การประเมินผลการเหนี่ยวนำแบคเทอริโอฟาจ ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยการใช้แสง Ultraviolet และสาร Mitomycin C

Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage Induction with an Application of Ultraviolet Light and Mitomycin C

จิราภรณ์ เกตุดี* และ สัณห์สิรี เมืองมาลย์

Jiraporn Gatedee* and Sunsiree Muangman

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

Faculty of Medical Technology, Rangsit University

**Corresponding author, E mail: Jiraporn.g@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการประเมินวิธีการเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกมาจากผู้ป่วยจำนวน 10 ไอโซเลทโดยวิธีการฉายรังสี (UV irradiation) และวิธีใช้สาร Mitomycin C พบว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้ 2 ไอโซเลท คือ ØU-PA9 และ ØU-PA10 จากการเหนี่ยวนำโดยการใช้แสง UV โดยคิดเป็น 20% และเมื่อทำการเหนี่ยวนำ prophage โดยใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C พบว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้ 9 ไอโซเลทคือ ØM-PA1, ØM-PA2, ØM-PA3, ØM-PA4, ØM-PA5, ØM-PA6, ØM-PA7, ØM-PA8 และ ØM-PA10 โดยคิดเป็น 90% สรุปงานวิจัยครั้งนี้สามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้โดยการใช้แสง UV และการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการเหนี่ยวนำ prophage โดยมุ่งเน้นถึงวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำแบคเทอริโอฟาจ เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ prophage กับ virulent ของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อไป

คำสำคัญ: *โปรฟาจ, การเหนี่ยวนำ, Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

This study aimed to evaluate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage induction with an application of UV light and Mitomycin C. The results showed that ØU-PA9 and ØU-PA10 were isolated by UV induction (20%). Nine prophages including ØM-PA1, ØM-PA2, ØM-PA3, ØM-PA4, ØM-PA5, ØM-PA6, ØM-PA7, ØM-PA8, and ØM-PA10 were isolated by mitomicin C induction (90%). Therefore, the application of UV light and Mitomycin C demonstrated the success of *P. aeruginosa* bacteriophage induction. These data could be useful for further studies related to the virulence factor of *P. aeruginosa* and their prophage carriage.

Keywords: *Prophage, induction, Pseudomonas aeruginosa*

มหาวิทยาลัยรังสิต

1. บทนำ

Pseudomonas aeruginosa เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส (opportunist) ที่มีความรุนแรงสูง และเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในผู้ป่วยในโรงพยาบาลเป็นเวลานานๆ ซึ่งเรียกว่า โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) หรือคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพติดต่อกัน จะเกิดการดื้อต่อยาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก

Bacteriophage (แบคเทอริโอฟาจ) หรือ phage เป็นไวรัสของแบคทีเรีย แบ่งเป็น 2 ชนิดตามวงจรชีวิตในแบคทีเรียคือ 1) Lytic phage หมายถึง ฟาจที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วมีการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยใช้สารต่างๆ จากโฮสต์ในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่างๆ เข้าเป็น phage progeny แล้วทำให้แบคทีเรียแตกออกเพื่อให้ phage ออกมาเพื่อเข้าสู่เซลล์อื่นต่อไป 2) Temparate phage หรือ prophage หมายถึง ฟาจที่เข้าสู่แบคทีเรียแล้วฟาจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม โดยแบคทีเรียใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย ซึ่งในการอยู่รวมกันระหว่างโฮสต์และ prophage นั้นสามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนสิ่งมีชีวิตที่ผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transfer ปรากฏการณ์นี้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) ดังนั้นจึงมีการศึกษา ความเกี่ยวข้องของ prophage กับ virulent ของเชื้อ *P. aeruginosa* และพบว่า *P. aeruginosa* prophage, Ø CTX ซึ่งอยู่ใน *Myoviridae* family มี CTX ยีนอยู่และ ทำให้เกิดการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ในสัตว์ทดลอง (Baltch AL, *et al*.,1994, O'Callaghan RJ, *et al*.,1996) ในปี 2009 Winstarnlay C และคณะ ได้ทำการ sequencing เชื้อ *P. aeruginosa* stain LES ซึ่งก่อให้เกิดโรคการติดเชื้อที่ปอด (Pulmonary infaction) พบว่ามี 6 prophage cluster และเมื่อผู้วิจัยทำให้ 3 prophage cluster ยีนนี้เกิด mutation พบว่าทำให้ virulence ของเชื้อลดลง (Kung VL, *et al*.,2010) ปัจจุบันวิธีการศึกษา prophage ซึ่งแฝงอยู่ในแบคทีเรียที่ใช้กันมานานและแพร่หลายนั้นคือ การเหนี่ยวนำ (induction) ด้วยการฉายด้วยแสง UV และการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น mitomycin C เป็นต้น (O'Callaghan RJ, *et al*.,1996) โดยพบว่าผลการเหนี่ยวนำของทั้งสองวิธีให้ผลที่แตกต่างกันไป (Berenstein D,1987) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการเหนี่ยวนำ prophage จากแบคทีเรียจากวิธีการฉายด้วยแสง ultraviolet และการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น mitomycin C โดยใช้ *P. aeruginosa* ที่แยกมาจากผู้ป่วยเป็น model ในการทดสอบและทำการตรวจสอบเพื่อยืนยัน prophage ที่แยกได้ด้วยการทำ การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Spot assay และยืนยันด้วยวิธี plaque assay

