAAGAACAAAA
CGTCCCCGGTGCCAATCTTGATCACCCATAAGCTGTAACCAAGAATCGGATTTCTTATGCATATCAATAAGAGCA
ACTAAAGGCGCAAACTTCTGGTAGTCATGCATCAGGTCTGTGAGGCGATCCATCAGGCGGGCAACATATTTCTTT
AGCTCAACCATTTCCTCTTCACTTGGATTCGAATCAACCCGCCAAACTACAAGATTACAAGCGGAGTGGCAcTGc
AgAGACACAGGATAGATATCTCTTCTTGCTGGACTACAGTCTGTAAAACTAATCTCCAATAATGATTCCAT**TCTT**
AAGCTTCTCGTAAGTAGGTTCGCCGCTTGATACTCGGCTGATTGGCATAAAAGTAATTTGTGGGAGAGTCAACTG
CATCTAGGATCGTTTCTGCGACAGTGTCTTTATTCCCATCATAAGGCTTTTGGTAAAAAATATGTTGCCACCCCA
AAGTCACTATTATTTTTGGAGTGATAGAACCTGCTGCCGTATCTTTATTAACAACTCTACGCAGGCTTGGCCGAA
TACGCGCACCGGCCTGCCCTAGAGCGAGAGCGAGATGGTTATTACCTCTCGGAACATTTACTTCATCCCCGGAAG
AGACAAATGAGGGATCTGCATTTAGATAAAGAAGCTTATCGCCAGTGAATTTCGCCTCAGAATGTTTGAATGATA
ACGCAATGCCACCTTCCAGCTCTTGTTCCGAACTTGGAGAAAGGAGGCCTTCAAATAAAAACAGCAATGTTACAA
GTTCAGACACAAGAGCTTTGTTTTCATTTATAGGATCATACTCTTTGGCTTTTCTACCATTGAGCTTAGATAAAC
TAGCAGCTAATGCAGAATATGCTTCCTGATCACTGATAACACCAGAAATAGAGTCTAGCCAGGgAGcTcTCGCAG
TGCA

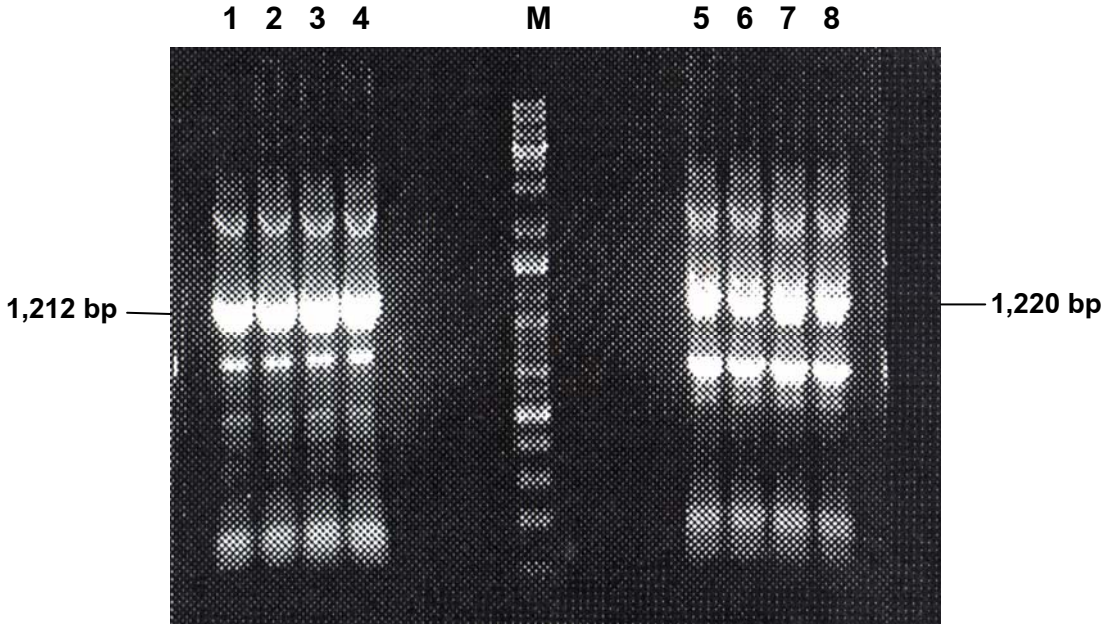
รูปที่ 5 ลำดับเบสที่ใช้ในการสร้าง VCA0729 deletion mutant ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือลำดับเบสของ primers ส่วนตัวอักษรเข้มคือผลผลิตของ PCR ที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR ตัวอักษรปกติคือลำดับเบสของ VCA0729 ที่ถูกตัดออก

CACCAGgATCCACAGAAACCTTTAAAATATCCGTAAATCGAGTAAATAGCTGCGGCTCAACGCCTCTGGGAGGTT
TAGCGTTTTTAACAGCTTCAGAAAGTACACAAGAAAAATCTTGGGCTGTTATTCTCCTAGGAGTATATTCACTTG
AGGCCAGCTCCCCTAACCAACGCTTCTTTGCATCTTCTACTGATTTTCCTTCAAATGATTTTACGGCTTGAAGAA
CAAAACGTCCCCGGTGCCAATCTTGATCACCCATAAGCTGTAACCAAGAATCGGATTTCTTATGCATATCAATAA
GAGCAACTAAAGGCGCAAACTTCTGGTAGTCATGCATCAGGTCTGTGAGGCGATCCATCAGGCGGGCAACATATT
TCTTTAGCTCAACCATTTCCTCTTCACTTGGATTCGAATCAACCCGCCAAACTACAAGATTACAAGCGGAGTGGC
AATGGACAGACACAGGATAGATATCTCTTCTTGCTGGACTACAGTCTGTAAAACTAATCTCCAATAATGATTCCA
TTCTTAAGCTTCTCGTAAGTAGGTTCGCCGCTTGATACTCGGCTGATTGGCATAAAAGTAATTTGTGGGAGAGTC
tgCaGCATCTAGGATCGTTTCTGCGACAGTGTCTTTATTCCCATCATAAGGCTTTTGGTAAAAAATATGTTGCCA
CCCCAAAGTCACTATTATTTTTGGAGTGATAGAACCTGCTGCCGTATCTTTATTAACAACTCTACGCAGGCTTGG
CCGAATACGCGCACCGGCCTGCCCTAGAGCGAGAGCGAGATGGTTATTACCTCTCGGAACATTTACTTCATCCCC
GGAAGAGACAAATGAGGGATCTGCATTTAGATAAAGAAGCTTATCGCCAGTGAATTTCGCCTCAGAATGTTTGAA
TGATAACGCAATGCCACCTTCCAGCTCTTGTTCCGAACTTGGAGAAAGGAGGCCTTCAAATAAAAACAGCAATGT
TACAAGTTCAGACACAAGAGCTTTGTTTTCATTTATAGGATCATACTCTTTGGCTTTTCTACCATTGAGCTTAGA
TAAACTAGCAGCTAATGCAGAATATGCTTCCTGATCACTGATAACACCAGAAATAGAGTCTAGCCAGGTAGGTGT
CGCAGTGCAGTAGTCGGAATCGTCTTTGAGTGTACCTTCGAGTGTTGATATAACTTGATGAAGAATGACTTCAGA
AAATGGTAAGACGGAAGTAAAGCTTGCATTCATTGACAGAATACTAGTTTTTAAGGCTTCAACAATTAATGTTCT
TGCTACTCGCTCATAAATACTTTTCCAGAGTTCATCTGCTGTTAAGTTCGGTCCTCTATCAGGATGTCGAATAAT
TAACTTATCGCCGTCCAAGGGAGACTTCTTGTGGTGCAAGGCGTAGGTATTGACGATTTGCTGCTGGTGAAAAGT
TGGGTAAGCATCATAAACTGCAACAATTGGCGCAGAATGTGTTTCCAATACATCGTGATTATTGTTTTCAAGTTC
ATCTATATACTCGTCCAAAACAGTCTGTAGTGTGTGATGCACTTGTGGCTCATCGCTACCAAAGCCCACAAACAT
CAAGGATTTACTTCTAAGTCGATCTCTAAAAACATCAGCAGCCCATTGCCTGTTCCGCCATTTCTGGAGCTGTCG
CTCAGTGAGAAGTATCGACTCGTATCTCTTTTCAACAGTAGTATCAGTAAGTTTCTCAGCACAACCATTTACCTT
AAAGACCTTTAGACGATTGACATTGTCTTCTCCAATCTCAGCGCCTTTTTTACGGTAATCGTCAAGACAGGAAAT
CACGTCTGAATTACTTCCACCGCTCAATTCAACATAGGCCTTTTCAAAGTTGCAGTCGTAGTTAGTGGTTATTAC
TTCATTAATCAGCCCCTCTCGTGACAACTTGGCTATGTAGTAATGAGCAGGCGTTGGGCATAGATCTCGATATTG
ATCAATTTTCAGAATATCTACCAAGCTCTTATAACCAATATCGGGGCTAACAAACTCCCACAGATACAGCTCAGA
CAGGCAACCCAGCTGATTAGCGCTCGCGGCCTTGGTAATATCACAGAAAAAACACACACCTTTGCAAATATCACC
AGTAATTTTATGACCAAGAGCTTCGAGTTCATGCGAGCACCAGCACTTGCATATAGTTCCATGAGCTTCAGCTTT
ATATCTAGCGAATCGAAGCTTAAACAACTCTTTTTTTAGGGTAGTTACCATCCATTTGACATTATGAACCCACTC
CCCGCTTCGAGGTTTACTTGTCATAGATATACCCGCACCGGCAACAGGCACACATCGTCGTCTCAATATTCTATC
GACAGTGTAATCAAACGCATTCCTTGCAATCAT**TTCTTACAGGGCTCC**GAATTTTGGGGCAGAGTAAACATTCTT
GTTGTCCACTTTTGGTCCTAGGCGGACTTGGTctGCaGTATAACAATCATAATGCAACGGCGCGCTTTTCCGTTT
CCATTGTCGAGGCTTGTTTTGTGAGTAACAAATTACGTAGAAGGAGCGCATGATTATGGGCTATTTGACTTCCTT
GTATCTGAACTCTCGGTATTCCGATGATGTTTGTTCATCAGTTGAATCTATTTAGCTGTGGCTGCGTATCAGCTC
GCTTCACCTACGACGCTAACTTTCAAGCTTGTTTTAAAGCATCATGCTTAATCCGTACCTATCTACTGTTTATGA
AGTAACTTTGTCGCATTACTAAAATCGGATCAATAGTTTTGGAAAGAAGTTACCCCTTTGTCACGTTACTAACTT
CGAATGGGGCATTTTCGTTTTGTACACCCCTGCCACACCTTTGGACACTCTCAACCCCAACCCATCACCCTCAAC
AATGCCTCACCTGCAACTAATACATACCACAATTACATATGAATACAGTTGCTTTTCGCGTTTTATACACGACCG
GATTGAGCGCCGCAACTATTCAGTCTAAGGTTTGCGGTGAACGACAGGTTCAACTTAACACCTTTGCTTGCACAC
TTTCAGCCGCCTTTCGGGGCGGCTTTTTCGTTCTGGaTccATTGGGCAGG

