



การวิเคราะห์ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในการตอบสนองต่อไฮโดร

ควินิน

Transcriptomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in response to

hydroquinine

ณัฐธยา ชินพงษ์
ประอรนุช ตันเอียด
ภาวรินทร์ เขตรักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีการศึกษา 2565

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ใน การตอบสนองต่อไฮโดรควินิน	
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐธยา	ชินพงษ์
	นางสาวประอรนุช	ตันเขียน
	นางสาวภาวรินทร์	เขตรักษา
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล	

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)



.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล)

อาจารย์ที่ปรึกษา



.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต คงรส)

หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภวิฑู สุขเพ็ง)

คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ใน การตอบสนองต่อไฮโดรควินิน	
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐธยา	ชินพงษ์
	นางสาวประอรนุช	ตันเขียน
	นางสาวภาวรินทร์	เขตรักษา
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล	

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ขอรับรองว่านิสิตผ่านการสอบ
ปากเปล่าวิทยานิพนธ์ โดยได้มีการปรับปรุงแก้ไขรายงานตามข้อเสนอแนะจากคณะกรรมการแล้ว



.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล)

ประธานกรรมการ



.....
(ดร.ไกร ดาวตาก)

กรรมการ



.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยอดหทัย ทองศรี)

กรรมการ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรภาส จงจิตวิมล อาจารย์ที่ปรึกษา คุณนนทพร รัตนจักร และคุณศศพร แว่วเสียงสังข์ ที่ได้ให้ความรู้ทั้งด้านวิชาการ ทักษะต่างๆ อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือ สั่งสอน ให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ มาโดยตลอด และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ดร.ไกร ดาวตาก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยอดหทัย ทองศรี ที่กรุณาสละเวลาเป็นอาจารย์สอนวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนการทำวิจัยจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2565 จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้



ณัฐธยา ชินพงษ์
ประอรนุช ตันเย็น
ภาวรินทร์ เขตรักษา

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ใน การตอบสนองต่อไฮโดรควินิน	
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐธยา	ชินพงษ์
	นางสาวประอรนุช	ตันเยียน
	นางสาวภาวรินทร์	เขตรักษา
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล	

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จัดเป็นเชื้อสำคัญที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ ในโรงพยาบาลและดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน จึงได้มีการคิดค้นสารต้านจุลชีพใหม่ๆ พบว่าสาร ไฮโดรควินินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหา กลไกในการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินินต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยอาศัยข้อมูล transcriptomics ในการศึกษาได้มีการวิเคราะห์หาลำดับ RNA โดยวิธี RNA-sequencing แล้วนำ ผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (DEGs) จากนั้นจะนำผลมาคัดเลือก โดยเกณฑ์ $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ และ $\text{FDR} \leq 0.05$ พบว่ามี 254 ยีน ที่มีการแสดงออกที่แตกต่าง กันในสถานะที่มีและไม่มีสารไฮโดรควินิน โดยแบ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated gene) จำนวน 157 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated genes) จำนวน 97 ยีน จากการศึกษาผล DEGs ทั้งหมด คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเฉพาะยีนที่มีการแสดงออกลดลง โดย นำมาวิเคราะห์หาการทำงานของยีนด้วยเกณฑ์ gene ontology และฐานข้อมูล KEGG pathway พบว่าสารไฮโดรควินินมีผลต่อกลไก ribonucleoside-diphosphate reductase activity, flagellar assembly, bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism และ oxidative phosphorylation จากข้อค้นพบในงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าสารไฮโดรควินินน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* รวมถึงยับยั้งความรุนแรงของการก่อโรค ได้ทั้งหมด 5 กลไก และอาจนำมาใช้ในด้าน การแพทย์เพื่อใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ : ทรานสคริปโตม, สารไฮโดรควินิน, ฐานข้อมูล KEGG pathway, เกณฑ์ยีนออนโทโลยี, เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน

Project Title	Transcriptomic analysis of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in response to hydroquinine	
By	Nattaya	Chinnapong
	Pra-ornut	Tanyean
	Pawarin	Ketraksa
Program Title	Medical Technology	
Advisor	Asst.prof. Jirapas Jongjitvimol, Ph.D.	

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common pathogens that causes infection in hospital and multidrug-resistant bacteria. Therefore, new anti-microbial agents have been developed as a result. It was discovered that hydroquinine was effective against many strains of bacteria. We aimed to determine anti-microbial mechanism of hydroquinine in response to *P. aeruginosa* using transcriptomics analysis. In this study was analyzed by RNA-sequencing. The results were analyzed for the differential expression genes (DEGs), and the results were selected using criteria $-2 \geq$ fold change ≥ 2 and $FDR \leq 0.05$ discovery are 254 genes. It is 157 up-regulated genes and 97 down-regulated genes. We only focus the down-regulated genes. The mechanism of gene activity was analyzed using the gene ontology and KEGG pathway. We found 5 mechanisms of hydroquinine in response to *P. aeruginosa* were ribonucleoside-diphosphate reductase activity, flagellar assembly, bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism and oxidative phosphorylation. In conclusion hydroquinine may be inhibit *P. aeruginosa* and inhibit pathogenic virulence factor. In the future, hydroquinine may be used in medicine to treat bacterial infection

Keywords: transcriptome, hydroquinine, gene ontology, KEGG pathway, *Pseudomonas aeruginosa*, differential expression genes

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
2	ทบทวนวรรณกรรม	4
	2.1 สารไฮโดรควินิน	4
	2.2 เชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
	2.2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	5
	2.2.2 การดื้อยาของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	7
	2.3 กลไกการยับยั้งแบคทีเรีย	7
	2.3.1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors)	7
	2.3.2. ยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (inhibitors of membrane function)	8
	2.3.3. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors)	8
	2.3.4. ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors)	8
	2.3.5. ยับยั้งกรดโฟลิก (folic acid metabolism inhibitors)	9
	2.4 Next generation sequencing	9
	2.5 Transcriptomics และการประยุกต์ด้านจุลชีววิทยา	10
	2.6 Gene ontology	12
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	14
	รูปแบบการวิจัย	14

	เชื้อแบคทีเรีย, วิธีการเพาะเลี้ยง และการนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีสารไฮโดรควินิน	14
	เครื่องมือในการวิจัย	14
	สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	15
	วิธีดำเนินการ	15
	3.1 การสกัด RNA	15
	3.2 การวิเคราะห์ลำดับ RNA ทั้งหมด (Transcriptomic analysis)	15
	3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล DEGs โดยใช้เกณฑ์ Gene ontology	15
	3.4 การวิเคราะห์และการแปลผลทางชีวภาพ	16
4	ผลการวิจัย	18
	4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับ RNA ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18
	4.2 ผลการจำแนกกลไกของยีนที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินินตามเกณฑ์ gene ontology	40
	4.3 ผลการวิเคราะห์กลไกของยีนที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินินโดยใช้ฐานข้อมูล KEGG pathway	42
5	อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	44
6	สรุปผลการวิจัย	48
	เอกสารอ้างอิง	49
	ประวัติผู้วิจัย	53

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลของการแสดงออกยีนที่ต่างกันในสภาวะที่มีการตอบสนองของสารไฮโดรควินิน	18
2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs	19
3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs	32
4 ยีนที่มีการแสดงออกลดลงผ่านทาง KEGG pathway	42



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 คิวบิน	4
2 ไฮโดรคิวบิน	4
3 กลไกการออกฤทธิ์ (PABA, p-aminobenzoic acid; DHFA, dihydrofolic acid	9
4 แสดงหน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม DAVID	16
5 แสดงหน้าต่างเครื่องมือที่ใช้จำแนกหน้าที่ข้อมูลโดยแสดงผลในรูปแบบต่างๆ	17
6 หน้าต่างแสดง การจำแนกตามเกณฑ์ต่าง ๆ	17
7 MA plot และ Volcano plot แสดงจำนวน DEGs	40
8 การจำแนกยีนที่มีการแสดงออกลดลงตามเกณฑ์ Gene ontology	41
9 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ flagella assembly ใน KEGG pathway	46
10 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ bacterial chemotaxis ใน KEGG pathway	46
11 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative phosphorylation ใน KEGG pathway	47

สัญลักษณ์และคำย่อ

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
β	beta
<i>C. calisaya</i>	<i>Cinchona calisaya</i>
<i>C. legeriana</i>	<i>Cinchona legeriana</i>
<i>C. officianalis</i>	<i>Cinchona officianalis</i>
<i>C. succirubra</i>	<i>Cinchona succirubra</i>
CAPs marker	cleaved amplified polymorphic sequence
CFU	colony forming unit
CLSI	clinical & laboratory standards institute
DAVID	the database for annotation, visualization and integrated discovery
DDBJ	DNA databank of japan
DEGs	differential expression genes
DHFA	dihydrofolic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	European Bioinformatics Institute
FC	fold change
FDR	false discovery rate
GO	gene ontology
HRM	high resolution melt
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	luria bertani
MHB	mueller hinton broth
MIC	minimum inhibitory concentration

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MIPS	Munich information center for protein sequence
ml	millilitres
mRNA	messenger ribonucleic acid
NGS	next generation sequencing
nm	nanometer
OF	oxidation-fermentation
OMPs	outer membrane proteins
PABA	p-aminobenzoic acid
PACE	PCR allele competitive extension
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	polymerase chain reaction
PIR	protein information resource
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT-qPCR	reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBE	single-base extension
SNP	single-nucleotide polymorphism
Spp.	species
THFA	tetrahydrofolic acid
V	volt
YPD	yeast extract peptone dextros

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ในปัจจุบันการติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและสามารถพบได้ในทุกโรงพยาบาลทั่วโลก โดยแต่ละปีประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยติดเชื้อประมาณ 1.7 ล้านคนและเสียชีวิตประมาณ 99,000 คน (1) ซึ่งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จัดอยู่ในสามลำดับแรกที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (2) เป็นแบคทีเรียแกรมลบสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทั้งยังมีกลไกที่เป็นพิษต่างๆที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง เช่น การหลั่งสารพิษ (toxins) การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (quorum sensing) การสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm formation) (3) และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนาน อีกทั้งผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพจะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือด (4) นอกจากนี้ยังก่อโรคอื่น ๆ เช่น การติดเชื้อของกระดูกตา โรคคลื่นหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น (5)

ผลการศึกษาจากโรงพยาบาลในประเทศไทยปี 2553 จำนวน 1,023 แห่ง พบการติดเชื้อในโรงพยาบาล 268,628 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 3.98 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและพบว่าเป็นการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพจำนวน 87,751 ครั้ง โดยมีเชื้อแบคทีเรียสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (6) ในขณะที่ในปี 2562 ได้มีการศึกษาการติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 92 แห่ง พบว่ามีการติดเชื้อจาก *E. coli* มากที่สุด รองลงมาคือ *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ตามลำดับ (7) ซึ่งจากผลการศึกษาทั้งในปี 2553 และปี 2562 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลตั้งแต่อดีตรวมถึงสถานการณ์ที่ผ่านมานี้ยังคงเป็นเชื้อในกลุ่มดังกล่าว จากการศึกษาข้างต้นพบว่า *P. aeruginosa* เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย (1, 4) และอีกทั้งยังพบปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* มีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี (4, 8) ซึ่งผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมักมีความยุ่งยากในการรักษาและมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง

ปัจจุบันมีการศึกษาหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาโดยเฉพาะสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในการศึกษาของงานวิจัยของ Kraikongjit และคณะ (9) ได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบผลของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างยางจากต้นยางแดงกับยางจากปากทางเข้ารังของชันโรงสายพันธุ์ *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยโดยพบว่ายางจากต้นยางแดงและยางจากปากทางเข้ารังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* และงานวิจัยของ Jongjitvimol และคณะ (10) ได้ทำการสกัดตัวอย่างจากปากทางเข้ารังชันโรงที่เก็บในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง 4 จังหวัด ได้แก่ พิชณุโลก เพชรบูรณ์ สุโขทัย และกำแพงเพชร ซึ่งพบว่าสารสกัดจากปากทางเข้ารังชันโรงทุกแหล่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* (9, 10) ยับยั้งเชื้อรา เช่น *Candida albicans* (10) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (HeLa cells) (10) ซึ่งองค์ประกอบของสารสกัดจากปากทางเข้ารังชันโรงมีส่วนประกอบของสารฟีนอลิก (9, 10) โดยสารประกอบดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (11) จากงานวิจัยได้ทดสอบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) พบว่ามีสารไฮโดรควิโนนอยู่ในสารสกัดดังกล่าวในปริมาณสูงเป็นลำดับต้น ๆ (9, 10)

จากการศึกษาข้อมูลของสารไฮโดรควิโนน พบว่าในปัจจุบันนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมาลาเรีย และยังสามารถยับยั้ง *Toxoplasma gondii* ได้ (12) นอกจากนี้ยังมีการนำสารไฮโดรควิโนนไปใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ในด้านเสริมความงาม เนื่องจากสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินทำให้ผิวมีความกระจ่างใสขึ้น (13) แต่ข้อมูลหรืองานวิจัยของสารไฮโดรควิโนนที่เกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียยังมีไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าสารไฮโดรควิโนนอาจจะเป็นสารชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ จากข้อมูลการศึกษางานวิจัยของนนทพร รัตนจักร และคณะ (14) พบว่าสารไฮโดรควิโนนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* เป็นต้น โดยงานวิจัยดังกล่าวได้มีการศึกษาในยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น พบว่าสารไฮโดรควิโนนสามารถส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของยีนที่สำคัญในกลุ่มการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ efflux pump ซึ่งเป็นกระบวนการที่ส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้มีการกล่าวถึงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลงในการตอบสนองต่อสารไฮโดรควิโนน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจเกี่ยวกับยีนที่มีการแสดงออกที่ลดลง โดยใช้วิธีศึกษาผลการแสดงออกของยีนของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะที่มีการเพาะเลี้ยงสารไฮโดรควิโนน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหากลไกในการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินินต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยอาศัยข้อมูล transcriptomics

ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับ RNA โดยศึกษาในเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินินในความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC และไม่มีสารไฮโดรควินิน ซึ่งผ่านการบ่มเพาะในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียไปสกัด RNA จากนั้น RNA ของเชื้อจะถูกส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของ RNA (RNA sequencing) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินิน ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาเฉพาะข้อมูลที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่ตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม

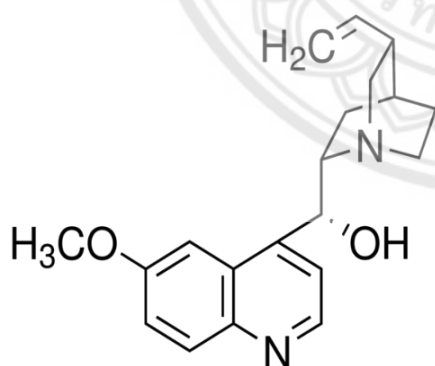


บทที่ 2

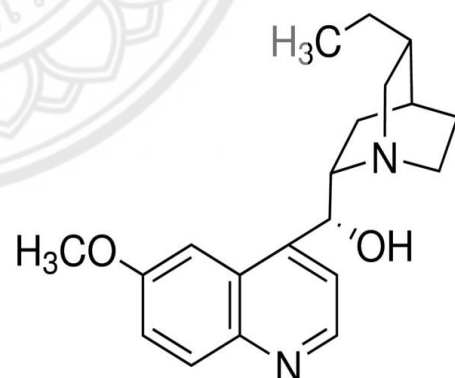
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 สารไฮโดรควินิน

ไฮโดรควินิน หรือ ไดไฮโดรควินิน เป็นสารประกอบอินทรีย์ โดยมีการจำหน่ายในประเทศเนเธอร์แลนด์เพื่อใช้ในการรักษาโรคตะคริวในตอนกลางคืน เริ่มมีการจำหน่ายตั้งแต่เดือนมีนาคม 1990 ซึ่งเป็นยาที่จำหน่ายตามร้านขายยาทั่วไป วิธีการรับประทานยาคือจะรับประทานขนาด 200 มิลลิกรัม หลังอาหารเย็น และรับประทานขนาด 100 มิลลิกรัม ก่อนนอนเป็นเวลา 14 วัน นอกจากนี้ไฮโดรควินินยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย (12, 15) และยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน (13) ทำให้ผิวมีความกระจ่างใสขึ้น ลดจุดต่างด่าง ลดผิวแตกภายหลังคลอด ไฮโดรควินินยังใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมและโลชั่นบำรุงผิวช่วยให้ผิวขาวขึ้นเนื่องจากเป็นสารฟอกขาว โดยมีประสิทธิภาพในการชะลอการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนส และลดปริมาณการสร้างเมลานิน (13, 16) จากการศึกษาของ Kraikongjit และคณะ พบว่าไฮโดรควินินเป็นสารประกอบหลักในสารสกัดจากปากทางเข้ารังชันโรง (9) เมื่อศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับไฮโดรควินินพบว่ามีความสัมพันธ์ค่อนข้างน้อย จึงได้มีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารควินิน ซึ่งพบว่าไฮโดรควินินมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับควินินเนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันจาก ภาพ 1 และ ภาพ 2 (13)



ภาพ 1 ควินิน (15)



ภาพ 2 ไฮโดรควินิน (15)

ควินิน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cinchona succirubra* มีการใช้ควินินในการบำบัดรักษาโรคมาเลเรีย (12, 15) และยังสามารถระงับอาการเจ็บไข้หนาวสั่นได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งในการฆ่าเชื้อมาลาเรียนั้นจะสามารถฆ่าได้เฉพาะเชื้อที่อยู่ในเลือดเท่านั้น แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในตับได้ ควินินยังมีฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ที่กระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้การบีบตัวของหัวใจช้าลง โดยในทางคลินิกนั้นจะใช้เป็นยารักษาอาการหัวใจเต้นผิดปกติ จากการศึกษา

การทดลองใช้สารควินินกับมดลูกของหนูที่ตั้งครรภ์ พบว่ามีฤทธิ์กระตุ้นให้มดลูกของหนูบีบตัวเป็นจังหวะได้มากขึ้น นอกจากนี้ควินินยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียได้อีกด้วย ซึ่งสารควินินนั้นได้มีการใช้มาเป็นเวลาอย่างยาวนาน เนื่องจากมีความปลอดภัยกว่าการใช้ยาสังเคราะห์และไม่เป็นพิษร้ายแรงต่อร่างกาย แต่ถ้าหากใช้ควินินในปริมาณที่มากเกินไปขนาดจะทำให้รู้สึกหือ้อ อาจอันตรายถึงขั้นได้ยินเสียงกระดิ่งแบบประสาทหลอนเรียกอาการนี้ว่า cinchonism โดยควินินที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นสารที่พบได้ในปริมาณมากจากต้นชิงโคนา (15)

ต้นชิงโคนา (Cinchona) เป็นต้นไม้ในวงศ์ *Rubiaceae* เป็นไม้ยืนต้น เปลือกต้นและเปลือก รากมีสรรพคุณทางยาสามารถผลิตสารอัลคาลอยด์ได้หลายชนิดแต่ชนิดที่สำคัญที่สุดคือควินิน ปกติแล้วต้นชิงโคนาจะชอบที่สูงจากระดับน้ำทะเล และพื้นที่ที่มีฝนตกชุกเป็นพืชที่ชอบแดดรำไรไม่ถูกกับแสงแดดที่มากเกินไปถ้าถูกแสงแดดมากเกินไปจะทำให้ปริมาณของสารควินินลดลง ต้นชิงโคนาจะเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุได้ 3-4 ปี ดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง ขาว หรือชมพู ผลจะมีลักษณะรียาว ต้นชิงโคนาที่เจริญเติบโตในป่าจะให้ควินินเพียงร้อยละ 7 แต่ต้นชิงโคนาที่ปลูกในไร่จะให้ควินินได้มากกว่าถึง 2 เท่า ในปัจจุบันนักพฤกษศาสตร์ค้นพบว่ามีต้นชิงโคนาเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่ให้สารควินิน คือ *C. calisaya*, *C. legeriana*, *C. officinalis* และ *C. succirubra* ในประเทศไทยมีการทำสวนป่าต้นชิงโคนาที่จังหวัดเชียงใหม่บนดอยสุเทพ ตรวจสอบปริมาณของอัลคาลอยด์ในเปลือกอยู่ในเกณฑ์ที่ใช้ได้ ต้นชิงโคนาที่มีอายุ 3-9 ปี จะให้ปริมาณของสารอัลคาลอยด์ในเปลือกสูง ฉะนั้นต้นชิงโคนาที่มีอายุในระยะนี้จะถูกโค่นลำต้นต้นและขุดรากลอกเปลือกขณะยังสด เปลือกชิงโคนานอกจากจะนำมาทำเป็นยาแล้วสามารถนำมาทำเหล้าหรือไวน์ที่มีรสขมได้อีกด้วย เช่น เหล้าเวอร์มูธ เป็นต้น (17)

2.2 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง จัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (aerobic bacteria) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มีการติดเชื้อในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำและเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยที่รักษาอยู่ในโรงพยาบาลนาน ๆ จะมีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายและรุนแรง (4) การเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถเจริญได้บน blood agar และ MacConkey agar ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง มักมี hemolysis มีกลิ่นคล้ายองุ่น (grape-like odor) ลักษณะของโคโลนีมักจะแบนและแผ่ขอบอาจจะมีหยัก (serrated) (5) โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทางห้องปฏิบัติการสามารถทำการแยกเชื้อแกรมลบกลุ่ม non-fermenter ได้จากการทำ OF test ซึ่งเชื้อจะสามารถสลายน้ำตาล glucose ในอาหารเพาะเชื้อโดยขบวนการ oxidation ในบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน แต่ไม่สามารถทำได้โดย

ขบวนการ fermentation ในบรรยากาศไร้ออกซิเจน การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสามารถช่วยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อได้ ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* ให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase สามารถสลายสาร acetamide ทำให้เกิดต่างและสามารถสลายสาร nitrate หรือ nitrite เป็นก๊าซไนโตรเจนโดยเชื้อสามารถสร้างกรดจากการสลาย glucose และ xylose แต่ไม่สามารถสลาย maltose และ sucrose การจำแนกสปีชีส์อื่นที่พบน้อยมักไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการทั่วไปส่วนการทดสอบทางซีโรโลยียังไม่มีบทบาทสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *Pseudomonas* spp. หรือการจำแนกเชื้อเนื่องจากการวินิจฉัยแยกเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวภาพและการทดสอบทางชีวเคมีทำได้ง่าย ในส่วนของการทดสอบระดับโมเลกุลใช้เทคนิค PCR และ pulsed-field gel electrophoresis มีศักยภาพสูงในการใช้แยกสายพันธุ์ของเชื้อในการศึกษาทางระบาดวิทยา และเชื้อ *Pseudomonas* spp. ยังเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญสามารถก่อโรคได้หลายระบบโดยแบ่งปัจจัยการก่อโรค (virulence factors) ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ได้แก่ ส่วนประกอบหรือโครงสร้างเซลล์ เอนไซม์ และสารพิษ (18) เช่น alginate (slime layers, biofilm) ซึ่งแบคทีเรียใช้การยึดเกาะเซลล์โฮสต์และป้องกันการถูกกำจัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย พิลหรือฟิมเบรีย (pili หรือ fimbriae) จะเป็นส่วนที่คล้ายเส้นขนเล็กๆที่ยื่นออกมาจากผิวเซลล์เพื่อที่จะจับกับเยื่อผิวทางเดินหายใจ เอนโดทอกซินหรือลิพิดเอ (endotoxin หรือ lipid A) เอนโดทอกซินเป็นลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ตามผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและเป็นแอนติเจนที่สำคัญอีกด้วย ส่วนลิพิดเอเป็นองค์ประกอบของเอนโดซินที่เกี่ยวกับความเป็นพิษแต่ความเป็นพิษของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นจะน้อยกว่าแบคทีเรียในตระกูล *Enterobacteriaceae* อยู่ประมาณ 10 เท่า อีลาสเทส (elastase) เป็นเอนไซม์ที่จะทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งจะทำให้เกิดเลือดออกและเชื้อแพร่กระจายออกไปอีกด้วย เอกโซทอกซินเอ (exotoxin A) เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงและจะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต ทอกซินนี้จะทำให้เซลล์ตายและมีความเป็นพิษแต่น้อยกว่าดิฟเทรีเรีย (diphtheria) โปรตีนเอส (proteases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์จะย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์และทำลายอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และคอมพลีเมนต์ (complement) นอกจากนี้ยังช่วยให้เชื้อมีการบุกรุกแพร่กระจายออกไปได้ เอกโซทอกซินเอส (exotoxin S) เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจะต่างกับเอกโซทอกซินเอตรงที่ทนความร้อนได้ ซึ่งพบในบางสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* ฟอสโฟไลเปสซี (phospholipase C) จะย่อยสลายไขมันและเลซิทิน (lecithin) เพื่อที่จะให้ปล่อยฟอสโฟโรโครีน (phospholycorine) ออกมาช่วยทำลายเนื้อเยื่อลิวโคซิดิน (leukocidin) จะยับยั้งการทำงานของลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และนิวโทรฟิล (neutrophil) (19) ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีอุบัติการณ์สูงและเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศต่างๆทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย (1, 4)

2.2.2 การดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน เช่น aminoglycosides, quinolone และ β -lactam ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการรักษา (2) ปัจจุบันมีการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disk diffusion กับยา third generation cephalosporins (ceftazidime), β -lactam (imipenem, ciprofloxacin) และ aminoglycoside (gentamicin, amikacin) วัดขนาดของ inhibition zone แล้วเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ CLSI จากการศึกษาพบว่า เชื้อมีการดื้อยา ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, gentamicin และ amikacin คิดเป็นร้อยละ 88, 90, 62, 80 และ 56 ตามลำดับ (20) โดยยาต้านจุลชีพที่อาจเลือกใช้ในการรักษาต่อโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ยาในกลุ่มของ antipseudomonal penicillins เช่น ticarcillin และ piperacillin, anti-pseudomonal cephalosporins เช่น ceftazidime และ cefepime, carbapenems, aminoglycosides และ fluoroquinolones ด้านความไวต่อยาในกลุ่มของ monobactam และ broad-spectrum cephalosporins นั้นไม่แน่นอนเนื่องจากปัจจุบันเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อยาสูงและดื้อยาในหลายกลุ่ม (8) ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรียเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกยาสำหรับการรักษา โดยการรักษาด้วยยาเพียงชนิดเดียวมักทำให้เกิดการดื้อยาชนิดนั้นในระหว่างทำการรักษาได้บ่อย โดยทั่วไปจึงควรใช้ยามากกว่า 1 ชนิดร่วมกันในการรักษา (8, 18)

2.3 กลไกการยับยั้งแบคทีเรีย

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics หรือ antibacterial) หมายถึง สารเคมีที่ได้จากเชื้อจุลชีพชนิดหนึ่งตามธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งยาปฏิชีวนะจะออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการทำงานต่างๆ และทำลายโครงสร้างของแบคทีเรียซึ่งมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย 2 รูปแบบคือ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) โดยเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในเวลาต่อมา กลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแบ่งเป็น 5 กลุ่ม (21) ดังนี้

