

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลนและการแสดงออกของยีนเซลล์ลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรีย  
ในรูเมนของกระบือ

CLOWING AND EXPRESSION OF A FAMILY 48 CELLULASE GENE  
FROM BUFFALO RUMINAL BACTERIA



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2556

KMITL-2013-AG-M-101-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**CLONING AND EXPRESSION OF A FAMILY 48 CELLULASE GENE  
FROM BUFFALO RUMINAL BACTERIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2013**

**KMITL-2013-AG-M-101-139**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2013**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48
นักศึกษา	นางสาวอรทัย ศรีมูล
รหัสประจำตัว	51065803
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

### บทคัดย่อ

เอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่ 48 ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นเซลลูโลโซมและยังมีการค้นพบเพียงจำนวนน้อย ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากกระเพาะหมักของกระบือด้วยเมทาจีโนมิกไลบรารี โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนและเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเรียกว่า Cel48MT03 มีขนาด 1,126 คู่เบส และแปลรหัสได้ 375 กรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนพบว่า โคลน Cel48MT03 มีความคล้ายคลึงกับด้านปลายหมู่อะมิโนของ catalytic domain ของเอนไซม์เซลลูเลสในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 48 โดยมีค่าความเหมือนมากที่สุดกับเอนไซม์เซลลูเลสGH48 จากเชื้อ *Ruminococcus flavefaciens* (WP\_0099877 06.1); เอนไซม์เซลลูเลสGH48 จากเชื้อ *R. champanellensis* 18P13 (YP\_007829324) และเอนไซม์ cellulose 1,4-beta-cellobiosidase จากเชื้อ *R. albus* 7 (YP\_004105715) เท่ากับ 68%, 56% และ 53% ตามลำดับจากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของโคลน Cel48MT03 ด้วยวิธี genome walking แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงได้ทำการทดสอบโดยนำยีนยีน Cel48MT03 มาทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 และ LMG194 โดยใช้เวกเตอร์ pBAD TOPO อย่างไรก็ตามผลการทดสอบไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบนเจลอะคริลาไมด์และเมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายซัสเซตรท CMC และ Avicel ก็ไม่พบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นกันดังนั้นจึงควรทำการตรวจสอบโปรตีนของ Cel48 ด้วยวิธี western blot analysis และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการค้นหาชิ้นส่วนที่เหลือให้เต็มเส้นและทำการทดสอบหาระบบการแสดงออกของโปรตีน  
ถูกผสมที่เหมาะสมต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Cloning and Expression of a Family 48 Cellulase Gene from Buffalo Ruminant Bacteria
<b>Student</b>	Miss Oratai Srimoon
<b>Student ID.</b>	51065803
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Agricultural Biotechnology
<b>Year</b>	2013
<b>Thesis Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Kanokrat Srikijsasemwat
<b>Thesis Co-Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Kanya Jirajaroenrat

## ABSTRACT

Cellulases in glycoside hydrolase family 48 (GH48) are mainly cellulosome enzymes and rarely identified. This research aimed to isolate genes encoding GH48 cellulase enzymes from buffalo rumen by metagenomic library approach. Conserved regions on the GH48 genes were used to design the primers and the DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method. The PCR fragment was named 'Cel48MT03' and analyzed. The result revealed 1,126 base pairs in length and could be translated into 375 amino sequences. The clone 'Cel48MT03' was similar to the NH<sub>2</sub>-terminal of catalytic domain of GH48. The translated amino sequences showed the similarity percentages at 68%, 56% and 53% to *Ruminococcus flavefaciens* GH48 protein (WP\_0099877.06.1), *R. champanellensis* 18P13GH48 protein (YP\_007829324) and *R. albus* 7cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (YP\_004105715), respectively. After that, full-length nucleotide sequence of Cel48MT03 was analyzed by using genome walking but not successful. The gene was tested to induce in *Escherichia coli* Top10 and *E. coli* LMG194 by using pBAD TOPO vector. However, no protein was detected on SDS-PAGE as well as protein activity examined with CMC and Avicel substrate degradation. Western blot

hybridization is suggested to confirm the protein expression. Further exploration of the complete sequence of the gene and examination of the protein expression are recommended.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพ-เกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยเป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง และรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ คนที่ได้ให้คำแนะนำ และให้การเอื้อเฟื้อช่วยเหลือและเสียสละเวลาในการเก็บตัวอย่างงานวิจัยนี้ อีกทั้งเป็นกำลังใจให้กันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ มารดา ลุง ป้า และ ญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์ และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาของการศึกษา และการวิจัย จนสำเร็จบรรลुวัตถุประสงค์

อรทัย ศรีมุล

พฤษภาคม 2556

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญภาพ.....	XIII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	XVII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กระบือ.....	4
2.1.1 โครงสร้างระบบทางเดินอาหารของกระบือ.....	4
2.1.2 หน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก.....	6
2.1.3 จุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก.....	7
2.1.3.1 แบคทีเรีย.....	7
2.1.3.2 โปรโตซัว.....	8
2.1.3.3 รา.....	9
2.2 เซลลูโลส (Cellulose).....	9
2.2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	9
2.2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis).....	10
2.3 เอนไซม์เซลลูเลส.....	11
2.3.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส.....	13

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2. โครงสร้างของเซลล์โลโซม.....	14
2.3.3 ลักษณะของ Cellulose Binding Domain (CBD).....	16
2.3.4 เซลล์เลสกลุ่มที่ 48.....	17
2.4 การค้นหาอินที่กำหนดการสร้างเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกไลบรารี.....	18
2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> .....	20
2.6 การนำเอนไซม์เซลล์ไปใช้ประโยชน์.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 การโคลนยีนเซลล์เลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	22
3.1.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	22
3.1.2 การสกัดเมทาจีโนมแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	23
3.1.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส.....	23
3.1.4 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์เลสกลุ่มที่ 48 จากเมทาจีโนมแบคทีเรีย.....	24
3.1.4.1 การออกแบบไพรเมอร์.....	24
3.1.4.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส.....	25
3.1.4.3 สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	25
3.1.5 การเชื่อมชิ้นส่วนยีนกับพลาสมิดเวกเตอร์.....	26
3.1.6 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	26
3.1.7 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์.....	26
3.1.8 การคัดเลือกโคโลนีเป้าหมาย.....	27
3.1.9 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid).....	27
3.1.9.1 การสกัดแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline Lysis.....	27
3.1.9.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส.....	28
3.1.9.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	28
3.1.9.4 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ Mini Kit.....	29
3.1.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	29

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.11 การหานิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนโดยวิธี genome walking ด้วยเทคนิค	
Ligation mediated PCR.....	30
3.1.11.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) .....	30
3.1.11.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Mini Kit.....	30
3.1.11.3 การเชื่อมต่อเมทาจีโนมิกไลบรารีกับ GenomeWalker adapter.....	30
3.1.11.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	31
3.1.11.5 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	33
3.1.11.6 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening.....	33
3.2 การคัดเลือกยีน Cel48 จากเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	33
3.2.1 การแสดงออกของยีนในระบบ pET28a(+). .....	34
3.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์ ระบบ pET28a(+). .....	34
3.2.1.2 การเตรียมยีนเซลล์ใน ระบบ pET28a(+). .....	35
3.2.1.3 การเตรียมเวกเตอร์ pET28a(+) และเชื่อมต่อยีนเข้าสู่เวกเตอร์.....	35
3.2.1.4 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์สำหรับการแสดงออกของยีน ในระบบ pET28a(+). .....	36
3.2.1.5 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับการแสดงออกของยีน (Expression host) .....	37
3.2.2 การแสดงออกของยีนในระบบ pBAD TOPO® vector.....	37
3.2.2.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์สำหรับการแสดงออกของยีน ในระบบ pBAD TOPO.....	37
3.2.2.2 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ของยีนกับ expression เวกเตอร์.....	38
3.2.2.3 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้า Expression host ในระบบ pBAD TOPO.....	38
3.2.2.4 การออกแบบไพรเมอร์.....	39
3.2.2.5 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์จากพลาสมิดลูกผสมและ การทำให้บริสุทธิ์.....	39

### VIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2.6 การโคลนชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส คู่เบคทีเรียพาหะและคัดเลือกโคลนด้วยวิธี โคลนีนีฟิชอาร์.....	39
3.2.2.7 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis.....	40
3.2.2.8 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์.....	41
3.2.2.9 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Mini Kit.....	41
3.2.2.10 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน.....	42
3.2.2.11 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	42
3.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> โดยใช้ LMG194.....	43
3.2.3.1 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน LMG194.....	43
3.2.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน.....	43
3.3 การสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer L1.....	44
3.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน.....	44
3.5 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์.....	45
3.5.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	45
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	46
4.1 การโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	46
4.1.1 การสกัดเมทาจีโนมแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	46
4.1.2 การออกแบบ degenerate primer.....	48
4.1.3 คัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	56
4.1.4 การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์.....	56
4.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	58
4.1.6 การทำ genome walking เพื่อหายีนเซลลูเลสเต็มเส้น.....	67
4.1.6.1 ผลการเตรียมเมทาจีโนมมิกโลบรารี.....	68
4.1.6.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนด้าน 5'up-stream.....	69

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.6.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	70
4.2 การโคลนยีน Cel48 จากพลาสมิดลูกผสม Cel48MT03 เพื่อตรวจสอบการ แสดงออกของยีนในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) และ pBAD TOPO.....	76
4.2.1 การการโคลนยีน Cel48 โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+)	76
4.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	76
4.2.1.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม.....	77
4.2.2 การการโคลนยีน Cel48 ใน <i>E. coli</i> Top10 โดยเวกเตอร์ pBAD TOPO.....	80
4.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	80
4.2.2.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม.....	81
4.2.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	83
4.2.2.4 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ใน <i>E. coli</i> pBAD TOPO.....	85
4.2.1.5 การวัดกิจกรรมเอนไซม์.....	87
4.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cel48MT03 ใน <i>E. coli</i> LMG194 โดยเวกเตอร์ pBAD TOPO.....	89
4.2.3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม.....	90
4.2.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ใน <i>E. coli</i> LMG194.....	90
4.2.2.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์.....	92
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	94
5.1 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์เลส.....	94
5.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์.....	94
5.3 การแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> .....	95
เอกสารอ้างอิง.....	97
ภาคผนวก ก อุปกรณ์และการเตรียมสารในการทำวิจัย.....	106
ภาคผนวก ข แผนที่เวกเตอร์.....	116

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค ลำดับนิวเคลียสไอโทค และ โปรตีน.....	121
ประวัติผู้เขียน.....	125



## สารบัญตาราง

	หน้า
2.1 คุณสมบัติของกระเพาะหมักสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	5
2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.....	14
3.1 รหัสสำหรับออกแบบ degenerate primer.....	24
4.1 ผลการออกแบบ degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของ เอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48.....	55
4.2 ความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cel48MT03 กับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการ Blastn ในฐานข้อมูลของ NCBI.....	59
4.3 ความเหมือนลำดับกรดอะมิโนของ Cel48MT03 กับฐานข้อมูลของโปรตีนจากการ Blastp ในฐานข้อมูลของ NCBI.....	62
4.4 ไพรมอร์สำหรับการทำ genome walking.....	69
4.5 สรุปรูปขนาดดีเอ็นเอผลผลิต ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสในแต่ละไลบรารี ที่ทำการโคลนและสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	73
4.6 ผลการเทียบหาปริมาณ reducing sugar ( $\mu\text{mole}$ ).....	88
4.7 ผลการเทียบหาปริมาณ reducing sugar ( $\mu\text{mole}$ ).....	93
ตารางภาคผนวกที่	
ก1 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม Polyacrylamide gel.....	114

## สารบัญภาพ

หน้า

2.2	ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส ไมโครไฟบริล ไฟบริลและเซลลูโลส ในผนังเซลล์ของพืช.....	10
2.3	กลไกการทำงานของ endoglucanase, exoglucanase และ $\beta$ -glucosidase ในการไฮโดรไลสเซลลูโลส.....	12
2.4	รูปแบบอย่างง่ายขององค์ประกอบของเซลลูโลส โคมซึ่งต่ออยู่กับผิวเซลล์ และทำปฏิกิริยา อยู่กับสารตั้งต้น โดยมาจากความรู้ขั้นพื้นฐานของเซลลูโลส โคมของ <i>Clostridium</i> sp.....	15
2.5	การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส โคมรอบโปรตีนแกนหลัก CipC ใน <i>C. cellulolyticum</i> .....	16
2.6	โครงสร้างสามมิติแบบ ( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub> ของ ยีนเซลลูเลส CEL48F โครงสร้างแบบ crystal structure จากเชื้อ <i>C. cellulolyticum</i> .....	18
2.7	Ligation-mediated PCR โดยวิธี genome walking แบบใช้ adapter.....	19
3.1	การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือ.....	22
3.2	การทำปฏิกิริยา ลูคโซ-โพลีเมอเรส โดยใช้ GenomeWalker™ Universal Kit.....	32
4.1	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ของ จีโนมคิตีเอ็นเอ.....	47
4.2	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจีโนมคิตีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ BSF และ R1VB ทำการตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจลห่อเล็กโทรโฟรีซิส 1.0%.....	48
4.3	การออกแบบไพรเมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ catalytic domain เอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากฐานข้อมูล.....	49
4.4	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิต พีซีอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48_F1 และ Cel48_R1.....	56
4.5	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของพลาสมิด ที่สกัดจากโคโลนีสีขาว.....	57
4.6	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิต พีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48_F1 และ Cel48_R1.....	58

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.7	การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cel48MT03 ให้เป็นกรดอะมิโน.....	61
4.8	การตรวจสอบ โครงสร้างและการผลิตยีน ของลำดับอะมิโน Cel48MT03 ในฐานข้อมูลจากการ Blastp.....	63
4.9	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel48MT03 กับลำดับกรดอะมิโนฐานข้อมูล.....	64
4.10	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของโคลน Cel48MT03 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48.....	67
4.11	การวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของเมทาจินีนาติก ดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	68
4.12	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Cel48MT03 กับยีนเซลลูเลสกลุ่มที่..... ในส่วน catalytic domain จากฐานข้อมูล.....	48 70
4.13	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์ จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรอบที่ 1 (secondary PCR) ของ Cel48MT03.....	71
4.14	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรอบที่ 2 (secondary PCR) ของ Cel48MT03.....	72
4.15	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยห่อเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	74
4.16	การเปรียบเทียบ single domain ในส่วน catalytic domain ที่แยกมาจาก metagenome ของ uncultured organism (ADX05724.1) ใน cow rumen และ catalytic domain ของ Cel48MT03.....	75
4.17	การออกแบบไพรเมอร์ Cel48-pET28-F และ Cel48-Pet28-R.....	77
4.18	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48-pET28-F และ Cel48-pET28-R.....	78
4.19	ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดได้จากเจลและทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i> และ <i>XhoI</i> ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว.....	79

## สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.20 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโพรจีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของโคลีนีพีซีอาร์.....	80
4.21 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโพรจีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48_F1 และ Cel48_R1.....	81
4.22 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโพรจีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของการทำยีนให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.1.11.3.....	82
4.23 ผลผลิตโคลีนีพีซีอาร์ของ <i>E.coli</i> op10 ด้วยเจลอิเล็กโทรโพรจีส์ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1%.....	82
4.24 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนCel48PT6 ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และส่วนท้ายของยีนมีการสร้าง His tag โปรตีน.....	83
4.25 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดลูกผสม pBAD TOPO/Cel48PT6 ใน <i>E. coli</i> Top10 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของ L-arabinose ที่ระดับต่างๆ คือ 0.00-0.02%วิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE.....	86
4.26 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ใช้เทียบหาปริมาณ reducing sugar ในระบบ <i>E.coli</i> Top10.....	88
4.27 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโพรจีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของการทำให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.2.2.9.....	89
4.28 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโพรจีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48_F1 และ Cel48_R1.....	90
4.29 การแสดงออกของโปรตีนรวมจากพลาสมิดลูกผสม pBAD TOPO/Cel48PT6 จากการสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer L1 ใน <i>E. coli</i> LMG ทำการวิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE.....	91
4.30 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ใช้เทียบหาปริมาณ reducing sugar.....	92
ภาพภาคผนวกที่	
ข 1 แผนที่เวกเตอร์ pTZ57R/T.....	117