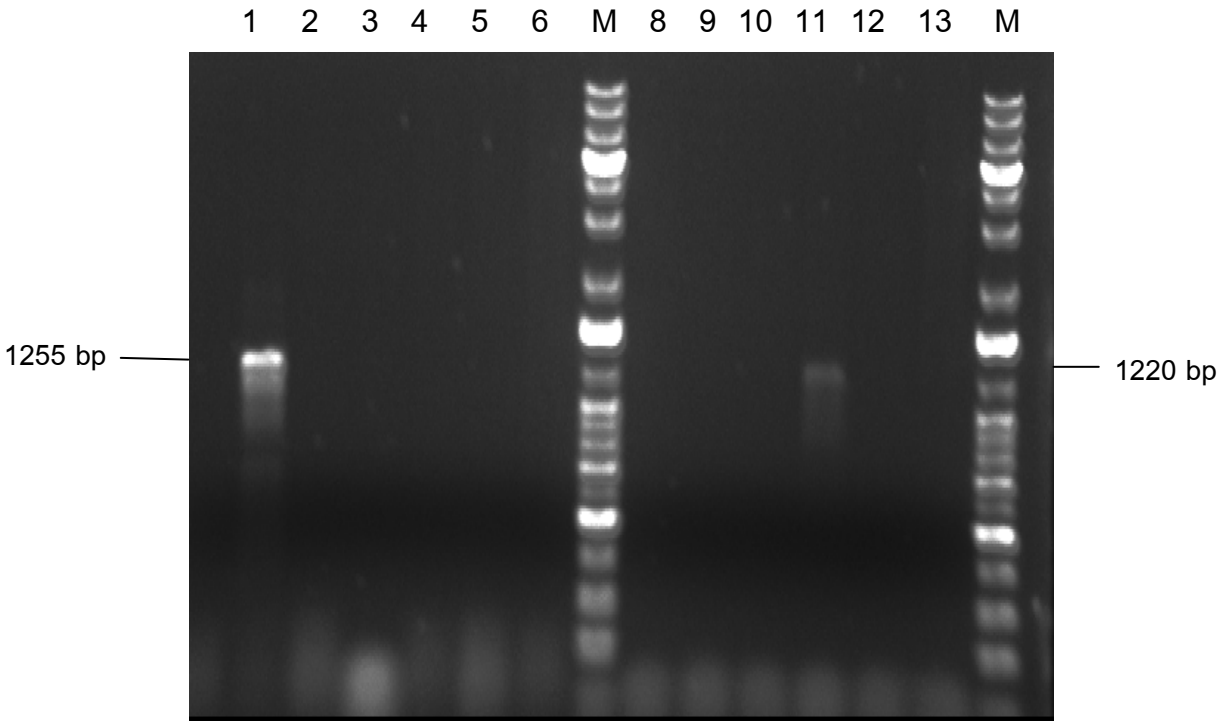
รูปที่ 6 ลำดับเบสที่ใช้ในการสร้าง VCA0730 deletion mutant ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือลำดับเบสของ primers ส่วนตัวอักษรเข้มคือผลผลิตของ PCR ที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำ overlapped PCR ตัวอักษรปกติคือลำดับเบสของ VCA0730 ที่ถูกตัดออก



รูปที่ 7 ผลผลิตดีเอ็นเอที่อยู่ก่อนและหลังตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต้องการตัดออก M: DNA marker (1 Kb DNA plus); ช่องที่ 1, A28-1 (738 bp); ช่องที่ 2, A28-2 (474 bp); ช่องที่ 3, A29-1 (647 bp); ช่องที่ 4, A29-2 (608 bp); ช่องที่ 5, A30-1 (528 bp); ช่องที่ 6, A30-2 (692 bp)



รูปที่ 8 ผลผลิตของ overlapped PCR M: DNA marker (1 Kb DNA plus); ช่องที่ 1-4, ΔVCA0728 (1,212 bp); ช่องที่ 5-8, ΔVCA0730 (1,220 bp)



รูปที่ 9 การคัดเลือกโคโลนีมี depleted DNA sequence ที่ต้องการด้วยวิธี PCR ช่องที่ 1-6 ผลการคัดเลือก ΔVCA0729 sequence (1,255 bp); ช่องที่ 8-13 ผลการคัดเลือก ΔVCA0730 sequence (1,220 bp); M, DNA marker (1 Kb DNA plus)

การคัดเลือก VCA0728 (หรือ VCA0729 หรือ VCA0730) deletion mutants

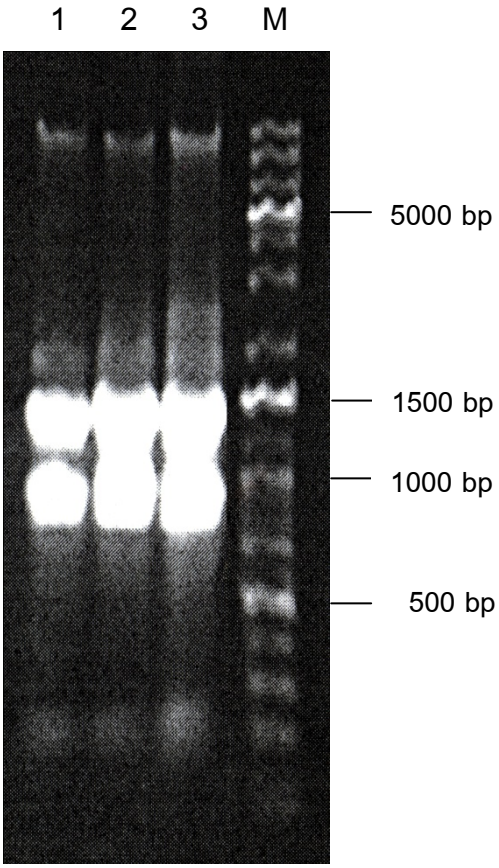
เมื่อนำ Conjugative host (SM10 λ *pir*) ที่มี depleted DNA sequence ที่ต้องการ (ΔVCA0728 หรือ ΔVCA0729 หรือ ΔVCA0730) และดื้อยาแอมพิซิลลิน ไป conjugate กับ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ N16961 ที่ดื้อยาสเตรปโตมัยซิน และคัดเลือกโดยการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสเตรปโตมัยซิน และแอมพิซิลลิน N16961 โคโลนีที่ได้รับ conjugative plasmid เท่านั้นที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ นำโคโลนีเหล่านี้ไป restreak บน LB agar ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ เพื่อเปิดโอกาสให้เกิด recombination ระหว่าง depleted DNA sequence และโครโมโซมของ N16961 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบน TCBS agar โคโลนีที่ไม่มีพลาสมิดเท่านั้นที่สามารถเจริญได้บน TCBS agar เพราะบน plasmid มี *sacB* ทำให้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส จากนั้นคัดเลือก deletion mutants ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่ใช้ทำ overlapped PCR และเลือกโคโลนีที่ให้ผล PCR เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 1,212 bp (ΔVCA0728), 1,255 bp (ΔVCA0729), และ 1,220 bp (ΔVCA0730) และยืนยันว่าโคโลนีเหล่านี้เป็น in frame deletion mutants โดยการทำ DNA sequencing ซึ่งให้ผลตรงตามที่กำหนด (รูปที่ 4, 5 และ 6)

การสังเคราะห์และเพิ่มจำนวน cDNA ของ N16961 และ deletion mutants

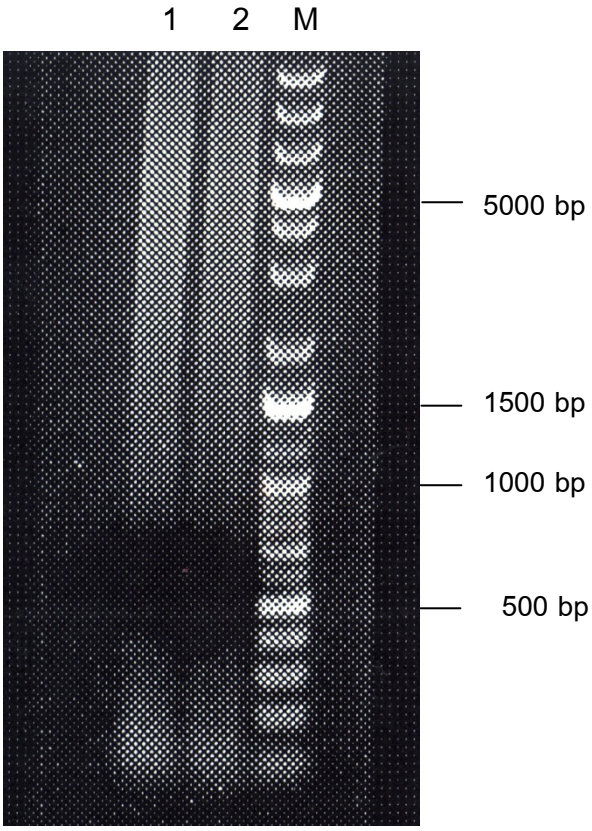
Total RNA ที่สกัดจาก N16961 และ deletion mutants (รูปที่ 10) ถูกนำไปเป็นต้นแบบในการสังคราะห์ cDNA libraries จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับ Adaptor และเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี PCR จนได้ cDNA ไม่น้อยกว่า 75 ไมโครกรัม (รูปที่ 11)

Subtraction Hybridization

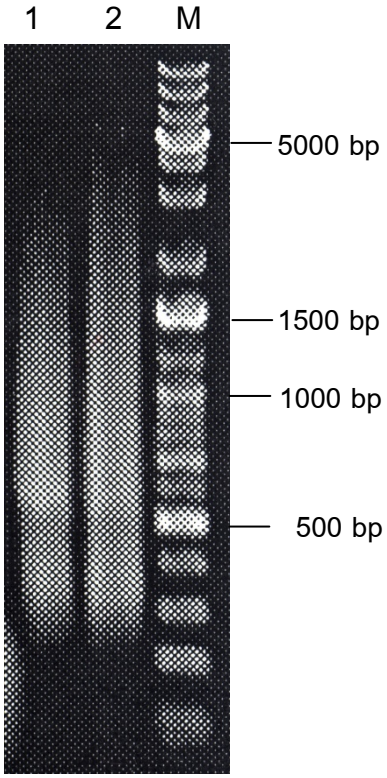
cDNA ของ N16961 และ deletion mutants ถูกนำไปใช้เป็นตัวเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่าง wild type (N16961) และ deletion mutants ด้วยวิธี subtraction hybridization โดยยีนที่แสดงออกเหมือนกันระหว่าง Tester และ Driver จะจับกัน ส่วนยีนที่แสดงออกเฉพาะใน Tester หรือ Driver จะจับกันเอง เมื่อนำ Differential products ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR จะสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะส่วนที่เป็น Tester จับกับ Tester เท่านั้น เนื่องจาก Driver ไม่มีลำดับเบสของ primer (รูปที่ 12)



รูปที่ 10 Total RNA ช่องที่ 1 N16961; ช่องที่ 2 ΔVCA0728 mutant; ช่องที่ 3 ΔVCA0729 mutant; M, DNA marker (1 Kb DNA plus)