2.3.1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย polysaccharide มาเชื่อมกันคล้ายโครงสร้างตาข่าย เรียกว่า peptidoglycan จะยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์โดยการจับกับ penicillin binding proteins (PBPs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกัน (cross-linking) ของสาย peptidoglycan ได้แก่ penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams และ glycopeptides

2.3.2. ยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (inhibitors of membrane function)

เยื่อหุ้มเซลล์ หรือ cytoplasmic membrane ทำหน้าที่ปกคลุมไซโตพลาซึมควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารภายในและภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนการทำงานหรือสูญเสียหน้าที่ สารต่าง ๆ จะไหลออกจากเซลล์เป็นผลให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการตาย ได้แก่ polymyxins

2.3.3. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors)

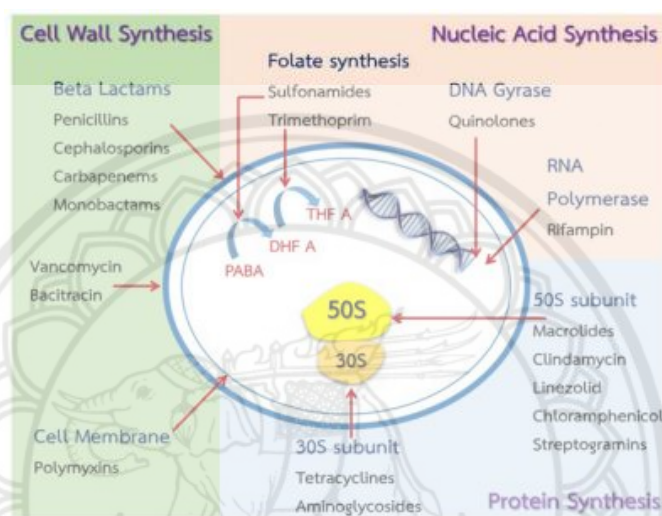
กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียเป็นกระบวนการที่สำคัญเช่นเดียวกับเซลล์มนุษย์ซึ่งไรโบโซมจะทำหน้าที่สร้างโปรตีนในแบคทีเรียจะพบไรโบโซมชนิด 70s ประกอบด้วย หน่วยย่อย 30s และ 50s ซึ่งหน่วยย่อยทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเป้าหมายหลักของการยับยั้งไรโบโซม หน่วยย่อยชนิด 30s ได้แก่ aminoglycosides และ tetracyclins ยับยั้งไรโบโซม หน่วยย่อยชนิด 50S ได้แก่ macrolides, clindamycin, linezolid, streptogramins และ chloramphenicol

2.3.4. ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors)

กรดนิวคลีอิกในเซลล์แบคทีเรีย ประกอบด้วย DNA และ RNA โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA จะรบกวนกระบวนการ transcription ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้าง mRNA เมื่อไม่มี mRNA เกิดขึ้น จะไม่มีการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นในลำดับถัดไป ได้แก่ rifampin ส่วนที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA มีกลไกการออกฤทธิ์โดยจะยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการคลายตัวของเกลียว DNA ในระหว่างที่มีการจำลองตัวของ DNA เมื่อเอนไซม์ DNA gyrase ถูกยับยั้งส่งผลให้เกิดภาวะเครียดในเซลล์ และเซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด ได้แก่ quinolones หรือบางชนิดมีผลต่อ DNA โดยตรง เช่น metronidazole

2.3.5. ยับยั้งกรดโฟลิก (folic acid metabolism inhibitors)

กรดโฟลิกเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญในแบคทีเรีย ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor ในกระบวนการสังเคราะห์ DNA เมื่อไปยับยั้งการสร้างและการทำงานของกรดโฟลิก จะส่งผลให้การสร้างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียถูกรบกวน แบคทีเรียจะหยุดการเจริญเติบโต ได้แก่ sulfonamides และ trimethoprim โดยเป้าหมาย (target sites) ในการออกฤทธิ์จะมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียและสิ่งแวดลอมรอบแบคทีเรียเท่านั้น (specific for bacteria) ไม่มีผลต่อเซลล์ของมนุษย์ (21)



ภาพ 3 กลไกการออกฤทธิ์ (PABA, p-aminobenzoic acid; DHFA, dihydrofolic acid; THFA, tetrahydrofolic acid) (21)

2.4 Next generation sequencing

Next Generation Sequencing (NGS) คือเทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของ DNA เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต่าง ๆ เป็นเทคโนโลยีที่มีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยได้ข้อมูลปริมาณมาก (high-throughput) ทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และมีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมสูง (22) ในการค้นหา ตรวจสอบ และสร้างข้อมูลพันธุกรรมในระดับยีนโครงสร้างของยีน และหน้าที่ของยีน โดยใช้ complementary DNA (cDNA) ที่ได้มาจาก mRNA เป็น สารพันธุกรรมเริ่มต้นในการวิเคราะห์ข้อมูลการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) (23) ทำให้การศึกษาวิจัยทำได้อย่างรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย NGS สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน ได้แก่ epigenetic, discovery of genetic variation, genetic diversity, population validation, community of microbial และ gene expression level

ปัจจุบัน เทคนิค NGS ได้ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต (whole genome sequencing; WGS) การหาลำดับเบสของอาร์เอ็นเอ (transcriptome หรือ RNA sequencing) การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย (metagenomic sequencing; metagenome) การศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน เช่น exome sequencing และ targeted sequencing

การใช้ NGS ศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์และความหลากหลายทางชีวภาพ ในการปรับปรุงพันธุ์ เทคนิค NGS สามารถนำมาใช้ในการศึกษา genotyping-by-sequencing (GBS) มีประโยชน์ทำให้ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และสามารถค้นหายีนได้ หลังจากการวิเคราะห์ NGS แล้ว นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ต่อโดยการทำ filter sequence variant, filter significant gene และการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์และยีน การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น single nucleotide polymorphism marker, CAPs (cleaved amplified polymorphic sequence) marker, HRM (High resolution melt) marker, SBE (Single-base extension) marker, PACE (PCR allele competitive extension) SNP เป็นต้น (22)

2.5 Transcriptomics และการประยุกต์ด้านจุลชีววิทยา

ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับเบสที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่สามารถเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็นจำนวนมากและเป็นเทคนิคที่นำมาใช้สำหรับงานวิจัยในปัจจุบันอย่างแพร่หลายเพื่อศึกษาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์ วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น การหาลำดับเบสของ RNA (RNA-sequencing) เป็นต้น วิธีการนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์เป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายใต้ความแตกต่างจากสภาวะแวดล้อมหรือทางพันธุกรรม เทคโนโลยีนี้สามารถนำมาใช้ศึกษาลำดับ RNA ของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งในรูปแบบ coding RNA และ non coding RNA (24, 25)

การศึกษา transcriptomics มีส่วนสำคัญต่างๆ ได้แก่ transcript cataloging เป็นการศึกษาโครงสร้าง RNA ทั้งหมดที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในจีโนม transcriptome profiling เป็นการศึกษาระดับการแสดงออกของ RNA ในเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือในสภาวะเวลาใดเวลาหนึ่ง ซึ่งการแสดงออกของ RNA จะมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับการทำงานและหน้าที่ของ RNA (24, 25) ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) ช่วยให้เราสามารถระบุยีนและกระบวนการในการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ช่วยในการถอดรหัสรูปแบบใหม่ที่มีความซับซ้อนได้ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์เปรียบเทียบการถอดลำดับของสายพันธุ์ถั่วลูกไก่ (chickpeas) ในระยะที่มีการพัฒนาเพื่อ

ระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับอาการแห้งและสภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็มในพืช การถอดรหัส isoforms ของ apetela 2 และ ethylene-responsive element binding protein (AP2-EREBP) จัดเป็นยีนหลักที่มีบทบาทในการควบคุมการออกดอกและมีความซับซ้อนต่อการตอบสนองต่อสิ่งเร้าในพืช (26, 27) ในส่วนของการทำ transcriptomic profiling ยังช่วยให้ได้ข้อมูลสำคัญ เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาต่อ artemisinin โดยการวิเคราะห์จากเชื้อ *Plasmodium falciparum* มากกว่า 1000 ชนิด พบว่าการที่เซลล์มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ลดลง และลดการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงแบบ asexual intraerythrocytic ที่มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นต้น (28)

ในการวิจัยของ Jun Hong และคณะ ได้ทำ RNA-sequencing เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในการแสดงออกของยีนทั้งจีโนมระหว่าง *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อ tachypleisin I (PA-99) กับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม (PA1.2620) แล้วทำการตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-qPCR จากนั้นจึงวิเคราะห์ความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียและโปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอก (OMPs) เพื่อให้เห็นถึงกลไกการดื้อยาของ *P. aeruginosa* ต่อ tachypleisin I (29)

การนำมาใช้ในทางการแพทย์เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค โดยใช้วิธี RNA-sequencing เพื่อระบุตำแหน่งเริ่มต้นในการถอดรหัสและช่วยในส่วน novel splicing alterations หรือกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของยีนสามารถทำให้เซลล์สร้างผลผลิตของยีนที่มีความหลากหลายได้มากขึ้น ซึ่งมีความสำคัญในการก่อโรคของมนุษย์ RNA-Sequencing สามารถระบุความหลากหลายของ single nucleotide polymorphisms (SNP) ที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยโรค การแสดงออกที่จำเพาะของ allele และการ fusions ของยีน ซึ่งช่วยให้เข้าใจถึงสาเหตุของโรคได้ (27)

โดยผลจากการทำ transcriptome จะแสดงออกมาในรูปแบบของ differentially-expressed genes (DEGs) เป็นการตรวจสอบยีนที่แสดงออกในสภาวะที่แตกต่างกัน ช่วยให้สามารถเข้าใจพยาธิสภาพของโรคและเป็นแนวทางในการรักษาได้ โดยการตรวจสอบยีนที่แสดงออกถึงความแตกต่าง DEGs ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการระบุยีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างในโรค ในการวิจัยทางเภสัชกรรมและทางคลินิก DEGs สามารถเป็นประโยชน์ในการระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของยีนเป้าหมายการรักษา และยีนสำหรับการวินิจฉัย แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนบางอย่างอาจไม่แปลเป็นกิจกรรมทางชีววิทยาที่เป็นผลสืบเนื่องเสมอไป แต่ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถรวมเข้ากับข้อมูลทางชีววิทยาอื่น ๆ ในรูปแบบปริมาณงานสูงเพื่อสร้างการวิเคราะห์แบบบูรณาการ เช่น การสร้างภูมิทัศน์เป้าหมายของโรค (30)

2.6 Gene ontology

ข้อมูลการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับ RNA จะมีข้อจำกัดของกลุ่มยีนและโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การพิจารณาถึงความสอดคล้องกันระหว่างชีววิทยาและข้อมูลเกี่ยวกับยีน และโปรตีนในสิ่งมีชีวิต (Organisms) ต่าง ๆ จะนำไปสู่กระบวนการเปรียบเทียบในระดับจีโนม ความรู้ทางชีววิทยาที่มีบทบาทต่อยีน และโปรตีนในสิ่งมีชีวิตหนึ่งอาจจะใช้ในการอ้างอิงในอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งได้ ดังนั้นความสามารถในการอ้างอิงดังกล่าวจึงช่วยในการอธิบาย (annotation) ในสิ่งมีชีวิตหนึ่งด้วยคำอธิบายของอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งได้อย่างอัตโนมัติ แต่ปัญหาก็คือฐานข้อมูล หรือองค์ความรู้ ที่จะอธิบายสิ่งเหล่านี้มีมากมาย และมีความแตกต่างกันในคำพูด หรือคำศัพท์ที่ใช้ทั้งที่อยู่ในความหมายเดียวกัน

กลวิธีหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหานี้คือการสร้างออนโทโลยี (ontology) สำหรับเป็นคำอธิบายยีน (gene annotation) ร่วมกันซึ่งนิยมใช้ในการจำแนกยีนในวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานทางด้าน transcriptome (31) ข้อดีของออนโทโลยีก็คือสามารถที่จะให้คำอธิบายฟังก์ชันการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันโดยอัตโนมัติ ซึ่งออนโทโลยีหนึ่งจะช่วยในการอธิบายคุณสมบัติของยีน ตัวอย่างเช่น ยีนตัวหนึ่งอาจให้ผลผลิต (product) ที่มากกว่าหนึ่งผลผลิตของยีนอาจมี คุณสมบัติ ทางชีวเคมี ทางฟิสิกส์ หรือฟังก์ชันการทำงานที่มากกว่าหนึ่งอย่าง และบ่อยครั้งที่ผลผลิตของยีนจะอยู่ในส่วนของเซลล์ที่เฉพาะกับมันเอง โครงสร้างหรือคำศัพท์ที่ใช้ในการควบคุมหรือออนโทโลยีจึงมีภาพที่กว้างกว่าสายพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์ (sequence of nucleotides) โดยยีนออนโทโลยีเป็นคำศัพท์ที่ใช้ควบคุมคำอธิบายลักษณะของยีน หรือผลผลิตของยีนในสิ่งมีชีวิตใด ๆ ที่มีคุณสมบัติในหลายลักษณะ ดังนี้ เป็นศัพท์ควบคุมที่สามารถรับรู้โดยทั่วกัน มีหลายมิติคือมีมากกว่าหนึ่งออนโทโลยี ใช้อธิบายข้ามสิ่งมีชีวิตได้และมีความสัมพันธ์ในหลายลักษณะ เช่น ความสัมพันธ์ในลักษณะที่เป็นส่วนประกอบ (structure) ความสัมพันธ์ในลักษณะการทำงาน (activity) สามารถจำแนกแสดงการควบคุมยีนของยีน (regulatory) และความสัมพันธ์ในเชิงปฏิกิริยา (reaction relationship) บางครั้งอาจใช้พาทเวย์ (KEGG Pathway) (32) กรณีเมื่อไม่ทราบหน้าที่ หรือคุณสมบัติของยีนออนโทโลยีก็สามารถแสดงได้ และยีนออนโทโลยีมีลักษณะของการจัดทำเป็นเครือข่ายของฐานข้อมูลหลายๆเครือข่ายร่วมกัน ในการสร้างเป็นยีนออนโทโลยี ฐานข้อมูลเหล่านี้ ได้แก่ ยีนแบงก์ (geneBank) อีเอ็มบีแอล(EMBL) ดีดีบีเจ (DDBJ) พีไออาร์ (PIR) มิบส์ (MIPS) วายพีดี (YPD) สวิตซ์-พรีอต (SWIZZ-PROT) เป็นต้น (33)