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ข 2 แผนที่เวกเตอร์ pET-28a(+)	118
ข 3 แผนที่เวกเตอร์ pBAD TOPO	119
ข 4 แผนที่เวกเตอร์ pBAD TOPO แสดงตำแหน่ง TOPO cloning site	120



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	Percentage
°C	Degree Celsius
μg	Microgram
μg/μl	Microgram per microlite
μg/ml	Microgram per milliliter
μl	Microlite
μM	MicroMolar
μMole	MicroMole
bp	คู่เบส
CMC	Carboxymethylcellulose
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G	Gram
IPTG	Isopropyl--D thiogalactoside
kDa	kilodalton
L	Liter
LB	Lubia-Bertani
M	Molar
mA	milliamp
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
mM	MilliMolar
ng	Nanogram
nm	Nanometer
rpm	รอบต่อนาที
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กระป๋องปลักเป็นสัตว์ที่มีกระเพาะหมัก (Rumen) ขนาดใหญ่ มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยอาหารสูง โดยอาศัยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะจำนวนมาก เป็นตัวช่วยย่อยเยื่อใยพืชให้เปลี่ยนเป็นสารอาหาร (Wanapat and Rowlinson. 2007) รูเมนจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการค้นหาอินซูลินเซลลูเลสชนิดใหม่ เพื่อจะนำมาช่วยย่อยสลายเยื่อใยพืช เนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์พืชมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลัก เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกัน จึงเป็นแหล่งของกลูโคสจำนวนมาก จากที่ปรากฏอยู่ในปัจจุบันเซลลูโลสที่มาจากซากพืช ไม่ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าอยู่มาก เช่น ซากพืชจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษไม้ อุตสาหกรรมไม้ และเศษกระดาษจากอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น ปัจจุบันวัสดุเหล่านี้มักจะถูกทำลายโดยการเผาซึ่งทำให้เกิดปัญหาหมอกควัน และยังไม่ได้ใช้ประโยชน์จากทรัพยากรอย่างคุ้มค่าอีกด้วย (Levine. 1996) อย่างไรก็ตามปริมาณของชีวมวลเซลลูโลสที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ มีศักยภาพที่สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าหลากหลายชนิด เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ และผลิตภัณฑ์เคมี โดยเซลลูโลสจะต้องถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของโมเลกุลที่เล็กลง คือ กลูโคส

เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ซึ่งทำงานโดยการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาแยกพันธะ  $\beta$ -1,4-glucosidic ในเซลลูโลส ปัจจุบันเซลลูเลสถูกใช้อย่างกว้างขวางในด้านการเกษตรและด้านอื่นๆ เช่น อาหาร, เครื่องดื่ม, สิ่งทอ, อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzyme database (CAZY) ซึ่งแบ่งเอนไซม์ออกเป็นกลุ่ม (family) โดยอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส (EC. 3.2.1.4, EC. 3.2.1.21, EC. 3.2.1.91) ปรากฏอยู่ใน 21 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 19, 26, 30, 44, 45, 48, 51, 61, 74, 116 และ 124 (Henrissat *et al.* 2012) โดยพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่ 5, 9, 44 และ 48 เป็นเอนไซม์ที่ค้นพบได้จากแบคทีเรียแกรมบวก (Henrissat and Davies. 1997) ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภทที่พบมากในกระเพาะรูเมนของกระป๋อง (ศรีธัญญา สถิตยัมน์วิวัฒน์. 2551) จากการรายงานการจำแนกเอนไซม์ ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ยังมีปริมาณที่น้อยมากจากแบคทีเรียที่อาศัยในกระเพาะรูเมนของกระป๋อง (*Bubalus bubalis*) จากฐานข้อมูล CAZY แบคทีเรียที่อาศัยในกระเพาะรูเมนของกระป๋องมีหลากหลายชนิด แต่ก็มีข้อจำกัดในการศึกษาและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำเอนไซม์จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมาใช้ ซึ่งมีประสบการณ์ปัญหาในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประเภทไม่ใช้ออกซิเจนและยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

ในการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของกระบือ (*Bubalus bubalis*) เนื่องจากแบคทีเรียในรูเมนมีมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกระเพาะรูเมน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ หลากหลายชนิดแตกต่างกัน ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีอยู่มากในอาหารหยาบ ที่กระบือกินเข้าไปได้ (Weimer, 1996) การวิจัยครั้งนี้จึงนำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านการตัดแต่งพันธุกรรม มาใช้ในการจำแนกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน แล้วทำการตัดต่อยีนที่ได้ไปยังแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผลิตยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และสามารถพัฒนาให้นำไปใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ชนิดใหม่จากเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ
- 2) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ในแบคทีเรีย *E. coli* และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์

## 1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

## 1.4 ขั้นตอนของการวิจัย

การโคลนและแสดงออกยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ โดยทำการสกัดเมทาจีโนมกิตีเอ็นเอแบคทีเรีย มาทำการคัดเลือกรหัสของยีนเซลลูเลสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนยีนที่ได้ แล้วจึงทำการหาลำดับที่เหลือของยีนที่สมบูรณ์ด้วยวิธีการ genome walking และนำชิ้นส่วนของยีนที่สมบูรณ์ทำการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนยีนลงในเวกเตอร์และเซลล์เจ้าบ้าน ทำการตรวจสอบการผลิตโปรตีน โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ตรวจสอบผลผลิตโปรตีนที่ได้โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและตรวจสอบการทำงานของโปรตีน

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลิตยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ชนิดใหม่จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ ทราบถึงการทำงานของเอนไซม์ที่แสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* และสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ในสเกลที่ใหญ่ขึ้นได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กระบือ

กระบือปลัก (Swamp buffalo) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Bubalus bubalis* เป็นกระบือเลี้ยงที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย และพบมากในแถบประเทศจีนตอนล่าง ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชา มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และ อินโดนีเซีย (จรัญ จันทลักษณ์, 2527)

#### 2.1.1 โครงสร้างระบบทางเดินอาหารของกระบือ

กระเพาะหมักเป็นระบบนิเวศที่มีความซับซ้อน (Weimer, 1996) และมีคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.1 อาหารส่วนใหญ่ที่สัตว์กินเข้าไปจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักไปเป็นโภชนาที่สัตว์นำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น กรดไขมันที่ระเหยง่าย (volatile fatty acids, VFA) เซลล์จุลินทรีย์ (microbial cells) และวิตามิน (vitamin) ซึ่งเป็นโภชนาที่จำเป็นต่อสัตว์เพื่อนำไปใช้ในการดำรงชีพ และเพื่อนำไปใช้ในการสร้างเป็นผลผลิตที่มีคุณภาพทั้งเนื้อ นม หรือขน (สุริยะ สะวานนท์, 2551)

กระบือเป็นสัตว์ที่มีกระเพาะถึง 4 ส่วน คือ กระเพาะรูเมนหรือ กระเพาะผ้าชีวรีว (rumen) กระเพาะรังผึ้ง (Reticulum) กระเพาะสามติบกลีบ (Omasum) และ กระเพาะแท้ (Abomasum) (ภาพที่ 2.1) โดยมีระบบการทำงานของกระเพาะส่วนต่างๆคือ

1) กระเพาะรูเมนหรือ กระเพาะผ้าชีวรีว (rumen) มีขนาด 80% ของกระเพาะทั้งหมด พื้นผนังของกระเพาะนี้มีลักษณะคล้ายขนเรียกว่า papillae โดยมีหน้าที่ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของกระเพาะให้มากขึ้น เพื่อช่วยในการดูดซึมอาหารได้มากขึ้น มีแถบของกล้ามเนื้อเรียกว่า pillars ทำหน้าที่แบ่งกระเพาะรูเมนออกเป็น 4 ตอน นอกจากนั้นยังทำหน้าที่บังคับให้อาหารภายในกระเพาะหมุนเวียนไปมาเพื่อให้อาหารผสมคลุกเคล้าเข้ากันน้ำภายในกระเพาะ และมีจุลินทรีย์จำนวนมากอาศัยอยู่

2) กระเพาะรังผึ้ง (Reticulum) มีขนาด 5% ของกระเพาะทั้งหมด วางตัวอยู่ข้างหน้ากระเพาะรูเมน โดยพื้นผนังของกระเพาะรังผึ้งมีลักษณะรูปร่างแอ่งหกเหลี่ยมคล้ายรังผึ้ง ทำหน้าที่กรองอาหาร กระจายอาหาร และช่วยในการเคลื่อนอาหารระหว่างกระเพาะ รูเมนกับหลอดคอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกระเพาะหมักสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ลักษณะ	ค่าที่สามารถพบได้
<b>ลักษณะทางกายภาพ</b>	
ความเป็นกรด-ด่าง	pH 5.5-6.9
อุณหภูมิ	38-41 °C
<b>ลักษณะทางเคมี</b>	
แก๊ส	CO <sub>2</sub> 65%, CH <sub>4</sub> 27%, N <sub>2</sub> 7%, O <sub>2</sub> 0.6%, H <sub>2</sub> 0.2%
กรดไขมันระเหยง่าย	60-90 mM กรดอะซิติก 15-30 mM กรดโพรพิโอนิก 10-25 mM กรดบิวทิริก 2-5 mM กรดอื่นๆ
กรดแลกติก	น้อยกว่า 10 mM
แอมโมเนีย	2-12 mM
ลิกนิน	พบได้ตลอดเวลา
แร่ธาตุ	พบโซเดียมในปริมาณสูง
วิตามิน	พบวิตามินบีชนิดต่างๆ

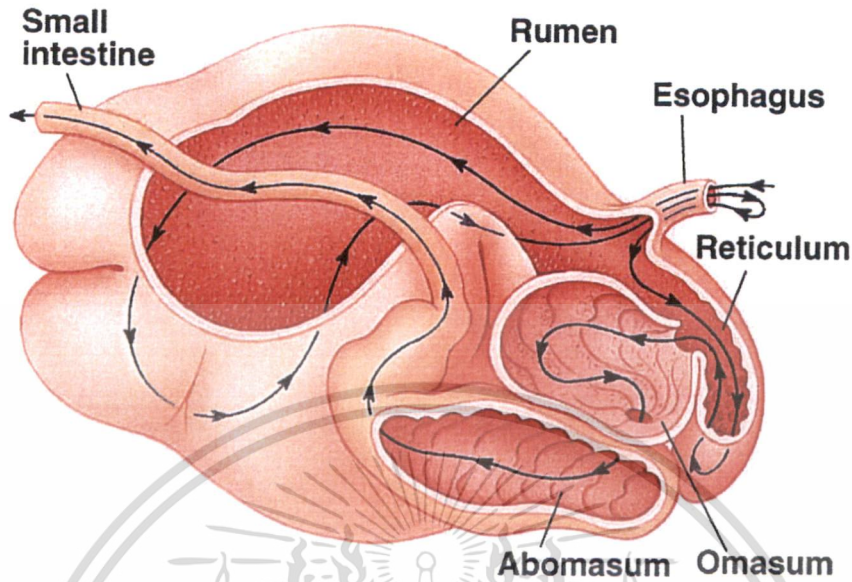
ที่มา: Mackie and White. (1997)

3) กระเพาะสามติบกลีบ (Omasum) มีขนาด 7-8% ของกระเพาะทั้งหมด ผนังกระเพาะเป็นกลีบหรือ หลีบจำนวนมาก มีหน้าที่ทำการลดจำนวนน้ำที่มีอยู่ในอาหารและ ทำหน้าที่บดขยี้อาหารที่ยังเป็นก้อนให้กระจายและหลวมตัว เพื่อส่งให้กระเพาะจริง

4) กระเพาะแท้ (Abomasum) มีขนาด 7-8% ของกระเพาะทั้งหมด โดยกระเพาะนี้มีลักษณะเหมือนกระเพาะเดี่ยว (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

กระเพาะรูเมนมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสให้เป็นสารอาหาร (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2527) อีกทั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะหมักมีแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (obligate anaerobes) และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) รวมอยู่ด้วยแต่มีปริมาณที่น้อย ทั้งนี้พบว่าอาจติดเข้ามากับน้ำและอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (Hungate. 1966; Wachenheim and Patterson. 1992) ซึ่งการเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยขึ้นอยู่กับสมดุลของระบบนิเวศน์ในกระเพาะหมัก (Baik *et al.* 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารของกรมส่งเสริมการเกษตร เพื่อการบริการแก่เกษตรกรและผู้สนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 กระเพาะอาหารส่วนต่างๆ ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Walter, 2011)

### 2.1.2 หน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

กระเพาะรูเมนเป็นที่หมักอาหาร โดยรูเมนมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิและระดับ pH เหมาะสม มีความชื้นคงที่ และมีการไหลเข้าของน้ำและอาหารเป็นไปอย่างคงที่ภายในกระเพาะรูเมนจะมีจุลินทรีย์ (microorganisms) เช่น แบคทีเรียและโปรโตซัว อาศัยอยู่แบบพึ่งพากัน (symbiotic relationship) อุณหภูมิภายในประมาณ 38–42°C ระดับ pH 6–7 (ทองเทียน บัวจุม, 2551) โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะหมัก มีทั้งที่เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (obligate anaerobes) และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) รวมอยู่ด้วยแต่มีปริมาณที่น้อย ทั้งนี้พบว่าอาจติดเข้ามากับน้ำและอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (Hungate, 1966; Wachenheim and Patterson, 1992) การเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักส่วนใหญ่ ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยขึ้นอยู่กับสมดุลของระบบนิเวศน์ในกระเพาะหมัก (Baik *et al.* 1997) ซึ่งหน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก มีดังต่อไปนี้ (วิโรจน์ จันทรรัตน์, 2540)

1) ช่วยย่อยอาหารเชื้อใย เนื่องจากพืชที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไป จะมีคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้งและเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสัตว์กระเพาะเคี้ยวรวมถึงกระเพาะอาหารของมนุษย์

ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่เอนไซม์ที่ผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะหมัก จะสามารถย่อยสลายเซลลูโลส รวมถึงสารประกอบเซลลูโลสชนิดอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส ให้เป็น กรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดบิวทริก (butyric acid), โพรไพโออิก (propionic acid) เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 60-80% ของพลังงานทั้งหมดที่ได้จากกรดไขมันระเหยได้

2) ช่วยสร้างโปรตีน เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น ยูเรีย หรือแอมโมเนีย ให้ไปเป็นโปรตีนของตัวเชื้อจุลินทรีย์เองได้ด้วยเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ย่อยจนเกิดเป็นแอมโมเนีย จากนั้นจุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียเหล่านี้ในการดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวน โดยต้องอาศัยแหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่ตายแล้วจะถูกย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะแท้ เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนอีกทางหนึ่งด้วย

3) ช่วยย่อยอาหารจำพวกไขมัน กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกระเพาะหมักจะถูกทำให้อิ่มตัวด้วยกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) จากนั้นไขมันจะถูกย่อยต่อได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรไพโออิก

4) สร้างวิตามินบี ซี และเค จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักสามารถสร้างวิตามินเหล่านี้ และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง

การจัดจำแนกจุลินทรีย์ระบบนิเวศน์ในกระเพาะหมัก สามารถจัดจำแนกหมวดหมู่ได้ 3 กลุ่มใหญ่ดังนี้คือ กลุ่มแบคทีเรีย ( $10^{10}$ - $10^{11}$  cell/ml) โปรโตซัว ( $10^5$ - $10^6$  cell/ml) และเชื้อรา ( $10^3$ - $10^7$  cell/ml) (สุริยะ สะวานนท์. 2551; Deng *et al.* 2008)

### 2.1.3 จุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

กระบือไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้ด้วยตัวเอง แต่กระเพาะรูเมนของกระบือ เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากอาหารที่กระบือกินเข้าไปเป็นพวกพืชที่มีเซลลูโลสสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนซึ่งมากกว่าครึ่งที่เป็นแบคทีเรีย จะช่วยย่อยสลายเซลลูโลสโดยการผลิตเซลลูเลสออกมาภายนอกเซลล์ โดยสามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรีย โปรโตซัว และรา

#### 2.1.3.1 แบคทีเรีย

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทที่สำคัญ ในการย่อยเยื่อใยมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ *Fibrobacter (Bacteroides) Succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Weimer. 1996) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิต endoglucanase, exoglucanase (cellobiohydrolases), exoxylanases และ hemicellulases โดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ผลิตจากส่วน intracellular ของแบคทีเรีย (เมธา วรณพัฒน์ และคณะ. 2552)