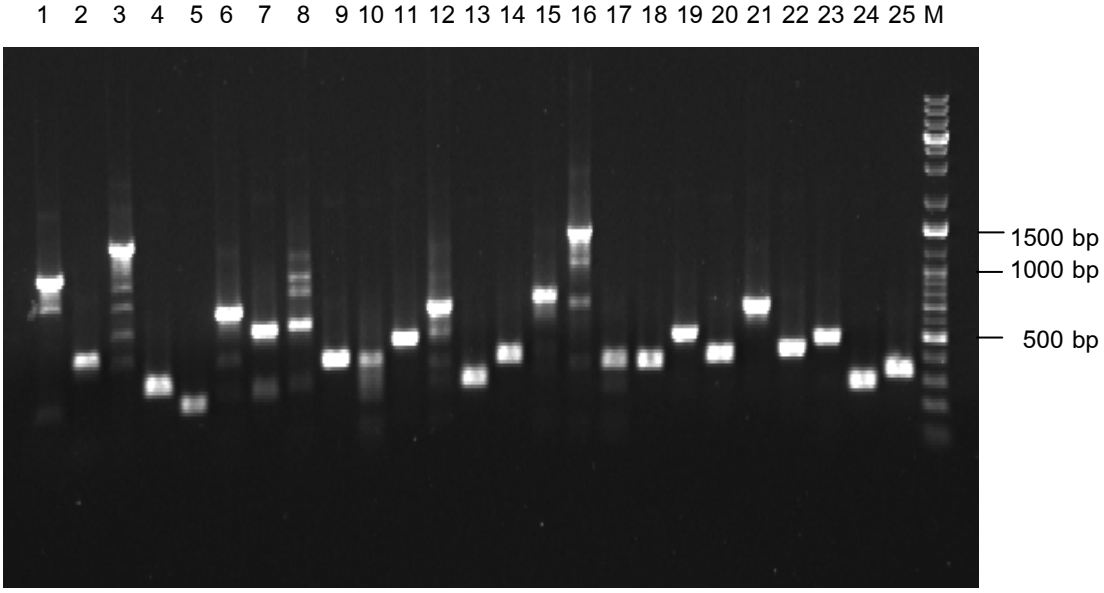
รูปที่ 11 cDNA libraries ช่องที่ 1 N16961; ช่องที่ 2 ΔVCA0728 mutant; M, DNA marker (1 Kb DNA plus)



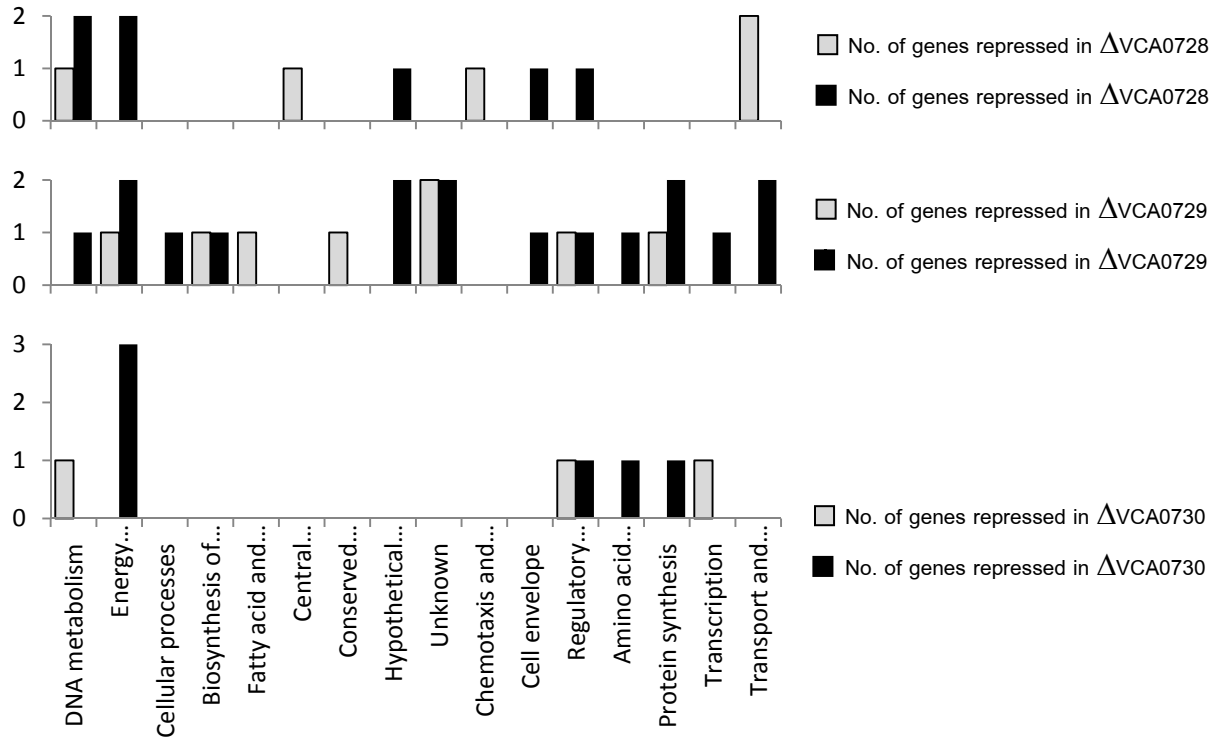
รูปที่ 12 Differential products ช่องที่ 1 N16961 เป็น Tester และ ΔVCA0729 mutant เป็น Driver; ช่องที่ 2 ΔVCA0729 mutant เป็น Tester และ N16961 เป็น Driver; M, DNA marker (1 Kb DNA plus)

ยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไปใน deletion mutants

นำ Differential products จากการ Subtraction ครั้งที่ 2 ไปตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จากนั้นเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันแล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ DH5α โดยวิธี electroporation จากนั้นคัดเลือกโคโลนีไม่มีสีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมพิซิลลินและ X-gal ไปสกัดพลาสมิดและตรวจสอบขนาดของ DNA inserts โดยวิธี PCR (รูปที่ 13) และหาลำดับเบสของ DNA inserts เพื่อเปรียบเทียบยีนที่แสดงออกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต้นกำเนิดกับ deletion mutants จากการส่งหาลำดับเบสทั้งสิ้น 169 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 46 ยีนที่แตกต่างกันเท่านั้น เนื่องจากบางยีนมีการแสดงออกแตกต่างกันมาก ทำให้พบได้ถึง 5-6 โคโลนี โดยที่ขนาดของ inserts แตกต่างกันจึงไม่ใช่การเลือกโคโลนีซ้ำ รูปที่ 14 แสดงจำนวนยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไประหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ deletion mutants โดยแบ่งตามหน้าที่ พบว่ายีนกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือกลุ่มของ Energy metabolism (8 ยีน) รองลงมาคือกลุ่มของ DNA metabolism (5 ยีน) และ Regulatory function (5 ยีน) ส่วนยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงอันดับถัดมาคือ กลุ่มของ Protein synthesis (4 ยีน), Transport and binding protein (4 ยีน), ยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ (4 ยีน), Hypothetical protein (3 ยีน), Biosynthesis of cofactors (2 ยีน), Cell envelope (2 ยีน), Amino acid biosynthesis (2 ยีน), Transcription (2 ยีน), Cellular processes (1 ยีน), Central intermediary metabolism (1 ยีน), Chemotaxis and motility (1 ยีน), Fatty acid and phopholipid metabolism (1 ยีน), Conserved hypothetical protein (1 ยีน) โดย deletion mutant ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนมากที่สุดคือ ΔVCA0729 รูปที่ 15 ตารางที่ 3, 4 และ 5 เป็นชื่อและหน้าที่ของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ deletion mutants



รูปที่ 13 ผลผลิตของ PCR ของ differential products ช่องที่ 1-25 ผลผลิตของ PCR ของโคโลนีที่นำไปหาลำดับเบส; M, DNA marker (1 Kb DNA plus)



รูปที่ 14 แสดงจำนวนยีนในแต่ละกลุ่มหน้าที่ ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ deletion mutants

VC0012	VC0012
	VC0190
VC2431	VC2431
	VC0473
	VC1573
VC2091	VC2087
	VC2414
	VC2698
	VCA0136
	VC2397
VC0062	
	VC0215
VC0296	
VC0667	
VC0420	
	VC0231
	VC1265
	VC1566
VC1366	
VC1367	
	VC1620
VC2197	VCA0975
	VC2252
VC2744	VC2744
	VCA0705
VCA0876	
	VC0030
VC0003	VC0003
	VC0327
	VC0682
VCA0804	VCA0804
VCA0205	VC2211
VCA0945	VCA0945

รูปที่ 15 แสดงรายนามของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ deletion mutants แบ่งตามกลุ่มหน้าที่

ตารางที่ 3 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ ΔVCA0728 mutant

Gene Identification	Expressed only in wild type	Gene Identification	Expressed only in ΔVCA0728 mutant
VC0012	chromosomal replication initiation protein (*dnaA*)	VC0190	DNA-dependent helicase II (*uvrD*)
VC0667	oxidoreductase TAS, aldo/keto reductase family	VC0473	transketolase (*tktA*)
VC2197	flagellar hook protein FlgE (*flgE*)	VC1566	ABC-type antimicrobial peptide transport system permease
VCA0205	anaerobic C4-dicarboxylate transporter (*dcuB*)		component
VCA0945	maltose ABC transporter periplasmic protein	VC2252	outer membrane protein assembly factor OMA87 (*yaeT*)
	(*malE*)	VC2414	pyruvate dehydrogenase subunit E1 (*aceE*)
		VC2431	DNA topoisomerase IV subunit B (*parE*)
		VC2744	GTP-binding protein TypA (*typA*)

ตารางที่ 4 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ ΔVCA0729 mutant

Gene Identification	Expressed only in wild type	Gene Identification	Expressed only in ΔVCA0729 mutant
VC0003	thiophene and furan oxidation protein ThdF (*thdF*)	VC0012	chromosomal replication initiation protein (*dnaA*)
VC0062	thiamine-phosphate pyrophosphorylase (*thiE*)	VC0030	acetolactate synthase 2 regulatory subunit (*ilvM*)
VC0296	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein (*accB*)	VC0215	DNA/pantothenate metabolism flavoprotein (*dfp*)
		VC0231	capsular polysaccharide biosynthesis protein
VC0420	Possible exported protein	VC0327	ribosomal protein L7/L12 (*rplL*)
VC1366	queuosine biosynthesis protein QueC (*queC*)/exsB protein	VC0682	isoleucyl-tRNA synthetase (*ileS*)
		VC1265	probable thiol oxidoreductase with 2 cytochrome c heme-binding sites
VC1367	GGDEF family protein (*cdgE*)		
VC2091	succinate dehydrogenase cytochrome b556 large membrane subunit (*sdhC*)	VC1573	fumarate hydratase, class II base (*fumC*)
		VC1620	Cadherin related protein
VC2744	GTP-binding protein TypA (*typA*)	VC2211	ferric vibriobactin receptor (*viuA*)
		VC2252	outer membrane protein assembly factor OMA87 (*yaeT*)
		VC2397	cell division protein FtsZ (*ftsZ*)
		VC2698	aspartate ammonia-lyase (*aspA*)
		VCA0705	phosphoglycerate transport reg protein PgtB (*pgtB*)
		VCA0804	ATP-dependent RNA helicase DeaD (*deaD*)
		VCA0945	maltose ABC transporter periplasmic protein (*malE*)
		VCA0975	ATP-dependent protease LA-related protein