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทำการประเมินวิธีการเหนี่ยวนำ prophages ของเชื้อ *P.aeruginosa* ที่แยกมาจากผู้ป่วยโดยวิธีการฉายแสง ultraviolet และวิธีใช้สาร mitomycin C

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเหนี่ยวนำแบคเทอริโอฟาจโดยการใช้แสง ultraviolet (UV)

การเหนี่ยวนำแบคเทอริโอฟาจโดยการใช้แสง UV ทำโดยการฉายแสง UV ทำ โดย culture เชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 10 ราย (PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PA9 และ PA10) ใน TSB broth ที่ 37ºC ข้ามคืน จากนั้น subculture โดยการดูด 100 µl ของ overnight culture ใส่ลงไปใน 3 ml TSB broth แล้ว incubate 37ºC นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เท subculture ดังกล่าวลงใน sterile petri dish จากนั้นนำไปฉายแสง UV (254 nm) นาน 10, 20 และ 30 นาทีตามลำดับ โดยให้ระยะห่างระหว่าง sterile petri dish และ light source ห่างกัน 25 cm หลังจากนั้นเท subculture ที่ผ่านการฉายแสง UV แล้วลงใน sterile 15 ml centrifuge tube แล้วปั่นที่ 3,500 rpm 20 นาที จากนั้นนำ supernatant ปริมาตร 1 ml มากรองผ่าน 0.45 µm filter ลงใน sterile tube และจะนำ supernatant ที่กรองมา แล้ว (น้ำกรอง) นำไปทดสอบ เพื่อหา prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อไป

3.2 การเหนี่ยวนำแบคเทอริโอฟาจโดยการใช้ Mitomycin C

การเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 10 ราย โดยการใช้ mitomycin C ทำ โดย culture เชื้อ *P. aeruginosa* ใน TSB broth ที่ 37ºC ข้ามคืน จากนั้น subculture โดยการดูด 100 µl ของ overnight culture ใส่ลงไปใน 3 ml TSB broth แล้ว incubate 37ºC นาน 2.30 hr. เมื่อครบเวลา เติม mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.5 ,1 , 5 µg/ml ลงใน เชื้อ *P. aeruginosa* PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PA9 และ PA10 จนครบเวลา 36 hr. จากนั้นนำมา centrifuge tube แล้วปั่นที่ 10,000 rpm 10 นาที จากนั้นนำ supernatant ปริมาตร 1 ml มากรองผ่าน 0.45 µm filter ลงใน sterile tube และจะนำ supernatant ที่กรองมา (น้ำกรอง) เก็บ ไว้ 4ºC จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หา prophage ต่อไป

3.3 การตรวจสอบหา prophages ด้วยวิธี spot assay

การตรวจสอบหา prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ทำได้โดยวิธี spot assay โดยการผสม overlay media (0.4% TSB agar) 3 mL กับ 100 µLของ *P. aeruginosa* ที่เลี้ยงไว้มาแล้ว 2.30 hr. จากนั้นเทส่วนผสมทับลงบน TSB agar plate กลิ้งไปมาจนทั่ว plate และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จน overlay media แข็ง จากนั้นหยดน้ำกรองปริมาตร 10 µL ลงบน plate ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำ plate ไป incubate 37 ºC 16-18 hr. เมื่อครบเวลาให้สังเกต clear zone รอบรอยหยดน้ำกรอง ซึ่งเป็นที่บ่งชี้ผลบวกของการแยกแบคเทอริโอฟาจของเชื้อ *P. aeruginosa* ผลลบไม่พบ clear zone

