



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* DH5 α /pJET-WHCA2**

ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ได้พิจารณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว เห็นว่ามีรายละเอียดถูกต้อง ดังนั้น ศูนย์ฯ จึงให้มีการประกาศโฆษณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว โดยมีรายละเอียดคำขอตามที่แนบมาทำยประกาศนี้

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 : 6/2569
- (2) ชื่อพันธุ์ : *Escherichia coli* DH5 α /pJET-WHCA2
- (3) ชื่อผู้ขอ : นางสาวจินดารัตน์ เอกประเสริฐ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- (4) ชื่อผู้ร่วมวิจัย/ปรับปรุงสายพันธุ์ :

1. นางสาวเซอร์ลินดา มารา ดิตตา (Miss Zerlinda Mara Ditta) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. นางฉัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร มหาวิทยาลัยมหิดล

- (5) รายละเอียดที่มาของพันธุ์ :

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* DH5 α /pJET-WHCA2 หรือ *E. coli* DH5 α /pJET-WHCA2 เป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นจากการตัดต่อยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ชนิดแกมมา (γ type) จากแบคทีเรีย *Lysinibacillus* sp. สายพันธุ์ WH (หนังสือรับรองการขึ้นทะเบียนพันธุ์จุลชีพตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145 พ.ศ. 2564 ณ วันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2565) โดยมีแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน สายพันธุ์นี้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยีนแกมมาคาร์บอนิก แอนไฮเดรสจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus* sp. สายพันธุ์ WH

วิธีการคัดเลือกพันธุ์/พัฒนาสายพันธุ์

แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ใช้สำหรับการตัดต่อยีน คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค ระดับความเสี่ยง เท่ากับ 1 เชื้อนี้มียีน *lacZ* Δ M15 สำหรับการคัดเลือกเซลล์แปลงพันธุ์กรรม (Transformant) ด้วยวิธี Blue/White screening นอกจากนี้มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *recA1* ซึ่งทำให้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีประสิทธิภาพสูงในการโคลนนิ่ง (cloning) และได้พลาสมิดที่มีคุณภาพ ลักษณะจีโนมไทป์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน คือ F-80dlacZ M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1hsdR17*(rk-, mk+) *phoA*supE44 -*thi-1 gyrA96 relA1* และประสิทธิภาพในการดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ

พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการตัดต่อยีน คือ pJET 1.2 (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) มียีนเครื่องหมายคัดเลือก (selectable marker) คือ ยีนดื้อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin resistant gene) ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน ประกอบด้วย T7 promoter และ lac operator มียีน *Eco47IR* (lethal gene) ที่เป็นบริเวณเป้าหมายในการแทรกยีนจากภายนอกเข้าสู่เวกเตอร์ ทำให้เกิดการคัดเลือกเซลล์ดัดแปลงพันธุ์กรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ยีนที่ถูกตัดต่อเข้าในพลาสมิดเวกเตอร์ คือ ยีนแกมมาคาร์บอนิก แอนไฮเดรส จากแบคทีเรีย *Lysinibacillus* sp. สายพันธุ์ WH ยีนมีลำดับกรดอะมิโนฮิสทีดีน 6 โมเลกุล (6XHis-tag sequence) ที่ปลาย

amino (N-terminal) มีขนาด 528 bp ซึ่งเมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีนแล้ว มีขนาดโมเลกุลโปรตีนเท่ากับ 19.4 kDa ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 176 กรดอะมิโน ยีนนี้ถูกเพิ่มจำนวนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อดังกล่าวด้วยวิธีโพลีเมอเรส เช่น รีแอคชัน (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยใช้เอนไซม์ Pfu DNA polymerase (มีจำหน่ายตามท้องตลาด) ทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) ตามสภาวะดังนี้

- Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 4 นาที
- Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที
- Primer annealing ที่อุณหภูมิ 54 °C เป็นเวลา 30 วินาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 75 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ โดยทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing 2 °C ทุกๆ 4 รอบ จนถึง 60 °C
- Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที

ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนนี้ ถูกนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Plasmid vector) pJET 1.2 ได้ เป็นรีคอมบิแนนท์เวกเตอร์ (Recombinant vector) ชื่อ pJET 1.2-WHCA2 จากนั้นนำส่ง (DNA transformation) pJET 1.2-WHCA2 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเทคนิคฮีทช็อก (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นทำการฟื้นฟูเซลล์ด้วยการบ่มเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lysogeny broth หรือ LB (ประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 N) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์แปลงพันธุกรรม (Transformant) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่ผสม agar 15 กรัมต่อลิตร และแอมพิซิลลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml ได้ เป็นแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีลักษณะจีโนไทป์ (genotype) คือ F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1]/pJET1.2-CA- Ψ (bla, Eco47IR-, pMB1 ori) และถูกตั้งชื่อใหม่ว่า *E. coli* DH5 α /pJET-WHCA2

(6) ลักษณะประจำพันธุ์ :

- 1) มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดแอมพิซิลลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml
- 2) ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม ขนาดเล็ก มีสีขาวเมื่อเจริญบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน
- 3) สามารถรักษาความเสถียรของจีโนไทป์ของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) ได้ดี