การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01

Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01

ระพี ธรรมมีภักดิ์[1*], ธวัชชัย กิตติ[2], ดวงกมล ขันธเลิศ[1], และ สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์[1]

Rapee Thummeepuk[1*], Thawatchai Kitti[2], Duangkamol Kunthalert[1] and Sutthirat Sitthisak[1]

[1] *ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

[2] *คณะแพทย์ตะวันออก มหาวิทยาลัยเชียงราย*

บทคัดย่อ

การระบาดของเชื้อmultidrug resistant-*Acinetobacter baumannii* (MDR-AB) กลายเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสุขภาพทั่วโลก เมื่อมีการอุบัติของ MDR-AB จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาทางเลือกในการรักษา ที่นอกเหนือจากการใช้ยาต้านจุลชีพ แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสที่สามารถติดเชื้อและทำลายเซลล์แบคทีเรียดื้อยาจึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในรูปแบบไวรัสบำบัด (bacteriophage (phage) therapy) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii*สายพันธุ์ ØABP-01 จากบ่อบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ ØABP-01 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pulsed field gel electrophoresis พบว่าจีโนมของ ØABP-01 มีขนาดประมาณ 35 kb และจีโนมิกดีเอ็นเอถูกย่อยได้ด้วย DNaseI ทำให้ทราบว่าจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS - polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีแถบโปรตีนหลักๆ อยู่หนึ่งแถบซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 28kDa และแถบโปรตีนอื่นๆ ซึ่งมีมวลโมเลกุลไล่เรียงตั้งแต่ 20 ถึง 97kDa จีโนมของ ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด จากทั้งหมด 11 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา คือ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I และ*Sph*I ส่วนการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 จากการสร้าง genomic library พบว่าลำดับเบสบางส่วนของ ØABP-01 มีความคล้ายคลึงกับ Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 และ Acinetobacter phage AB3 เป็นต้น ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการนำØABP-01 ไปพัฒนาในรูปแบบไวรัสบำบัดเพื่อใช้ควบคุมการติดเชื้อ MDR-AB

คำสำคัญ: multidrug resistant-*A. baumannii*/แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* /ไวรัสบำบัด

*Corresponding author. E-mail : Rapee_worm32@hotmail.com

Abstract

Multidrug resistant-*Acinetobacter baumannii* (MDR-AB) has become a worldwide health problem.The emergence of MDR-AB requires the exploration of alternative antibacterial therapy.Bacteriophages (phages) - viruses of bacteria - can kill antibiotic-resistant bacteria,which led our group to studythe phage for phage therapy.*A. baumannii* bacteriophage, ØABP-01 was isolated from waste water treatment plants. In this study, we examined the molecular characteristics of the bacteriophage ØABP-01. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysisrevealed that phage DNAØABP-01 have genome sizes of approximately 35 kb. The ØABP-01 genome was digested with DNaseI and revealed that the genome was double stranded DNA. Protein analysis using SDS - polyacrylamide gel electrophoresis revealed 1 major protein band of approximately 28 kDa and many minor protein bands with molecular weight ranging from 20 - 97 kDa. Restriction analysis of the ØABP-01 DNA indicated that the DNA was cut by only 8 of the 11 used enzymes,namely*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I and *Sph*I. Partial sequence of the ØABP-01 genomereveals sequence similarity to Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 andAcinetobacter phage AB3. Results from this study can be used as a preliminarydata for developing ØABP-01 as a phage therapy to control MDR-AB infection.

Keywords :multidrug resistant-*A. baumannii* / *A. baumannii* bacteriophage / phage therapy

*Corresponding author. E-mail : Rapee_worm32@hotmail.com

1. บทนำ

*Acinetobacter baumannii*เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถพบเชื้อได้ในสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล พบมีการปนเปื้อนในอุปกรณ์ทางการแพทย์ สามารถแพร่จากบุคคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วยได้ และยังทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และระบบทางเดินปัสสาวะ(Seifert, et al., 1995; Fournier, et al., 2006) โดยสามารถพบการก่อโรคได้ทั้งในชุมชนและในเขตโรงพยาบาล ที่สำคัญคือเชื้อมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด multidrug resistant-*A.baumannii* (MDR-AB)เป็นผลให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพไม่ได้ผลเท่าที่ควรทั้งยังพบการระบาดไปทั่วโลกรวมถึงในประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี การติดเชื้อ MDR-AB จึงเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา และเกิดการสูญเสียชีวิตตามมา