ตารางที่ 5 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ ΔVCA0730 mutant

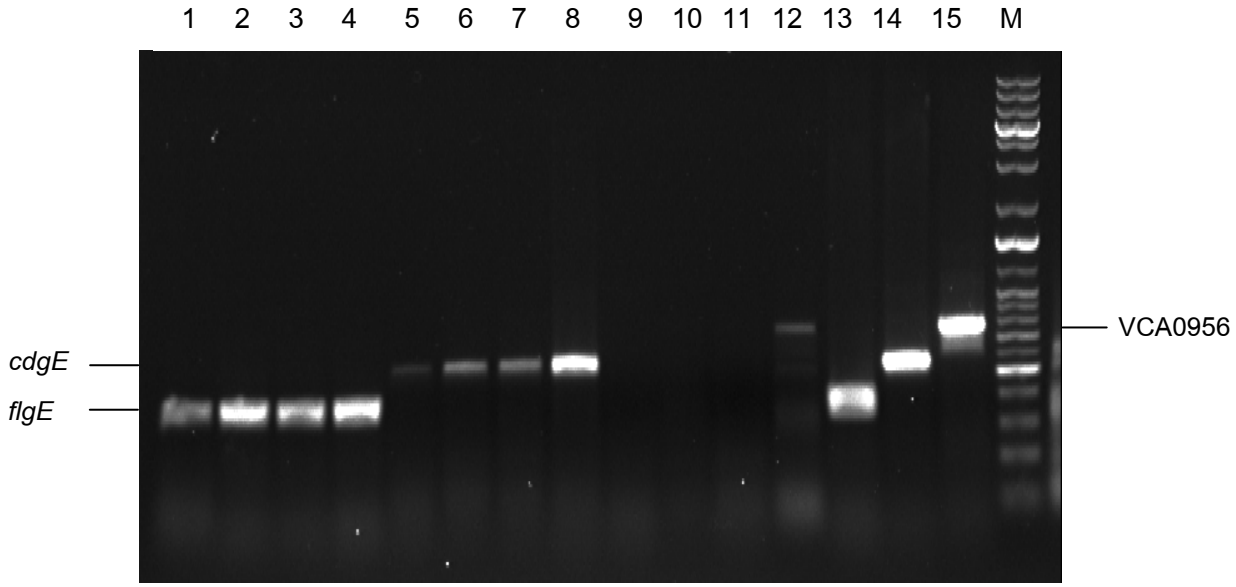
Gene Identification	Expressed only in wild type	Gene Identification	Expressed only in ΔVCA0730 mutant
VC2431	DNA topoisomerase IV subunit B (*parE*)	VC0003	thiophene and furan oxidation protein ThdF (*thdF*)
VCA0804	ATP-dependent RNA helicase DeaD (*deaD*)	VC0030	acetolactate synthase 2 regulatory subunit (*ilvM*)
VCA0876	D-serine deaminase activator (*dsdC*)	VC1573	fumarate hydratase (*fumC*)
		VC2087	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component (*sucA*)
		VC2744	GTP-binding protein TypA (*typA*)
		VCA0136	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (*glpQ*)

การยืนยันผลด้วยวิธี RT-PCR

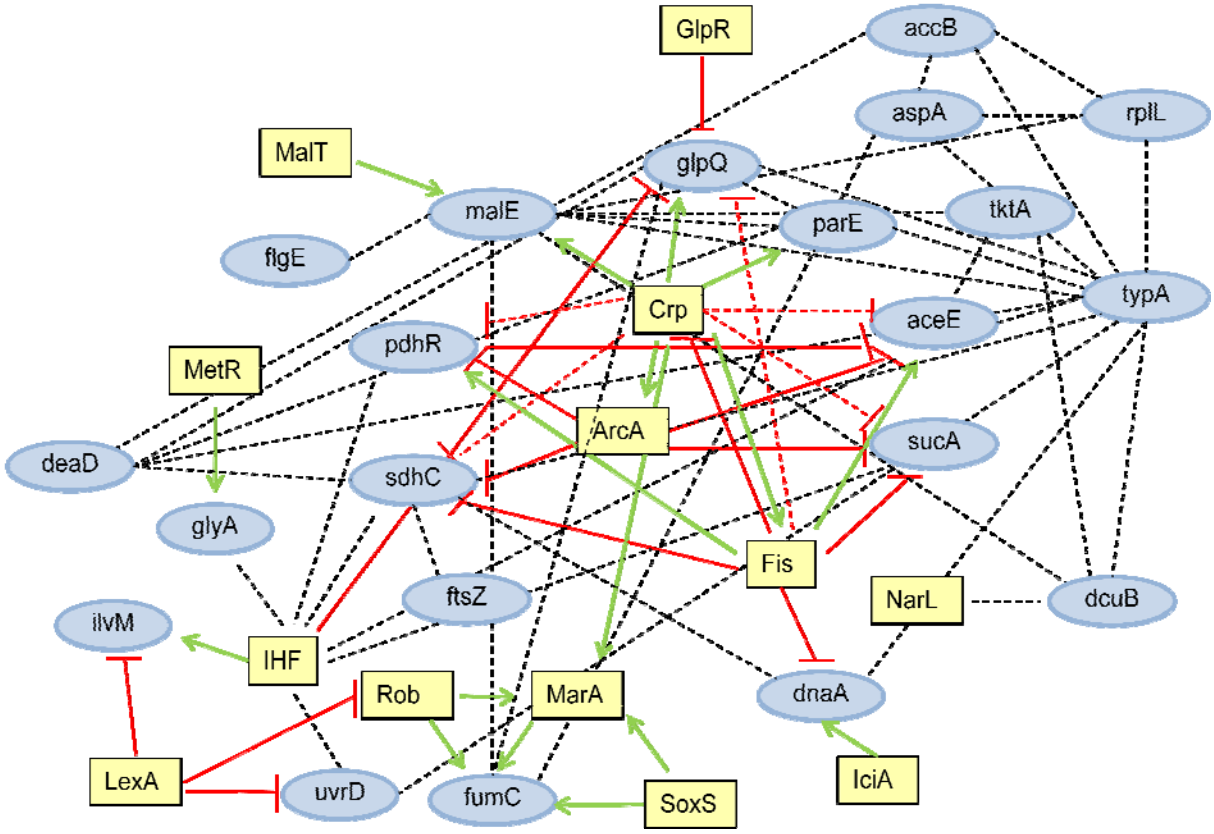
การยืนยันความถูกต้องของวิธี modified representational difference analysis สามารถทำได้โดยการทำ RT-PCR ซึ่งในที่นี้เลือกยีน *flgE, cdgE* และ VCA0956 เพื่อออกแบบ primers และใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและ deletion mutants (รูปที่ 16) จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ *flgE* ลดลงใน ΔVCA0728 mutant ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลของ representational difference analysis ส่วน *cdgE* พบว่ามีการแสดงออกลดลงทั้ง 3 mutants โดย ΔVCA0728 mutant มีการแสดงออกน้อยที่สุด ซึ่งผลของ representational difference analysis พบเพียง ΔVCA0729 mutant เท่านั้นที่มีการแสดงออกลดลง ผลที่ได้นับว่าสอดคล้องกัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการทำ subtraction hybridization คือเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่จะส่ง sequencing ทำให้ไม่สามารถครอบคลุมได้ทุกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามผลที่ได้นับว่าเชื่อถือได้แต่อาจขาดความสมบูรณ์ไปบ้าง วิธีที่จะให้ผลครอบคลุมได้ทุกยีนคือวิธี microarray analysis ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและสามารถทำได้เฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ที่มีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมแล้วเท่านั้น ส่วนข้อดีของวิธี modified representational difference analysis คือเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถใช้ศึกษาเปรียบเทียบเชื้อที่อาจยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน และที่สำคัญคือสามารถทำได้โดยใช้เพียงเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (24)

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์รวมถึงกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านั้นทำได้โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRING v. 8.3 (25) และ Prodonet v. 9.12 (26) โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาใน *E. coli* สายพันธุ์ K-12 เพื่อช่วยในการทำนาย เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง ในขณะที่ยังขาดข้อมูลเรื่องการแสดงออกของยีนของ *V. cholerae* โดยเฉพาะยีนที่ปรากฏอยู่ในผลการทดลองอีกเป็นจำนวนมาก ผลการวิเคราะห์สรุปได้ดังรูปที่ 17



รูปที่ 16 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ช่องที่ 1-4 ยีน *flgE*; ช่องที่ 5-8 ยีน *cdgE*; ช่องที่ 9-12 ยีน VCA0956; ช่องที่ 1, 5, 9 ΔVCA0728 mutant; ช่องที่ 2, 6, 10 ΔVCA0729 mutant; ช่องที่ 3, 7, 11 ΔVCA0730 mutant; ช่องที่ 4, 8, 12 N16961; ช่องที่ 13 N16961 *flgE*; ช่องที่ 14 N16961 *cdgE*; ช่องที่ 15 N16961 VCA0956; M, DNA marker (1 Kb DNA plus)



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวควบคุมและยีนต่าง ๆที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออก

ตัวควบคุม (Transcription factor)

ยีน

การควบคุมในเชิงบวก

การควบคุมในเชิงลบ

มีความสัมพันธ์กันแต่ยังไม่ทราบว่าเชิงบวกหรือลบ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730

จีโนมของ *V. cholerae* สายพันธุ์ N16961 ประกอบด้วยโครโมโซมสองเส้น โครโมโซมใหญ่มี 2.96 x 10^6 คู่เบส ควบคุมการสร้าง 2,775 ORFs และโครโมโซมเล็กขนาด 1.07 x 10^6 คู่เบส ควบคุมการสร้าง 1,115 ORFs (9) โครโมโซมใหญ่ประกอบด้วยยีนควบคุมการสร้างผลผลิตที่จำเป็นในการดำรงชีวิต เช่น เกี่ยวกับการ transcription, translation. เมตาโบลิซึมและชีววิทยาของเซลล์ ในขณะที่โครโมโซมเล็กควบคุมการสร้างยีนซึ่งไม่ทราบหน้าที่เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ใน LB พบว่าการแสดงออกของยีนบนโครโมโซมเล็กมีน้อยมาก แต่การแสดงออกของยีนบนโครโมโซมเล็กนี้จะมีมากขึ้นเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่โฮสต์ (rabbit ileal loop) (27)

ยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 ตั้งอยู่บนโครโมโซมเล็ก ควบคุมการสร้างโปรตีนซึ่งไม่ทราบหน้าที่ เมื่อทดลองหาความคล้ายคลึงกับยีนหรือโปรตีนอื่น โดยการเทียบกับข้อมูลสากล (National Center for Biotechnology Information: NCBI) โดยการทำ BLASTN และ BLASTX พบว่าทั้งลำดับเบสและกรดอมิโนของยีนทั้งสามไม่เหมือนยีนหรือโปรตีนใดในฐานข้อมูลสากล นอกจาก *V. cholerae* El Tor biotype สายพันธุ์อื่น เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนทั้งสามโดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้ CDD เพื่อหา conserved domain (28), SMART (simple modular architecture research tool) เพื่อหา signaling domain (16, 17), TMHMM v. 2.0 เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็น transmembrane protein (18), SignalP v. 3.0 เพื่อหา signal peptide (19), Coils v. 2 เพื่อทำนายส่วนที่มีโครงสร้างเป็น coiled coil (20), SEG เพื่อหาโครงสร้างส่วนที่มีแนวโน้มจะมีเบสหรือกรดอมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่าปกติ (21), Prospero เพื่อหาบริเวณที่มี repeats (22), DisEMBL เพื่อทำนายบริเวณที่มีความผิดปกติของโครงสร้างหรือโดเมนซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน (23) ผลจากการวิเคราะห์ให้ผลดังนี้