Oyeleke and Okusanmi (2008) ได้คัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยแยกได้จากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่แตกต่างกันคือ โคน และแพะ พบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *P. aeruginosa* (9.0%), *Bacillus* (37.8%), *Micrococcus* (8.1%) และ *Streptococcus* (44.3%) ส่วนเชื้อราที่แยกได้เป็นชนิด *Fusarium* (21.2%), *Penicillium* (23.4%), *Aspergillus* (14.7%) และ *Mucor* (40.6%) ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้พบว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Penicillin*, *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Mucor*

ศรัณยา สติธัยมันวิวัฒน์ (2551) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือโดยใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากตัวอย่างประชากรแบคทีเรียที่ได้จากรูเมนกระบือสามตัวผสมรวมกัน เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและทำการโคลนแล้ว ได้คัดเลือกทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจำนวน 216 โคลน แล้ววิเคราะห์ยีน 16S rDNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HhaI* สามารถจัดกลุ่มตามขนาดที่เหมือนกันได้ 173 รูปแบบ หลังจากหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล แล้วพบประชากรแบคทีเรียซึ่งจำแนกได้ 8 กลุ่ม คือ Low G+C gram-positive bacteria (57%), Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids (32%), Proteobacteria (6.36%), Lentisphaerae (1.16%), Spirocheates (0.58%) ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มประชากรแบคทีเรีย Low G+C gram-positive bacteria เป็นกลุ่มที่มีมากที่สุด และเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยพบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม unculturable bacteria (56.07%)

### 2.1.3.2 โปรโตซัว

โปรโตซัวย่อยเซลลูโลสที่พบในรูเมน เช่น *Enoploplastron triloriatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Diploplastron affine*, *Epidinium ecaudatum caudatum*, *Diplodinium monacanthum* และ *Diplodinium pentacanthum* (Coleman et al. 1976) โปรโตซัวที่พบในกระเพาะหมัก ได้แก่ *Isotrichia intestinalis*, *I. prostoma*, *Dasytrich ruminantium* *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Entodinium* และ *Ostracodinium* เป็นต้น (Moat and Foster, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3.3 รา

ในกระเพาะหมักหากมีเชื้อรามากจะช่วยลดระยะเวลาการเข้าย่อยอาหารเชื้อใยเชื้อราที่มีพบในกระเพาะหมัก และมีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Neocallimastix* sp. *Piromonas* sp. (Kostiukovskil *et al.* 1990) เชื่อว่าเชื้อราไปลดความตึงของเส้นใยและทำให้เกิดการแตกของเส้นใยได้ง่าย เมื่อเกิดการเคี้ยวเอื้อง แบคทีเรียสามารถเข้าไปย่อยเชื้อใยพืชได้ง่ายขึ้น (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

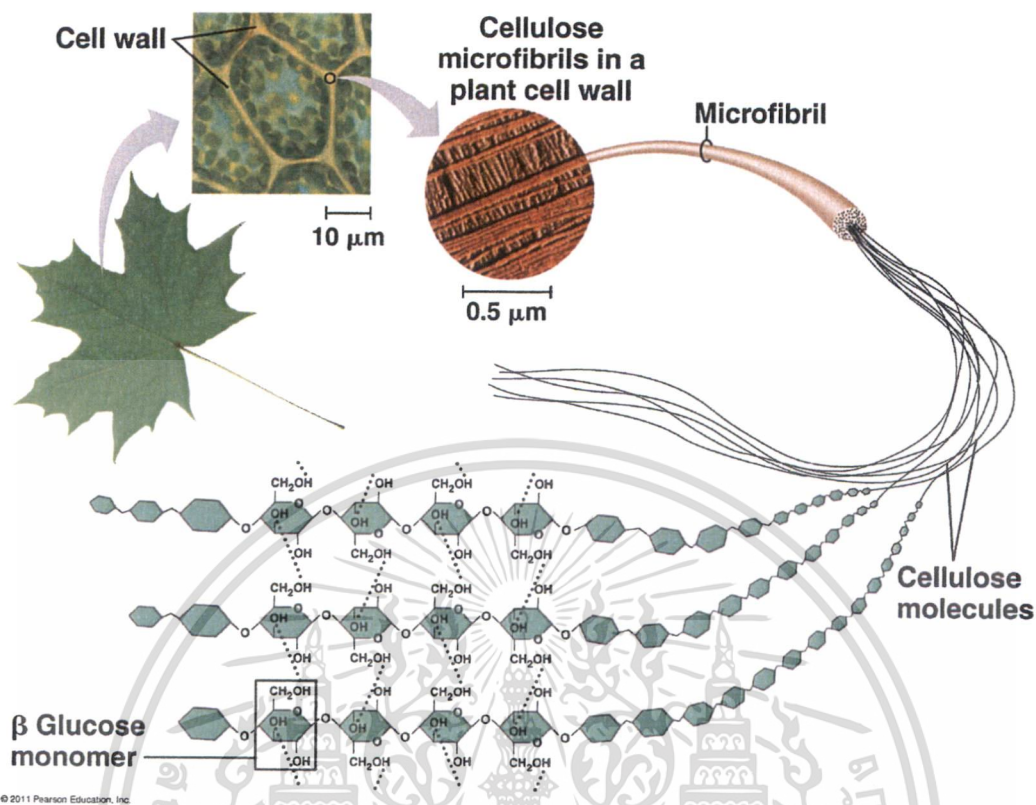
## 2.2 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชชั้นสูงและเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ที่มีมากที่สุดในโลก (Li *et al.* 2009) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1838 โดย Anselme Payen พบว่าเชื้อใยในเซลล์พืชชั้นสูงทุกชนิด มีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะและเรียกชื่อโครงสร้างนี้ว่า “เซลลูโลส”

### 2.2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

โครงสร้างของเซลลูโลสมีการจัดเรียงเป็นเส้นตรง ด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสหลายโมเลกุลมาเรียงตัวเป็น D-anhydro glucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glucosidic ซึ่งถือเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง และมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glucosidic และเซลลูโลสธรรมชาติหนึ่งหน่วยโมเลกุลประกอบด้วย D-anhydrogluco pyranose ประมาณ 1,000 – 30,000 หน่วย ทำให้เซลลูโลสมีความยาวจาก 500 – 15,000 nm (Ioelovich. 2008) การจัดเรียงตัวของแต่ละโมเลกุลของเซลลูโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของกลูโคสอีกสายหนึ่ง ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่สี่ (ภาพที่2.2) โดยเซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ในบริเวณที่เรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า amorphous และส่วนที่เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเรียกว่า crystalline cellulose (Atalla and Vanderhart. 1984)

ในธรรมชาติเซลลูโลสจะรวมอยู่กับโมเลกุลอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในพืช เช่น เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน โดยเซลลูโลสพบมากที่สุดในส่วนของ secondary cell wall การเรียงตัวของ



ภาพที่ 2.2 ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส ไมโครไฟบริล ไฟบริลและเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช (ไวฑูติะ เทตู่เหล้าะ. 2013)

เซลลูโลสจะมีโครงสร้างเป็นแบบ Flat-Ribbon และระหว่างชั้นของโมเลกุลจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนในผนังเซลล์ชั้นที่สองมีการจัดเรียงของเซลลูโลสเป็นกลุ่มยาว เรียกว่า microfibril ซึ่งบริเวณ paracrystalline จะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส (Kasana *et al.* 2008)

### 2.2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis)

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเสถียร เนื่องจากพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) เป็นพันธะที่มีความแข็งแรงและคงทนภายใต้สภาวะปฏิกิริยาหลายแบบ Wolfenden and Snider (2001) ซึ่งสามารถทำการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย 2 วิธีหลัก (Fan *et al.* 1987) คือ

1) ; วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรด (acidic hydrolysis) เช่น กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้มีข้อจำกัด คือให้ปริมาณกลูโคสต่ำ และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการอีกด้วย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

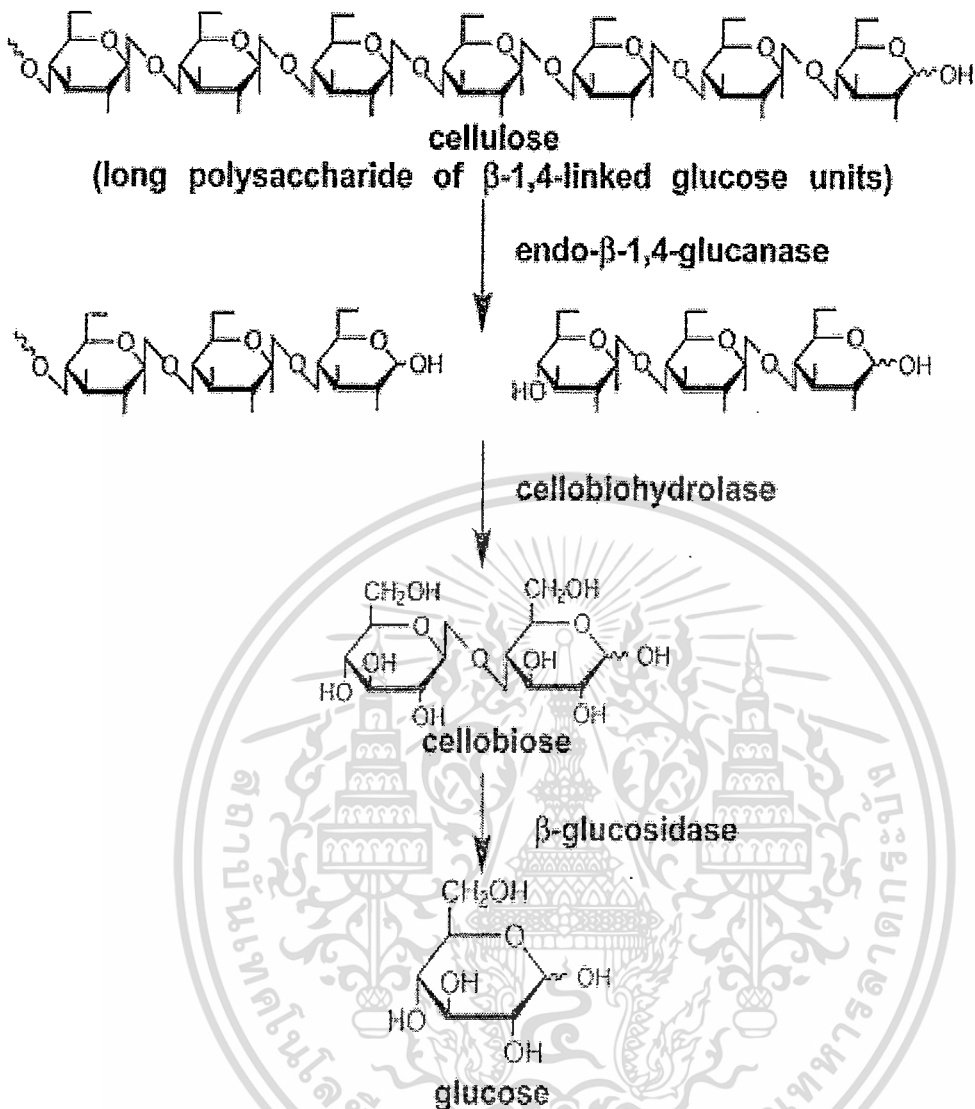
2) วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยปฏิกิริยาการย่อยเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงและ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก จึงไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ฉะนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงค่อนข้างบริสุทธิ์

## 2.3 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ ที่เกิดจากการกระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของ เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยที่เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส (Kasana *et al.* 2008) เซลลูเลสทำงานโดยการกระตุ้น (catalyze) ให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ ของพันธะ  $\beta$ -1,4-glucosidic ในเซลลูโลส ดังนั้นจึงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase family : GHF) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์โบไฮเดรตหรือ ระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโมเลกุลอื่น ปัจจุบันมีการจำแนกเอนไซม์กลุ่มนี้โดยอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (Henrissat. 1991)

จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzyme database (CAZy) ได้แบ่งไกลโคไซด์ไฮโดรเลสออกเป็น 130 กลุ่ม โดยเซลลูเลส (EC. 3.2.1.4, EC. 3.2.1.21, EC. 3.2.1.91) ปรากฏอยู่ในกลุ่มที่ 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 19, 26, 30, 44, 45, 48, 51, 61, 74, 116 และ 124 (Henrissat *et al.* 2012) ในแต่ละ family ที่ถูกจัดกลุ่มเอนไซม์แล้วพบว่า กลไกการทำงานมีสองแบบคือ inverting และ retaining ซึ่งมีรูปแบบของ clans แตกต่างกัน และพบว่าบาง family มีลำดับเบสอนุรักษ์ (conserve sequence) ที่มีลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ในแต่ละ family และมีหลักการตั้งชื่อเอนไซม์ใน family ต่าง ๆ ของเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสคือ อักษรสามตัวแรกแสดงถึง activities ของเอนไซม์ อักษรตัวที่สี่แสดงถึงกลุ่มของ family

หากแบ่งกลุ่มของเซลลูเลสตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลสสามารถแบ่งตามลักษณะการเข้าจับจำเพาะกับสารตั้งต้นหรือ สับสเตรต (ภาพที่ 2.3) ตามระบบการแบ่งกลุ่มของ international union of biochemistry and molecular biology (IUB-MB) แบ่งได้ 3 ชนิด คือ (Reese *et al.* 1950)



ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของ endoglucanase, exoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase ในการไฮโดรไลสเซลลูโลส (Xie *et al.* 2007)

1) endoglucanase (1, 4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolase; EC.3.2.1.4) จะย่อยสลายเซลลูโลส ทำหน้าที่สุมตัดพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic ภายในสายเซลลูโลสบริเวณที่เป็น amorphous หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ไปเป็นกลูโคสเซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์ โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยให้ทำปฏิกิริยากับ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นต้น (Wike *et al.* 1983)

2) exoglucanase (1, 4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase; EC.3.2.1.74) จะย่อยเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอส โดยทำหน้าที่ตัดโมโนเมอร์และไดเมอร์จากปลายสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลลูโลสด้าน non-reducing ทำให้ได้ กลูโคส และ เซลโลไบโอส โดยสามารถวัดกิจกรรมของ เอนไซม์ชนิดนี้ด้วยการทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง และ Avicel เป็นต้น (Wike *et al.* 1983)

3)  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -d-glucosideglucohydrolase; EC.3.2.1.21) จะย่อยสลายเซลลูไบโอสไปเป็นกลูโคส ทำหน้าที่ตัดกลูโคสโคโมเมอร์ และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นกลูโคส โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ด้วยการชักนำให้เกิดปฏิกิริยากับ cellobiose และ p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (p-NPG) เป็นต้น (Wike *et al.* 1983)

Malherbe and Cloete (2002) กล่าวว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้จำเป็นสำหรับการไฮโดรไลสเซลลูโลสที่สมบูรณ์และจำเป็นสำหรับการนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ ซึ่งขั้นตอนที่เป็นตัวกำหนดอัตราของปฏิกิริยาคือความสามารถของ endoglucanase ในการสุมตัดภายในโครงสร้างเพื่อทำให้เกิดปลายสายใหม่ขึ้นและ cellobiohydrolase สามารถเข้าทำงานต่อไปได้