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีการติดเชื้อและเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียอย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อเข้าสู่ช่วงสุดท้ายของวงจรชีวิต แบคเทอริโอเฟจจะสร้างเอนโดไลซิน (lytic enzyme)ขึ้นมาเพื่อทำลายผนังเซลล์ของโฮสต์ทำให้เซลล์ตาย แล้วปลดปล่อยอนุภาคลูกหลานออกนอกเซลล์(Kutter and Sulakvelidze, 2005) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในรูปแบบ phage therapy เพื่อควบคุมและรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Parisien, et al., 2007) รวมถึง MDR-AB โดยมีการศึกษาของ Soothill และคณะ (1992) พบว่าอนุภาค Acinetobacter phage BS46 สามารถป้องกันการติดเชื้อของหนู mice จากแบคทีเรีย *A. baumannii* นอกจากนั้นยังมีการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซินเป็น therapeutic agents เช่น การศึกษาในปี ค.ศ.2010 มีการแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* (*A. baumannii* bacteriophage: ABP) ในประเทศไต้หวัน (Lai, et al., 2011) จากนั้นได้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน แล้วนำไปทดสอบกับ MDR-AB พบว่าสามารถเกิด lytic activity และยังสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้อีกด้วย (antimicrobial activity) (Lai, et al., 2011) แต่เนื่องจากสายพันธุ์ของ*A. baumannii* ที่มีการระบาดในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันประกอบกับแบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะและทำลาย *A. baumannii*ได้เพียงบางสายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องมีการ

แยกและศึกษาคุณสมบัติABP ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อได้หลายสายพันธุ์ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยา และทราบลำดับนิวคลิโอไทด์ในจีโนมของ ABP โดยเฉพาะลำดับนิวคลิโอไทด์ที่จะถูกแปรรหัสไปเป็น lytic enzyme

การระบาดที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีของเชื้อ MDR-AB และคุณสมบัติที่โดดเด่นของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายเซลล์โฮสต์อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ไวรัสบำบัดเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมการติดเชื้อ MDR-AB โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ (ธวัชชัย กิตติ, 2555) ได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ MDR-ABจากบ่อบำบัดน้ำเสียในประเทศไทยพบว่าแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์ ØABP-01 มีโครงสร้างส่วนหัวเป็นทรงหกเหลี่ยม (icosahedral head) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 nm มีหางสั้น (short tail) ขนาด 9 nm จัดอยู่ในวงศ์ตระกูล *Podoviridae* และที่สำคัญ ØABP-01 มีคุณสมบัติในการทำลายMDR-AB ได้หลายสายพันธุ์ จึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำอณุภาคแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบไวรัสบำบัด (Phage therapy)

2. วิธีการ

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียแบคเทอริโอเฟจและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *A. baumannii*สายพันธุ์ AB1589 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (นริศรา บุญเกิด, 2550) ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (MDR-AB)ทั้งยังพบยีนดื้อยา OXA-23และ OXA-51 ในพลาสมิดและโครโมโซมตามลำดับและ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5alpha (Hanahan, 1983)ส่วนแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์ ØABP-01 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii*แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (ธวัชชัย กิตติ, 2555) และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ pBluescript (Fermentas, USA)