ยีนออนโทโลยี (gene ontology) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ หรือ 3 ออนโทโลยีซึ่งเป็นอิสระต่อกัน คือ กลุ่มกระบวนการทางชีววิทยา (biological process) เช่น mitosis และ purine metabolism เป็นต้น กลุ่มระดับโมเลกุล (molecular function) ซึ่งอธิบายถึงลักษณะกิจกรรมเฉพาะ ผ่านทางคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของสารที่ได้จากยีน โดยการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น transcription factor และ ATPase activity และกลุ่มองค์ประกอบของเซลล์ (Cellular

component) เป็นการอธิบายถึงโครงสร้างในระดับที่เล็กกว่าเซลล์ ตำแหน่ง และส่วนประกอบของ โมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น nucleus และ origin recognition complex เมื่อพิจารณาในระดับลึกลงไป อีกก็จะแสดงให้เห็นถึงออนโทโลยีย่อยที่ใช้อธิบายยีนหรือผลผลิตของยีนได้อีก ซึ่งยีนหรือผลผลิตของ ยีน แต่ละยีน สามารถที่จะอธิบายได้โดยออนโทโลยีหลาย ๆ ออนโทโลยี ดังนั้นจึงอาศัยออนโทโลยีใน การอธิบายยีนหรือกลุ่มยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ นอกจากนี้ออนโทโลียังสามารถใช้อธิบายพาหะเวทย์ ในกระบวนการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย (34)



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยพื้นฐาน

เชื้อแบคทีเรีย, วิธีการเพาะเลี้ยง และการนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีสารไฮโดรควินิน

ผู้วิจัยได้นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เพาะเลี้ยงใน Luria Bertani (LB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคไล 2-5 โคไลนี้นำไปเพาะเชื้อใน LB broth เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง (log phase) แล้วนำเชื้อไปปรับความขุ่นของเชื้อโดยเปรียบเทียบกับ 0.5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml) จากนั้นใช้เชื้อร้อยละ 10 ของปริมาณที่ต้องการทดสอบ นำไปเพาะเลี้ยงใน Mueller Hinton broth (MHB) ในสภาวะที่มีที่ ความเข้มข้น $1/2$ MIC และไม่มีสารไฮโดรควินิน บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (โดยได้รับการอนุเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยของนพพร รัตนจักร)

เครื่องมือในการวิจัย

- 1) Incubator
- 2) Autoclave
- 3) Automatic pipette and Pipette tips
- 4) Gloves
- 5) Microcentrifuge
- 6) Loop
- 7) Microtube
- 8) Vortex mixer
- 9) Rack
- 10) ชุดสกัด Qiagen RNeasy Mini Kit
- 11) Nanodrop spectrophotometer
- 12) Electrophoresis

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Hydroquinine (Sigma-Aldrich)
- 2) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3) Mueller Hinton agar
- 4) RNA protection

วิธีดำเนินการ

3.1 การสกัด RNA

ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด Qiagen RNeasy Mini Kit โดยเริ่มจากนำเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 10.1 ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 2 เท่าของน้ำยา RNA Protection ต่อ 1 เท่าของอาหาร MHB แล้วปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วเดิม เพื่อทำการเก็บตะกอนเซลล์ไปสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Qiagen RNeasy Mini kit จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง NanoDrop Spectrophotometers ความบริสุทธิ์ของ RNA ทั้งหมดจะถูกตรวจสอบจากอัตราส่วนของ A260/A280 nm และค่าที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 2-2.2 และความสมบูรณ์ของ RNA จะถูกตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 V เป็นเวลา 40 นาที (โดยได้รับการอนุเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยของนันทพร รัตนจักร)

3.2 การวิเคราะห์ลำดับ RNA ทั้งหมด (Transcriptomic analysis)

ทำการวิเคราะห์ลำดับ RNA ทั้งหมดโดยใช้วิธี RNA-sequencing (RNA-seq) โดยเทคโนโลยี next generation sequencing ด้วยเครื่อง Illumina แล้วนำผล RNA-sequencing ที่ได้ไปวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ถูกเลี้ยงด้วยสถานะที่มีและไม่มีไฮโดรควินิน จากนั้นนำผลการแสดงออกของยีนที่ทราบกลไกและปริมาณของการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ไปทำการวิเคราะห์หา differential expression gene (DEGs) โดยใช้ซอฟต์แวร์ edgeR ซึ่งผลของ DEGs จะถูกนำมาสรุปผลโดยใช้เกณฑ์ $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ และ false discovery rate ≤ 0.05 . (โดยได้รับการอนุเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยของนันทพร รัตนจักร และผศ.ดร. จิรภาส จงจิตวิมล)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล DEGs โดยใช้เกณฑ์ Gene ontology

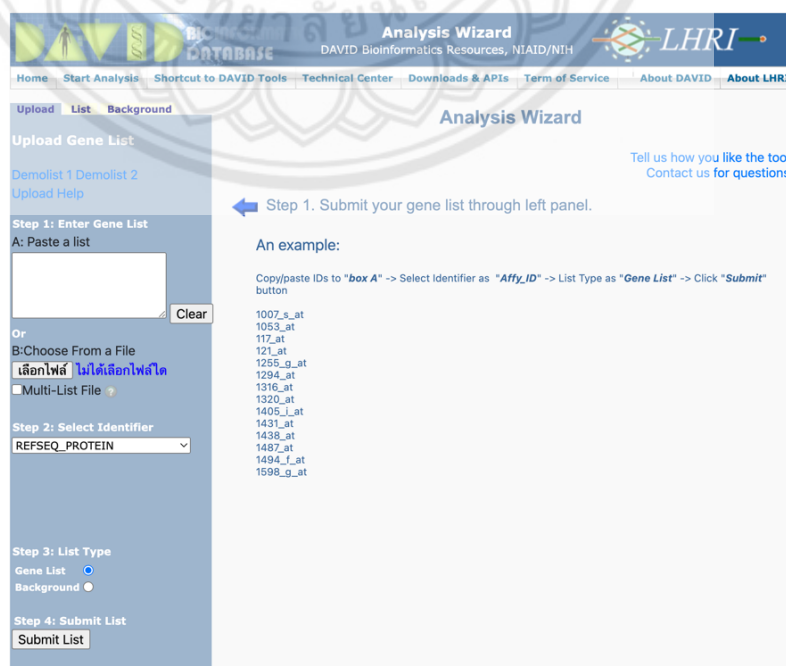
นำผล DEGs ไปจำแนกเพื่อหากลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ของไฮโดรควินิน โดยจะจำแนกตาม gene ontology แบ่งเป็น กลุ่มกระบวนการทางชีววิทยา (biological process) ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function) และ องค์ประกอบของเซลล์ (cellular component) และจำแนกตาม KEGG pathway เพื่อดูกระบวนการทำงานของยีนแต่ละยีน จากนั้น

จะนำผลการแสดงออกของยีนมาจัดลำดับกลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ของไฮโดรควินิน เพื่อทำการวิเคราะห์กลไกที่มีการแสดงออกลดลงมากที่สุดและหาความสัมพันธ์ของกลไกที่มีความเกี่ยวข้องกัน

3.4 การวิเคราะห์และการแปลผลทางชีวภาพ

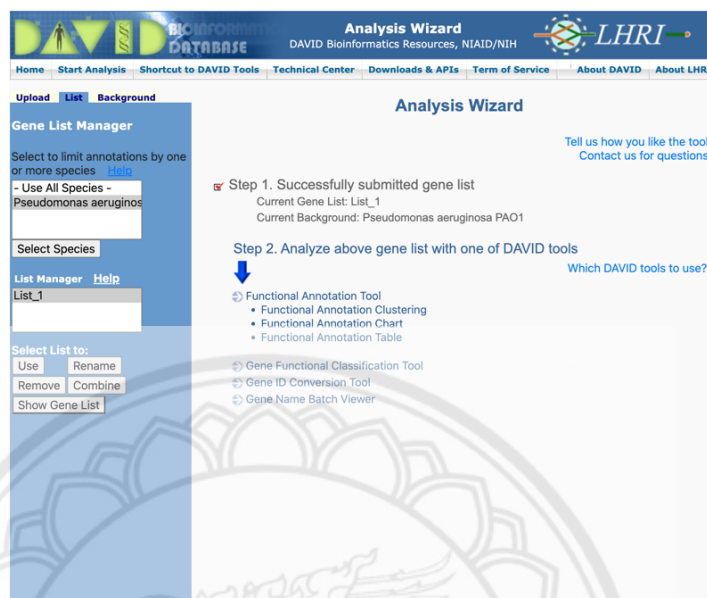
นำผล DEGs ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์และแปลผล ซึ่งทำการค้นหาข้อมูลโดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID (the database for annotation, visualization and integrated discovery; Huang et al., 2009) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ค้นหาหน้าที่หรือข้อมูลทางชีวภาพจากฐานข้อมูลต่างๆ และมีการแปลผลโดยใช้เกณฑ์ยีนออนโทโลยีประกอบไปด้วย 3 กระบวนการได้แก่ กระบวนการทางชีววิทยา (biological process) ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function) และ องค์ประกอบของเซลล์ (cellular component) และมีการแปลผลด้วยฐานข้อมูล KEGG pathway (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) เพื่อช่วยในการประมวลผลกลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินิน ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเน้นเฉพาะข้อมูลที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่ตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม โดยมีขั้นตอนดังนี้

step 1: เข้าสู่หน้าโปรแกรม DAVID เลือก Start Analysis แล้วใส่ชื่อกลุ่มยีนที่ต้องการนำมาจำแนกในช่อง Enter gene list ต่อไปจึงระบุรูปแบบที่ช่อง step 2: select identifier กดเลือก REFSEQ _PROTEIN ในส่วน Step 3: List Type เลือกประเภทของรายชื่อยีน Gene List จากนั้น Step 4: ทำการกด Submit list เพื่อให้โปรแกรมเลือกชนิดของสิ่งที่ต้องการศึกษาดังภาพ ภาพ 4



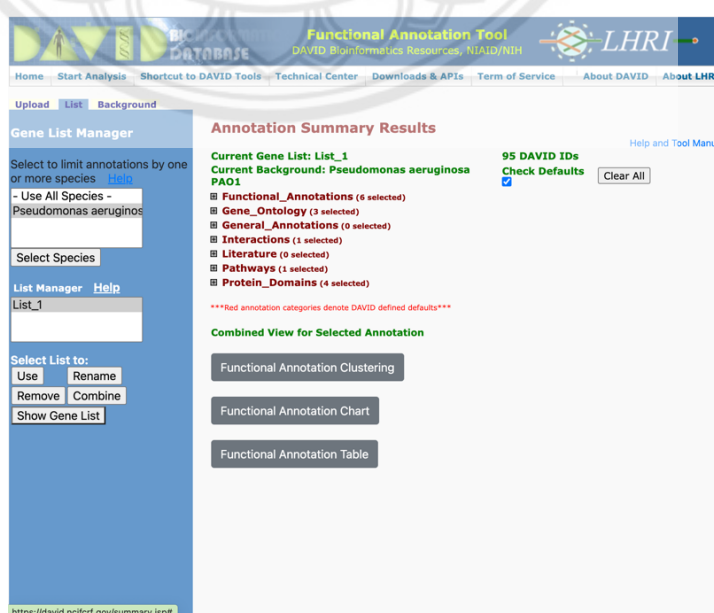
ภาพ 4 แสดงหน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม DAVID

หลังจากกด Submit list หน้าต่างโปรแกรมจะแสดงเครื่องมือที่จะใช้ในการอธิบายหน้าที่ทางชีวภาพ (Functional Annotation Tool) ดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดงหน้าต่างเครื่องมือที่ใช้จำแนกหน้าที่ข้อมูลโดยแสดงผลในรูปแบบต่างๆ

จากนั้นกดเลือก Functional Annotation tool แล้วจึงเลือกการแปลผลโดยใช้ Gene Ontology ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ Biological processes, Cellular components และ Molecular function ร่วมกับการแปลผลด้วยฐานข้อมูล Pathways : KEGG pathway และสามารถเลือกรูปแบบการแสดงผลได้ตามข้อมูลที่ต้องการ ดังภาพ 6



ภาพ 6 หน้าต่างแสดง การจำแนกตามเกณฑ์ต่าง ๆ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับ RNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินินความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC และสภาวะที่ไม่มีสารไฮโดรควินิน ซึ่งผ่านการบ่มเพาะในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียไปสกัด RNA จากนั้นจะนำ RNA ของเชื้อจะถูกส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของ RNA (RNA sequencing) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินิน ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งนี้ข้อมูลการวิเคราะห์ดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากคุณนันทพร รัตน์จักร และผศ.ดร.จิรภาส จงจิตวิมล