### 2.3.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส

แหล่งที่มาของเอนไซม์เซลลูเลสอาจเป็นไปได้ที่เซลล์พืช เซลล์สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ดังตัวอย่างตารางที่ 2.2 ส่วนเอนไซม์ที่มีปริมาณการผลิตสูงและมีความสำคัญ ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มักใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547) ส่วนเซลลูเลสที่ได้จากพืช รายงานว่ามีการพบเฉพาะเอนโดกลูคาเนสแต่ไม่พบ เอกโซกลูคาเนส โดยบทบาทของเอนไซม์เซลลูเลสในพืชคาดว่าเกี่ยวกับพัฒนาการของพืชเช่น ทำให้เกิดการสุกของผลไม้ การร่วงของใบ เป็นต้นและ เซลลูเลสจากสัตว์ โดยส่วนมากสัตว์ไม่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ด้วยตัวเอง ส่วนมากมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในร่างกายของสัตว์ เช่นสัตว์เคี้ยวเอื้องจำพวกกระบือ ที่มีกระเพาะรูเมน จะมีจุลินทรีย์คอยผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับการย่อยสลายเยื่อใยพืช ที่สัตว์กินเข้าไป (Wanapat and Rowlinson. 2007) แต่ก็มีกรพบเซลลูเลสจากสัตว์ในกลุ่ม arthropods เช่น กุ้ง ปู (Linton *et al.*, 2006) และแมลง (Girard and Jouanin. 1999) เซลลูเลสจากราโดย Royer and Nakas (1990) ได้ศึกษา *Trichoderma reesei* และ *Humicola insolens* เป็นแหล่งเซลลูเลสในอุตสาหกรรมพบว่าใน *T. longibrachiatum* ถ้าใช้ไซแทนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนจะสร้างไซแทนเนสและ ถ้าใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสร้างเซลลูเลส แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียทนต่อความร้อนได้มากกว่าเชื้อรา เช่นเซลลูเลสจากแบคทีเรีย สามารถย่อย crystalline cellulose เช่น avicel ได้สูงกว่าเชื้อรา นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีช่วงการแบ่งตัวที่สั้น สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายให้จำนวนเซลล์หนาแน่นสูง โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกทั้งสามารถหลั่งเอนไซม์ในปริมาณมากได้ รวมถึงระบบที่ใช้ในการแสดงออกและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสะดวก การชักนำให้เกิดการแสดงออกของเซลล์สูงปริมาณสูงในแบคทีเรียนั้นทำได้ง่ายกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับรา (Li *et al.* 2008) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่ดีที่สุดของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงในช่วงเวลาสั้น ๆ และสามารถใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในการเพิ่มปริมาณ หรือเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ได้ง่าย อีกทั้งมักมีความเสถียรสูงกว่าเอนไซม์ ที่ได้จากพืชหรือสัตว์ ดังนั้นการค้นหาเอนไซม์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อให้ได้เอนไซม์ชนิดใหม่ หรือเอนไซม์เดิมที่มีสมบัติใหม่ จึงต้องเริ่มหาจากแหล่งจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551)

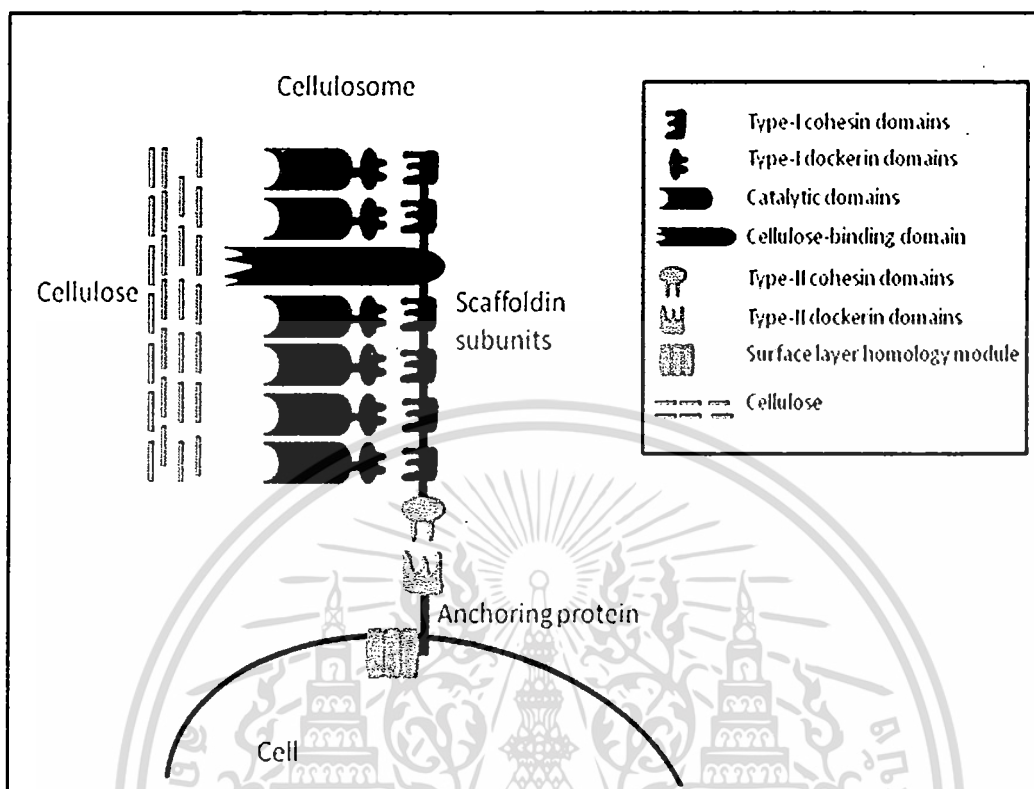
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

สายพันธุ์, จุลินทรีย์	ชนิดจุลินทรีย์
แบคทีเรีย	<i>Acidothermus, Acid. cellulolyticus, Bacillus substilis, Clostridium, Cl. acetobutylicum, Cel. thremocellum, Pseudomonas, P. cellulose, Rhodothermus, Rho. marinus</i>
เชื้อรา	<i>Aspergillis, A. niger, A.nidulans, A. oryzae, Fusarium, F. solani, F. oxysporum, Penicillium, Pen. brasilianum, Pen. occitanis และ Pen. Decymbans</i>
แอกติโนมัยซิส	<i>Cellulomonas, Cel. fimi, Cel. bioazotea, Streptomycetes, Strep. drozdowiczii, Thermoanosporea, Ther. fusca, Ther. Curvata</i>

ที่มา: Sukuma *et al.* (2005)

### 2.3.2 โครงสร้างของเซลลูโลโซม

ส่วนมากในแบคทีเรียจะพบการผลิตเซลลูเลส เป็นแบบหลายเอนไซม์ ทำงานร่วมกัน เรียกว่าเซลลูโลโซม (cellulosome) ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Barak *et al.* (2010) พบว่า *Clostridium thermocellum* มีโครงสร้างของเซลลูโลโซมที่ซับซ้อน ประกอบไปด้วยโดเมนที่มีหน้าที่แตกต่างกันหลายโดเมน (multiple subunit) หนึ่งในซับยูนิตคือ catalytic domain ซึ่งพบสองส่วนติดกันคือ dockerin domain จะประกอบด้วยโมเลกุลที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำ ๆ กัน 22 โมเลกุล และ multiple domain subunit ที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า scaffoldin ซึ่ง scaffoldin เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลลูโลโซม โดยซับยูนิตนี้ประกอบด้วย cellulose-binding domain (CBD) หรือ cellulose-binding module (CBM) ซึ่งเซลลูโลโซมที่พบประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ส่วนแรกที่ไม่ใช่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (noncatalytic) ขนาด 160 กิโลดาลตัน ซึ่งมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

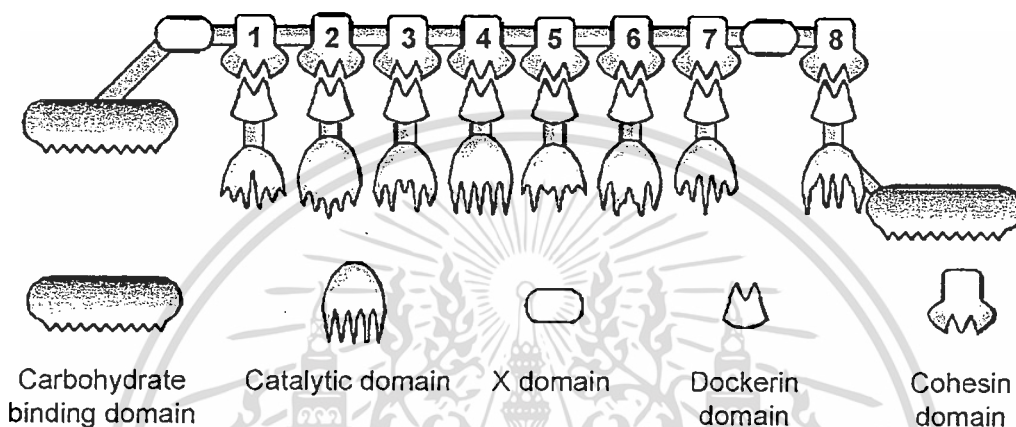


ภาพที่ 2.4 รูปแบบอย่างง่ายขององค์ประกอบของเซลลูโลสโชมซึ่งต่ออยู่กับผิวเซลล์ และทำปฏิกิริยาอยู่กับสารตั้งต้น โดยมาจากความรู้ขั้นพื้นฐานของเซลลูโลสโชมของ *Clostridium* sp. (Bayer *et al.* 2004)

หน้าที่จับกับ dockerin ของเซลลูเลส คือ โปรตีนแกนหลัก (scaffolding protein) CipC และอีกสององค์ประกอบที่เหลือขนาด 94 กิโลดาลตัน และ 80.6 กิโลดาลตัน คือ CelE และ CelF ตามลำดับ (Gal *et al.* 1997) ซึ่ง scaffoldin เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลลูโลสโชม โดยบางกรณีพบว่า scaffoldin สองชนิดหรือมากกว่าสองชนิดอาจจะไปกระตุ้นให้ anchoring protein ของเซลลูโลสโชมไปจับกับผิวของสิ่งเอนไซม์จะย่อย (Lamed. 2008) ตัวอย่างโครงสร้างของเซลลูโลสโชมจาก *Clostridium* sp. ดังภาพที่ 2.4

จากการศึกษาโปรตีนแกนหลัก CipC ใน *C. cellulolyticum* ของ Pages *et al.* (1999) ได้อธิบายว่าหน่วยย่อยสำหรับเร่งปฏิกิริยา (catalytic subunit) ของเซลลูโลสโชมจะติดอยู่กับโปรตีนแกนหลัก CipC ซึ่งประกอบไปด้วยโดเมนสำหรับจับกับเซลลูโลส (cellulose binding domain: CBD) โดเมน X สองโดเมน ที่เรียกว่าโดเมน X2 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ และโดเมนที่ซ้ำกันแปดโดเมน ที่เรียกว่า cohesin โดยเอนไซม์แต่ละตัวจะจับกับ CipC ทางโดเมน dockerin ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ทางตำแหน่ง C-terminus ของเอนไซม์ ซึ่งจะมีปฏิสัมพันธ์ต่อ cohesin หนึ่งในแปดของ CipC เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ภาพที่ 2.5) และพบว่าปฏิสัมพันธ์ cohesion dockerin นี้เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการรวมตัวของเซลลูโลโซม โดยพบว่าโดเมน dockerin นี้คือข้อแตกต่างหลักระหว่างเอนไซม์ที่เป็นเซลลูโลโซมกับเอนไซม์ที่ไม่ใช่เซลลูโลโซม เนื่องจากเอนไซม์ที่ไม่ใช่เซลลูโลโซมจะไม่มีส่วนของ dockerin domain (Bayer *et al.* 1998)



ภาพที่ 2.5 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลโซมรอบโปรตีนแกนหลัก CipC ใน *C. cellulolyticum* (Desvaux, 2005).

### 2.3.3 ลักษณะของ Cellulose Binding Domain (CBD)

CBD มีคุณสมบัติเป็น non-hydrolytic สามารถจับกับเส้นใยเซลลูโลสได้ ซึ่งตำแหน่งของการเข้าจับเส้นใยนั้น จะแตกต่างกันไปในแต่ละแฟมิลี เช่น แฟมิลี I จะใช้ด้าน hydrophobic ที่มีกรดอะมิโนไทโรซีนและกลูตามีน สำหรับแฟมิลี II จะใช้ด้าน  $\beta$ -sheet ที่มีกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นตำแหน่งจับ ซึ่งในแต่ละแฟมิลีจะมีความจำเพาะต่อการจับเส้นใยเซลลูโลสที่ต่างกัน โดยส่วนใหญ่แล้ว CBD จะสามารถจับเส้นใยเซลลูโลสในสภาพ crystalline ได้ดีกว่าในสภาพ amorphous ซึ่งมีเพียงไม่กี่แฟมิลีเท่านั้นที่สามารถจับกับเส้นใยเซลลูโลสในสภาพนี้ได้ (Shoseyov and Warren, 1997)

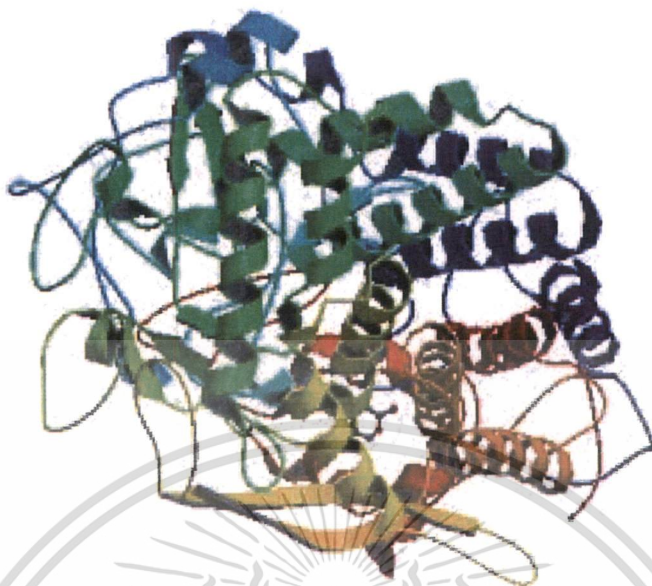
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ที่อยู่ในรูปเซลลูโลโซม พบว่าองค์ประกอบที่อยู่ในเซลลูโลโซมมีความสำคัญ เนื่องจากเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกบทบาทของเซลลูโลโซม (Beguin, 1990) และบางครั้งสามารถทำนายความจำเพาะต่อการจับจับ-

## สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สเตรท ช่วยจำแนกหน้าที่ของโมเลกุล ทราบความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการ และช่วยคาดการณ์ถึง การพับม้วนของโพลีเปปไทด์ได้ โดยใน CAZy ได้ทำการปรับปรุงการแบ่งกลุ่มตามการพับม้วน ของโปรตีน โดยพบว่า การพับม้วนของโปรตีนมีความเป็นลำดับเบสอนุรักษ์ มากกว่าลำดับของ กรดอะมิโน โดย CBD ส่วนใหญ่อยู่ในแฟมิลี I, II และ III สำหรับในแฟมิลี I มาจากเชื้อราเท่านั้น และประกอบด้วยกรดอะมิโน 32-36 หน่วย ส่วนแฟมิลี II และ III จัดเป็นแฟมิลีขนาดใหญ่ พบใน แบคทีเรียมากกว่า 30 ชนิด เช่น *Cellulomonas fimi*, *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน 95-108 หน่วย ส่วน แฟมิลี III ประกอบด้วยกรดอะมิโน 130-172 หน่วย โดยอาจมี CBD 1, 2 หรือ 3 domain ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (Shoseyov and Warren. 1997)

### 2.3.4 เซลลูเลสกลุ่มที่ 48

เอนไซม์เซลลูเลสที่เป็น endoglucanase มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลายเซลลูโลสให้ เป็นสายที่สั้นลง ซึ่งจะทำให้อินไซม์อื่นๆ เข้าทำงาน ได้ดีขึ้น จากฐานข้อมูลพบว่าเอนไซม์ endoglucanase ใน GH 5, 9, 44 และ 48 เป็นเอนไซม์ที่ค้นพบได้จากจุลินทรีย์ประเภทแกรมบวก และมีเพียงส่วนน้อย ที่แยกได้จากแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยในรูเมนของโค (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551) จากฐานข้อมูล CAZy เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส อาศัยการจัดลำดับเบส ด้วยองค์ความรู้ ในส่วนของลำดับกรดอะมิโน ที่เกี่ยวข้องกับแอลกอริทึม (algorithmic methods) สำหรับการ เปรียบเทียบลำดับเบส ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งมีความเกี่ยวข้องกันโดยลำดับเบส การเทียบเคียง และ การม้วนพับของโปรตีน จากการจัดหมวดหมู่โดยอาศัยลำดับเบส สามารถทำนายโครงสร้าง ของโปรตีน โดยไม่ต้องอาศัยหลักฐานทางชีวเคมี ทำนายการทำหน้าที่กลไกการกระทำ และ กลไกในระดับโมเลกุลที่ถูกอนุรักษ์ไว้ จึงจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ได้ และสามารถจำแนกเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 48 (Glycoside Hydrolase Family 48: GH48) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม M (GH=M) คือมีโครงสร้างสามมิติแบบ ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> ตามภาพที่ 2.6 โดยเอนไซม์กลุ่มนี้พบว่ามีคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์อยู่หลายแบบ ได้แก่ endo-glucanase (EC.3.2.1.4), chitinase (EC.3.2.1.14), cellobiohydrolase (EC.3.2.1.91), endoprocessive cellulose (EC.3.2.1.-) และ reducing end หรือ cellobiohydrolase (3.2.1.-) เดิมเคยเรียกเอนไซม์ในแฟมิลีนี้ ว่า cellulose family L ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลส GH48 ส่วนมากจะอยู่ในรูปแบบของ cellulosome (CAZY data base)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างสามมิติแบบ ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> ของ ยีนเซลลูเลส CEL48F โครงสร้างแบบ crystal structure จากเชื้อ *C. cellulolyticum* (CAZypedia, 2012)