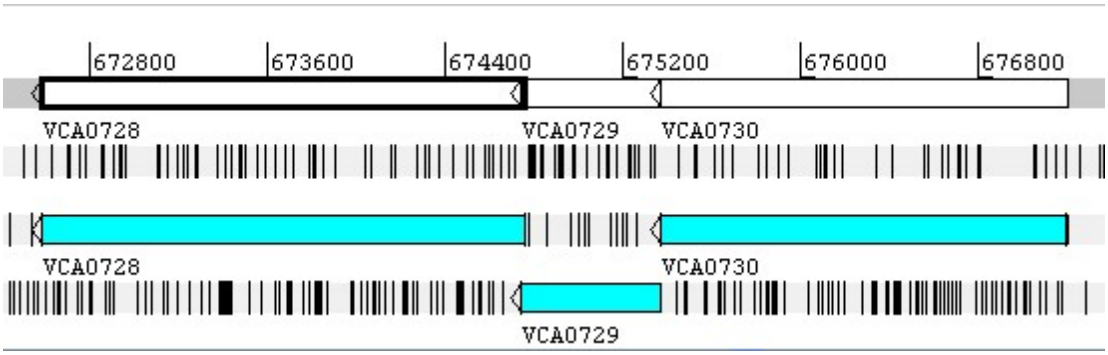
VCA0728 เป็นยีนที่มีขนาดความยาว 2172 เบส ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอมิโน 723 โมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณ 80.81 กิโลดัลตัน เมื่อทดสอบด้วย SMART พยว่ากรดอมิโนลำดับที่ 7-682 มีคุณสมบัติเป็น SMC_N domain (16) และเมื่อทดสอบด้วย CDD พบว่ากรดอมิโนลำดับที่ 8-439 มีคุณสมบัติเป็น SbcC domain (28) ซึ่ง domain ทั้งสองจัดอยู่ใน SMC family เช่นกัน SMC ย่อมาจาก structural maintenance of chromosomes โปรตีนใน family นี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งแบคทีเรียและอาร์เคีย โปรตีน SMC มีความจำเป็นในการส่งผ่านโครโมโซมในขณะที่มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของสิ่งมีชีวิต โดยทำหน้าที่ condensation และ segregation ของ

โครโมโซม (29)นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ, DNA recombination และ gene silencing อีกด้วย (30) กรดอมิโนลำดับที่ 8-89 มีคุณสมบัติเป็น P-loop NTPase (28) ซึ่งสามารถไฮโดรไลส์นิวคลิโอไทด์ GTP หรือ ATP ภายในโดเมนประกอบด้วย Walker A motif (GxxxxGK[S/T], x คือกรดอมิโนชนิดใดก็ได้) ซึ่งเป็นส่วนที่จับหมู่ฟอสเฟตของ ATP หรือ GTP และ Walker B motif (hhhh[D/E], h คือกรดอมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic) ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ Mg^{2+} (28) และกรดอมิโนลำดับที่ 134-168 และ 305-342 มีคุณสมบัติเป็น coiled coil domain (20) องค์ประกอบทั้งหมดที่กล่าวมานี้สอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของโปรตีนใน SMC family ซึ่งโปรตีนใน family นี้ประกอบด้วย 1) N-terminal globular domain ซึ่งประกอบด้วย Walker A motif 2) coiled-coil domain อันแรก 3) globular domain ซึ่งทำหน้าที่เสมือนบานพับ 4) coiled-coil domain อันที่สองและ 5) C-terminal globular domain ซึ่งจะมี DA box อันประกอบด้วย Walker B และ motif อื่นๆ (30) โปรตีน SMC ของโปรคาริโอตจะอยู่ในรูป homodimers โดยมีทิศทางกลับหัวกลับหางกัน (31) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอมิโนลำดับที่ 103-499 มีคุณสมบัติเป็น EzrA domain (16) ซึ่งโปรตีนใน family นี้ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม (negative regulator) การโพลีเมอไรส์โปรตีน FtsZ ซึ่งเป็นโปรตีนที่กำหนดบริเวณที่จะเกิดการแบ่งตัว ทำให้เกิดการโพลีเมอไรส์ FtsZ บริเวณกลางเซลล์และเกิดขึ้นเพียงครั้งเดียวในแต่ละรอบของการแบ่งตัว (32)

จากการศึกษาใน *E. coli* ซึ่งมีการศึกษากันมากที่สุด พบว่าถ้าใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่มี palindrome ขนาดใหญ่ คือ >150-200 เบส เข้าไปใน wild type มีโอกาสเกิด 2 อย่างคือ เชื้อไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ หรือเกิด deletion ภายในและรอบๆ palindrome ทำให้เชื้อนั้นไม่เสถียร (33-35) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสเชื่อว่า *sbcC* และ *sbcD* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ย่อยกรดนิวคลิอิค และลำดับกรดดมิโนของ SbcC และ SbcD ก็คล้าย exonuclease ของแบคเทอริโอเฟจ T4 และ T5 (36, 37) SbcCD สามารถจดจำ hairpin ที่เกิดขึ้นบนแม่แบบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อมีการตัด hairpin แล้วจะทำให้ดีเอ็นเอทั้งสองเส้นขาดจากกัน (double strand break คำย่อ DSB) ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อได้ การเกิด hairpin อันมีสาเหตุจาก palindrome sequence เป็นสาเหตุให้เชื้อนั้นไม่เสถียร โดยเฉพาะเมื่อเกิด hairpin ใน lagging strand ของ replication fork (38) แต่ *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *sbcC* หรือ *sbcD* จะสามารถรับชิ้นดีเอ็นเอที่มี palindrome ขนาดใหญ่ได้ (33) การที่ N16961 มี SbcC domain แต่มีลำดับเบสและกรดอมิโนที่ไม่เหมือนสิ่งมีชีวิตอื่นๆอาจเกิดจากการวิวัฒนาการของเชื้อทำให้ SbcC ของ N16961 มีคุณสมบัติเหมือน *E. coli* ที่เกิดการกลายพันธุ์คือสามารถรับชิ้นดีเอ็นเอที่มี palindrome ขนาดใหญ่ได้ ดังจะเห็นได้จากบนโครโมโซมเล็กของ N16961 มี integron island ขนาดใหญ่ซึ่งประกอบไปด้วย *Vibrio cholerae* repeat (VCR) จำนวนมาก

VCA0729 เป็นยีนที่มีขนาดความยาว 624 เบส ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอมิโน 207 โมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณ 23.4 กิโลดัลตัน กรดอมิโนตำแหน่งที่ 42-64 มีลักษณะเป็น coiled coil motif (20) ซึ่งโปรตีนที่มีลักษณะนี้มักทำหน้าที่สำคัญ เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น (transcription factors) เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส และการรักษาโครงสร้างของเซลล์

VCA0730 เป็นยีนที่มีขนาดความยาว 1830 เบส ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอมิโน 609 โมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณ 68.4 กิโลดัลตัน กรดอมิโนลำดับที่ 131-287 มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่จัดอยู่ใน SIR2 superfamily ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้ รวมไปถึงเอนไซม์ silent information regulator 2 (Sir2) หรือ sirtuins ซึ่งพบได้ทั้งในยูคาริโอต อาร์เคีย และโปรคาริโอต โปรตีนนี้ทำหน้าที่คงความเสถียรให้กับโครโมโซม, ควบคุม gene silencing, การซ่อมแซมดีเอ็นเอ, เอนไซม์ต่างๆในขบวนการเมตาโบลิซึม, apoptosis, ความยืนยาวของชีวิต และควบคุม (negative regulate) การเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ หน้าที่ซึ่งมีการศึกษากันมากที่สุดคือ gene silencing โดยเอนไซม์นี้จะบดบังโดเมนบนโครโมโซมส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นทำให้ไม่สามารถทำงานได้



รูปที่ 18 แสดงตำแหน่งและทิศทางของยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 บนโครโมโซมเล็ก

จากการวิเคราะห์หน้าที่และตำแหน่งของยีนทั้งสาม (รูปที่ 18) ทำให้คาดว่ายีนทั้งสามอยู่บน operon เดียวกันและทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการแบ่งโครโมโซมให้เซลล์ลูกขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว ช่วยคงความเสถียรให้กับโครโมโซมโดยควบคุมการเกิด homologous recombination, DNA repair และการกระตุ้นการตอบสนองของระบบ SOS นอกจากนี้ยังอาจทำหน้าที่เป็น transcriptional activator อีกด้วย

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกใน deletion mutants สามารถวิเคราะห์ตามกลุ่มหน้าที่ดังนี้

DNA metabolism

DnaA ของแบคทีเรียทำหน้าที่เป็น transcription factor (39) และ replication initiator บนโครโมโซมของ *E. coli* พบว่ามี DnaA boxes ประมาณ 1600 ตำแหน่ง (40) แสดงให้เห็นว่า DnaA ควบคุมยีนอื่นๆเป็นจำนวนมาก โดยการไปจับกับ DnaA boxes ที่อยู่เหนือด้าน 5' ของ regulatory region หรือ coding region ของยีนเหล่านี้ (41) และกดการแสดงออก ยีนเหล่านี้ได้แก่ *dnaA, mioC, rpoH, guaBA* และ *uvrB* (41) นอกจากนี้ DnaA อาจจะหยุดการ transcription ของบางยีนเลยก็ได้ (41) ใน *V. cholerae* ซึ่งมี 2 โครโมโซม พบว่า DnaA ทำหน้าที่ควบคุมการเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม 1 ส่วน RctB ทำหน้าที่ควบคุมการเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม 2 (42)

นอกจากนี้ยังพบว่า DnaA มีผลต่อการขดเกลียวของดีเอ็นเอ โดยพบว่าพลาสมิดของแบคทีเรียที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *dnaA* จะมีการขดเกลียวมากกว่าปกติ โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ (43) ใน *dnaA* mutants พบการยับยั้งการแสดงออกของยีนหลายชนิดเนื่องจากเกิดการขดเกลียวมากผิดปกติของดีเอ็นเอภายในเซลล์ ได้แก่ *fliC*, *proU, tonB, osmZ* และ *virR* (44-47) การทำงานของ DnaA ถูกควบคุมโดยฟอสโฟไลปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ (47) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ long chain fatty acid transport protein และ β-ketoacyl synthase II ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมของฟอสโฟไลปิดจึงมีความสำคัญ การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการปรับตัวเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37°ซ แต่ไม่เปลี่ยนแปลงที่ 28°ซ (48) เมื่อโปรตีนสองชนิดนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งก็จะมีผลต่อการทำงานของ DnaA

ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *dnaA* ใน VCA0728 และ VCA0729 mutants แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดเป็นทางตรงกันข้ามคือ ลดการแสดงออกใน VCA0728 mutant แต่แสดงออกมากขึ้นใน VCA0729 mutant ความสำคัญของการแสดงออกที่ต่างกันนี้อาจเกี่ยวข้องกับยีนอื่นๆอีกหลายยีนเนื่องจาก *dnaA* ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาต่อไป