4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับ RNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับ RNA จะมีการตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลดิบ (raw sequencing data) พบว่าข้อมูลดิบนั้นได้มีการผ่านเกณฑ์ในการตรวจวิเคราะห์ แล้วจึงทำการระบุตำแหน่งของแต่ละ read ที่ได้ (reads mapping) หลังจากนั้น raw sequencing reads จะถูกนำมาผ่านการตัด adapter ออก (trimming) แล้วจะนำข้อมูลไปผ่านการตรวจสอบโดยจะมีการตัดข้อมูลที่มีคุณภาพต่ำออกด้วยโปรแกรม FastP จากนั้นข้อมูลที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 โดยใช้โปรแกรม Bowtie2 ต่อมาได้ทำการหาปริมาณการแสดงออกของยีนทั้งหมดด้วย Feature count และ edgeR ตามลำดับ ซึ่งจะทำได้ผลการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างกัน (DEGs) แล้วเข้าสู่กระบวนการคัดเลือกตามเกณฑ์ $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ และ $\text{FDR} \leq 0.05$ พบว่ามียีน 254 ยีน ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่มีและไม่มีสารไฮโดรควินิน โดยสามารถแบ่งออกเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated gene) จำนวน 157 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated genes) จำนวน 97 ยีน ดังตาราง 1 ผลการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง ดัง และ ตาราง ตามลำดับ ตาราง 1 ผลของการแสดงออกยีนที่แตกต่างกันในสภาวะที่มีการตอบสนองของสารไฮโดรควินิน

Stains	Up-regulated	Down-regulated	Total
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	157	97	254

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs

No.	Gene Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
1	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexC precursor	NP_253289	9.47	11.10	2.56×10 ⁻¹⁹	4.79×10 ⁻²³
2	NAD(P)H dehydrogenase	NP_249916	7.93	10.12	2.53×10 ⁻¹⁵	9.46×10 ⁻¹⁹
3	SMR multidrug efflux transporter	NP_253677	6.84	8.40	5.22×10 ⁻¹²	3.91×10 ⁻¹⁵
4	morphinone reductase	NP_251622	6.69	9.02	5.22×10 ⁻¹²	3.85×10 ⁻¹⁵
5	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux transporter MexD	NP_253288	6.27	9.81	3.83×10 ⁻¹¹	3.59×10 ⁻¹⁴
6	hypothetical protein	NP_253044	6.10	10.73	7.51×10 ⁻¹¹	8.44×10 ⁻¹⁴
7	major facilitator superfamily (MFS) transporter	NP_249973	6.05	7.83	3.91×10 ⁻¹⁰	5.86×10 ⁻¹³
8	Multidrug efflux outer membrane protein OprJ precursor	NP_253287	6.02	8.32	2.90×10 ⁻¹⁰	3.80×10 ⁻¹³
9	hypothetical protein	NP_252409	5.83	7.55	1.66×10 ⁻⁹	2.79×10 ⁻¹²
10	antirepressor for MexR, ArmR	NP_252408	5.71	5.60	6.10×10 ⁻⁸	1.48×10 ⁻¹⁰
11	CifR	NP_251621	5.31	9.57	9.16×10 ⁻⁹	1.72×10 ⁻¹¹
12	inner membrane protein CreD	NP_249156	5.29	8.12	1.73×10 ⁻⁸	3.57×10 ⁻¹¹

หมายเหตุหมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้านซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
13	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexX precursor	NP_250709	5.26	7.85	2.47×10 ⁻⁸	5.55×10 ⁻¹¹
14	organic hydroperoxide resistance protein	NP_251540	5.24	6.77	6.77×10 ⁻⁸	1.78×10 ⁻¹⁰
15	hypothetical protein	NP_249157	4.95	5.27	1.48×10 ⁻⁶	6.64×10 ⁻⁹
16	transcriptional regulator	NP_252978	4.90	7.31	1.85×10 ⁻⁷	6.93×10 ⁻¹⁰
17	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux transporter MexY	NP_250708	4.90	8.95	9.60×10 ⁻⁸	2.88×10 ⁻¹⁰
18	FAD-dependent oxidoreductase	NP_249225	4.89	8.64	1.04×10 ⁻⁷	3.31×10 ⁻¹⁰
19	hypothetical protein	NP_253313	4.88	10.51	8.16×10 ⁻⁸	2.29×10 ⁻¹⁰
20	heat-shock protein IbpA	NP_251816	4.82	10.69	1.04×10 ⁻⁷	3.52×10 ⁻¹⁰
21	metal-transporting P-type ATPase	NP_252380	4.75	9.98	1.64×10 ⁻⁷	5.84×10 ⁻¹⁰
22	metal transporter	NP_249988	4.56	7.14	1.19×10 ⁻⁶	5.13×10 ⁻⁹
23	transcriptional regulator	NP_249974	4.56	7.50	9.32×10 ⁻⁷	3.84×10 ⁻⁹

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
24	hypothetical protein	NP_253568	4.51	11.57	5.75×10 ⁻⁷	2.26×10 ⁻⁹
25	ParD antitoxin	NP_248815	4.42	7.31	2.04×10 ⁻⁶	9.55×10 ⁻⁹
26	hypothetical protein	NP_250660	4.29	7.78	3.16×10 ⁻⁶	1.66×10 ⁻⁸
27	EsrC	NP_253286	4.28	6.35	6.98×10 ⁻⁶	4.18×10 ⁻⁸
28	hypothetical protein	NP_250964	4.24	3.65	5×10 ⁻⁴	4.90×10 ⁻⁶
29	Uncharacterized protein	NP_252421	4.22	9.97	3.10×10 ⁻⁶	1.56×10 ⁻⁸
30	hypothetical protein	NP_252420	4.19	10.15	3.53×10 ⁻⁶	1.92×10 ⁻⁸
31	ParE toxin	NP_248814	4.19	7.31	6.12×10 ⁻⁶	3.44×10 ⁻⁸
32	transcriptional regulator	NP_249981	4.12	5.46	3.75×10 ⁻⁵	2.95×10 ⁻⁷
33	PyeM	NP_253045	4.10	9.36	6.22×10 ⁻⁶	3.61×10 ⁻⁸
34	hypothetical protein	NP_249427	4.06	7.58	1.09×10 ⁻⁵	6.95×10 ⁻⁸
35	hypothetical protein	NP_250435	4.03	6.40	2.06×10 ⁻⁵	1.42×10 ⁻⁷
36	hypothetical protein	NP_249428	3.98	6.98	2.06×10 ⁻⁵	1.36×10 ⁻⁷

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
37	hypothetical protein	NP_249989	3.96	5.55	6.30×10 ⁻⁵	5.19×10 ⁻⁷
38	transcriptional regulator	NP_249914	3.95	6.41	3.61×10 ⁻⁵	2.71×10 ⁻⁷
39	oxidoreductase	NP_249828	3.84	8.25	2.88×10 ⁻⁵	2.11×10 ⁻⁷
40	hypothetical protein	NP_249165	3.71	2.81	9.6×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
41	hypothetical protein	NP_250194	3.67	2.78	1.04×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
42	hypothetical protein	NP_249721	3.67	9.40	5.97×10 ⁻⁵	4.81×10 ⁻⁷
43	biofilm-associated metzincin Inhibitor, BamI	NP_251472	3.61	2.23	3.06×10 ⁻²	1.1412×10 ⁻³
44	ArsR protein	NP_250967	3.59	5.60	3×10 ⁻⁴	2.88×10 ⁻⁶
45	transcriptional regulator CynR	NP_250744	3.53	5.30	5×10 ⁻⁴	5.05×10 ⁻⁶
46	hypothetical protein	NP_251123	3.50	4.98	7×10 ⁻⁴	8.90×10 ⁻⁶
47	hypothetical protein	NP_250632	3.49	8.82	2×10 ⁻⁴	1.44×10 ⁻⁶
48	hypothetical protein	NP_249982	3.47	6.42	3×10 ⁻⁴	2.94×10 ⁻⁶
49	hypothetical protein	NP_252079	3.41	4.40	2.2×10 ⁻³	3.08×10 ⁻⁵

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน , Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
50	PelC	NP_251752	3.40	6.23	5×10 ⁻⁴	5.02×10 ⁻⁶
51	oxidoreductase	NP_253673	3.38	7.37	4×10 ⁻⁴	3.47×10 ⁻⁶
52	hypothetical protein	NP_250034	3.33	8.47	4×10 ⁻⁴	3.81×10 ⁻⁶
53	multidrug resistance operon repressor MexR	NP_249115	3.32	6.87	5×10 ⁻⁴	5.47×10 ⁻⁶
54	transcriptional regulator	NP_251159	3.28	4.70	2.3×10 ⁻³	3.35×10 ⁻⁵
55	permease	NP_249167	3.28	3.56	6.5×10 ⁻³	1.27×10 ⁻⁴
56	hypothetical protein	NP_251436	3.27	6.30	7×10 ⁻⁴	8.97×10 ⁻⁶
57	major facilitator superfamily (MFS) transporter	NP_251623	3.27	3.89	4.4×10 ⁻³	7.76×10 ⁻⁵
58	hypothetical protein	NP_252651	3.24	7.94	6×10 ⁻⁴	6.96×10 ⁻⁶
59	heat shock protein GrpE	NP_253450	3.23	10.53	5×10 ⁻⁴	5.87×10 ⁻⁶
60	transcriptional regulator NfxB	NP_253290	3.21	8.02	7×10 ⁻⁴	7.62×10 ⁻⁶
61	Uncharacterized protein	NP_253672	3.19	6.79	9×10 ⁻⁴	1.13×10 ⁻⁵
62	hypothetical protein	NP_250434	3.19	5.67	1.6×10 ⁻³	2.22×10 ⁻⁵

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
63	hypothetical protein	NP_252508	3.18	10.80	7×10 ⁻⁴	7.70×10 ⁻⁶
64	major facilitator superfamily (MFS) transporter	NP_250007	3.17	5.11	2.3×10 ⁻³	3.23×10 ⁻⁵
65	FMN-dependent NADH-azoreductase 2, Azor2	NP_250652	3.16	3.46	1.02×10 ⁻²	2.33×10 ⁻⁴
66	short-chain dehydrogenase	NP_249757	3.08	5.73	2.3×10 ⁻³	3.48×10 ⁻⁵
67	SawR	NP_251823	3.07	5.53	2.4×10 ⁻³	3.58×10 ⁻⁵
68	short-chain dehydrogenase	NP_250035	3.05	8.52	1.3×10 ⁻³	1.74×10 ⁻⁵
69	heat shock protein HtpG	NP_250287	3.04	10.72	1.2×10 ⁻³	1.65×10 ⁻⁵
70	hypothetical protein	NP_250799	3.03	3.35	1.46×10 ⁻²	3.98×10 ⁻⁴
71	transcriptional regulator	NP_253589	3.02	5.86	2.7×10 ⁻³	4.25×10 ⁻⁵
72	transcriptional regulator	NP_254069	3.00	6.12	2.5×10 ⁻³	3.80×10 ⁻⁵
73	AsrA	NP_249470	2.93	10.57	2.2×10 ⁻³	3.04×10 ⁻⁵
74	ArnB	NP_252242	2.90	7.60	2.8×10 ⁻³	4.38×10 ⁻⁵
75	hypothetical protein	NP_253185	2.89	9.15	2.6×10 ⁻³	4.04×10 ⁻⁵