2.2 การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจดัดแปลงจากวิธีของ Su Venkatesh และ Bodmer (1989) โดยเลี้ยง*A. baumannii* สายพันธุ์ AB 1589 ในอาหาร Luria-Bertani (LB) broth ปริมาณ 50mlที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600nm เท่ากับ 0.3 - 0.4 จึงเติม ØABP-01 โดยใช้ปริมาณไวรัสต่อแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 1 นำไปบ่มต่อจนมีการทำลายโฮสท์สมบูรณ์ จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์แบคทีเรียออกไป นำเอาเฉพาะส่วนใสมาเติม 10 mg/mlDNase I ปริมาตร 10µlนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา30 นาที แล้วเติม NaCl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ1 Mและเติม Polyethylene Glycol 8000 (PEG8000)ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8-10% (w/v)นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสทิ้ง แล้วนำตกตะกอนแบคเทอริโอเฟจมาละลายใน SM buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM $MgSO_4$, และ 1% gelatin) ปริมาตร 1ml เก็บอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีนและสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

2.3 การตรวจสอบโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ

นำอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ละลายใน SM buffer มาผสมกับ sample buffer(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% beta-mercaptoethnol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol และ 0.01% bromphenolblue)นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแยกขนาดโปรตีนใน 15% SDS-polyacrylamide gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า150 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที และนำเจลไปย้อมด้วย 0.125 % Coomassie blue R-250 นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลมาล้างสีย้อมด้วย destaining solution (40% methanol และ 10% glacial acetic acid) ข้ามคืน

2.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ

นำอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่ละลายใน SM buffer ปริมาตร 1 ml มาเติมchloroform ในอัตราส่วน 1:1 จะเกิดการแยกชั้น จากนั้นดูดเอาสารละลายชั้นบนที่มีลักษณะขาวขุ่น ประมาณ 1.5 ml นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา5 นาที แล้วแยกเอาส่วนใสชั้นบนประมาณ 600 µl มาผสมกับ TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0และ 1 mM EDTA)ปริมาตร 60 µlจากนั้นเติม 10% SDSปริมาตร 60 µlนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม phenol ปริมาตร600 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา5 นาที แยกเอาส่วนใสชั้นบนสุด มาเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 50 µlและ isopropanol ปริมาตร 500 µl บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอในTE buffer ปริมาตร 500 µlแล้วเติม 8 M potassium acetate ปริมาตร 150 µlและ isopropanol ปริมาตร 650 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอกลับในTE buffer (pH 8.0)ปริมาตร 100 µl นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ

นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII, *Pst*I, *Bam*HI, *Sma*I *Eco*RI, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I, *Xba*I และ*Sph*I (Vivantis., Selangor, Malasia) โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 1 µg มาตัดเดี่ยวและหรือตัดคู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 11 ชนิด จากนั้นนำมาตรวจสอบ fragment ของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE) โดยใช้ 1% agarose gel และ 0.5X TBE running buffer ปริมาตร 2.5 ลิตรตั้งโปรแกรมอัตโนมัติ (20K-500K automatic program) บนเครื่อง CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) ปรับเวลาให้เป็น 18 ชั่วโมง, อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสและความต่างศักย์ 4.5 V/cm (initial Sw Tm: 2.98s; final Sw Tm 1 m 13.58s) และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hind*III Marker และ VC 1 Kb เมื่อครบ 18 ชั่วโมงนำเจลมาย้อมใน 10 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

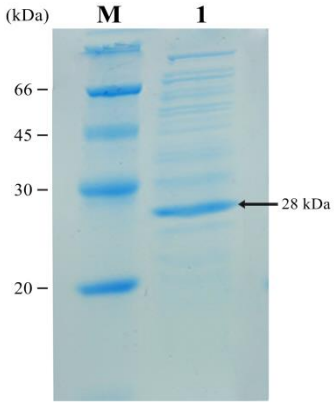
2.6 การสร้าง genomic library ของแบคเทอริโอเฟจ

นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ส่วนดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการโคลน ได้แก่ pBluescript นำดีเอ็นเอพาหะดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III จากนั้นนำมากำจัด phosphate group ที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphataseจากนั้นเชื่อมต่อชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอ (insert) เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) แล้วนำไป transform เข้าในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 alphaจากนั้นคัดเลือกเอาโคลนที่มี insert โดยใช้วิธีblue/white colony screening นำเอาโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III เพื่อเป็นการตรวจสอบหา insertจากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวไปหาลำดับเบส (Applied Biosystems) และวิเคราะห์หาส่วนที่เป็น ORF (Open Reading Frame) โดยใช้โปรแกรม ORF Finder (http:// ncbi.nlm.nih.gov/gorf) จากนั้นนำแต่ละ ORF ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