DNA replication

Topoisomerase (Topo) IV เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่แยกโครโมโซมเส้นใหม่ที่เพิ่งเพิ่มจำนวนออกจากเส้นเก่าในช่วงที่มีการแบ่งตัว เอนไซม์ Topoisomerase (Topo) IV ของโปรคาริโอตประกอบด้วยส่วนที่เป็น ATP-binding subunit คือ *parE* และส่วนที่ทำหน้าที่เป็น catalytic subunit หรือ *parC* (49) การกลายพันธุ์ของยีนนี้ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังกั้นระหว่างเซลล์ได้ เกิดภาวะ conditionally lethal phenotypes (49, 50) ผลของการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีน *parE* เพิ่มขึ้นใน VCA0728 mutant แต่กลับแสดงออกลดลงใน VCA0730 เนื่องจากผลผลิตของยีนนี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโครโมโซมเส้นใหม่ที่เพิ่งมีการเพิ่มจำนวนออกจากเส้นเก่าในช่วงที่มีการแบ่งตัว ทำให้สนใจศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ mutants เหล่านี้ ผลจากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 37°ซ โดยเลี้ยงใน alkaline peptone water ที่มีปริมาณเกลือร้อยละ 0, 1, 3 และ 6 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0, 1, 3 แต่พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 6 อัตราการเจริญเติบโตของ VCA0728 mutant มีสูงสุด (ไม่ได้แสดงผล)

การซ่อมแซมดีเอ็นเอเป็นขบวนการพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทั่วไปรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัวเองเพื่อให้มีชีวิตรอดอยู่ในโฮสต์ได้ ขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอประกอบด้วย mismatch repair (MMR) ซึ่งมี MutSLH เป็นโปรตีนที่สำคัญในขบวนการนี้ (51), base excision repair หรือ glycosylases (52) และ nucleotide excision repair (NER) ซึ่งอาศัยการทำงานของโปรตีน UvrABCD (53) นอกจากนี้ยังมีขบวนการ homologous recombination ซึ่งอาศัยโปรตีน RecBCD และ RecFOR (54) ก็เป็นกลไกสำคัญที่ช่วยในการซ่อมแซมการเสียหายที่เกิดการขาดของดีเอ็นเอทั้งสองเส้น (double-strand breaks: DSBs) (55) โดยความเสียหายนี้อาจเกิดได้จากทางกายภาพและสารเคมีที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอเพียงเส้นเดียว ถ้าไม่รีบแก้ไขทันทีก็จะนำไปสู่ DSB ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของจีโนม

ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ ถ้า replication fork พบกับเบสที่เสียหายก็จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อได้ ทำให้เกิด DSB ซึ่งโปรตีน UvrD มีส่วนสำคัญในการแก้ไขนี้ โดยการไปจับกับดีเอ็นเอแทนที่ RecA (56) การศึกษาใน *E. coli* พบว่า 20-50% ของ replication forks ต้องการ recombination repair เพื่อซ่อมแซมความเสียหาย (57) โปรตีน UvrD ทำงานร่วมกับ MutSHL ในระบบ mismatch repair และ UvrABC ในระบบ nucleotide excision repair (58) ถ้าขบวนการ mismatch repair เสียไปจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และเกิด homologous recombination มากขึ้น (59, 60) แต่ถ้าระบบ nucleotide excision repair ไม่ทำงานจะทำให้แบคทีเรียไวต่อรังสีอัลตราไวโอเลต และสารที่มีฤทธิ์

ทำลายดีเอ็นเอ (61, 62) เนื่องจากการที่แบคทีเรียขาด UvrD helicase ทำให้ไม่สามารถกำจัดดีเอ็นเอที่ถูกตัดทิ้งเนื่องจากเกิดความเสียหายออกไปได้ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของ NER pathway (58) นอกจากนี้ยังทำให้มีอัตราการเกิด intergenomic recombination มากขึ้นอีกด้วย การที่ UvrD และ MutS ถูกกดจะมีผลให้เกิด DNA recombination มากขึ้น (58, 63) เพื่อรักษาสภาพของจีโนม แต่การซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยวิธี recombination อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เนื่องจากไป recombination กับยีนที่เหมือนกันเพียงบางส่วน (homeologous gene) หรืออาจมีการเรียงตัวใหม่เนื่องจากเกิด recombination กับ direct repeat sequences

จากการทดลองพบว่า VCA0728 mutant เพิ่มการแสดงออกของ *uvrD* ซึ่งทำหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอจึงพิสูจน์โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และกระตุ้นด้วย Mitomycin C ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิด DNA strand cross-links อันจะนำไปสู่ภาวะดีเอ็นเอขาดทั้งสองเส้น และต้องมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยวิธี DNA recombination จากการทดสอบพบว่า VCA0728 และ VCA0730 mutants สามารถทนทั้งรังสีอัลตราไวโอเลต และ Mitomycin C ได้ดีกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ไม่ได้แสดงผล) การที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนนี้ใน VCA0730 mutant อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดในเรื่องจำนวนโคโลนีที่ส่งหาลำดับเบส แต่สามารถทดสอบยืนยันผลได้โดยการทำ RT-PCR

Cellular process

การแยกตัวของโครโมโซมและการสร้างเซลล์ใหม่เป็นการทำงานที่เชื่อมต่อกัน ถ้าโครโมโซมแยกตัวออกช้าทำให้นิวคลิออยอยู่ตรงกลางซลล์นานขึ้นทำให้เซลล์ไม่แบ่งตัว (64) โครงสร้างหลักของการสร้างเซลล์ใหม่คือ septal ring ซึ่งเริ่มสร้างเกือบทันทีหลังการเริ่มต้นเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอและการสร้าง FtsZ ring ที่บริเวณกลางเซลล์ (65) FtsZ เป็นโปรตีนที่มีลักษณะ tubulin-like (66) เมื่อมีการหดตัวของ FtsZ ring จะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ในการศึกษานี้พบว่า VCA0729 mutant เพิ่มการแสดงออกของ *ftsZ*

SeqA เป็นโปรตีนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยป้องกันการเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ในขณะที่เส้นเก่ายังสร้างอยู่ โดย SeqA จะจับกับดีเอ็นเอที่เพิ่งเพิ่มจำนวนทำให้ oriC ไม่สามารถเริ่มเพิ่มจำนวนครั้งใหม่ และช่วยให้ดีเอ็นเอที่เพิ่งเพิ่มจำนวนพันออกมาจากส่วนกลางของเซลล์ (67) ใน *E. coli* เมื่อดีเอ็นเอที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่หลุดออกจาก SeqA ดีเอ็นเอจะจับกับ SMC-like protein MukB (68) ซึ่งช่วยให้ดีเอ็นเอหนาแน่นขึ้น สำหรับ *V. cholerae* ซึ่งมี 2 โครโมโซม VCA0728 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น SMC-like protein อาจทำหน้าที่แทน MukB โดยจับกับโครโมโซมเล็กที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่ก็เป็นได้ ซึ่งต้องทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ต่อไป

Chemotaxis and motility

แฟลกเจลลัมของแบคทีเรียประกอบด้วย 3 ส่วน คือ filament, hook และ basal body (69) โดยที่ส่วน filament และ hook เป็นส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ส่วน basal body จะเป็นโครงสร้างที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน การประกอบเป็นแฟลกเจลลาเริ่มจาก basal body ไปหา filament โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแฟลกเจลลาต้องส่งออกไปจากไซโตพลาสซึมสู่นอกเซลล์ (70) โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาส่วนใหญ่ไม่มี signal sequences ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบของแฟลกเจลลามีกลไกการขนส่งต่างไปจากโปรตีนทั่วไป มีผู้เสนอว่าโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาน่าจะไปทางอวัยวะพิเศษที่อยู่บริเวณ basal body ที่เรียกว่า export apparatus ซึ่งจะจดจำโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาเท่านั้น และผลักเข้าสู่แกนกลางของแฟลกเจลลัมที่อยู่ตรงกลางของวงแหวนรูปตัวซี (C ring) ของ basal body (70, 71) แฟลกเจลลาเป็นคุณสมบัติสำคัญที่มีผลต่อรูปร่าง การเคลื่อนที่ พฤติกรรมและการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแฟลกเจลลามีผลต่อการสร้าง biofilms อีกด้วย (72) การลดการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาอาจลดอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียเนื่องจากลดอัตราการสร้าง biofilms (73) การศึกษาใน *Vibrio vulnificus* พบว่าแบคทีเรียที่ถูกกำจัดยีน *flgE* ไม่มีแฟลกเจลลา และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (74) จากการทดลองพบว่า *flgE* ซึ่งควบคุมการสร้าง hook protein แสดงออกลดลงใน VCA0728 mutants ส่วน VC0420 ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่เป็น export protein แสดงออกลดลงใน VCA0729 mutants ทำให้คาดว่า mutants เหล่านี้อาจมีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่และการสร้าง biofilms เปลี่ยนไป จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการสร้าง biofilms และการ เคลื่อนที่ของ mutants ทั้งสามตัวเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น และพบว่าทั้งสาม mutants สร้าง biofilms ได้ดีกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเล็กน้อย โดย VCA0728 mutant สร้างได้ดีที่สุด (ไม่ได้แสดงผล) ส่วนการทดสอบการเคลื่อนที่พบว่ามีเพียง VCA0729 mutant เท่านั้นที่เคลื่อนที่ได้น้อยลง แต่เนื่องจากยีน VCA0729 อยู่เหนือยีน VCA0728 ทำให้เกิดคำถามว่าการตัดยีน VCA0729 เป็นการไปตัด promoter ของ VCA0728 หรือไม่ เพราะผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า VCA0729 mutant เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนมากที่สุด ถ้าเป็นเช่นนั้นก็เท่ากับทำลายทั้ง 2 ยีนคือทั้ง VCA0728 และ VCA0729 จึงได้ทำการพิสูจน์โดยการใส่ complementary sequence (VCA0729) พบว่าสามารถทำให้กลับมาเคลื่อนที่ได้เหมือนเดิม (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการตัดยีน VCA0729 ไม่ได้รบกวนการแสดงออกของ VCA0728

Transport and binding protein

ยีน *dcuA*, *dcuB* เป็นสมาชิกของ dcu operon ใน *E. coli* ยีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่ช่วยการดูดซึม C4-dicarboxylic acids ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (75, 76) ทำให้สามารถดูดซึม fumarate มาทดแทน

succinate ได้ (77) การกลายพันธุ์ของ *dcuA* และ *dcuB* มีผลให้แบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อตัวอื่นภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ (78)

แบคทีเรียต้องการธาตุเหล็กในการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตในภาวะที่มีออกซิเจน โดยเหล็กจะอยู่ในรูปของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำและสามารถจับกับโปรตีนบางชนิดได้ (79, 80) แบคทีเรียก่อโรคทั้งหลายรวมถึง *V. cholerae* สามารถสร้าง siderophore ซึ่งเป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สามารถจับธาตุเหล็กได้ โดยจะแย่งจับกับโปรตีนของโฮสต์ เช่น lactoferrin และ transferrin (80, 81) siderophore ของ *V. cholerae* เรียกว่า vibriobactin แบคทีเรียจะสร้าง vibriobactin และ metal-binding outer membrane proteins หลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อม (82) ดังนั้นการแสดงออกของ vibriobactin (*viuA*) ที่เพิ่มขึ้นใน VCA0729 mutant อาจบ่งบอกถึงความพยายามของแบคทีเรียในการดำรงชีวิตในภาวะกดดันอันอาจมีผลสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์