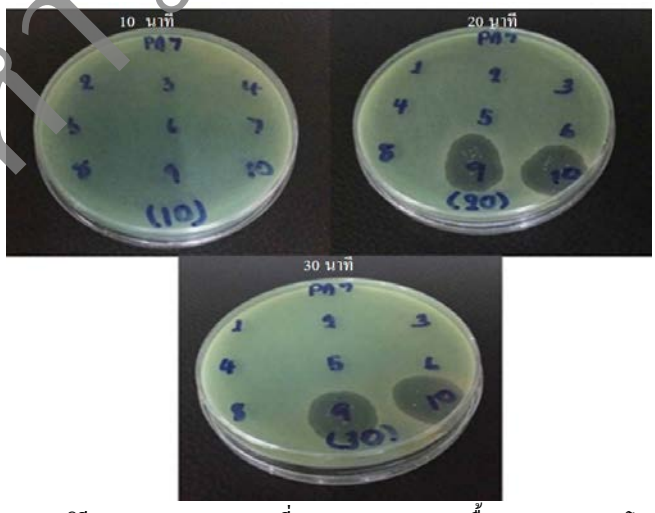
3.4 การตรวจสอบหา prophages ด้วยวิธี Plaque assay

การตรวจสอบหา prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ทำได้โดยวิธี Plaque assay โดยการเจือจาง supernatant ที่กรองมาเป็น 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 จากนั้นผสมในแต่ละการเจือจางจำนวน 200 µl กับ 200 µl ของ *P. aeruginosa* ที่เลี้ยงไว้มาแล้ว 2.30 hr. จากนั้นนำส่วนผสมไป incubate ที่ 37ºC, 15 นาที เมื่อครบเวลานำส่วนผสมมาผสมกับ overlay media 3 ml จากนั้นเทส่วนผสมทับลงบน TSB agar plate กลิ้งไปมาจนทั่วเพลทและตั้ง

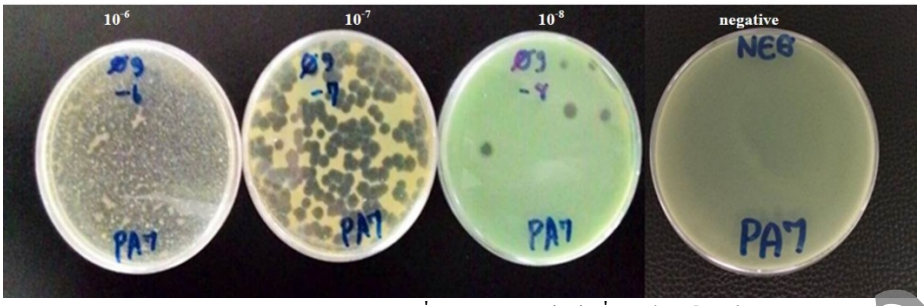
ทิ้งไว้ 15 นาทีจน overlay media แข็ง จากนั้นนำเพลทไป incubate ที่ 37ºC 16-18 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้สังเกตรอยแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใสที่เรียกว่า พล้าค (plaque) ในแต่ละการเจือจาง