3. ผลและอภิปราย

3.1 การตรวจสอบโปรตีนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01

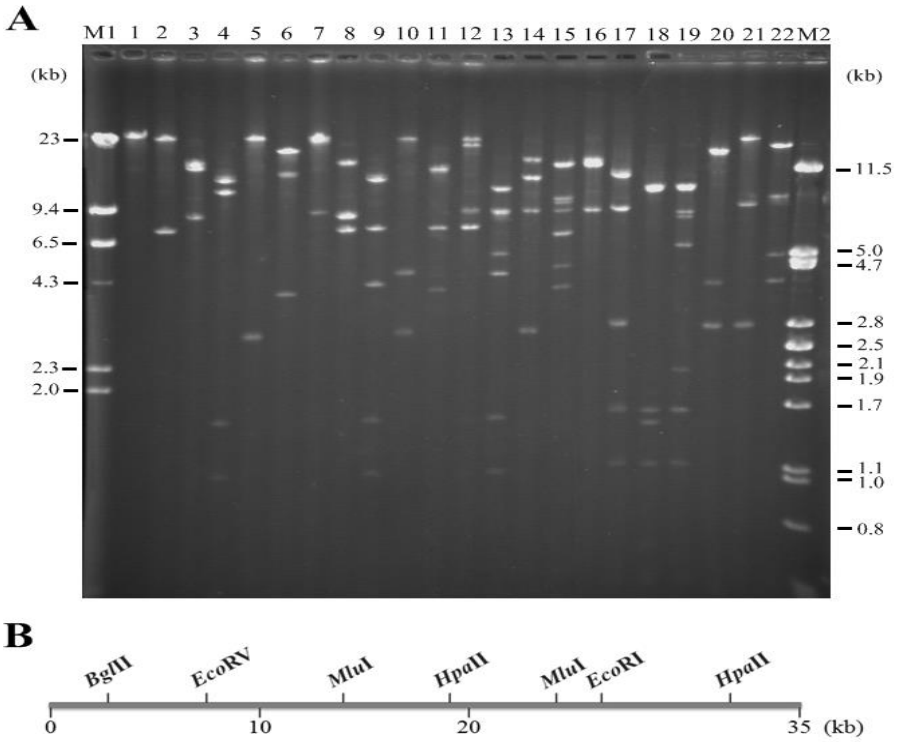
เพื่อตรวจสอบโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 โดยนำอนุภาคแบคเทอริโอเฟจมาผสมกับ sample buffer แล้วนำไปต้มและแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS - polyacrylamide gel (15 %) electrophoresis จากนั้นนำมาย้อมด้วย 0.125 % Coomassie blue R-250 พบว่ามีแถบโปรตีนอย่างน้อย 10 แถบ โดยมีแถบโปรตีนหลักๆ อยู่หนึ่งแถบซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 28 kDa ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนโครงสร้างที่ห่อหุ้มจีโนม (coat protein) ของ ØABP-01 และแถบโปรตีนอื่นๆ ซึ่งมีมวลโมเลกุลไล่เรียงตั้งแต่ 20 ถึง 97kDa ดังในรูปที่ 1สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (2010) พบว่า Acinetobacter phage phiAB2 จัดอยู่ใน *Podoviridae* family มีแถบโปรตีนหลัก 1 แถบ ขนาดประมาณ 35 kDa ซึ่งน่าจะเป็นแคปซิดโปรตีน และมีแถบโปรตีนย่อย อย่างน้อย 10 แถบ



รูปที่ 1 SDS - polyacrylamide gel (15 %) electrophoresis ของโปรตีนจากอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01: โปรตีนมาตรฐาน (BIO-RAD) (lane M) และแถบโปรตีนจากอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 (lane 1)

3.2 การสร้าง restriction map ของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01