Energy metabolism

Transketolase (*tkt)* เป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway ทำหน้าที่ย้าย glycol aldehyde จาก ketose หรือฟอสเฟตไปยัง aldose หรือฟอสเฟตของมัน เอนไซม์นี้ทำหน้าที่สร้าง NADPH และ sugar phosphate intermediates เช่น ribose 5-phosphate ซึ่งจะนำไปใช้สังเคราะห์นิวคลิโอไทด์พิวรีนและไพริมีดีนรวมทั้งฮีสติดีน erythrose 4-phosphate ซึ่งจะนำไปใช้สังเคราะห์ aromatic amino acids และ sedoheptulose 7-phosphate ซึ่งจะนำไปใช้สังเคราะห์ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ *tktA* เป็นยีนที่มีผลต่อการเกิด supercoiling ของโครโมโซมแต่ไม่มีผลต่อโครงสร้างของพลาสมิด (83) พบว่า *tktA* mutant มีการคลายเกลียวของโครโมโซมอย่างมากและ mutant นี้ยังไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ รังสีอัลตราไวโอเลต Mitomycin C (83) oxidative stress (84) ยาต้านจุลชีพ เช่น คลอแรมเฟนิคอล นอร์ฟลอกโซซิน นาลิดิซิกแอซิด (85, 86) และการเกิด recombination อีกด้วย (87) ดังนั้นหน้าที่ของ TktA จึงเกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ส่วนอีกหน้าที่หนึ่งคือเป็น regulator ที่ควบคุมการจัดเรียงตัวของโครโมโซม การศึกษาในครั้งนี้พบว่า VCA0728 mutant มีการแสดงออกของ *tktA* เพิ่มขึ้น เมื่อผนวกกับการสร้าง UvrD เพิ่มขึ้นทำให้ mutant นี้ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลต ความดันออสโมติก (ทนเกลือ) และ Mitomycin C ได้ดี

ใน *E. coli* เอนไซม์ 2-oxoglutarate dehydrogenase ซึ่งเร่งปฏิกิริยา oxidative decarboxylation ของ 2-oxoglutarate ไปเป็น succinyl-CoA และคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 3

subunits คือ 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1o) ซึ่งถูกกำหนดโดยยีน *sucA*, dihydrolipoamide succinyltransferase (E2o) กำหนดโดยยีน *sucB* และ lipoamide dehydrogenase (E3) ซึ่งกำหนดโดยยีน *lpd* ยีนเหล่านี้จะถูกกระตุ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี acetate (2-oxoglutarate) และถูกกดในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสและถูกกดอย่างมากในภาวะที่ขาดออกซิเจน ส่วนPyruvate dehydrogenase complex เป็นเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย 3 subunits ถูกกำหนดโดยยีน *aceE* (E1p), *aceF* (E2p) และ lipoamide dehydrogenase (E3) ซึ่งถูกกำหนดโดยยีน *lpd* เช่นเดียวกับ 2-oxoglutarate dehydrogenase complex ยีนเหล่านี้จะถูกกระตุ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pyruvate และถูกกดเล็กน้อยในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือ acetate และในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า *aceE* และ *sucA* มี ribosome binding site ที่เดียวกัน (88)

Fumarase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งใน tricarboxylic acid (TCA cycle) ซึ่งช่วยเปลี่ยน fumarate ไปเป็น L-malate (89) พบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และแบคทีเรีย ใน *E. coli* FumA สร้างขึ้นในขณะที่มีขบวนการเมตาโบลิซึมในภาวะที่มีออกซิเจน ส่วน FumB สร้างในภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อเป็นตัวรับอิเลคตรอน (89) FumC แสดงออกทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ความสำคัญของ FumC ยังไม่ทราบแน่นอนแต่มีผู้สันนิษฐานว่าสร้างในภาวะที่สิ่งแวดล้อมขาดแคลนธาตุเหล็กเพื่อทดแทน FumA ซึ่งไม่ทนความร้อนและไวต่อการถูกทำลายด้วยออกซิแดนท์ หรือมี superoxide radicals สะสมอยู่ (90) การแสดงออกของ *fumC* จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของแหล่งคาร์บอน (91) การขาดแคลนธาตุเหล็ก (92) การกระตุ้นของ rpoS และแบคทีเรียในระยะ early stationary phase (90, 93) แต่การทดลองนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ mid logarithmic phase ดังนั้นการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ *fumC* ใน VCA0729 จึงน่าจะเกิดจากการตอบสนองต่อความกดดันจากสิ่งแวดล้อม

Aspatase (aspA) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน L-aspartate ไปเป็น fumarate ซึ่งเป็นตัวรับอิเลคตรอนในภาวะไร้ออกซิเจน การขัดขวางการทำงานของ AspA ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อตัวอื่นภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ การกลายพันธุ์ของ *dcuA* และ *dcuB* ซึ่งกำหนดระบบการขนส่ง C4-dicarboxylic acid ก็ให้ผลเช่นกัน (78) เชื่อว่า AspA เป็นกลไกสำรองที่เปลี่ยน oxaloacetate ไปเป็น fumarate ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ reductive branch ของ non-cyclic form ของ citric acid cycle ภายใต้ภาวะที่มีไม่ออกซิเจน

Unknown

3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) ทำหน้าที่เป็น second messenger ในการเชื่อมโยงสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเซลล์ (94, 95) ระดับของ c-di-GMP ถูกควบคุมโดย 1) diguanylate cyclases (DGCs) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี conserved domain GGDEF และ 2) phosphodiesterases (PDEAs) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี conserved domain EAL (13, 96, 97) โปรตีนที่มี DGC และ/หรือ PDEA domains พบได้ทั่วไปในหมู่แบคทีเรีย (98) จากการวิเคราะห์ *V. cholerae* พบว่ามี 31 ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน DGC, 12 ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน PDEA และ 10 ยีนที่ควบคุมการสร้างทั้ง DGC และ PDEA domains บนโพลีเปปไทด์เส้นเดียวกัน (98) การเพิ่มระดับของ c-di-GMP (VCA0956) ทำให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลกเจลลาและยีนที่ควบคุมการ transcription ของแฟลกเจลลารวมถึง *flgE* ลดลง (99) แต่ยีนที่เกี่ยวกับการสร้าง biofilms เพิ่มขึ้น

นิวคลิโอไทด์พิวรีนสามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง de novo หรือ salvage pathways โดยมี 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) เป็นสารตั้งต้นของทั้งพิวรีนและไพริมิดีน (99) เมื่อระดับของ c-di-GMP (VCA0956) ในเซลล์สูงขึ้น การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ฮีสติดีนและไทอามีนก็สูงขึ้นด้วย (*thiE*) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไทอามีนนี้เป็น intermediate ของการสังเคราะห์พิวรีนใน de novo pathway (99) การศึกษานี้พบว่า VCA0729 mutant ลดการแสดงออกทั้ง c-di-GMP (VC1367) และ *thiE* ดังนั้นการสังเคราะห์พิวรีนโดย de novo pathway ใน mutant นี้อาจถูกกดก็เป็นได้

จากการวิเคราะห์ยีน VCA0728, VCA0729 และ VCA0730 เบื้องต้นด้วยคอมพิวเตอร์และทำนายว่ายีนทั้งสามอยู่บน operon เดียวกันและทำงานร่วมกันในการควบคุมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการแบ่งโครโมโซมให้เซลล์ลูกขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว ช่วยคงความเสถียรให้กับโครโมโซมโดยควบคุมการเกิด homologous recombination, DNA repair และการกระตุ้นการตอบสนองของระบบ SOS และอาจทำหน้าที่เป็น transcriptional activator ด้วยนั้น ผลของการศึกษาโดยการตัดยีนทั้งสามทีละยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของ deletion mutant แต่ละตัวกับสายพันธุ์ต้นแบบ ให้ผลสอดคล้องกับการทำนายคือมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างนิวคลิโอไทด์ การเริ่มต้นเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ การแบ่งโครโมโซมและการสร้างผนังกั้นเซลล์ การขดเกลียวของโครโมโซม และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น เช่น *typA, pgtB, dsdC, deaD* และยีนที่มี GGDEF domain

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

Vibrio cholerae เป็นแบคทีเรียที่พบในทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และสามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย แต่องค์ความรู้ในเรื่องกลไกการควบคุมการปรับตัวของ *Vibrio cholerae* ยังนับว่ามีน้อยมาก จึงควรมีการศึกษาในเรื่องนี้ให้มากขึ้นเพื่อความสำเร็จในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998 Dec;62(4):1301-14.
2. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. Clin Microbiol Rev. 1995 Jan;8(1):48-86.
3. ชาติพิทักษ์ พ, สำนักระบาดวิทยา, กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานเฝ้าระวังโรค 2549. กรุงเทพฯ2549. p. 264-5.
4. แสงสว่าง ช, สำนักระบาดวิทยา, กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานเฝ้าระวังโรค 2550. กรุงเทพฯ2550. p. 101-2.
5. Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Feb 5;99(3):1556-61.
6. Beyhan S, Tischler AD, Camilli A, Yildiz FH. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. Infection and immunity. 2006 Jun;74(6):3633-42.
7. Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel Vibrio pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. Microbiology (Reading, England). 2002 Nov;148(Pt 11):3681-93.
8. Faruque SM, Tam VC, Chowdhury N, Diraphat P, Dziejman M, Heidelberg JF, et al. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007 Mar 20;104(12):5151-6.
9. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 2000 Aug 3;406(6795):477-83.
10. Rahman MH, Biswas K, Hossain MA, Sack RB, Mekalanos JJ, Faruque SM. Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains. DNA Cell Biol. 2008 Jul;27(7):347-55.
11. O'Shea YA, Finnan S, Reen FJ, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. The Vibrio seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. Microbiology (Reading, England). 2004 Dec;150(Pt 12):4053-63.

12. O'Shea YA, Reen FJ, Quirke AM, Boyd EF. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4657-71.
13. Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. The Journal of biological chemistry. 2005 Sep 2;280(35):30829-37.
14. Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. Journal of bacteriology. 1988 Jun;170(6):2575-83.
15. Metcalf WW, Jiang W, Daniels LL, Kim SK, Haldimann A, Wanner BL. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying lacZ alpha for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. Plasmid. 1996 Jan;35(1):1-13.
16. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 May 26;95(11):5857-64.
17. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 6: recent updates and new developments. Nucleic acids research. 2009 Jan;37(Database issue):D229-32.
18. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of molecular biology. 2001 Jan 19;305(3):567-80.
19. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of molecular biology. 2004 Jul 16;340(4):783-95.
20. Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. Science. 1991 May 24;252(5010):1162-4.
21. Wootton JC, Federhen S. Analysis of compositionally biased regions in sequence databases. Methods in enzymology. 1996;266:554-71.
22. Mott R. Accurate formula for P-values of gapped local sequence and profile alignments. Journal of molecular biology. 2000 Jul 14;300(3):649-59.
23. Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. Structure. 2003 Nov;11(11):1453-9.
24. O'Hara EF, Williams MB, Rott L, Abola P, Hansen N, Jones T, et al. Modified representational difference analysis: isolation of differentially expressed mRNAs from rare cell populations. Anal Biochem. 2005 Jan 15;336(2):221-30.

25. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. Nucleic acids research. 2009;37(Database):D412-D6.

26. Klein J, Leupold S, Munch R, Pommerenke C, Johl T, Karst U, et al. ProdoNet: identification and visualization of prokaryotic gene regulatory and metabolic networks. Nucleic acids research. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W460-4.