4. ผลการวิจัย

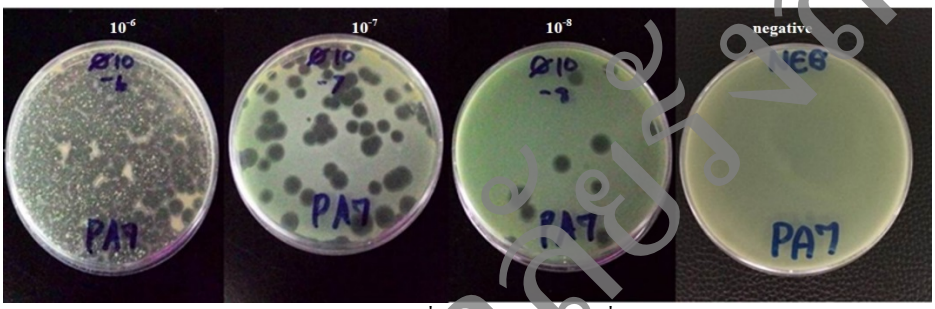
การทดสอบการเหนี่ยวนำ prophage โดยการใช้แสง UV ทำโดยการฉายแสง UV กับ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 10 รายได้แก่ *P. aeruginosa* PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PA9 และ PA10 โดยนำไปฉายแสง UV นาน 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า จากการทดสอบด้วยวิธี spot assay การฉายแสง UV นาน 10 นาที ไม่พบ clear zone รอบรอยหยดน้ำกรองที่ 1: *P. aeruginosa* PA1, 2: *P. aeruginosa* PA 2, 3: *P. aeruginosa* PA3, 4: *P. aeruginosa* PA4, 5: *P. aeruginosa* PA5, 6: *P. aeruginosa* PA 6, 7: *P. aeruginosa* PA7, 8: *P. aeruginosa* PA8, 9: *P. aeruginosa* PA9, และ 10: *P. aeruginosa* PA10 แสดงว่าการฉายแสง UV นาน 10 นาที ไม่สามารถเหนี่ยวนำ prophage ออกมาได้เลย และ เมื่อเพิ่มเวลาการฉายแสง UV เป็นที่ 20 นาที พบ clear zone ที่น้ำกรอง 9: *P. aeruginosa* PA9 และ 10: *P. aeruginosa* PA10 ตามลำดับ แสดงว่าการฉายแสง UV เป็นที่ 20 นาที สามารถเหนี่ยวนำ prophage ออกมาได้ 2 ไอโซเลท โดยตั้งชื่อว่า ØU-PA9 และ ØU-PA10 ตามลำดับ โดย prophage ØU-PA9 สามารถเหนี่ยวนำออกมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* PA9 และ prophage ØU-PA10 สามารถเหนี่ยวนำออกมาจาก *P. aeruginosa* PA10 ซึ่ง prophage ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเข้าโฮสต์ *P. aeruginosa* PA7 และทำให้เกิด clear zone ได้ แต่ไม่สามารถทำให้เกิด clear zone กับโฮสต์ชนิดอื่น และเมื่อเพิ่มเวลาการฉายแสง UV เป็นที่ 30 นาที พบว่าให้ผลเหมือนกับการฉายแสง UV ที่เวลา 20 นาที (รูปที่ 1) จากนั้น เมื่อทำการยืนยันผลการเหนี่ยวนำ prophage ที่ได้จากการฉายแสง UV ที่เวลา 20 นาทีและ 30 นาที โดยวิธี plaque assay โดยใช้ *P. aeruginosa* PA7 เป็นโฮสต์ พบว่า prophage ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ ØU-PA9 และ ØU-PA10 ให้ผลบวก กับวิธี plaque assayโดยพบพล้าคใสขนาด 3-5 มิลลิเมตร (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 1 แสดงผลบวกจากวิธี spot assay จากการเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยการฉายแสง UV ที่เวลา 10 นาที , 20 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ

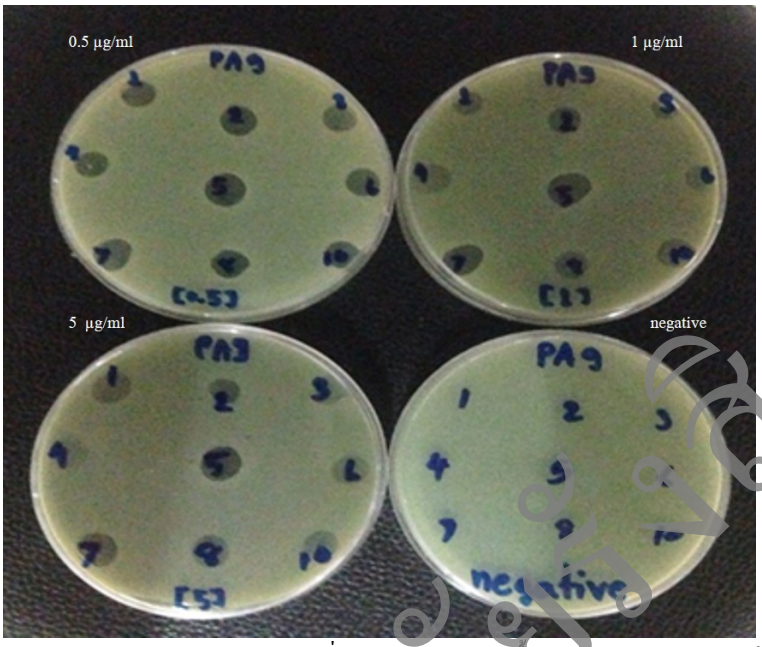


รูปที่ 2 แสดงผลบวกจากวิธี Plaque assay ของ ØU-PA9 ที่เจือจางความเข้มข้นที่ 10^{-6}, 10^{-7} ,10^{-8} และ negative control โดยมี *P. aeruginosa* PA7 เป็นโฮสต์