เพื่อประมาณขนาดของจีโนมและสร้าง restriction map ของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด ได้แก่ *Hin*dIII, *Pst*I, *Bam*HI, *Sma*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I, *Xba*I และ*Sph*I จากนั้นแยก fragment โดย PFGE ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 2aโดยพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ 8 ชนิด จากทั้งหมด 11 ชนิด คือเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I และ*Sph*I เมื่อทำการรวมขนาดของ fragment ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าจีโนมของ ØABP-01 มีขนาดประมาณ 35 kb ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับจีโนมของ Acinetobacter phage phiAB2 (Lin, et al., 2010) คือประมาณ 40 kb โดยมีการประมาณขนาดของจีโนมด้วยเทคนิค PFGE เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ ส่วน Acinetobacter phage AB3 (KC311669), Acinetobacter phage Abp1 (JX658790) และ Acinetobacter phage AB1 (HM368206) จากการหาลำดับเบสทั้งจีโนมพบว่ามีขนาดจีโนมเท่ากับ 31.185 kb, 42.185 kb และ 45.159 kb ตามลำดับ และผลจากการสร้าง restriction map พบว่าที่ตำแหน่งต่างๆ ของจีโนม ØABP-01 ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bgl*II, *Eco*RV, *Mlu*I และ *Hpa*II ดังแสดงในภาพที่ 2b



ภาพที่ 2 Restriction analysis ของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01: PFGE ของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทั้งตัดเดี่ยวและคู่ (a) และ Restriction map ของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 (b), lane 1: uncut, lane 2: *Eco*RV, lane3: *Mlu*I, lane4: *Sph*I, lane5: *Bgl*II, lane6: *Hpa*II, lane7: *Eco*RI, lane8: *Eco*RV+*Eco*RI, lane9: *Eco*RV+*Sph*I, lane10: *Eco*RV+*Bgl*II, lane11: *Eco*RV+*Hpa*II, lane12: *Eco*RV+*Eco*RI, lane13: *Mlu*I+*Sph*I, lane14: *Mlu*I+*Bgl*II, lane15: *Mlu*I+*Hpa*II, lane16: *Mlu*I+*Eco*RI, lane17: *Sph*I+*Bgl*II, lane18: *Sph*I+*Hpa*II, lane19: *Sph*I+*Eco*RI, lane20: *Bgl*II+*Hpa*II, lane21: *Bgl*II+*Eco*RI, lane22: *Hpa*II+*Eco*RI, laneM1: λ *Hind*III marker และ laneM2: λ *Pst*I marker

3.3 การสร้าง genomic library และการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01

จากการสร้าง genomic library เพื่อหาลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 เมื่อนำลำดับเบสมาวิเคราะห์พบ 11incomplete ORF(ตารางที่ 1) พบว่า ORF ของ ØABP-01 โดยส่วนมากมีลำดับเบสที่คล้ายกับ ORF ของ Acinetobacter phage สายพันธุ์อื่นๆ เช่น Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1และ Acinetobacter phage AB3 เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบว่า clone4 มี ORF ที่มีลำดับเบสที่คล้ายกับtype VI secretion protein ของเชื้อ *A. baumannii* MDR-TJ โดยการเปรียบเทียบทั้งโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนใน type VI secretion system (T6SS) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของหางแบคเทอริโอเฟจ (Leiman, et

al., 2009) กล่าวคือ เป็นโครงสร้างที่ไม่ได้มีบรรพบุรุษร่วมกัน แต่มีวิวัฒนาการและทำหน้าที่คล้ายคลึงกัน (analogous) โดยแบคเทอริโอเฟจจะใช้ส่วนหางในการเจาะเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ ส่วนแบคทีเรียจะใช้ T6SS ในการหลั่งสารมหโมเลกุลออกนอกเซลล์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ insert ใน clone8 พบว่ามี 2 incomplete ORF ซึ่งเป็นแปลรหัสให้โปรตีน helicase และ ligase ซึ่งยีนทั้งสองมีส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่ (overlapping gene) ซึ่งอาจจะเป็นการปรับตัวของไวรัสที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอและมีจีโนมขนาดเล็ก เพื่อให้มีการแปลรหัสได้โปรตีนที่หลากหลายและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Chirico, et al., 2010) ซึ่งสามารถพบoverlapping geneในแบคเทอริโอเฟจทั่วไป รวมถึงแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* เช่นAcinetobacter phage phiAB1 (Chang, et al., 2011)