27. Xu Q, Dziejman M, Mekalanos JJ. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intraintestinal growth and midexponential phase in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Feb 4;100(3):1286-91.

28. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic acids research. 2009 Jan;37(Database issue):D205-10.

29. Hirano T, Mitchison TJ, Swedlow JR. The SMC family: from chromosome condensation to dosage compensation. Curr Opin Cell Biol. 1995 Jun;7(3):329-36.

30. Soppa J. Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny, and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic coiled-coil proteins. Gene. 2001 Oct 31;278(1-2):253-64.

31. Melby TE, Ciampaglio CN, Briscoe G, Erickson HP. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. J Cell Biol. 1998 Sep 21;142(6):1595-604.

32. Haeusser DP, Schwartz RL, Smith AM, Oates ME, Levin PA. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. Molecular microbiology. 2004 May;52(3):801-14.

33. Collins J. Instability of palindromic DNA in *Escherichia coli.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1981;45 Pt 1:409-16.

34. Collins J, Volckaert G, Nevers P. Precise and nearly-precise excision of the symmetrical inverted repeats of Tn5; common features of recA-independent deletion events in *Escherichia coli.* Gene. 1982 Jul-Aug;19(1):139-46.

35. Allers T, Leach DR. DNA palindromes adopt a methylation-resistant conformation that is consistent with DNA cruciform or hairpin formation in vivo. Journal of molecular biology. 1995 Sep 8;252(1):70-85.

36. Leach DR, Lloyd RG, Coulson AF. The SbcCD protein of *Escherichia coli* is related to two putative nucleases in the UvrA superfamily of nucleotide-binding proteins. Genetica. 1992;87(2):95-100.

37. Naom IS, Morton SJ, Leach DR, Lloyd RG. Molecular organization of sbcC, a gene that affects genetic recombination and the viability of DNA palindromes in Escherichia coli K-12. Nucleic acids research. 1989 Oct 25;17(20):8033-45.

38. Trinh TQ, Sinden RR. Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in *E. coli*. Nature. 1991 Aug 8;352(6335):544-7.

39. Messer W, Weigel C. DnaA initiator--also a transcription factor. Molecular microbiology. 1997 Apr;24(1):1-6.

40. Schaefer C, Messer W. DnaA protein/DNA interaction. Modulation of the recognition sequence. Mol Gen Genet. 1991 Apr;226(1-2):34-40.

41. Skarstad K, Boye E. The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. Biochimica et biophysica acta. 1994 Mar 1;1217(2):111-30.

42. Duigou S, Knudsen KG, Skovgaard O, Egan ES, Lobner-Olesen A, Waldor MK. Independent control of replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes by DnaA and RctB. Journal of bacteriology. 2006 Sep;188(17):6419-24.

43. Mizushima T, Tanino J, Miki T, Sekimizu K. Decrease in the linking number of plasmid DNA in dnaA mutants of *Escherichia coli*. Biochemical and biophysical research communications. 1996 Jan 5;218(1):137-41.

44. Dorman CJ, Barr GC, Bhriain NN, Higgins CF. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of tonB gene expression. Journal of bacteriology. 1988 Jun;170(6):2816-26.

45. Dorman CJ, Bhriain NN, Higgins CF. DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri. Nature. 1990 Apr 19;344(6268):789-92.

46. Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G, et al. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in S. typhimurium and *E. coli*. Cell. 1988 Feb 26;52(4):569-84.

47. Ohba A, Mizushima T, Katayama T, Sekimizu K. Amounts of proteins altered by mutations in the dnaA gene of *Escherichia coli.* FEBS letters. 1997 Mar 10;404(2-3):125-8.

48. Suzuki E, Kondo T, Makise M, Mima S, Sakamoto K, Tsuchiya T, et al. Alteration in the contents of unsaturated fatty acids in dnaA mutants of *Escherichia coli*. Molecular microbiology. 1998 Apr;28(1):95-102.

49. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli.* Cell. 1990 Oct 19;63(2):393-404.

50. Kato J, Nishimura Y, Yamada M, Suzuki H, Hirota Y. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 1988 Sep;170(9):3967-77.

51. Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. Science. 1994 Dec 23;266(5193):1959-60.
52. Michaels ML, Miller JH. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). Journal of bacteriology. 1992 Oct;174(20):6321-5.
53. Sancar A. Mechanisms of DNA excision repair. Science. 1994 Dec 23;266(5193):1954-6.
54. Kowalczykowski SC. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends Biochem Sci. 2000 Apr;25(4):156-65.
55. Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. Mol Cell. 2001 Dec;8(6):1163-74.
56. Flores MJ, Sanchez N, Michel B. A fork-clearing role for UvrD. Molecular microbiology. 2005 Sep;57(6):1664-75.
57. Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ. The importance of repairing stalled replication forks. Nature. 2000 Mar 2;404(6773):37-41.
58. Kang J, Blaser MJ. UvrD helicase suppresses recombination and DNA damage-induced deletions. Journal of bacteriology. 2006 Aug;188(15):5450-9.
59. Glickman BW, Radman M. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980 Feb;77(2):1063-7.
60. Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. Nature. 1989 Nov 23;342(6248):396-401.
61. Caron PR, Kushner SR, Grossman L. Involvement of helicase II (uvrD gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the uvrABC protein complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985 Aug;82(15):4925-9.
62. Kuemmerle NB, Masker WE. Effect of the uvrD mutation on excision repair. Journal of bacteriology. 1980 May;142(2):535-46.
63. Pinto AV, Mathieu A, Marsin S, Veaute X, Ielpi L, Labigne A, et al. Suppression of homologous and homeologous recombination by the bacterial MutS2 protein. Mol Cell. 2005 Jan 7;17(1):113-20.
64. Hendricks EC, Szerlong H, Hill T, Kuempel P. Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif, xerC* and *xerD*) of *Escherichia coli*. Molecular microbiology. 2000 May;36(4):973-81.

65. Espeli O, Lee C, Marians KJ. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. The Journal of biological chemistry. 2003 Nov 7;278(45):44639-44.

66. Lowe J, Amos LA. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. Nature. 1998 Jan 8;391(6663):203-6.

67. Brendler T, Sawitzke J, Sergueev K, Austin S. A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. The EMBO journal. 2000 Nov 15;19(22):6249-58.

68. Ohsumi K, Yamazoe M, Hiraga S. Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. Molecular microbiology. 2001 May;40(4):835-45.

69. DePamphilis ML, Adler J. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and Bacillus subtilis. Journal of bacteriology. 1971 Jan;105(1):384-95.

70. Saito T, Ueno T, Kubori T, Yamaguchi S, Iino T, Aizawa SI. Flagellar filament elongation can be impaired by mutations in the hook protein FlgE of *Salmonella typhimurium*: a possible role of the hook as a passage for the anti-sigma factor FlgM. Molecular microbiology. 1998 Mar;27(6):1129-39.

71. Kutsukake K. Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. Journal of bacteriology. 1997 Feb;179(4):1268-73.

72. Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae.* Dev Cell. 2003 Oct;5(4):647-56.

73. Asakura H, Ishiwa A, Arakawa E, Makino S, Okada Y, Yamamoto S, et al. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. Environ Microbiol. 2007 Apr;9(4):869-79.

74. Lee JH, Rho JB, Park KJ, Kim CB, Han YS, Choi SH, et al. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Infection and immunity. 2004 Aug;72(8):4905-10.

75. Six S, Andrews SC, Unden G, Guest JR. *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). Journal of bacteriology. 1994 Nov;176(21):6470-8.

76. Zientz E, Six S, Unden G. Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C4-dicarboxylate transport in *Escherichia coli:* roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. Journal of bacteriology. 1996 Dec;178(24):7241-7.

77. Engel P, Kramer R, Unden G. Transport of C4-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli.* Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. European journal of biochemistry / FEBS. 1994 Jun 1;222(2):605-14.

78. Nogrady N, Imre A, Rychlik I, Barrow PA, Nagy B. Genes responsible for anaerobic fumarate and arginine metabolism are involved in growth suppression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in vitro, without influencing colonisation inhibition in the chicken in vivo. Veterinary microbiology. 2003 Dec 30;97(3-4):191-9.

79. Crosa JH. The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. Annu Rev Microbiol. 1984;38:69-89.

80. Crosa JH. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. Microbiological reviews. 1989 Dec;53(4):517-30.

81. Neilands JB. Microbial iron compounds. Annu Rev Biochem. 1981;50:715-31.

82. Tashima KT, Carroll PA, Rogers MB, Calderwood SB. Relative importance of three iron-regulated outer membrane proteins for in vivo growth of *Vibrio cholerae.* Infection and immunity. 1996 May;64(5):1756-61.

83. Hardy CD, Cozzarelli NR. A genetic selection for supercoiling mutants of Escherichia coli reveals proteins implicated in chromosome structure. Molecular microbiology. 2005 Sep;57(6):1636-52.

84. Juhnke H, Krems B, Kotter P, Entian KD. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. Mol Gen Genet. 1996 Sep 25;252(4):456-64.

85. Ueda O, Yoshimura F. Transposon-induced norfloxacin-sensitive mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron*. Microbiol Immunol. 2003;47(1):17-25.

86. Domain F, Bina XR, Levy SB. Transketolase A, an enzyme in central metabolism, derepresses the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon of *Escherichia coli* by interaction with MarR. Molecular microbiology. 2007 Oct;66(2):383-94.

87. Reizer J, Reizer A, Bairoch A, Saier MH, Jr. A diverse transketolase family that includes the RecP protein of *Streptococcus pneumoniae,* a protein implicated in genetic recombination. Res Microbiol. 1993 Jun;144(5):341-7.

88. Darlison MG, Spencer ME, Guest JR. Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of *Escherichia coli* K12. European journal of biochemistry / FEBS. 1984 Jun 1;141(2):351-9.

89. Woods SA, Schwartzbach SD, Guest JR. Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. Biochimica et biophysica acta. 1988 Apr 28;954(1):14-26.

90. Park SJ, Gunsalus RP. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase fumA and fumC genes of *Escherichia coli*: role of the arcA, fnr, and soxR gene products. Journal of bacteriology. 1995 Nov;177(21):6255-62.

91. Ohne M. Regulation of the dicarboxylic acid part of the citric acid cycle in *Bacillus subtilis.* Journal of bacteriology. 1975 Apr;122(1):224-34.

92. Hassett DJ, Howell ML, Sokol PA, Vasil ML, Dean GE. Fumarase C activity is elevated in response to iron deprivation and in mucoid, alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of fumC and purification of native fumC. Journal of bacteriology. 1997 Mar;179(5):1442-51.

93. Tseng CP, Yu CC, Lin HH, Chang CY, Kuo JT. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. Journal of bacteriology. 2001 Jan;183(2):461-7.

94. Jenal U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? Curr Opin Microbiol. 2004 Apr;7(2):185-91.

95. D'Argenio DA, Miller SI. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. Microbiology (Reading, England). 2004 Aug;150(Pt 8):2497-502.

96. Pei J, Grishin NV. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. Proteins. 2001 Feb 1;42(2):210-6.

97. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. Molecular microbiology. 2004 Aug;53(4):1123-34.

98. Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS microbiology letters. 2001 Sep 11;203(1):11-21.

99. Beyhan S, Tischler AD, Camilli A, Yildiz FH. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. Journal of bacteriology. 2006 May;188(10):3600-13.