ประกาศศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

เรื่อง ประกาศโฆษณาคำขอขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จุลชีพ และเซลล์เพาะเลี้ยง

ตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145/2564

ด้วยศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ได้รับคำขอขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จุลชีพ และเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ยื่นโดยนักวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145/2564 เพื่อขอรับหนังสือแสดงการขึ้นทะเบียนดังกล่าว ได้แก่ **แบคทีเรีย สายพันธุ์** ***Escherichia coli*** **DH5α/pJET-WHCA1**

ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ได้พิจารณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว เห็นว่ามีรายละเอียดถูกต้อง ดังนั้น ศูนย์ฯ จึงให้มีการประกาศโฆษณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว โดยมีรายละเอียดคำขอตามที่แนบมาท้ายประกาศนี้

หากผู้ใดมีสิทธิในส่วนได้เสีย หรือเห็นว่าคำขอขึ้นทะเบียนฯ ดังกล่าวไม่ถูกต้อง สามารถยื่นคัดค้านต่อเจ้าหน้าที่ ณ ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์ 043-202733 หรือ 086-4514455 ภายในกำหนดหกสิบวัน นับตั้งแต่วันเริ่มประกาศโฆษณานี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 22 เมษายน 2569

นางจิราภรณ์ เหลืองไพรินทร์

ผู้อำนวยการศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

แบคทีเรีย

(1) เลขที่คำขอ : 5/2569

(2) ชื่อพันธุ์ : ***Escherichia coli*** **DH5α/pJET-WHCA1**

(3) ชื่อผู้ขอ : นางสาวจินดารัตน์ เอกประเสริฐ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(4) ชื่อผู้ร่วมวิจัย/ปรับปรุงสายพันธุ์ :

1. นางสาวเซอร์ลินดา มารา ดิทตา (Miss Zerlinda Mara Ditta) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.นางธัญญารัตน์ พงศ์ทรางกูร มหาวิทยาลัยมหิดล

(5) รายละเอียดที่มาของพันธุ์ :

แบคทีเรียสายพันธุ์ Escherichia coli DH5α/pJET-WHCA1 หรือ E. coli DH5α /pJET-WHCA1 เป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นจากการตัดต่อยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ชนิด`เบต้า (β type) จากแบคทีเรีย Lysinibacillus sp. สายพันธุ์ WH (หนังสือรับรองการขึ้นทะเบียนพันธุ์จุลชีพตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145 พ.ศ. 2564 ณ วันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2565) โดยมีแบคทีเรีย E. coli DH5α เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน สายพันธุ์นี้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยีน`เบต้าคาร์บอนิก แอนไฮเดรสจากแบคทีเรีย Lysinibacillus sp. สายพันธุ์ WH

วิธีการคัดเลือกพันธุ์/พัฒนาสายพันธุ์

แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ใช้สำหรับการตัดต่อยีน คือ Escherichia coli สายพันธุ์ DH5α (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค ระดับความเสี่ยง เท่ากับ 1 เชื้อนี้มียีน lacZΔM15 สำหรับการคัดเลือกเซลล์แปลงพันธุกรรม (Transformant) ด้วยวิธี Blue/White screening นอกจากนี้มีการกลายพันธุ์ที่ยีน recA1 ซึ่งทำให้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีประสิทธิภาพสูงในการโคลนนิ่ง (cloning) และได้พลาสมิดที่มีคุณภาพ ลักษณะจีโนไทป์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน คือ F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1 และประสิทธิภาพในการดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ พลาสมิดเวคเตอร์ที่ใช้สำหรับการตัดต่อยีน คือ pJET 1.2 (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) มียีนเครื่องหมายคัดเลือก (selectable marker) คือ ยีนดื้อยาแอมพิซิลิน (ampicillin resistant gene) ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน ประกอบด้วย T7 promotor และ lac operator มียีน Eco47IR (lethal gene) ที่เป็นบริเวณเป้าหมายในการแทรกยีนจากภายนอกเข้าสู่เวคเตอร์ ทำให้เกิดการคัดเลือกเซลล์ดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ยีนที่ถูกตัดต่อเข้าในพลาสมิดเวคเตอร์ คือ ยีนเบต้าคาร์บอนิก แอนไฮเดรส จากแบคทีเรีย Lysinibacillus sp. สายพันธุ์ WH ยีนมีลำดับกรดอะมิโนฮีสทิดีน 6 โมเลกุล (6XHis-tag sequence) ที่ปลาย amino (N-

terminal) มีขนาด 579 bp ซึ่งเมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีนแล้ว มีขนาดโมเลกุลโปรตีนเท่ากับ 21.74 kDa ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 193 กรดอะมิโน ยีนนี้ถูกเพิ่มจำนวนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อดังกล่าวด้วยวิธีโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยใช้เอนไซม์ Pfu DNA polymerase (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) ทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) ตามสภาวะดังนี้

- Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ºC เป็นเวลา 4 นาที
- Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ºC เป็นเวลา 30 วินาที
- Primer annealing ที่อุณหภูมิ 52 ºC เป็นเวลา 30 วินาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 75 ºC เป็นเวลา 75 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ โดยทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing 2 ºC ทุกๆ 4 รอบ จนถึง 60 ºC
- Final extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 3 นาที

ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนนี้ ถูกนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (Plasmid vector) pJET 1.2 ได้เป็นรีคอมบิแนนท์เวคเตอร์ (Recombinant vector) ชื่อ pJET 1.2-WHCA1 จากนั้นนำส่ง (DNA transformation) pJET 1.2-WHCA1 เข้าสู่แบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิคฮีทช็อค (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นทำการฟื้นฟูเซลล์ด้วยการบ่มเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lysogeny broth หรือ LB (ประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 N) ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์แปลงพันธุกรรม (Transformant) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่ผสม agar 15 กรัมต่อลิตร และแอมพิซิลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ได้เป็นแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีลักษณะจีโนไทป์ (genotype) คือ F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1]/pJET1.2-CA-β (bla, Eco47IR-, pMB1 ori) และถูกตั้งชื่อใหม่ว่า *E. coli* DH5α /pJET-WHCA1

(6) ลักษณะประจำพันธุ์ :

1) มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวินะชนิดแอมพิซิลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml
2) ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม ขนาดเล็ก มีสีขาวเมื่อเจริญบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน
3) สามารถรักษาความเสถียรของจีโนไทป์ของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) ได้ดี