Ramirez-Ramirez *et al.* 2008 ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนสองยีนคือ Cel9 และ Cel48 ซึ่งยีน Cel48 glycosyl hydrolase มีรูปแบบโครงสร้างของยีนเป็น cellulosome ที่แทรกสอดในแบคทีเรีย *E.coli* มาจากเชื้อ *Myxobacter sp.* AL-1 พบว่า Cel48 มีกิจกรรมการย่อยสลาย degrading acid-swollen avicel (ASC) ได้ดีกว่า carboxymethylcellulose (CMC) ดังนั้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงอยู่ในกลุ่ม exocellobiohydrolase ส่วน Cel9 ย่อยสลาย CMC ได้ดีที่สุด จึงจัด Cel9 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม endocellulase

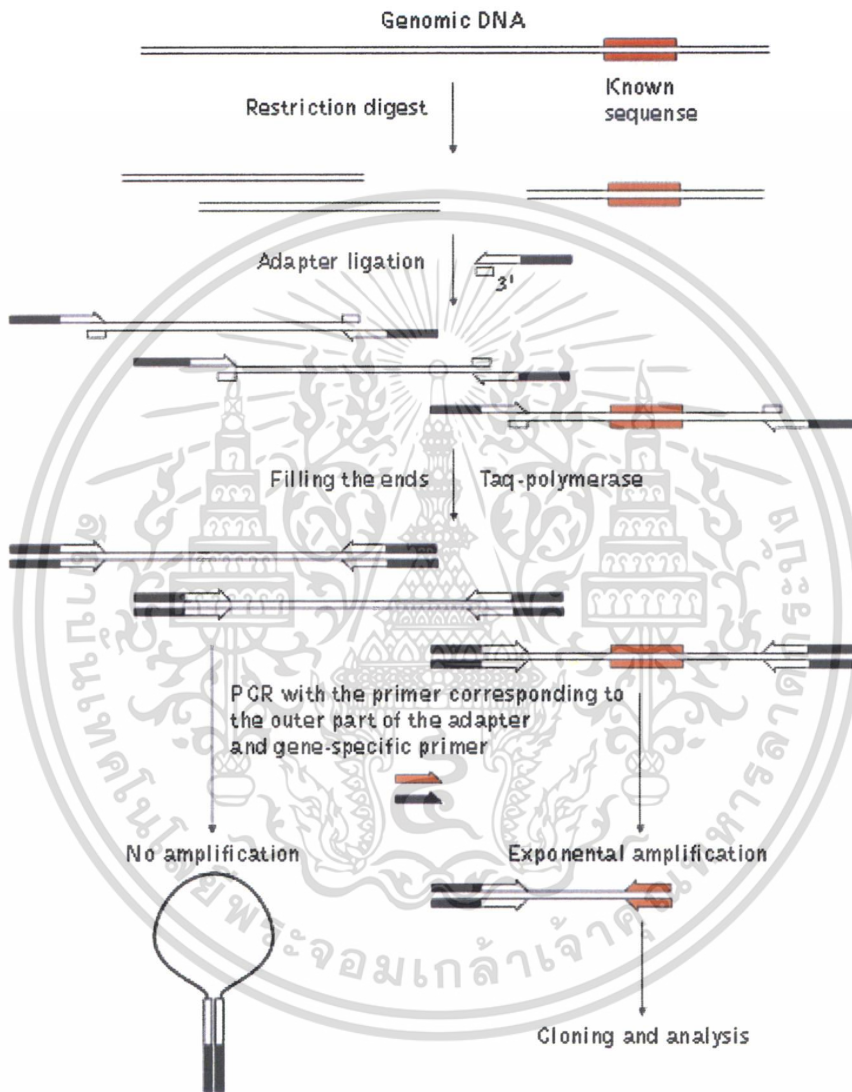
## 2.4 การค้นหาเอ็นที่กำหนดการสร้างเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกส์ไลบรารี

เทคนิคจีโนมิกส์ไลบรารีเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่ใช้ในการคัดแยกยีนที่สนใจจากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นสามารถทำการค้นหาเอ็นที่สนใจจากเชื้อแบคทีเรียได้ ด้วยเทคนิคจีโนมิกส์ไลบรารี แบ่งได้ 2 วิธีหลักๆ คือ

1) Function driven analysis เป็นการคัดแยกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ โดยนำจีโนมิกส์เอ็นเอของแบคทีเรีย มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำชิ้นส่วนของ จีโนมิกส์เอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามขนาดที่ต้องการศึกษา ทำการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ เพื่อหาอินที่กำหนดการสร้าง เอนไซม์ จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (Vercoe *et al.* 1995)



ภาพที่ 2.7 Ligation-mediated PCR โดยวิธี genome walking แบบใช้ adapter (Evrogen. 2013)

2) Sequence driven analysis เป็นการนำโคลนที่สนใจจากเมทาจีโนมิกไลบรารีมาหาลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยตรง หาอินที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เช่น GenBank หรือ CAZy โดยอาศัยเทคนิค hybridization หรือ PCR amplification (Giovannoni *et al.* 1998) ซึ่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน จะทำการออกแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโน บริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเรียกว่า เทคนิค Genome walking มีหลักการคือ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านปลาย 5' และ 3' โดย ออกแบบไพรเมอร์ ให้มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ และทำการเพิ่ม ปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำยีนที่ได้มาตรวจสอบ โดยศึกษาตำแหน่งการซ้อนทับกัน ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (overlapping) จนกว่าจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์ เทคนิค genome walking สามารถทำได้ 2 วิธี คือ (Cui *et al.* 2007)

2.1) Randomly primed PCR การใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับชิ้นส่วนยีน ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม (semi-random primer) ซึ่งไพรเมอร์แบบสุ่มสามารถจับบนชิ้นส่วนจีโนม ของจุลินทรีย์ได้ ตามตำแหน่งต่างๆแบบไม่จำเพาะ จากนั้นทำการเพิ่มชิ้นส่วนของยีนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมจากยีนเดิมที่มีอยู่ จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ สมบูรณ์ของยีนที่ต้องการศึกษา

2.2) Ligation-mediated PCR เป็นหลักการหาชิ้นส่วนของยีนโดย วิธี genome walking แบบใช้ adapter โดยการนำจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำชิ้นยีนที่ได้ ไปเชื่อมต่อกับ adapter หรือส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ โดยปลายของยีนที่มีการ เชื่อมต่อจะมีลักษณะปลายทู่ (blunt-end) จากนั้นเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มี ความจำเพาะกับ adapter และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนภายในสายของยีนที่ทราบลำดับ นิวคลีโอไทด์แล้ว (ภาพที่ 2.7) จะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติม ออกจากชิ้นส่วนยีนที่ได้ ตอนต้นได้ (Evrogen. 2013)

## 2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli*

*E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีการนำมาใช้ในการศึกษา การแสดงออกของโปรตีน มากที่สุด ข้อดีในการเลือกใช้ *E. coli* สำหรับการแสดงออกของยีนคือ มีการผลิตโปรตีนในระดับสูง อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาถูก เลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตเร็ว ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ง่าย แต่มี ข้อจำกัดคือ โปรตีนที่ผลิตได้ไม่สามารถปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ จำเป็นต้องทำการสกัด โปรตีนออกจากเซลล์ก่อน จึงสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้ (Soetaert and Waegeman. 2011) จากการศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์  $\beta$ -1,4-endoglucanase จาก *Bacillus sp.* โดยให้มีการ แสดงออกของยีนใน *E. coli* เมื่อนำยีนมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์พบว่า crude enzyme จาก *E. coli* มีค่าเท่ากับ 720 ยูนิต ส่วน crude enzyme จาก *Bacillus sp.* มีค่าเท่ากับ 360 ยูนิต จึงสรุปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าเอนไซม์  $\beta$ -1,4-endoglucanase จากเชื้อ *E. coli* มีการแสดงออกของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.*

## 2.6 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบันได้มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในระบบอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยเริ่มแรกเป็นการใช้ในอุตสาหกรรมเชิงชีวภาพ ซึ่งเป็นทางเลือกในการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ (Xia and Cen, 1999) ดังตัวอย่างต่อไปนี้

- 1) อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส และแพคติเนส ลงในหญ้าหมัก เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (Cinar, 2005)
- 2) อุตสาหกรรมอาหาร ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ในการผลิตน้ำผลไม้ เพื่อให้ผลไม้ใส ใช้ในการผลิตเบียร์ ไวน์ และใช้เป็นส่วนผสมในการทำเบเกอรี่ (Bhat and Bhat, 1997)
- 3) อุตสาหกรรม โรงชักรีด และ ผลิตผงซักฟอก เอนไซม์เซลลูเลส เช่น EGIII และ CBHI ทั่วไปใช้เป็นส่วนผสมของผงซักฟอกสำหรับทำความสะอาดสิ่งทอต่างๆ โดย EGIII จากเชื้อ *Trichoderma reesei* มีความเหมาะสมสำหรับการใช้ในการผสมลงในผงซักฟอก (Kottwitz and Schambil, 2005)
- 4) อุตสาหกรรมกระดาษ เติมเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงแรก ของการเตรียมการย่อยกระดาษแข็ง เพื่อให้กระดาษแข็งนุ่มขึ้น เพื่อนำกระดาษแข็งไปผ่านกระบวนการย่อยต่อไป (Pastor *et al.* 2001)

ปัจจุบันทั่วโลกเริ่มมีปัญหา การขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิง ซึ่งสวนทางกับการต้องการใช้เชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสจึงเป็นทางเลือกใหม่ ในการหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงแหล่งใหม่ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ ซึ่งเซลลูเลส สามารถย่อยสลายสารชีวมวลที่เหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นสารตั้งต้นของเชื้อเพลิง ไบโอดีเซลได้ (Kasana *et al.* 2008)

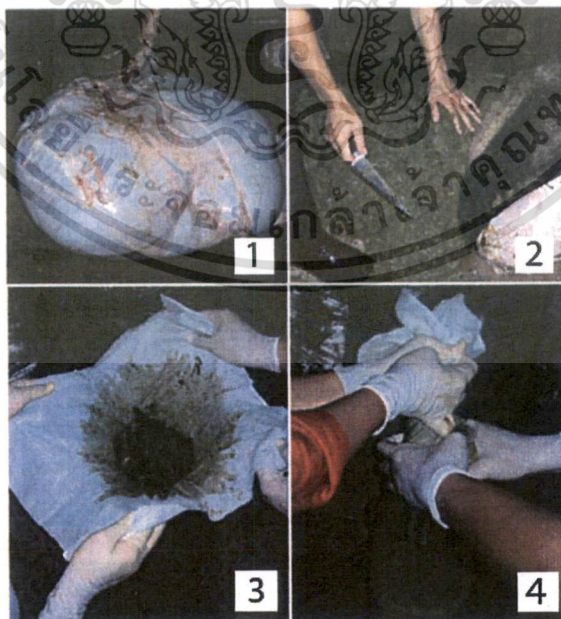
### บทที่ 3

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 การโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

#### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

ในงานวิจัยได้ใช้แบคทีเรียที่อยู่ภายในกระเพาะรูเมนของกระบือเป็นแหล่งค้นหาเอ็นที กำหนดการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 โดยการเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือจาก โรงฆ่าสัตว์จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 3 ตัวและนำมารวมกัน กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบางลงในขวดที่ ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 3.1) นำส่วนของของเหลวที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงโดยแบ่งใส่หลอด 50 ml ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง ละลาย ตะกอนแบคทีเรียซึ่งเป็นชั้นบางๆ ลอยอยู่เหนือชั้นของเศษรูเมนด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 3 ml เขย่าเบาๆให้ส่วนของตะกอนผสมกับน้ำเกลือ แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เก็บ แบคทีเรียที่ -80°C (ศรัณยา สติตมันน์วิวัฒน์, 2551)



ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือเรียงตามลำดับหมายเลข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.2 การสกัดเมทาจีโนมแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

การสกัดเมทาจีโนมจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ทำการตัดแปลงมาจากวิธีการสกัดเมทาจีโนมแบคทีเรียที่รายงานโดย Tajima *et al.* (1999) ด้วยการนำตัวอย่าง 300  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย extraction buffer (ภาคผนวก ก) 300  $\mu$ l (อุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 45 นาที ก่อนนำมาผสม) เติม proteinase K (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.16 mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 60 นาที ทำการบ่มและแช่แข็งซ้ำให้ครบ 3 รอบ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนใสมาสกัดเมทาจีโนมด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) ที่ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่ได้ ผสมเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสชั้นบนสุดมาตกตะกอนเมทาจีโนมด้วยการเติม 5.3 M NaCl และ absolute ethanol 2 เท่าของสารละลายที่ได้ และล้างตะกอนเมทาจีโนมด้วย 70% ethanol หลังจากตกตะกอนแห้งทำการละลายตะกอนของเมทาจีโนมด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และนำสารละลายเมทาจีโนม ไปวัดหาปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของเมทาจีโนมที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง spec-trophotometer (Ultraspec 1100 pro: Amersham Biosciences, UK) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) และ 280 nm (A280) สำหรับการวัด ดีเอ็นเอ และโปรตีนตามลำดับ ความเข้มข้นดีเอ็นเอ ( $\mu$ g/ $\mu$ l) คำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) คูณด้วยจำนวนเท่าของการเจือจางดีเอ็นเอ (dilution factor) คูณด้วย 50  $\mu$ g/ml แล้วหารด้วย 1,000 ประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอได้จากค่า A260/A280 โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรจะมีค่าเท่ากับ 1.8-1.9 (Hoisington *et al.* 1994) เก็บเมทาจีโนมที่ ดีเอ็นเอที่ -20°C

### 3.1.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 1:5 และทำการวิเคราะห์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Fermentas) เชื่อมกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอโดยนำแผ่นเจลอะกาโรสแช่ในสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ที่ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ g/ml เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene genius: Bio Imaging System, Germany) การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่าการแตกหักของ โมเลกุลมากเพียงใดและดีเอ็นเอมีขนาด โมเลกุลหรือมีปริมาณ เท่าไร (สุรินทร์ ปิยะ โขคณากุล. 2545)

### 3.1.4 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์สกลุ่มที่ 48 จากเมทาจีโนมแบคทีเรีย

#### 3.1.4.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ให้เป็น degenerate primer โดยเปรียบเทียบลำดับกรด อะมิโนของเอนไซม์เซลล์สกลุ่มที่ 48 ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล CAZy โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) ทำการเลือกบริเวณที่เป็นลำดับเบสอนุรักษ์ (conserve sequence) สองตำแหน่งที่ห่างกันมาออกแบบไพรเมอร์หัวและท้ายยื่น โดยรหัสสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ ตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสสำหรับออกแบบ degenerate primer

Single Letter Code	Nucleotide
A	Adenosine (A)
C	Cytidine (C)
G	Guanosine (G)
T	Thymidine (T)
I	Inosine (I)
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
K	G or T
M	A or C
N	A or C or G or T
R	A or G
S	C or G
V	A or C or G
W	A or T
Y	C or T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.4.2 การทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส

คัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์กลุ่มที่ 48 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากข้อ 3.1.4.1 คือ ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดยมีขนาดของชิ้นยีนเป้าหมายที่ 1,200 bp ซึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วยเมทาจีโนมที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 200 ng, สารละลาย 1X Taq Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.1% Triton™ X-100), สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 400  $\mu$ M, สารละลาย MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2 mM, ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 ความเข้มข้น อย่างละ 0.4  $\mu$ M, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Vivantis, US) 0.1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler: Biometra, Germany) โดยทำการกำหนดอุณหภูมิและเวลายภายในเครื่อง สำหรับแต่ละขั้นตอนคือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย primer annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% และย้อม แลบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจเช็คแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.1.4.3 สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย GEL Purification Mini Sample kit (Favorgen, Germany) โดยตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม FADF buffer 500  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที กลับหลอดทุก ๆ 3 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด จากนั้นย้ายสารละลายใส่ใน FADF column วางทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติม wash buffer 700  $\mu$ l วางทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างด้วย wash buffer ซ้ำอีกครั้งตามขั้นตอน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้าย spin column ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จึงเติม elution buffer ปริมาตร 50  $\mu$ l (อุณหภูมิ 55°C เวลา 15 นาที) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส 1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.5 การเชื่อมชิ้นส่วนยีนกับพลาสมิดเวกเตอร์

ทำการเชื่อมต่อยีนส่วนที่ยีน (partial gene) เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์ ลงในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวก ข) ตามวิธีการของ InsTAclone™ PCR Cloning Kit Fermentas, USA) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ในปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย 1X Ligation buffer [40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 ที่ 16°C)] พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T 55 ng เอนไซม์ T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์ 150 ng และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

### 3.1.6 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5α

ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Luria-Bertani agar (LB agar) บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Super Optimal Broth (SOB) ปริมาตร 200 ml เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ประมาณ 2-3 วัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm จนได้ค่าประมาณ 0.6 (Inoue *et al.* 1990) จากนั้นนำเชื้อวางไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาละลายด้วยสารละลาย Transformation Buffer (TB) ที่แช่เย็นปริมาตร 40 ml จากนั้นวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็นปริมาตร 10 ml จากนั้นเติม dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7% และวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นแบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ (competent host cell) ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวจนเซลล์แข็งตัวแล้วเก็บเซลล์ที่ -80°C

### 3.1.7 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

ถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ โดยวิธี Heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ที่แช่แข็งปริมาตร 100 µl ในข้อ 3.1.6 ทำให้ละลายโดยบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นใส่สารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนยีนกับพลาสมิดเวกเตอร์ ในข้อ 3.1.5

ปริมาณ 10  $\mu$ l ผสมเบาๆ ให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกประมาณ 800  $\mu$ l และทำการละลายตะกอนกับสารละลายที่เหลือ นำสารละลายไปเกลี่ย (spread) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Ampicillin 100  $\mu$ g/ml IsopropylB-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.2 mM/ml และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-Dgalactoside (X-gal) ความเข้มข้น 0.2  $\mu$ g/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

### 3.1.8 การคัดเลือกโคโลนีเป้าหมาย

คัดเลือกโคโลนีที่มีการถ่ายพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue/white screening ซึ่งโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีเป้าหมาย เพราะยีน lacZ บริเวณ multiple cloning site ของ pTZ57R/T (Fermentas, USA) เมื่อถูกแทรกด้วยชิ้นยีนจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ไปย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า จึงได้โคโลนีสีขาวแทน จึงเลือกโคโลนีสีขาวเก็บเป็น master plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เพื่อนำไปตรวจสอบการแทรกสอดของพลาสมิดลูกผสมต่อไป

### 3.1.9 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid)

#### 3.1.9.1 การสกัดแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis

นำโคโลนีที่มีการแทรกสอดชิ้นยีนมาเพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 100  $\mu$ g/ml ปริมาตร 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 1 นาที ทิ้งส่วนอาหารและละลายตะกอนที่เหลือด้วย Alkaline lysis I (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200  $\mu$ l แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ต่อมาเติม Alkaline lysis II (ภาคผนวก ก) 400  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 300  $\mu$ l กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนสุดประมาณ 600  $\mu$ l ใส่ในหลอดทดลอง 1.5 ml และเติม isopropanol 600  $\mu$ l กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 10 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 10 นาที เทของเหลวทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50  $\mu$ l จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8%

### 3.1.9.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการแทรกสอดของ ชิ้นยีนเป้าหมายด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดยใช้พลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.1.9.1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยวิธีการ ตามข้อ 3.1.4.2 ในกรณีที่พลาสมิดเวกเตอร์มีการแทรกของชิ้นส่วนของยีนเป้าหมาย เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แล้วควรจะพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 bp จากนั้นนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปเช็คการแทรกของชิ้นส่วนยีนอีกครั้ง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 3.1.9.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเช็คพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.1.9.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xba*RI (Fermentas, Canada) เนื่องจากเวกเตอร์ pTZ57R/T มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้สามารถตรวจสอบการแทรกสอดของชิ้นยีน เพื่อดูรูปแบบของพลาสมิดเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 10  $\mu$ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, IX buffer Tango™ with BSA (33 mM Tris-acetate (pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM magnesium acetate, 6.6 mM potassium acetate, 0.01 mg/ml BSA) ปริมาตร 1  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xba*RI ตัวอย่างละ 3 ยูนิต จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำปฏิกิริยาไปตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% หลังจากตรวจสอบการแทรกสอดของชิ้นยีน ทำการสุ่มเลือกพลาสมิดที่มีการตรวจพบการแทรกสอดของชิ้นยีนในขนาดที่ต้องการ ทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extration Mini Kit (Favorgen, Austrai) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base, มาเลเซีย) ด้วยไพรเมอร์ M13F เป็นไพรเมอร์ด้าน forward และไพรเมอร์ M13-pUC เป็นไพรเมอร์ด้าน reverse เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.1.9.4 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ Mini Kit

ทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extration Mini Kit (Favorgen, Austrai) นำโคลนที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Ampicillin 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำไปสกัดแยกพลาสมิดด้วยการละลายตะกอนเซลล์โดยใช้ FAPD1 buffer 250 µl เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม FAPD2 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 3-5 ครั้ง เติม FAPD3 350 µl ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ใน FAPD column ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนล่าง เติม W1 buffer 400 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เวลา 1 นาที ทิ้งส่วนล่าง เติม Wash buffer 250 µl ทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เวลา 1 นาที ทิ้งส่วนล่าง จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ทิ้งคอลัมน์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติม elution buffer 50 µl (อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้กับ pTZ57R/T (2,886 bp) และแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Fermentas) โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%

### 3.1.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ดูเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) หรือความคล้าย (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล หาบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) เพื่อยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ได้ เป็นยีนเซลล์ลูเลสในกลุ่มที่ 48

### 3.1.11 การหานิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนโดยวิธี genome walking ด้วยเทคนิค Ligation mediated PCR

#### 3.1.11.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.1.10 มา alignment กัน ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์สกรูมที่ 48 จากฐานข้อมูลของ CAZy มาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาส่วนยื่นต่อจากชิ้นส่วนยีนที่ได้ โดยใช้โปรแกรม BioEdit ทำการออกแบบ forward primer จากปลายทางด้าน 5' และ reverse primer จากปลายด้าน 3' ของชิ้นส่วนยีนที่เป็นยีนต้นแบบด้านละสองเส้น (GSP1 และ GSP2)

#### 3.1.11.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Mini Kit

สกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) โดยนำจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 3.1.9.3 มาเติมสารละลาย PB buffer ปริมาตรหนึ่งเท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นย้ายสารละลายใส่ใน spin column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติม PE buffer ปริมาตร 750  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย spin column ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม elution buffer 50  $\mu$ l (อุณหภูมิที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ในเจลอะกาโรส 1%

#### 3.1.11.3 การเชื่อมต่อเมทาจีโนมิกไลบรารีกับ GenomeWalker adaptor

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.1.11.2 มาเชื่อมต่อกับ GenomeWalker adaptor (Clontech, USA) โดยในปฏิกิริยา 8  $\mu$ l ประกอบด้วย digested DNA 400 ng, 25  $\mu$ M Genome Walker adaptor, 2X ligation buffer และ T4 DNA ligase 3 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จึงเติม TE buffer 72  $\mu$ l ทำการเก็บสต็อกที่ -20°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

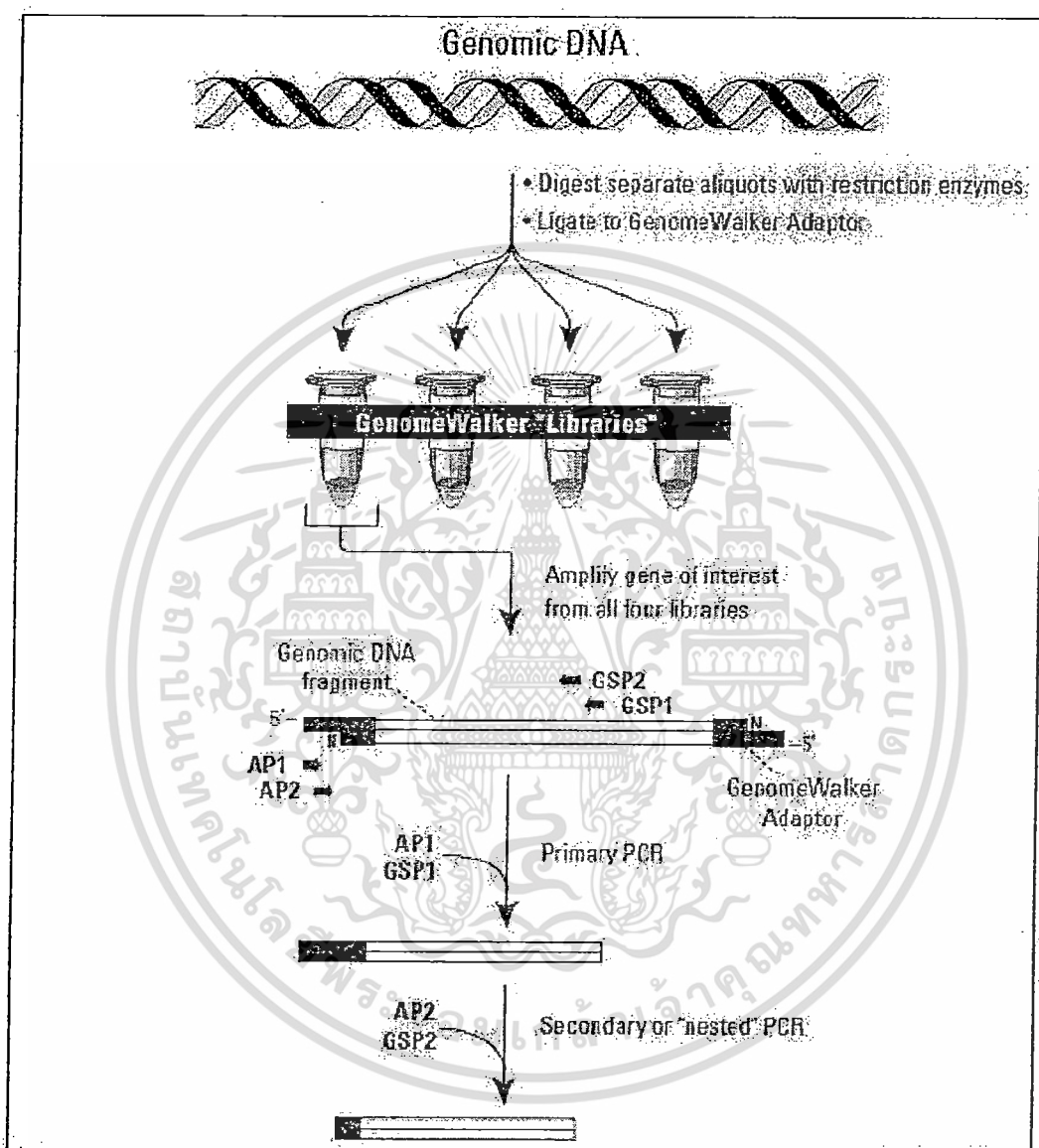
### 3.1.11.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การหาส่วนของยีนโดยใช้ Genome Walker adaptor อาศัยการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 รอบ (nested PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวนสองคู่ ในปฏิกิริยารอบที่ 1 (primary PCR) ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor ตำแหน่งที่ 1 (AP1) คู่กับ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิมตำแหน่งที่ 1 (GSP1) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 มาเพิ่มความจำเพาะของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการทำปฏิกิริยารอบที่ 2 (secondary PCR) โดยเปลี่ยนไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor ตำแหน่งที่ 2 (AP2) และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิมตำแหน่งที่ 2 (GSP2) ตามภาพที่ 3.2

Primary PCR ปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วย DNA library 0.5  $\mu$ l, 1x*Tth* PCR reaction buffer (40mM Tris-HCl (pH 9.3 ที่ 25°C), 15 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100), 1X advantage genomic polymerase mix (0.1-0.2 units/ $\mu$ l *Tth* DNA polymerase, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l *Tth* Start antibody, 1.0% glycerol, 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.6 mM KCl, 1.1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M dNTP, 0.2  $\mu$ M AP1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (Clontech, US), 0.2  $\mu$ M GSP1 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ขั้นตอนคือ วงรอบที่ 1 ให้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที ตามด้วย primer annealing ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 7 รอบ ต่อจากนั้นทำวงรอบที่ 2 ให้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที ตามด้วย primer annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 32 รอบ extension 60°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรส 1% และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบแล้วมาเป็น DNA template สำหรับการทำให้ secondary PCR

Secondary PCR ทำการเจือจางดีเอ็นเอจาก primary PCR ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1:100ส่วน ในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วย 1x*Tth* PCR reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 9.3 ที่ 25°C), 15 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100), 1X advantage genomic polymerase mix (0.1-0.2 units/ $\mu$ l *Tth* DNA polymerase, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l *Tth*Start antibody, 1.0% glycerol, 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.6 mM KCl, 1.1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M dNTP, 0.2  $\mu$ M AP2: 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' (Clontech, US), 0.2  $\mu$ M GSP2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ขั้นตอนคือ วงรอบที่ 1 ให้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที ตามด้วย

primer annealing ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 7 รอบ ต่อจากนั้นทำวงรอบที่ 2 ให้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที ตามด้วย primer annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็น



ภาพที่ 3.2 การทำปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ GenomeWalker™ Universal Kit (ดัดแปลงจาก Anonymous. 2012)

เวลา 3 นาที จำนวน 32 รอบ extension 60°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรส 1% จากนั้นทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์แล้วทำการโคลนตามวิธีในข้อ 3.1.5-3.1.8 และสุ่มเลือกโคลนเป้าหมายไปตรวจสอบการแทรกสอดของยีนด้วยวิธี size screening

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.11.5 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการตัดโดยให้ชิ้นส่วนของยีนเป็นปลายตัด (blunt end) เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับ adaptor ของชุด Genome Walker™ universal kit (Clontech, US) ได้ โดยทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ 4 เอนไซม์ คือ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะจะสับตัดบนจีโนมิกดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้เคียงกับชิ้นส่วนยีน จนสามารถทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 100  $\mu$ l ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย เมทาจีโนมิกดีเอ็นเอ 3.5  $\mu$ g, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 100 ยูนิต, สารละลาย 1X restriction enzyme buffer และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1%

### 3.1.11.6 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening

เก็บโคลนด้วยไม้ปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงใน lysis buffer ที่อุณหภูมิ 25  $\mu$ l คนให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายส่วนใสไปตรวจสอบขนาดในเจลอะกาโรส 0.8% จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคลนที่มีการแทรกสอดของยีนไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