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ห้ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
76	major facilitator superfamily (MFS) transporter	NP_252407	2.89	4.06	1.38×10 ⁻²	3.65×10 ⁻⁴
77	ArnA	NP_252244	2.86	8.43	3.1×10 ⁻³	4.96×10 ⁻⁵
78	transcriptional regulator	NP_248813	2.83	6.56	4.4×10 ⁻³	7.91×10 ⁻⁵
79	PelA	NP_251754	2.79	7.83	4.2×10 ⁻³	7.46×10 ⁻⁵
80	hypothetical protein	NP_252641	2.79	7.04	4.9×10 ⁻³	8.96×10 ⁻⁵
81	transcriptional regulator	NP_249633	2.75	6.94	5.8×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
82	hypothetical protein	NP_249429	2.74	3.94	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
83	hydrolase	NP_251822	2.73	5.36	9.9×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
84	probable transporter	NP_250198	2.72	5.09	1.02×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
85	DnaK protein	NP_253449	2.71	12.24	5.3×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
86	transcriptional regulator	NP_251620	2.70	5.68	9.4×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
87	heat shock protein HslV	NP_253740	2.70	9.33	5.7×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
88	amino acid permease	NP_252287	2.70	3.41	2.99×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ห้ล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
89	hypothetical protein	NP_250162	2.69	5.73	9.4×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
90	probable transporter	NP_251628	2.68	4.18	2.16×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
91	homogentisate 1,2-dioxygenase	NP_250699	2.67	7.09	7.7×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
92	acyl-CoA dehydrogenase	NP_251505	2.64	9.96	7.2×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
93	transcriptional regulator BkdR	NP_250936	2.62	4.36	2.25×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
94	SpeD2	NP_253461	2.61	5.33	1.46×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
95	lysis phenotype activator, AlpA	NP_249598	2.60	6.10	1.18×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
96	probable drug efflux transporter	NP_250232	2.58	7.43	1.02×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
97	AgtB	NP_249295	2.58	5.44	1.52×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
98	hypothetical protein	NP_250611	2.56	3.56	4.82×10 ⁻²	2.3×10 ⁻³
99	FAD-dependent oxidoreductase	NP_251466	2.56	8.75	1.02×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
100	PelB	NP_251753	2.55	7.83	1.08×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
101	SDS hydrolase SdsA1	NP_249431	2.53	3.27	4.83×10 ⁻²	2.3×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ห้ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
102	hypothetical protein	NP_251005	2.53	3.27	4.83×10 ⁻²	2.3×10 ⁻³
103	hypothetical protein	NP_250543	2.53	5.47	1.7×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
104	hypothetical protein	NP_252418	2.50	8.55	1.27×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
105	transcriptional regulator TrpI	NP_248727	2.50	6.30	1.51×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
106	PelD	NP_253315	2.49	6.90	1.46×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
107	cyclic diguanylate-regulated TPS partner A, CdrA	NP_253315	2.47	9.95	1.32×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
108	hypothetical protein	NP_250283	2.47	9.89	1.33×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
109	hypothetical protein	NP_252419	2.46	6.72	1.67×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
110	OhrR	NP_251539	2.46	6.15	1.8×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
111	GroES protein	NP_253076	2.45	10.07	1.42×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
112	Heme/Hemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR precursor	NP_253398	2.45	6.79	1.67×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
113	glyoxylate carboligase	NP_250193	2.45	4.29	3.62×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC¹ = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM² = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR³ = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์หาล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
114	transcriptional regulator	NP_254115	2.45	6.67	1.67×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
115	hypothetical protein	NP_253899	2.44	8.91	1.52×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
116	aconitate hydratase	NP_249485	2.41	8.90	1.67×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
117	hypothetical protein	NP_251131	2.40	6.52	2.1×10 ⁻²	6×10 ⁻⁴
118	probable ATP-binding component of ABC transporter	NP_252362	2.40	6.33	2.19×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
119	hypothetical protein	NP_250262	2.40	4.45	3.67×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³
120	transcriptional regulator	NP_249920	2.40	4.56	3.45×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³
121	thiol:disulfide interchange protein	NP_251168	2.37	5.55	2.65×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
122	hypothetical protein	NP_250233	2.37	6.31	2.35×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴
123	MexZ	NP_250710	2.37	6.73	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
124	transcriptional regulator	NP_249917	2.37	6.54	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
125	expressed protein with apparent function in citronellol catabolism	NP_251576	2.36	5.26	3.11×10 ⁻²	1.2×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
126	nucleotide sugar dehydrogenase	NP_252249	2.35	6.82	2.34×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴
127	ArnC	NP_252243	2.35	7.23	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
128	hypothetical protein	NP_249613	2.34	6.83	2.38×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴
129	ChtA	NP_253364	2.33	8.24	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
130	hypothetical protein	NP_253865	2.31	9.24	2.35×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴
131	hypothetical protein	NP_252060	2.29	6.16	3.05×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
132	anti-sigma factor MucA	NP_249454	2.28	11.05	2.57×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
133	PelF	NP_251749	2.27	7.05	2.93×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
134	GntP	NP_251012	2.25	5.33	4.11×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³
135	acyl-CoA dehydrogenase	NP_250322	2.24	5.26	4.42×10 ⁻²	2×10 ⁻³
136	transcriptional regulator CatR	NP_251200	2.23	5.25	4.48×10 ⁻²	2×10 ⁻³
137	PhoP/Q and low Mg ²⁺ inducible outer membrane protein H1 precursor	NP_249869	2.23	11.91	3.06×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
138	GroEL protein	NP_253075	2.22	12.54	3.06×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
139	repressor protein LexA	NP_251697	2.22	8.97	3.22×10 ⁻²	1.2×10 ⁻³
140	hypothetical protein	NP_252360	2.20	7.03	3.77×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³
141	hypothetical protein	NP_249524	2.20	10.34	3.37×10 ⁻²	1.3×10 ⁻³
142	hypothetical protein	NP_254160	2.20	8.82	3.45×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³
143	dicarboxylate transporter	NP_248809	2.19	6.06	4.2×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
144	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexE precursor	NP_251183	2.19	9.75	3.45×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³
145	hypothetical protein	NP_252059	2.19	6.61	4.05×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³
146	hypothetical protein	NP_250801	2.17	5.43	5×10 ⁻²	2.4×10 ⁻³
147	hypothetical protein	NP_250023	2.16	6.96	4.16×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
148	PelG	NP_251748	2.15	6.14	4.8×10 ⁻²	2.2×10 ⁻³
149	hypothetical protein	NP_250288	2.15	6.98	4.42×10 ⁻²	2×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 2 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up-regulated genes) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
150	hypothetical protein	NP_252417	2.14	8.36	4.13×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
151	hypothetical protein	NP_251173	2.14	7.38	4.41×10 ⁻²	1.9×10 ⁻³
152	hypothetical protein	NP_249707	2.14	5.98	4.92×10 ⁻²	2.3×10 ⁻³
153	hypothetical protein	NP_249445	2.14	6.38	4.7×10 ⁻²	2.2×10 ⁻³
154	transcriptional regulator RtcR	NP_253271	2.13	7.05	4.58×10 ⁻²	2.1×10 ⁻³
155	heat shock protein HtpX	NP_251520	2.10	9.66	4.5×10 ⁻²	2×10 ⁻³
156	osmotically inducible lipoprotein OsmE	NP_253563	2.10	8.12	4.7×10 ⁻²	2.2×10 ⁻³
157	heat shock protein HslU	NP_253741	2.09	9.89	4.68×10 ⁻²	2.1×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน, Log₂FC¹ = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂CPM² = จำนวน log₂ ต่อล้านซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR³ = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
1.	hypothetical protein	NP_249404	-5.07	3.90	3.66×10 ⁻⁵	2.81×10 ⁻⁷
2.	hypothetical protein	NP_253372	-4.25	6.35	8.54×10 ⁻⁶	5.28×10 ⁻⁸
3.	arginine/ornithine antiporter	NP_253857	-4.24	12.72	2.51×10 ⁻⁶	1.22×10 ⁻⁸
4.	hypothetical protein	NP_253371	-3.98	5.20	6.90×10 ⁻⁵	5.82×10 ⁻⁷
5.	class III (anaerobic) ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein, 'activase', NrdG	NP_250609	-3.94	7.41	2.09×10 ⁻⁵	1.49×10 ⁻⁷
6.	arginine deiminase	NP_253858	-3.85	13.39	2.06×10 ⁻⁵	1.43×10 ⁻⁷
7.	hypothetical protein	NP_250607	-3.56	2.04	4.8×10 ⁻²	0.002228
8.	permease of ABC transporter	NP_253917	-3.54	8.10	1×10 ⁻⁴	1.23×10 ⁻⁶
9.	carbamate kinase	NP_253860	-3.41	12.45	2×10 ⁻⁴	1.96×10 ⁻⁶
10.	hypothetical protein	NP_253370	-3.35	3.97	4.1×10 ⁻³	7.15×10 ⁻⁵
11.	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	NP_253859	-3.32	12.87	4×10 ⁻⁴	3.36×10 ⁻⁶
12.	oxidoreductase	NP_251007	-3.29	9.54	4×10 ⁻⁴	4.23×10 ⁻⁶

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
13.	ATP-binding/permease fusion ABC transporter	NP_253918	-3.17	9.69	7×10 ⁻⁴	8.33×10 ⁻⁶
14.	hypothetical protein	NP_249405	-3.17	4.38	3.3×10 ⁻³	5.59×10 ⁻⁵
15.	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	NP_252027	-3.16	9.34	7×10 ⁻⁴	8.99×10 ⁻⁶
16.	NirG	NP_249204	-3.15	6.59	1.2×10 ⁻³	1.49×10 ⁻⁵
17.	amino acid permease	NP_252761	-3.06	9.02	1.2×10 ⁻³	1.59×10 ⁻⁵
18.	hypothetical protein	NP_251008	-3.06	9.22	1.2×10 ⁻³	1.54×10 ⁻⁵
19.	amino acid permease	NP_250606	-3.01	3.19	2.35×10 ⁻²	7.85×10 ⁻⁴
20.	heme d1 biosynthesis protein NirL	NP_249205	-2.97	6.74	2.3×10 ⁻³	3.48×10 ⁻⁵
21.	heme d1 biosynthesis protein NirF	NP_249207	-2.94	8.52	2.3×10 ⁻³	3.29×10 ⁻⁵
22.	flagellar basal-body rod protein FlgC	NP_249769	-2.93	5.59	3.9×10 ⁻³	6.66×10 ⁻⁵
23.	hypothetical protein	NP_252760	-2.91	6.63	3.2×10 ⁻³	5.33×10 ⁻⁵
24.	hypothetical protein	NP_250608	-2.91	4.56	7.4×10 ⁻³	1.49×10 ⁻⁴
25.	hypothetical protein	NP_248967	-2.89	5.48	4.6×10 ⁻³	8.29×10 ⁻⁵

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะหียีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
26.	transcriptional regulator	NP_252148	-2.88	7.51	3.1×10 ⁻³	5.16×10 ⁻⁵
27.	class III (anaerobic) ribonucleoside-triphosphate reductase subunit, NrdD	NP_250610	-2.85	8.95	3.1×10 ⁻³	5.15×10 ⁻⁵
28.	hypothetical protein	NP_254162	-2.83	9.45	3.2×10 ⁻³	5.45×10 ⁻⁵
29.	two-component sensor	NP_248868	-2.79	4.82	9.8×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
30.	NirH	NP_249203	-2.78	6.59	5.1×10 ⁻³	9.55×10 ⁻⁵
31.	hypothetical protein	NP_253713	-2.74	5.11	1.04×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
32.	O6-methylguanine-DNA methyltransferase	NP_250808	-2.74	5.07	1.04×10 ⁻²	2×10 ⁻⁴
33.	hypothetical protein	NP_251257	-2.72	8.51	5.3×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
34.	hypothetical protein	NP_252608	-2.68	9.36	6.2×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴
35.	transcriptional regulator	NP_249206	-2.66	7.25	7.7×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
36.	hypothetical protein	NP_251070	-2.64	3.82	2.52×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
37.	ribosome modulation factor	NP_251739	-2.64	7.63	8.1×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
38.	c-type cytochrome precursor nirC	NP_249208	-2.63	7.31	8.7×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
39.	hypothetical protein	NP_252304	-2.62	8.96	8.1×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
40.	transcriptional regulator Dnr	NP_249218	-2.61	7.55	9.1×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
41.	pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain	NP_252106	-2.60	3.58	3.06×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
42.	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoO subunit	NP_250247	-2.59	10.05	8.7×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
43.	aldehyde dehydrogenase	NP_252762	-2.58	10.37	9.3×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴
44.	hypothetical protein	NP_252121	-2.52	6.13	1.52×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
45.	cytochrome c551 peroxidase precursor	NP_253277	-2.52	10.39	1.09×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
46.	hypothetical protein	NP_248831	-2.51	9.78	1.17×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
47.	class II (cobalamin-dependent) ribonucleotide-diphosphate reductase subunit, NrdJb	NP_254183	-2.50	7.91	1.3×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
48.	cytochrome c	NP_253261	-2.49	8.95	1.28×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
49.	hypothetical protein	NP_253018	-2.49	8.07	1.3×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
50.	cupA gene regulator C, CgrC	NP_250816	-2.48	6.53	1.57×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
51.	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	NP_250237	-2.48	10.22	1.3×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
52.	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoP subunit	NP_250246	-2.48	8.74	1.31×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
53.	hypothetical protein	NP_253155	-2.48	9.36	1.3×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴
54.	chemotaxis protein CheZ	NP_250148	-2.46	5.19	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
55.	flagellar assembly protein	NP_249794	-2.46	6.84	1.57×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴
56.	drug efflux transporter	NP_253847	-2.46	5.01	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
57.	ribonuclease	NP_249642	-2.44	5.69	2.19×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
58.	class II (cobalamin-dependent) ribonucleotide-diphosphate reductase subunit, NrdJa	NP_254184	-2.43	10.07	1.52×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
59.	dehydrogenase	NP_252789	-2.43	9.26	1.54×10 ⁻²	4×10 ⁻⁴
60.	type 4 fimbrial biogenesis protein FimU	NP_253240	-2.39	5.69	2.57×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
61.	flagellar basal-body rod protein FlgB	NP_249768	-2.38	5.73	2.43×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
62.	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoN subunit	NP_250248	-2.37	11.39	1.87×10 ⁻²	6×10 ⁻⁴
63.	acyl-CoA thiolase	NP_250427	-2.36	7.02	2.26×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
64.	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)	NP_250809	-2.35	8.64	2.16×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
65.	hypothetical protein	NP_252122	-2.35	5.82	2.65×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
66.	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoP subunit	NP_250246	-2.34	10.66	2.16×10 ⁻²	7×10 ⁻⁴
67.	flagellar protein FlgJ	NP_249776	-2.33	6.83	2.41×10 ⁻²	8×10 ⁻⁴
68.	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	NP_249770	-2.33	6.09	2.76×10 ⁻²	1×10 ⁻³
69.	hypothetical protein	NP_253049	-2.33	5.55	3.06×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
70.	protease	NP_252602	-2.32	6.99	2.58×10 ⁻²	9×10 ⁻⁴
71.	hypothetical protein	NP_253226	-2.31	5.50	3.45×10 ⁻²	1.3×10 ⁻³
72.	NosF protein	NP_252084	-2.31	6.23	2.83×10 ⁻²	1×10 ⁻³
73.	hypothetical protein	NP_253225	-2.29	5.72	3.28×10 ⁻²	1.3×10 ⁻³
74.	hypothetical protein	NP_253484	-2.28	4.96	4.05×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