รูปที่ 3 แสดงผลบวกจากวิธี Plaque assay ของ ØU-PA10 ที่เจือจางความเข้มข้นที่ 10^{-6} ,10^{-7} , 10^{-8} และ negative control โดยใช้ *P. aeruginosa* PA7 เป็นโฮสต์

การเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยการใช้ mitomycin C ทำโดยเติม mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.5 ,1 และ 5 μg/ml ลงใน เชื้อ *P. aeruginosa* PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PA9 และ PA10 จากการทดสอบโดยวิธี spot assay พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 μg/ml ให้ผลการทดสอบเหมือนกันคือ พบ clear zone รอบรอยหยดน้ำกรองที่ 1 : *P. aeruginosa* PA1, 2: *P. aeruginosa* PA 2, 3: *P. aeruginosa* PA3, 4: *P. aeruginosa* PA4, 5: *P. aeruginosa* PA5, 6: *P. aeruginosa* PA 6, 7: *P. aeruginosa* PA7, 8: *P. aeruginosa* PA8, และ 10: *P. aeruginosa* PA10 (รูปที่ 4) แสดงว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophage ออกมาได้ 9 ไอโซเลท โดยได้ตั้งชื่อ prophage ทั้ง 9 ไอโซเลทว่า ØM-PA1, ØM-PA2, ØM-PA3, ØM-PA4, ØM-PA5, ØM-PA6, ØM-PA7,ØM-PA8 และ ØM-PA10 โดย prophage ทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถเข้าโฮสต์ *P. aeruginosa* PA9 ได้ และเมื่อทำการยืนยันผลการเหนี่ยวนำ prophage ทั้ง 9 ไอโซเลท โดยวิธี plaque assay โดยใช้ *P. aeruginosa* PA 9 เป็นโฮสต์ พบว่า prophage ทั้ง 9 ไอโซเลท ให้ผลบวก กับวิธี plaque assay โดยพบพล้าคลักษณะใสทุกไอโซเลท



รูปที่ 4 แสดงผลบวกจากวิธี spot assay จากการเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยการใช้ mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml, 1 µg/ml และ 5 µg/ml เทียบกับ negative control โดยใช้ *P. aeruginosa* PA 9 เป็นโฮสต์

5. การอภิปรายผล

การเหนี่ยวนำ prophage ด้วยวิธีการฉายด้วยแสง UV และการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C เป็นการกระตุ้น SOS response ของแบคทีเรีย (Sassanfar M and Roberts JW.1990) โดยจะส่งผลให้ prophage ที่อยู่ใน โคโมโซม แบคทีเรียหลุดออกมาสู่ lytic pathway มากกว่า lysogenic pathway (Rokney A *et al*.,2008) งานวิจัยนี้ประเมินผลการเหนี่ยวนำ prophage จากแบคทีเรียจากวิธีการฉายด้วยแสง UV และการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C พบว่าการเหนี่ยวนำโดยการใช้แสง UVสามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้ 2 ไอโซเลท โดยสามารถเหนี่ยวนำ prophage ออกมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* PA9, และ *P. aeruginosa* PA10 ได้คิดเป็น 20% (2/10) และเมื่อทำการเหนี่ยวนำ prophage โดยใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C พบว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้ 9 ไอโซเลทจากเชื้อ *P. aeruginosa* PA1, *P. aeruginosa* PA2, *P. aeruginosa* PA3, *P. aeruginosa* PA4, *P. aeruginosa* PA5, *P. aeruginosa* PA 6, *P. aeruginosa* PA7, *P. aeruginosa* PA8, และ *P. aeruginosa* PA10 โดยคิดเป็น 90 % (9/10) แสดงว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C สามารถเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ออกมาได้ดีกว่าการฉายด้วยแสง UV ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shan Jinyu และคณะที่ได้ทำการเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *Clostridium difficile* โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C และ norfloxacin ผลการทดลองพบว่าการเหนี่ยวนำโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C สามารถแยก prophage ได้มากถึง 9 ไอโซเลต จากเชื้อ *Clostridium difficile* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 16 ไอโซเลต ในขณะที่มีเพียง 2 ไอโซเลต ที่สามารถเหนี่ยวนำได้จากการใช้ยาปฏิชีวนะ norfloxacin และ 3 ไอโซเลต ที่สามารถเหนี่ยวนำได้จากการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด (Shan J *et al*. 2014) และงานวิจัยครั้งนี้ผลของการเหนี่ยวนำโดยการฉายแสง UV ได้อัตราการเหนี่ยวนำน้อยกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C อาจเกิดจาก 2 กรณี คือ 1) การฉายแสง UV ไม่สามารถเหนี่ยวนำ