## 3.2 การคัดเลือกยีน Cel48 จากเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

จากผลผลิตลูกผสมเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* จากการทำ genome walking เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนจากชิ้นส่วนยีนที่ได้ เมื่อพบว่าไม่มีโคลนใดที่มีส่วนของยีนที่ต้องการเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน ดังนั้นการคัดเลือกชิ้นยีนที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ ที่มีเฉพาะส่วนของ mature gene สามารถดูการแสดงออกของยีนได้ จากการหาชิ้นส่วนของยีนเซลล์กลุ่มที่ 48 จากข้อ 3.1.4.2 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมส่วนของ mature gene ที่มี catalytic domain และเป็นยีนเซลล์ในกลุ่มที่ 48 ที่คัดเลือกได้จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ จึงเริ่มต้นเพิ่มปริมาณยีน Cel48 จากแบคทีเรียที่มีการแทรกสอดของยีน Cel48 เพื่อดูการแสดงออกในของยีนใน *E. coli* จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฐานข้อมูล CAZy (<http://www.cazy.org>) ยีนเซลลูเลสในกลุ่มที่ 48 มักจะประกอบด้วยสองโดเมนหลัก ได้แก่ CBD และ catalytic domain จากการทดลองของ Taguchi *et al.* (2004) พบว่าเมื่อนำเพียงส่วน catalytic domain ของ GH5 ที่ได้จาก *R. albus* ทำการแสดงออกใน *E. coli* เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ และจากการทดลองของ บุษยฉัญญ์ รุ่งรัตนกลิน (2554) พบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน catalytic domain ของยีนเซลลูเลส ในยีสต์ *Kluyveromyces lactis* สายพันธุ์ GG799 โดยใช้เวกเตอร์ pKLAC2 จึงคาดว่าโอกาสที่จะพบโดเมนเซลลูเลสของยีน Cel48 จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ ที่สามารถทำงานได้ในแบคทีเรีย *E. coli* เช่นกัน จากการคัดเลือกเฉพาะโดเมนเซลลูเลสของพลาสมิดลูกผสม ที่ทำการแทรกโดเมนเซลลูเลสไว้แล้ว สามารถออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อนำไปตรวจสอบ การแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) (Novagen, Germany) และ pBAD-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, 2009)

### 3.2.1 การแสดงออกของยีนในระบบ pET28a(+)

#### 3.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์ ระบบ pET28a(+)

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับคัดเลือกยีน Cel48 จากพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/Cel48 เพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET28a(+) (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการ โคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดในชิ้นส่วนยีนของเรา แต่ตัดที่เวกเตอร์ ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a(+) นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม webcutter2.0 (<http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/>) ซึ่งไพรเมอร์ mature gene ของยีน Cel48MT03 ทำการออกแบบไพรเมอร์ 2 เส้น คือ Cel48pET28F สำหรับด้าน forward และ Cel48pET28R สำหรับด้าน Reward ที่ตัดส่วนของ signal peptide โดยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล CAZy (<http://www.cazy.org/fam/GH48.html>) ร่วมกับโปรแกรม SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ออกไป เนื่องจากในเซลล์ *E. coli* โปรตีนสายผสมจะไม่มี post-translational modification เป็นการคัดเลือกเฉพาะยีนในส่วนที่เป็นโดเมนของเซลลูเลส ซึ่งมีขนาด 1,200 bp โดยแต่ละไพรเมอร์จะเติมตำแหน่งตัดของเอนไซม์ (restriction site enzyme) จำเพาะในเวกเตอร์บริเวณ cloning site และไม่มีตำแหน่งตัดภายในยีน เพื่อให้ยีนสามารถเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ ซึ่งเอนไซม์ที่เลือกสำหรับตัดชิ้นยีนคือ *XhoI* และ *NcoI*

### 3.2.1.2 การเตรียมยีนเซลล์ในในระบบ pET28a(+)

นำไพรเมอร์มาทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส โดยปฏิกิริยาปริมาตร 25  $\mu$ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 200 ng, 1X Taq Buffer (160 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 500 mM Tris-HCl (pH 9.2 ที่ 22°C), 17.5 mM  $\text{MgCl}_2$  และ 0.1% Triton™ X-100), 200  $\mu$ M dNTP, ไพรเมอร์ความเข้มข้นอย่างละ 0.4  $\mu$ M, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Vivantis, USA) 0.1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนอื่นเป้าหมายโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler: Biometra, Germany) โดยทำการกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 นาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วย GEL Purification Mini Sample kit (Favorgen, Taiwan) ตามวิธีการข้อ 3.1.4.3 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xho*I โดยทำการตัดเอนไซม์พร้อมกันสองตัว โดยปฏิกิริยา 30  $\mu$ l ประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์, 1X restriction buffer, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ยูนิตต่อดีเอ็นเอ 100 ng ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) ตามข้อ 3.1.11.3 นำปฏิกิริยาที่ได้ตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1%

### 3.2.1.3 การเตรียมเวกเตอร์ pET28a(+) และเชื่อมต่อยีนเข้าสู่เวกเตอร์

เวกเตอร์ pET28a(+) (Novagen, Germany) (ภาคผนวก ข) เป็นเวกเตอร์สำหรับใช้ในการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* โดยเวกเตอร์มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ kanamycin การเตรียมเวกเตอร์ ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pET28a(+) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.1.9.1 และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามวิธีในข้อ 3.2.1.2 จากนั้นเชื่อมต่อยีนและเวกเตอร์ที่เตรียมไว้ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ตามวิธีการข้อ 3.1.5

### 3.2.1.4 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์สำหรับการแสดงออกของยีน ในระบบ

#### pET28a(+)

เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแสดงออกของยีน (expression host) จะต้องมีระบบในการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับเวกเตอร์ pET28a(+) โดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (strain) คือ สายพันธุ์ BL21 (Novagen, USA) ตัวเชื้อไม่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะใช้ทั่วไปสำหรับระบบ โปรโมเตอร์ (promoter) เป็นระบบที่ทำให้ผลผลิตโปรตีนถูกทำลายน้อยที่สุด สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS (Novagen, USA) เป็น host ที่มีประสิทธิภาพในการแสดงออกโปรตีนสูง มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ ยีน T7 gene 1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG จะถ่ายทอดรหัสเป็น T7 polymerase สำหรับรองรับการแสดงออกของเวกเตอร์ที่มี T7 promoter และ สายพันธุ์ Rosetta(DE3) (Novagen, USA) เป็นสายพันธุ์ที่แยกมาจาก BL21 ถูกออกแบบให้เพิ่มการแสดงออกโปรตีนยูคาริโอท (eukaryotic protein) ประกอบด้วยรหัสที่หายาก (rare codon) ใน *E. coli* โดย Rosetta(DE3) จะให้ tRNA สำหรับรหัส rare Ile codon (AUA), rare Arg codon (AGA และ AGG), rare Leu codon (CUA), rare Pro codon (CCC) และ rare Gly codon (GGA)

การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ทำการดัดแปลงจากวิธีของ (Sambrook et al. 1989) เริ่ม BL21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะ ส่วน BL21(DE3)pLysS และ Rosetta(DE3) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ chloramphenicol 34 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm เลี้ยงจนได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3-0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นแบ่งเชื้อลงหลอดทดลอง หลอดละ 50 ml และวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และเก็บตะกอนเซลล์มาละลายด้วย 0.1 M MgCl<sub>2</sub> ที่แช่เย็น ปริมาตร 10 ml ละลายตะกอนและวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำการละลายตะกอนซ้ำด้วยสารละลาย MgCl<sub>2</sub> อีก 1 รอบ จากนั้นทำการเก็บตะกอน โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 ml และใส่ glycerol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30% จากนั้นเก็บเชื้อที่ -80°C

### 3.2.1.5 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับการแสดงออกของยีน

(Expression host)

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ จากข้อ 3.2.1.3 ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วทำการเลือกโคลนด้วยวิธี size screening เปรียบเทียบกับเวกเตอร์ pET28a(+) คัดเลือกโคลนที่มีขนาดใหญ่กว่า pET28a(+) ไปตรวจสอบด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Cel48pet\_F และ Cel48pet\_R จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกสอดนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ expression host ทั้ง 3 ชนิดโดยใช้วิธี heat shock ตามข้อ 3.1.7 จากนั้นนำเซลล์ที่มีนิวคลีโอไทด์เชื่อมต่อบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับ เวกเตอร์ และ host แต่ละชนิด เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคลนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.2.2 การแสดงออกของยีนในระบบ pBAD TOPO® vector

#### 3.2.2.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์สำหรับการแสดงออกของยีน ในระบบ pBAD TOPO

การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ ทำการตัดแปลงจากวิธีของ (Sambrook et al. 1989) เลี้ยง Top10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ส่วน LMG194 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ streptomycin 40  $\mu\text{g/ml}$  ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm เลี้ยงจนได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3-0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นแบ่งเชื้อลงหลอดทดลอง หลอดละ 50 ml และวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และเก็บตะกอนเซลล์มาละลายด้วย 0.1 M  $\text{MgCl}_2$  ที่แช่เย็น ปริมาตร 10 ml ละลายตะกอนและวางไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำการละลายตะกอนซ้ำด้วยสารละลาย  $\text{MgCl}_2$  อีก 1 รอบ จากนั้นทำการเก็บตะกอน โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 ml และใส่ glycerol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30% จากนั้นเก็บเชื้อที่ -80°C

### 3.2.2.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีนกับ expression เวกเตอร์

ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนกับเวกเตอร์ด้วยวิธีการของ pBAD TOPO® TA Expression Kit ของ Invitrogen Version N 13 April 2004 เป็นการเชื่อมต่อชิ้นยีนด้วยเทคนิค TA cloning โดยปฏิกิริยารวม 6  $\mu$ l ประกอบด้วย ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 ในข้อ 3.1.4.2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 2  $\mu$ l, Salt solution 1  $\mu$ l, TOPO® vector 0.5  $\mu$ l และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 22°C 15 นาที

### 3.2.2.3 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้า Expression host ในระบบ pBAD TOPO

ถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ Top10 โดยดัดแปลงวิธี Heat shock จาก (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ที่แช่แข็งปริมาตร 100  $\mu$ l ในข้อ 3.1.6 ทำให้ละลายโดยบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นใส่สารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนยีนกับพลาสมิดเวกเตอร์ ในข้อ 3.2.2.2 ปริมาตร 6  $\mu$ l ผสมเบาๆ ให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกประมาณ 800  $\mu$ l และทำการละลายตะกอนกับสารละลายที่เหลือ นำสารละลายไปเกลี่ย (spread) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Ampicillin 100  $\mu$ g/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

Host LMG194 จะใช้ในกรณีของยีนที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์มีขนาดใหญ่ หรือมีการผลิตยีนในกลุ่มที่ทำให้เกิด Toxic gene กับเซลล์ในปริมาณมาก ทำให้ Top10 ไม่สามารถผลิตยีนตัวนั้นได้ จึงจำเป็นต้องใช้ LMG194 ในการผลิตยีนที่ต้องการ โดย LMG194 จะกดโปรโมเตอร์ในกระบวนการสังเคราะห์ยีน ทำให้เกิดการสังเคราะห์ยีนในปริมาณน้อยๆ ทำให้ไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์สามารถทำการสังเคราะห์ยีนที่ต้องการได้ต่อไป

การถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมลงใน LMG194 ทำการสกัดยีนที่มีลำดับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องมาจาก Top10 ตามวิธีการสกัดข้อ 3.1.9.4 จากนั้นถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมตามวิธีการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ Top10 โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมียาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ Ampicillin 100  $\mu$ g/ml และ Streptomycin 50  $\mu$ g/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเก็บโคโลนีที่มีการแทรกสอดของชิ้นยีนที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.2.4 การออกแบบไพรเมอร์

จะใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 สำหรับด้าน Forward และไพรเมอร์ Cel48\_R1 จากข้อ 3.1.4.1 เนื่องจากทั้ง 2 เส้นครอบคลุมเส้น partial gene และจะใช้ start codon ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO

### 3.2.2.5 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูลัส จากพลาสมิดลูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ลูลัสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในขั้นตอนนี้จะใช้พลาสมิดลูกผสม Cel48MT03 ที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.1.10 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng , 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3 (ที่ 42 องศาเซลเซียส) , 500 mM KCl , 25 mM MgCl<sub>2</sub> และ 0.01% gelatin) , 10 mM dNTP Mix , 0.5  $\mu$ M Forward primer และ 0.5  $\mu$ M Reverse primer , *Taq* DNA polymerase (vivantis<sup>®</sup>) 1 U ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยา แล้วนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1% แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Gel Purification Mini sample Kit (Favorgen<sup>®</sup>)

### 3.2.2.6 การโคลนชิ้นส่วนยีนเซลล์ลูลัส สู่วีเรียลเวกเตอร์และคัดเลือกโคลนด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์จากข้อ 3.2.2.5 มาเชื่อมต่อเข้ากับ pBAD-TOPO<sup>®</sup> vector ในปริมาตร 6  $\mu$ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ 4  $\mu$ l , Salt Solution 1 $\mu$ l และ pBAD-TOPO<sup>®</sup> vector 1  $\mu$ l ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์นี้ จะทำที่อุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียส เมื่อเปิดสารครบทุกตัวผสมกันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว เป็นเวลา 5-10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ขึ้นอยู่กับขนาดของยีน) จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ One Shot® TOP10 *E.coli* โดยใส่สารละลาย ดีเอ็นเอสายผสม 2 µl ลงในหลอด TOP10 *E.coli* ปริมาตร 100 µl ผสมโดยการใช้มือตะขางหลอด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที 5 นาที ต่อมาเติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 µl นำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubate shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 µg/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏ มาทำเป็น master plate โดยเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับ ยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 µg/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Cel48\_F1 และไพรเมอร์ Cel48\_F2 เพื่อเช็คนิรันแรกว่ามี ชิ้นส่วนยีนเซลล์ลูเลสในดีเอ็นเอสายผสมดังกล่าว จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis ต่อไป

### 3.2.2.7 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

นำโคลนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 3 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้งเหลือตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม Alkaline lysis I (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเติม Alkaline lysis II (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 µl ผสมให้เข้ากัน กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากันกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนปริมาณ 600 µl ใส่ไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ต่อมาเติม isopropanol ปริมาตร 600 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 µl จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8%

### 3.2.2.8 การตรวจสอบพลาสมิดถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์

ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pBAD-TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit จะต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์เพื่อเชื่อมที่ขึ้นยีนที่แทรกเข้าไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ถูกทิศทางหรือไม่ (5'-3') เนื่องจากเวกเตอร์ดังกล่าวสามารถเกิดการแทรกของยีนได้ทั้ง 2 ทิศทาง โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเซลล์ที่เชื่อมต่อเข้ากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO เข้าโปรแกรม webcutter2.0 เลือก 1 เอนไซม์ ที่สามารถตัดยีนเบต้ากลูโคซิเดสได้ 1 ตำแหน่ง และสามารถตัดในเวกเตอร์ได้อีก 1 ตำแหน่ง จากนั้นคำนวณขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดได้ทั้ง 2 ชิ้น โดยใช้โปรแกรม Serial Cloner เวอร์ชัน 2.1

### 3.2.2.9 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen)

เลือกโคลนที่มีการแทรกอย่างถูกทิศทาง มาทำการสกัดพลาสมิด โดยบีบ 3 ml จาก bacteria culture ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ใช้บีบหลอดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ FAPD1 ปริมาตร 250  $\mu$ l แล้วละลายตะกอนด้วยบีบ 3 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 250  $\mu$ l พลิกหลอดไปมาอย่างเบาเมื่อ ตั้งไว้ 2 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 350  $\mu$ l แล้วพลิกหลอดไปมา 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที บีบสารละลายดังกล่าว มาใส่ใน FADP column (ระวังตอนบีบตะกอนสีขาวอาจฟุ้ง) จากนั้นวางทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ทำการล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ทำการล้าง column ครั้งที่ 2 โดยการเติม wash buffer ปริมาตร 750  $\mu$ l วางทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย FADP column มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ วางทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 40  $\mu$ l ตั้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มา ตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8% และทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 3.2.2.10 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.2.2.9 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ปริมาตร 2 ml เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 1-2 จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100  $\mu$ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัด  $OD_{600}$  ได้ประมาณ 0.5 จึงทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม L-arabinose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% , 0.02% , 0.002% , 0.0002% และ 0.00002% โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย L-arabinose เขย่าต่อที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE วิธีการในข้อ 3.2.2.11

### 3.2.2.11 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.2.2.10 ผสมกับ 5X SDS dye loading buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 จากนั้นนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ในเจล polyacrylamide ที่มีความเข้มข้นของเจลชั้นล่าง (separating gel) 12% และความเข้มข้นของเจลชั้นบน (stacking gel) 4% โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7×10×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้ไฟฟ้าขนาด 20 mA ต่อเจล เป็นเวลา 80 นาที ใช้ PageRuler Plus Prestained Protein ladder (Fermentas, Canada) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน และใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า เมื่อครบกำหนดเวลา นำเจลไปย้อมด้วย coomassie blue staining buffer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย destaining buffer นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีน

### 3.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนเซลล์ในแบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ LMG194