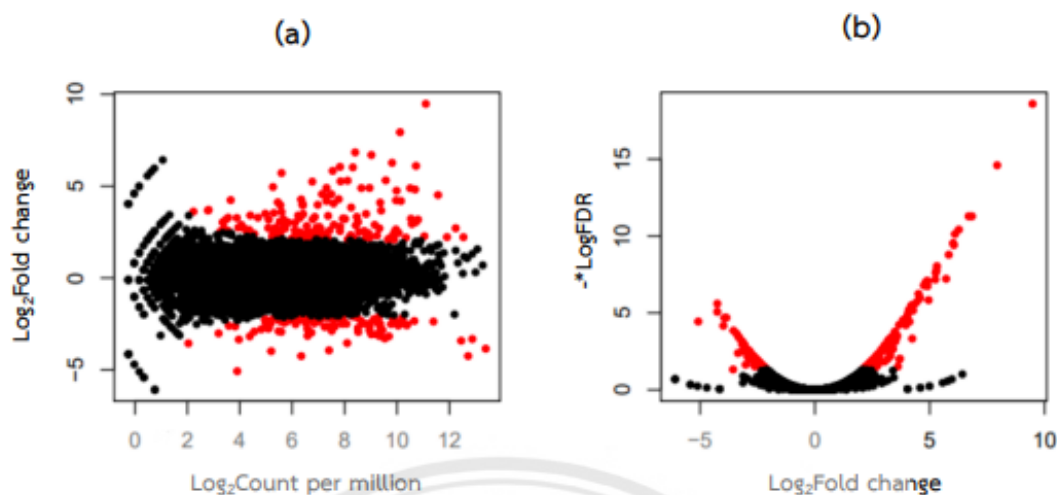
No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
75.	type 4 fimbrial biogenesis protein PilV	NP_253241	-2.27	5.66	3.55×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³
76.	epoxide hydrolase	NP_252119	-2.26	4.98	4.25×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
77.	Flagella M-ring outer membrane protein precursor	NP_249792	-2.26	7.63	2.92×10 ⁻²	1×10 ⁻³
78.	transcriptional regulator	NP_252763	-2.25	5.76	3.67×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³
79.	hypothetical protein	NP_253038	-2.24	9.12	3.05×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³
80.	flagellar motor switch protein FlIG	NP_249793	-2.23	7.56	3.22×10 ⁻²	1.2×10 ⁻³
81.	hypothetical protein	NP_249217	-2.22	5.89	4.05×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³
82.	multidrug resistance protein	NP_253846	-2.22	5.27	4.42×10 ⁻²	2×10 ⁻³
83.	nitrite reductase precursor	NP_249210	-2.21	9.86	3.28×10 ⁻²	1.3×10 ⁻³
84.	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	NP_249777	-2.21	6.50	3.7×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³
85.	hypothetical protein	NP_253213	-2.20	7.80	3.56×10 ⁻²	1.4×10 ⁻³
86.	hypothetical protein	NP_252040	-2.20	5.71	4.31×10 ⁻²	1.9×10 ⁻³
87.	cytochrome c-551 precursor	NP_249209	-2.19	7.93	3.64×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC1 = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM2 = จำนวน log₂ ต่อล้าน ซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR3 = false discovery rate

ตาราง 3 การแสดงผลของยีนที่มีการแสดงออกลดลง (Down-regulated gene) ในสถานะที่มีการตอบสนองต่อสารไฮโดรควินินซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผล DEGs (ต่อ)

No.	Product	RefSeq_protein	Log ₂ FC ¹	Log ₂ CPM ²	FDR ³	p-Value
88.	flagellar L-ring protein precursor FlgH	NP_249774	-2.18	6.55	4.13×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
89.	hypothetical protein	NP_252601	-2.17	6.62	4.31×10 ⁻²	1.9×10 ⁻³
90.	phosphate transporter	NP_253894	-2.17	7.44	4.05×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³
91.	hypothetical protein	NP_252303	-2.17	10.21	3.67×10 ⁻²	1.5×10 ⁻³
92.	two-component response regulator CheY	NP_250147	-2.16	7.17	4.13×10 ⁻²	1.8×10 ⁻³
93.	cholinesterase, ChoE	NP_253608	-2.16	6.21	4.48×10 ⁻²	2×10 ⁻³
94.	hypothetical protein	NP_253714	-2.15	8.49	4.05×10 ⁻²	1.7×10 ⁻³
95.	major facilitator superfamily (MFS) transporter	NP_253717	-2.14	7.35	4.32×10 ⁻²	1.9×10 ⁻³
96.	aerotaxis receptor Aer	NP_250252	-2.11	9.31	4.41×10 ⁻²	1.9×10 ⁻³
97.	chemotaxis protein CheZ	NP_250148	-2.09	8.31	4.8×10 ⁻²	2.2×10 ⁻³

หมายเหตุ: RefSeq_protein = รหัสวิเคราะห์ยีน , Log₂ FC¹ = log₂ ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน, Log₂ CPM² = จำนวน log₂ ต่อล้านซึ่งปรับให้เป็นมาตรฐานสำหรับขนาดของ library , FDR³ = false discovery rate



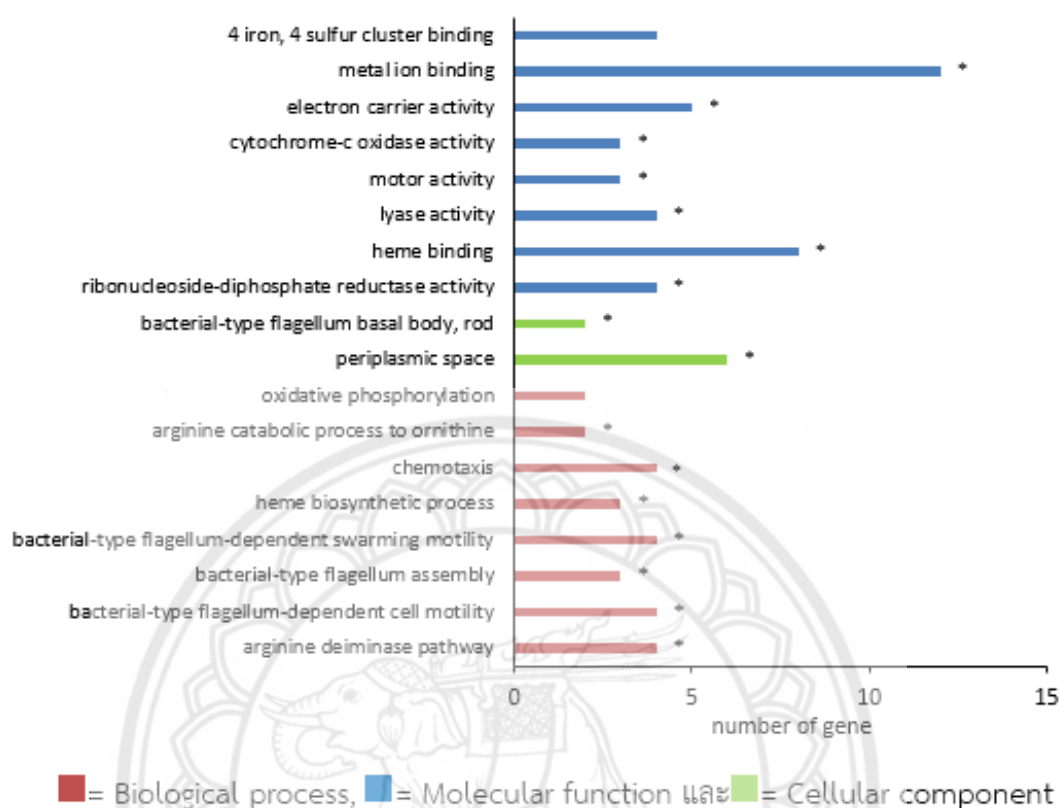
ภาพ 7 MA plot และ Volcano plot แสดงจำนวน DEGs

ภาพ 7a กลุ่มของจุดสีแดงด้านบนมีจำนวนยีนทั้งหมด 157 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มของจุดสีแดงด้านล่างมีจำนวนยีนทั้งหมด 97 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกลดลง ทั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลง ($\text{Log}_2\text{Fold change}$) กับจำนวนการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ($\text{Log}_2\text{Count per million}$) ส่วนภาพ 7b เป็นการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลง ($\text{Log}_2\text{Fold change}$) กับค่าของความผิดพลาดที่ยอมรับได้ ($-\text{*LogFDR}$) ซึ่งจุดสีแดงคือ significant differential expression gene และจุดสีดำคือ non-significant differential expression gene

4.2 ผลการจำแนกกลไกของยีนที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินินตามเกณฑ์ gene ontology

จากการศึกษาผลของ DEGs ทั้งหมด คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเฉพาะยีนที่มีการแสดงออกลดลง โดยทำการวิเคราะห์หากลไกการทำงานของยีนและจำแนกยีนโดยใช้เกณฑ์ gene ontology ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยา (biological process) ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function) และองค์ประกอบของเซลล์ (cellular component) ด้วยฐานข้อมูล DAVID (<https://david.ncicrf.gov/> 2021 updated database) ดังภาพ 8

Functional annotation of downregulated gene ontology (GO) terms



ภาพ 8 การจำแนกยีนที่มีการแสดงออกลดลงตามเกณฑ์ Gene ontology

ผลการจำแนกกลไกของยีนที่มีการแสดงออกลดลงจากการวิเคราะห์ gene ontology พบว่า ในกลุ่มของ biological process พบกลไกทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่ arginine deaminase pathway, bacterial-type flagellum-dependent cell motility, bacterial-type flagellum assembly, bacterial-type flagellum-dependent swarming motility, heme biosynthetic process, chemotaxis, arginine catabolic process to ornithine และ oxidative phosphorylation โดยพบว่าจำนวนของยีนที่พบมากที่สุดในกลุ่ม biological process มีความเกี่ยวข้องกับ 4 กลไก คือ arginine deaminase pathway, bacterial-type flagellum-dependent cell motility, bacterial-type flagellum-dependent swarming motility และ chemotaxis ในส่วนของ cellular component พบว่ากลไกการแสดงออกของยีนที่ลดลงมีความเกี่ยวข้องกับ periplasmic space และ bacterial-type flagellum basal body โดยพบว่าจำนวนยีนที่พบมากที่สุดในกลุ่ม คือ periplasmic space ในกลุ่มของ molecular function พบกลไกทั้งหมด 8 กลไก ได้แก่ ribonucleoside-diphosphate reductase activity, heme binding, lyase activity, motor activity, cytochrome-c oxidase activity, electron carrier activity, metal ion

binding และ 4 iron and 4 sulfur cluster binding โดยพบว่าจำนวนของยีนที่มากที่สุดเกี่ยวข้องกับก็มี metal ion binding

4.3 ผลการวิเคราะห์กลไกของยีนที่มีการแสดงออกลดลงในสภาวะที่มีสารไฮโดรควินิน

โดยใช้ฐานข้อมูล KEGG pathway

จากการวิเคราะห์กลไกการทำงานของยีนผ่านทาง KEGG pathway จากฐานข้อมูล DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/> 2021 updated database) พบว่ายีนที่มีการแสดงออกลดลงมีความเกี่ยวข้องกับกลไกทั้งหมด 4 กลไก ได้แก่ flagellar assembly, bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism และ oxidative phosphorylation ซึ่งจำนวนของยีนที่มากที่สุดมีความเกี่ยวข้องกับ flagellar assembly และรองลงมามี 3 กลไก ที่มีจำนวนยีนที่เท่ากัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism และ oxidative phosphorylation ดังตาราง

ตาราง 4 ยีนที่มีการแสดงออกลดลงผ่านทาง KEGG pathway

No.	KEGG pathway	Number of genes	Down-regulated genes	Log ₂ FC ¹	FDR ²	p-Value
1	Flagellar assembly	10	<i>flgC</i>	-2.92859	3.866×10 ⁻³	6.66×10 ⁻⁵
			PA1103	-2.4645	1.5745×10 ⁻²	4.51×10 ⁻⁴
			<i>flgB</i>	-2.37868	2.4337×10 ⁻²	8.29×10 ⁻⁴
			<i>flgD</i>	-2.33453	2.7609×10 ⁻²	9.77×10 ⁻⁴
			<i>flgJ</i>	-2.33279	2.4144×10 ⁻²	8.18×10 ⁻⁴
			<i>fliF</i>	-2.26475	2.9231×10 ⁻²	1.046×10 ⁻³
			<i>fliG</i>	-2.23142	3.2193×10 ⁻²	1.224×10 ⁻³
			<i>flgK</i>	-2.21066	3.6987×10 ⁻²	1.51×10 ⁻³
			PA3350	-2.1993	4.309×10 ⁻²	1.872×10 ⁻³
			<i>flgH</i>	-2.1789	4.1306×10 ⁻²	1.764×10 ⁻³

No.	KEGG pathway	Number of genes	Down-regulated genes	Log ₂ FC ¹	FDR ²	p-Value
2	Bacterial chemotaxis	5	PA0178	-2.79229	9.771×10 ⁻³	2.18×10 ⁻⁴
			<i>cheZ</i>	-2.46126	2.2602×10 ⁻²	7.13×10 ⁻⁴
			<i>fliG</i>	-2.23142	3.2193×10 ⁻²	1.224×10 ⁻³
			<i>cheY</i>	-2.15816	4.1306×10 ⁻²	1.763×10 ⁻³
			<i>aer</i>	-2.11339	4.4096×10 ⁻²	1.949×10 ⁻³
3	Porphyrin metabolism	5	<i>nirG</i>	-3.15	1.2×10 ⁻³	1.49×10 ⁻⁵
			<i>nirL</i>	-2.973	2.3×10 ⁻³	3.48×10 ⁻⁵
			<i>nirH</i>	-2.7839	5.1×10 ⁻³	9.55×10 ⁻⁵
			<i>nirD</i>	-2.66412	7.747×10 ⁻³	1.58×10 ⁻⁴
			<i>hemN</i>	-2.47738	1.2953×10 ⁻²	3.32056×10 ⁻⁴
4	Oxidative phosphorylation	5	<i>ccoO2</i>	-2.5928	8.745×10 ⁻³	1.85056×10 ⁻⁴
			PA0141	-2.50876	1.1724×10 ⁻²	2.85415×10 ⁻⁴
			<i>ccoN2</i>	-2.37049	1.8661×10 ⁻²	5.59122×10 ⁻⁴
			<i>ccoP2</i>	-2.33823	2.1558×10 ⁻²	6.58049×10 ⁻⁴
			<i>nirM</i>	-2.18851	3.6371×10 ⁻²	1.457576×10 ⁻³