มหาวิทยาลัยรังสิต

prophage ออกจาก *P. aeruginosa* PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8 ได้ 2) prophage อาจถูกเหนี่ยวนำออกมาได้แต่อาจจะตายไปหรืออาจเกิด mutation ที่ attachment site ของ prophage จึงทำให้ไม่สามารถจับกับ receptor บนผนังเซลแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2010 ของ Sherri Tomlinson ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการอยู่รอดของ แบคเทอริโอฟาจโดยใช้แสง UV พบว่าเมื่อทำการฉายแสง UV เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที จะทำให้ lytic activity ของแบคเทอริโอฟาจ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (Tomlinson S., 2010) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง การเหนี่ยวนำ prophage โดยการฉายแสงสามารถเหนี่ยวนำ prophage ออกมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* PA9 ได้ ในขณะที่การเหนี่ยวนำโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ไม่สามารถเหนี่ยวนำออกมาได้ ดังนั้นเสนอแนะว่าหากต้องทำการเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ควรใช้ การเหนี่ยวนำโดยยาปฏิชีวนะ mitomycin C ก่อน หากเหนี่ยวนำ prophage ไม่ได้ อาจใช้ การฉายด้วยแสง UV หรือ วิธีอื่นในการเหนี่ยวนำร่วมด้วยได้

6. บทสรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินวิธีการเหนี่ยวนำ prophage จากแบคทีเรียด้วยวิธีการฉายด้วยแสง UV และการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น mitomycin C โดยใช้แบคทีเรียชนิดเดียวกัน คือ *P. aeruginosa* ที่แยกมาจากผู้ป่วยเป็น model ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophageโดยการฉายแสง UV ได้ 2 ไอโซเลท โดยคิดเป็น 20% และเมื่อทำการเหนี่ยวนำ prophage โดยใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C พบว่าสามารถเหนี่ยวนำ prophage ได้ 9 ไอโซเลท โดยคิดเป็น 90% แสดงว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C สามารถเหนี่ยวนำ prophage ของเชื้อ *P. aeruginosa* ออกมาได้ดีกว่าการฉายด้วยแสง UV โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการเหนี่ยวนำ prophage โดยมุ่งเน้นเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำ prophage สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ prophage กับ virulent ของเชื้อ *P. aeruginosa* แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ ควรทำการศึกษาคุณลักษณะของ prophage เช่น การศึกษารูปร่างของ prophage และ ศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาของผู้ป่วยกับ prophage ที่เหนี่ยวนำออกมาได้ ต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กัญญนันทน์ กฤษศิริวุตินันท์ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย และนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับความร่วมมือในการเหนี่ยวนำ prophage

8. เอกสารอ้างอิง

Baltch AL, Smith RP, Franke M, Ritz W, Michelsen P, Bopp L, *et al*. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenicity factor in a systemic infection of leukopenic mice. Toxicon off J Int Soc Toxinology, 32(1):27–34.

Berenstein D. (1987) UV-inducible DNA repair in *Acinetobacter calcoaceticus*. Mutat Res Repair Rep, 183(3):219–24.

Chen F, Wang K, Stewart J, Belas R. (2006). Induction of Multiple Prophages from a Marine Bacterium:a Genomic Approach. Applied and Environmental Microbiology, 72(7), 4995–5001.

Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev MMBR, 74(4):621–41.

O'Callaghan RJ, Engel LS, Hobden JA, Callegan MC, Green LC, Hill JM. (1996). *Pseudomonas keratitis*. The role of an uncharacterized exoprotein, protease IV, in corneal virulence. Invest Ophthalmol Vis Sci,37(4):534–43.

Rokney A, Kobiler O, Amir A, Court DL, Stavans J, Adhya S, Oppenheim A B. (2008). Host responses influence on the induction of lambda prophage. Molecular Microbiology, *68*(1), 29–36.

Sassanfar M, Roberts JW. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. J Mol Biol. 212:79–96.

Shan J, Korbsrisate S , Withatanung P, Adler NL , Clokie MR.J, Galyov EE. (2014). Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. Frontiers in Microbiology, 5, 599. http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00599

Sherri Tomlinson. UV Irradiation on Bacteriophage Survival. Bachelor's Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, Coastal Carolina University.

มหาวิทยาลัยรังสิต