ตารางที่ 1แสดงผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 โดยโปรแกรม BLASTn

Clone name	ORF length	% Identity	Accession no.
4	- 1,329 bp	- 100 % type VI secretion protein (*A. baumannii*MDR-TJ)	- AFI96010
5	- 264 bp	- 99 % putative ATP-dependent DNA ligase (Acinetobacter phage phiAB1)	- ADQ12720
	- 183 bp	- 100 % DNA-directed DNA polymerase (Acinetobacter phage Petty)	- AGY47989.1
6	- 159 bp	- 99 % hypothetical protein (*A. baumannii*TYTH-1)	- AFU3978
	- 228 bp	- 98 % structural protein (Acinetobacter phage phiAB1)	- ADQ12734
8	- 804 bp	- 98 % putative DNA helicase (Acinetobacter phage phiAB1)	- ADQ12719
	- 165 bp	- 99 % putative ATP-dependent DNA ligase (Acinetobacter phage phiAB1)	- ADQ12720
9	- 351 bp	- 98 % hypothetical protein (Acinetobacter phage Abp1)	- AFV51020
	- 687 bp	- 99 % hypothetical protein (Acinetobacter phage Abp1)	- AFV51020
10	- 795 bp	- 97 % putative internal virion protein (Acinetobacter phage Abp1)	- AFV51021
13	- 891 bp	- 93 % putative head-tail connector protein (Acinetobacter phage AB3)	- AGC35314

4. บทสรุป

จากการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาพบว่า ØABP-01 มีขนาดจีโนมประมาณ 35 kb จีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Bgl*II, *Hpa*II, *Mlu*I และ*Sph*I ส่วนการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของจีโนมแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 พบว่าลำดับเบสบางส่วนของ ØABP-01 มีความคล้ายคลึงกับ Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 และ Acinetobacter phage AB3 ผลที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการหาลำดับเบสทั้งจีโนมเพื่อตรวจสอบหายีนที่จะแปรรหัสไปเป็น lytic enzymeและประยุกต์ใช้อนุภาคแบคเทอริโอเฟจØABP-01หรือการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเอนโดไลซิน เพื่อใช้รักษาหรือควบคุมการติดเชื้อ MDR-ABต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวรNaresuan University Research fund (R2555C085)

6. เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย กิตติ. (2555). การแยกและศึกษาลักษณะแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Acinetobacter baumannii* ที่แยกจากบ่อบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. , มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

นริศรา บุญเกิด. (2550). การดื้อยา carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*และ *Pseudomonas aeruginosa*. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

Chang, K.C., Lin, N.T., Hu, A., Lin, Y.S., Chen, L.K. and Lai, M.J. (2011). Genomic analysis of bacteriophage ØAB1, a ØKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, *97*(4), 249–255.

Chirico, N., Vianelli, A. and Belshaw, R. (2010). Why genes overlap in viruses. *Proceedings.Biological sciences*,*277*(1701), 3809-3817.

Fournier, P.E. and Richet, H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical infectious diseases*, *42*(5), 692-699.

Hanahan, N. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid.*Journal of molecular biology*, *166*(4), 557-580.

Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2005).*Bacteriophages: biology and applications*. USA: CRC Press.

Lai, M.J., Lin, N.T., Hu, A., Soo, P.C., Chen, L.K., Chen, L.H., et al. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ØAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, *90*(2), 529-539.

Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4154-4159.

Lin, N. T., Chiou, P. Y., Chang, K. C., Chen, L. K. and Lai, M. J. (2010). Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in microbiology*, *161*(4),308-314.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. and Lan, Q.C. (2007). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied microbiology*, *104*(1), 1-13.

Seifert, H., Strate, A. and Pulverer, G. (1995). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology and preaictirs of motality. *Medicine (Baltimore)*, *74*(6), 340-349.

Soothill, J.S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages.*Journal of medical microbiology*, *37*(4), 258-261.

Su, M.T., Venkatesh, T.V. and Bodmer, R. (1998).Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA.*BioTechniques*, *25*(1), 44-46.