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการค้นคว้าหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ โดยเฉพาะสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีรายงานว่าสารไฮโดรควิโนนมีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารไฮโดรควิโนนยังมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหากลไกในการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควิโนนต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยอาศัยข้อมูลการแสดงออกของยีนทั้งหมด (transcriptome) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ตอบสนองต่อสารไฮโดรควิโนน

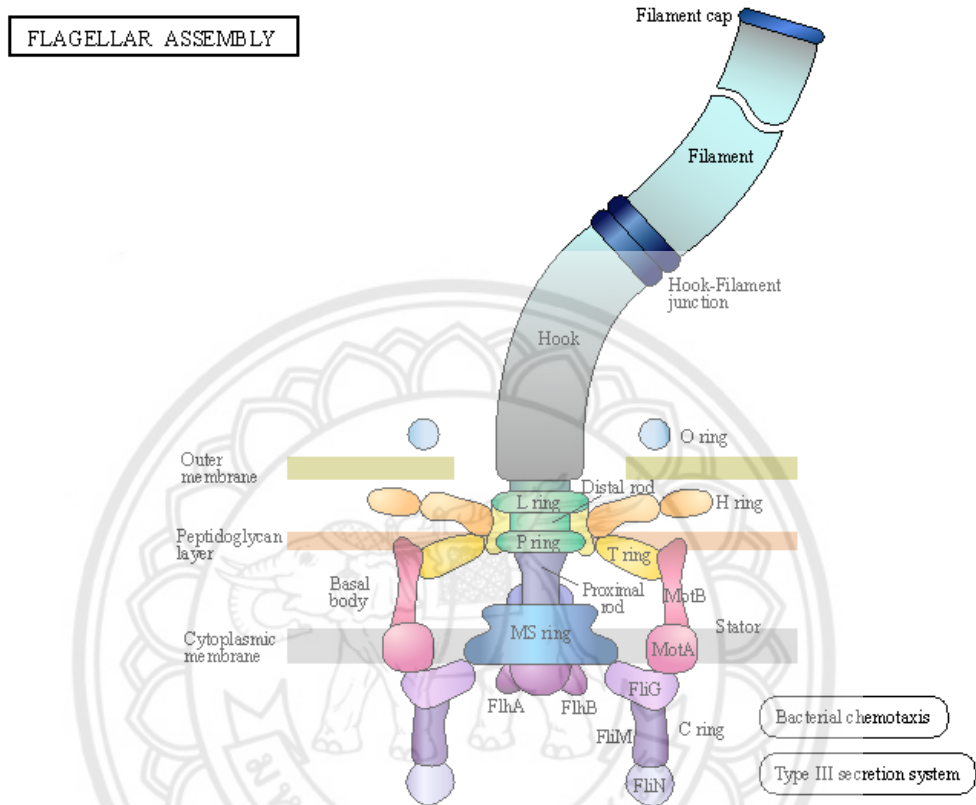
งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับ RNA โดยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพและควบคุมคุณภาพของข้อมูลในทุกขั้นตอน เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือที่สุด ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ผ่านกระบวนการควบคุมคุณภาพของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Fast P และยังมีโปรแกรมอื่น ๆ ที่คล้ายกัน ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลได้ เช่น โปรแกรม Fast Q (35) ทั้งนี้งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับ RNA จะต้องมีเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกข้อมูล โดยเทียบเกณฑ์จากค่า fold change และ fold discovery rate ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ใช้เกณฑ์ $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ และ $\text{FDR} \leq 0.05$ พบยีนทั้งหมด 254 ยีน แบ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) จำนวน 157 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) จำนวน 97 ยีน ดังตาราง 1 ผลของการแสดงออกยีนที่แตกต่างกันในสภาวะที่มีการตอบสนองของสารไฮโดรควิโนน โดยหากมีการปรับเกณฑ์ Fold change ลดลงมา ก็อาจจะทำให้เห็นจำนวนกลุ่มของยีนมากขึ้นได้ เช่น งานวิจัยของคุณ Liu Xiayu และคณะ (36) ได้ใช้เกณฑ์ $\text{fold change} > 1$ และ $\text{FDR} \leq 0.05$

ก่อนหน้านี้มีงานวิจัยของคุณนพพร รัตนจักร และคณะ ได้รายงานเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควิโนนต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยพบว่าสารไฮโดรควิโนนที่ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ efflux pump ซึ่งเป็นกระบวนการที่ส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* (14) แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของ เชื้อ *P. aeruginosa* ต่อสารไฮโดรควิโนนในกลุ่มของยีนที่แสดงออกลดลงยังไม่ได้รับการรายงาน ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับยีนที่มีการแสดงออกลดลงของเชื้อ *P. aeruginosa* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารไฮโดรควิโนน เพื่อที่จะได้เป็นแนวทางในการหากลไกการยับยั้ง

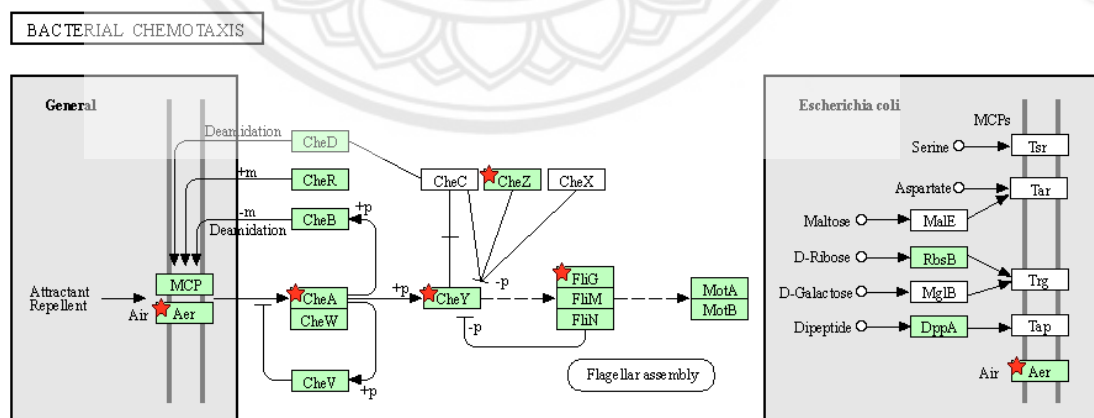
เชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ทำการจัดกลุ่มข้อมูลที่ได้โดยใช้เกณฑ์ gene ontology ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เกี่ยวกับกระบวนการทางชีววิทยา (biological process) ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function) และองค์ประกอบของเซลล์ (cellular component) พบว่าในกลุ่มของ molecular function มียีนที่มีการแสดงออกลดลง จำนวน 4 ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ ribonucleoside-diphosphate reductase activity ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ DNA (37) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้โดยตรง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารไฮโดรควิโนนอาจมีกลไกในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ผ่านทางกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ quinolones แต่ทั้งนี้จากการศึกษากลไกการทำงานของยีนที่ลดลงจาก gene ontology พบกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลกเจลลา(flagella) ในทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ bacterial-type flagellum-dependent cell motility, bacterial-type flagellum assembly, bacterial-type flagellum-dependent swarming motility, bacterial-type flagellum basal body และ motor activity เช่นเดียวกันกับกลไกใน KEGG pathway ที่พบยีนในกลุ่มของ flagellar assembly มากที่สุด ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย การสืบพันธุ์ และการเกิดโรค เช่น มีการยึดเกาะกับพื้นผิว การสร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้นสารไฮโดรควิโนนอาจมีความสามารถในการลดการสร้างโคโลนี และลดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* ผ่านทางการยับยั้งการสร้าง flagella

จากการศึกษากลไกการทำงานของยีนที่แสดงออกลดลงผ่านฐานข้อมูลทาง KEGG pathway พบว่าจำนวนของยีนที่พบมากที่สุดที่มีความเกี่ยวข้องกับ flagellar assembly จำนวนทั้งหมด 10 ยีน และพบว่ามีอีก 3 กลไกที่มีจำนวนยีนที่เท่ากัน จำนวน 5 ยีน ได้แก่ bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism และ oxidative phosphorylation ดังตาราง 1 ซึ่งยีนในกลุ่ม flagellar assembly เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ flagellar และมีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ โดยยีน *flgC*, *flgB* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง basal-body rod ยีน *flgJ* เป็นยีนสารตั้งต้นในการสร้าง P-ring ยีน *fliF* เป็นสารตั้งต้นของ MS ring ยีน *flgH* เป็นสารตั้งต้นโปรตีน L-ring อย่างไรก็ตามยังมียีน *fliG* *fliH* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ motor switch และ *flgK* *flgD* เป็นยีนในการสร้างบริเวณ hook ของ flagella (38) โดยจะมีการแสดงออกของยีน ดังภาพ 9 ซึ่งหากยีนดังกล่าว มีการแสดงออกที่ลดลง จะส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้ยังพบยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ bacterial chemotaxis ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง flagella ของแบคทีเรีย โดยพบยีน *cheZ*, *cheY*, *fliG* และ *aer* ดังภาพ 10 ซึ่งเป็นยีนที่ส่งสัญญาณควบคุมการสร้างและการเคลื่อนที่ของ flagella ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (39) ซึ่งจากการศึกษา ในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยไฮโดรควิโนน ส่งผลให้ยีนในกลุ่ม bacterial chemotaxis มีการแสดงออกลดลง ทำให้

ลดการส่งสัญญาณของแบคทีเรียที่ควบคุมการเคลื่อนที่เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (40)



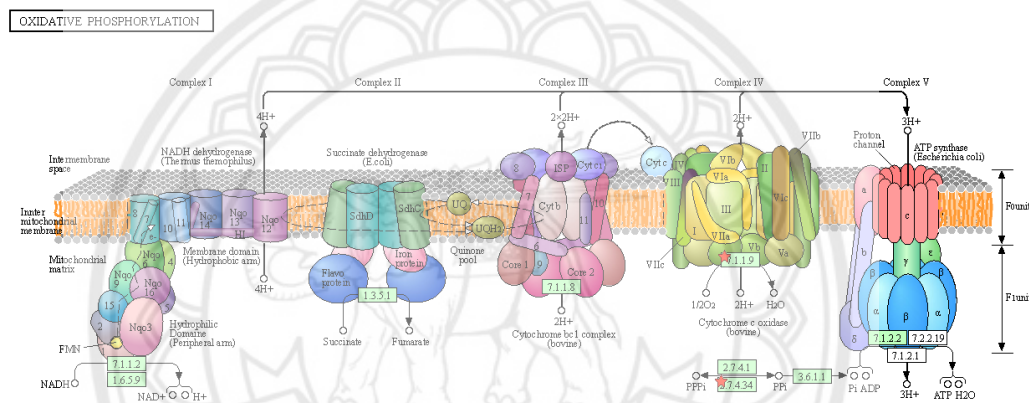
ภาพ 9 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ flagella assembly ใน KEGG pathway



ภาพ 10 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ bacterial chemotaxis ใน KEGG pathway

งานวิจัยนี้ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ porphyrin metabolism ได้แก่ ยีน *nirG*, *nirL*, *nirH*, *hemN* และ *nirD* มีการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งส่งผลต่อการสังเคราะห์ heme และขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ดังนั้นไฮโดรควินินอาจยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดย

ผ่านทางกรยับยั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการแทรกเข้าสู่เซลล์ของ heme d1 ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ (41) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์กลไกของยีนที่แสดงออกลดลงจาก KEGG pathway พบว่ามีความเป็นไปได้ที่กลไกการยับยั้ง *P. aeruginosa* ของสารไฮโดรควินินจะเกี่ยวกับกลไก oxidative phosphorylation เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าว มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ ยีน *ccoO2*, *ccoP2*, *nirM* และ *ccoN2* ดังภาพ 11 ซึ่งยีนในกลุ่ม oxidative phosphorylation มีกลไกหลักในการสร้าง ATP โดยการรวมตัวของ ADP กับฟอสเฟตโดยอาศัยพลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (42) ซึ่งหากยีนดังกล่าวลดลงจะมีผลต่อการสร้างพลังงานที่ลดลง ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้



ภาพ 11 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative phosphorylation ใน KEGG pathway

แต่ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มีข้อเสนอแนะว่าควรจะต้องมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง โดยควรตรวจสอบการแสดงออกในระดับยีน โปรตีน หรือพีโนไทป์ เพิ่มเติม ซึ่งวิธีการตรวจสอบยีนย่นผลที่นิยมใช้ เช่น วิธี real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) และหากสามารถที่จะทำการวิเคราะห์ในระดับของพีโนไทป์ได้ เช่น การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ She Pengfei และคณะที่มีการทดสอบการเคลื่อนที่ทางพีโนไทป์เพิ่มเติม เช่น swimming motility, swarming motility และ twitching motility (43) ก็จะสามารถช่วยยืนยันผลการทดลองให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารไฮโดรควินินต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* โดยดูจากผลการแสดงออกของยีน (DEGs) พบว่ามียีนจำนวนทั้งหมด 254 ยีน แบ่งออกเป็นยีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (up-regulated) จำนวน 157 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) จำนวน 97 ยีน และจากการศึกษากลไกของยีนที่มีการแสดงออกที่ลดลงพบว่าสารไฮโดรควินินมีผลต่อกลไก ribonucleoside-diphosphate reductase activity, flagellar assembly, bacterial chemotaxis, porphyrin metabolism และ oxidative phosphorylation จากข้อค้นพบในงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่า สารไฮโดรควินินน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* รวมถึงยับยั้งความรุนแรงของการก่อโรค ได้ทั้งหมด 5 กลไก และอาจนำมาใช้ในด้านการแพทย์เพื่อใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ในอนาคตต่อไป