#### 3.2.3.1 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน LMG194

นำพลาสมิดจากข้อ 3.2.2.9 คือ Cel48PT6 มาทำการถ่ายฝากชิ้นพลาสมิด-เวกเตอร์อีกครั้ง (Re-transform) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน(host express) LMG194 โดยเปิดสารละลายดีเอ็นเอสายผสม 2  $\mu$ l ใส่ลงในหลอด *E.coli* LMG194 ปริมาตร 100  $\mu$ l ผสมโดยการใช้มือตะขางหลอด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อมาเติม S.O.C. medium ปริมาตร 250  $\mu$ l นำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubate shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100  $\mu$ g/ml และ streptomycin 50  $\mu$ g/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏ มาทำเป็น master plate โดยเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100  $\mu$ g/ml และ streptomycin 50  $\mu$ g/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Cel48\_F1 และไพรเมอร์ Cel48\_R1 แล้วนำมาเช็คในเจลอะกาโรส 1.0%

#### 3.2.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.2.3.1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RM medium + 0.2% glucose (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100  $\mu$ g/mlm และ streptomycin 50  $\mu$ g/ml ปริมาตร 2 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 1-2 จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100  $\mu$ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RM medium + 0.2% glycerol (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100  $\mu$ g/mlm และ streptomycin 50  $\mu$ g/ml เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัด  $OD_{600}$  ได้ประมาณ 0.5 จึงทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม L-arabinose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% , 0.02% , 0.002% และ 0.00002% โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย L-arabinose เขย่าต่อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์

โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE วิธีการในข้อ 3.2.2.11

### 3.3 การสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer L1

นำตะกอนเซลล์แช่แข็งจากข้อที่ 3.2.2.10 และ 3.2.3.2 วางบนน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นละลายเซลล์แบคทีเรียด้วย lysis buffer L1 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.3) ปริมาตร 200  $\mu$ l (cell 3.0 OD) เติม 100 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) ปริมาตร 10  $\mu$ l และ 100 mg/ml lysozyme ปริมาตร 30  $\mu$ l จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม 1 M MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 5  $\mu$ l และ DNase ปริมาตร 1  $\mu$ l นำไปบ่มต่อที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เก็บ total enzyme ที่ -20°C (ควรเก็บที่ 4°C ไม่เกิน 7 วัน หลังจากทำการสกัดโปรตีน สำหรับนำไปวิเคราะห์โปรตีนขั้นต่อไปให้ได้ผลดีที่สุด)

### 3.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

ใช้วิธี Bradford assay หรือ BioRad assay ซึ่งเป็นการหาโปรตีน โดยอาศัยหลักการความสมมูลระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 3 รูป และการรวมตัวของ Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีนแบบเฉพาะเจาะจง ภายใต้สภาวะกรดเข้มข้น Coomassie Brilliant Blue G-250 จะให้สีน้ำตาลออกแดง เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนมาก สีที่เปลี่ยนไปจะยิ่งเข้มข้น ซึ่งเราสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่อง spectro-photometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm (ชญาภา นิ่มสุวรรณ. 2550) วิธีนี้ให้ผลรวดเร็ว ขั้นตอนการทำงานง่าย และไม่ต้องอาศัยความร้อน โดยวิธีการเริ่มต้นจากการเจือจางน้ำยาลวัดโปรตีน BioRad Protein Assay Reagent (Biorad, US) ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:4 ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีนโดยใช้ bovine serum albumin : BSA (Serva, US) ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml ผสมกับน้ำยาลวัดโปรตีน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 595 nm นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานคำนวณสมการถดถอย  $y = ax + b$  โดยค่า  $y$  เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA จากนั้นนำโปรตีนที่ต้องการวัดความเข้มข้น จากข้อ 3.3 ปริมาตร 20  $\mu$ l ผสมกับน้ำยาลวัดโปรตีน (Biorad, US) ที่เจือจางแล้ว 500  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (หรือไม่เกิน 1 ชั่วโมง) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 nm นำค่าที่ได้ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนในสมการเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

### 3.5 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme 100  $\mu$ l ผสมกับ carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 1% (w/v) ที่ละลายใน สารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH 6 ปริมาตร 300  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 600  $\mu$ l (บุษยฉัตร รุ่งรัตนกลิน. 2554) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar (Miller. 1959) นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ reducing sugar จากกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน โดย 1 ยูนิตของเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้ reducing sugar 1  $\mu$ M/min ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ (Li *et al.* 2009)

#### 3.5.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีน โดยนำ bovine serum albumin: BSA (Fluka, USA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาอย่างละ 20  $\mu$ l ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีน Biorad protein assay (Biorad, USA) 1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปแสดงกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการถดถอย  $y=ax+b$  โดยค่า  $y$  เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

จากนั้นนำโปรตีนที่ต้องการวัด 20  $\mu$ l ละลายในน้ำยาโปรตีน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น โดยแทนค่า  $y$  ด้วยค่าการดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาค่า  $x$  (ความเข้มข้นของสารละลาย) เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในรูเมนของกระบือ หลังจากวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก ส่วนอนุรักษ์ของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 และนำผลผลิตพีซีอาร์ไปเชื่อมต่อกับ พลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสที่ได้ มาวิเคราะห์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน ด้วยวิธี Genome walking เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน แต่พบว่าการทำ Genome walking เพื่อให้ได้ยีนเต็มเส้นในงานวิจัยนี้ไม่ประสบผลสำเร็จจึงใช้เพียงชิ้นยีนเซลลูเลสของยีนที่เป็น โดเมนหลัก (catalytic domain) ในกลุ่มยีนเซลลูเลส กลุ่มที่ 48 แล้ว และคาดว่าน่าจะเกิดการแสดงออกของยีนให้เป็นเอนไซม์ได้ จึงทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากพลาสมิดเวคเตอร์ลูกผสมที่ได้ แล้วโคลนยีนที่โคลนในเวคเตอร์และเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกยีน เพียงเพิ่มจำนวนแล้วจึงชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นนำผลผลิตโปรตีนที่ได้ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและการทำงานของโปรตีน โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ

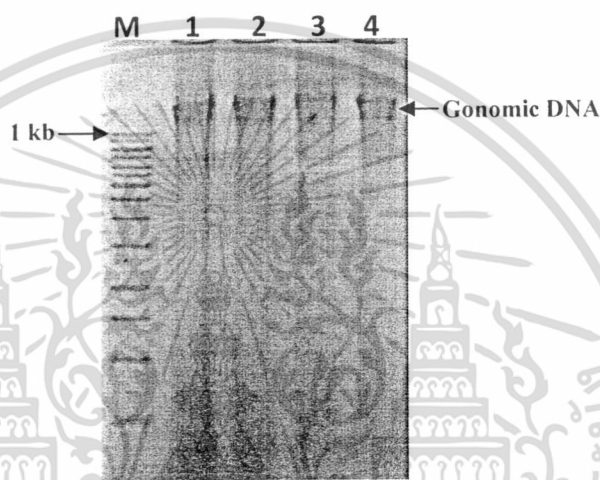
#### 4.1 การโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

##### 4.1.1 การสกัดเมทาจีโนมแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอตัวอย่างจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือ ตามวิธีการที่ทำการดัดแปลงมาจากวิธีของ Tajima *et al.* (1999) แล้วทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 0.895  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า  $A_{260}/A_{280}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

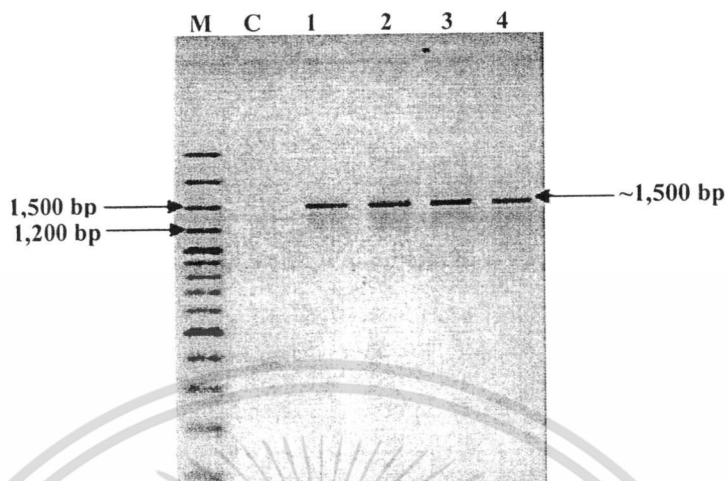
เท่ากับ 1.643 แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนเล็กน้อย โดยพิจารณาจากค่า  $A_{260}/A_{280}$  ประเมินไว้ว่าดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่าเท่ากับ 1.8-1.9 จากการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส 0.8 % พบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอปรากฏอยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) ที่มีขนาด 10 kb (ภาพที่ 4.1) และจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไปตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วย ปรากฏาถูกโซ่โพลีเมอเรส



ภาพที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ห่ออิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ของ จีโนมิกดีเอ็นเอโดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder และ 1-4 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียในรูเมน

โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ 16S rDNA ที่ออกแบบโดย Kanokratana *et al.* (2004) คือ BSF8/20 primer : 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3' และ REV8 primer : 5'-GGTACC TTGTTACGACTT-3' จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ไปวิเคราะห์หั่นอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus Ladder พบแถบดีเอ็นเอตามคาดหมายที่ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.2) สอดคล้องกับ Maciel *et al.* (2009) ที่รายงานว่าการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA จากจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จะมีขนาดประมาณ 1,500 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

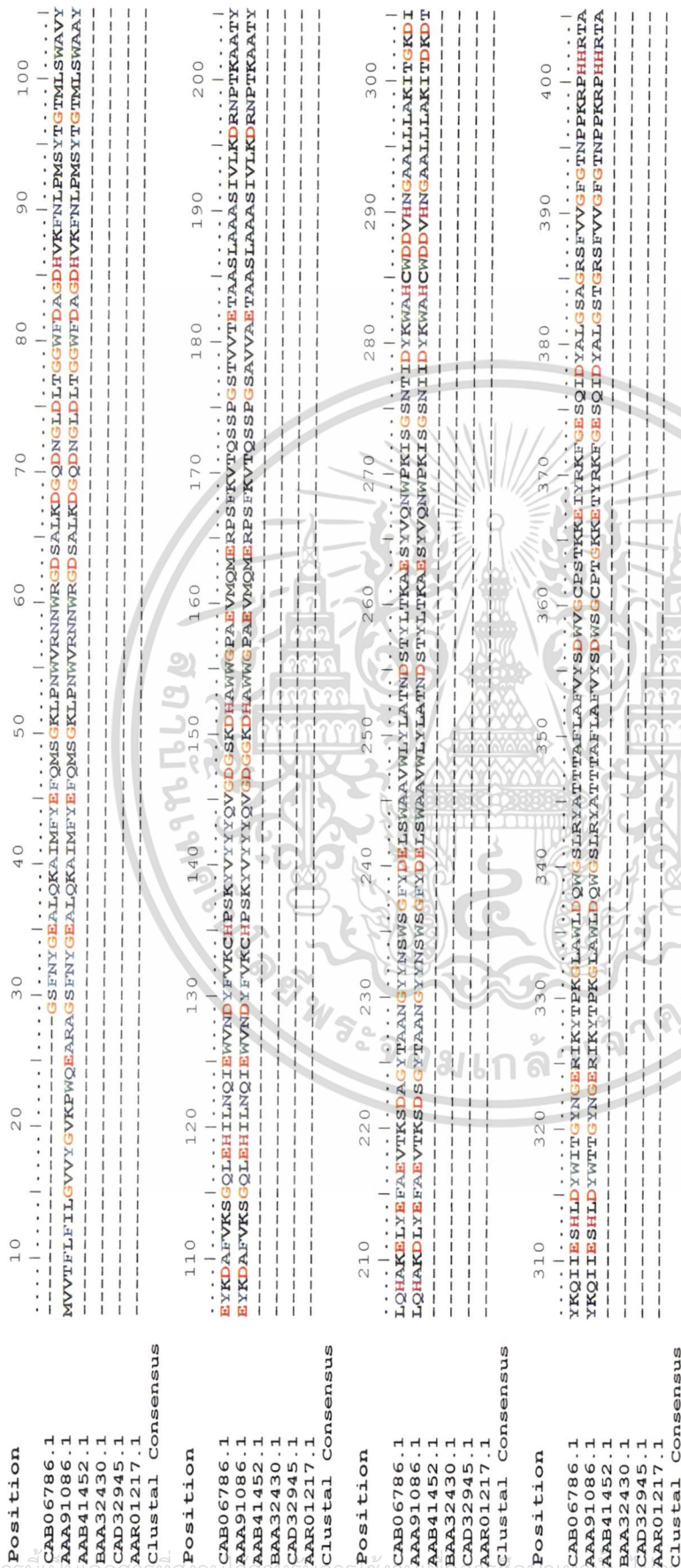


ภาพที่ 4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ BSF และ RIVB (Kanokratana *et al.*, 2004) ทำการตรวจสอบด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder 100 ng , C คือ negative control ที่ไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ และ 1-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้จีโนมดีเอ็นเอทั้ง 4 หลอดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

#### 4.1.2 การออกแบบ degenerate primer

ออกแบบไพรเมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ เอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จาก *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725 (CAB06786.1), *C. saccharolyticus* (AAA91086.1), *Clostridium cellulolyticum* H10 (AAB41452.1), *Cl. josui* (BAA32430.1), *Ruminococcus albus* 8 (AAR01217.1) และ *Paenibacillus barcinonensis* (CAD32945.1) ในฐานข้อมูล CaZy (<http://www.cazy.org/fam/GH48.html>) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) ซึ่งได้เลือกบริเวณลำดับอนุรักษ์ (conserve sequence) สองตำแหน่งเป็น ส่วนหัวและท้ายของชิ้นส่วนยีน (ภาพที่ 4.3) ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ โดยปกติจะมีความยาวประมาณ 15-30 nucleotides มี GC content ประมาณ 50% หรือมากกว่าได้ ด้วยการเลือกลำดับกรดอะมิโนที่เรียงต่อกัน 6 ตัว จากบริเวณอนุรักษ์ปลาย N (5') และปลาย C (3') โดยเลือกบริเวณที่มี Consensus มากที่สุด ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์จะต้องแปลรหัสเป็นนิวคลีโอไทด์ ทำให้ไพรเมอร์ที่ได้เป็น degenerate primer เนื่องจาก primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของ amino acid sequence

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การออกแบบไพรเมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ catalytic domain เอนไซม์เซลลูโลสกลุ่มที่ 48 จากฐานข้อมูล : *Caldicellulosiruptor*

*bescii* DSM 6725 (CAB06786.1), *C. saccharolyticus* (AAA91086.1), *Cl. cellulolyticum* H10 (AAB41452.1), *Cl. josui* (BAA32430.1), *Paenibacillus barcinonensis* (CAD32945.1) และ *Ruminococcus albus* 8 (AAR01217.1) โดยกรอบสี่เหลี่ยมคือบริเวณลำดับอนุรักษ์ที่เลือกสำหรับการออกแบบไพรเมอร์, (\*) ลำดับโปรตีนที่มีความเหมือนกัน 100%, (:) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และ (.) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันปานกลาง



<b>Position</b>	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
CAB06786.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAA91086.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAB41452.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAA32430.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CAD32945.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAR01217.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Clustal Consensus</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Position</b>	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CAB06786.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAA91086.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAB41452.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAA32430.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CAD32945.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAR01217.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Clustal Consensus</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Position</b>	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
CAB06786.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAA91086.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAB41452.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAA32430.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CAD32945.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAR01217.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Clustal Consensus</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Position</b>	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
CAB06786.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAA91086.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAB41452.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAA32430.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CAD32945.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AAR01217.1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>Clustal Consensus</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**ภาพที่ 4.3** การออกแบบไพรเมอร์ โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ catalytic domain เอนไซม์เซลลูโลสที่ 48 จากฐานข้อมูล : *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725 (CAB06786.1), *C. saccharolyticus* (AAA91086.1), *Cl. cellulolyticum* H10 (AAB41452.1), *Cl. josui* (BAA32430.1), *Paenibacillus barcinonensis* (CAD32945.1) และ *Ruminococcus albus* 8 (AAR01217.1) โดยกรอบสี่เหลี่ยมคือบริเวณลำดับอนุกรมวิธานที่เลือก สำหรับการออกแบบไพรเมอร์, (\*) ลำดับโปรตีนที่มีความเหมือนกัน 100%, (:) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และ (.) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันปานกลาง (ต่อ)



Position	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
CAB06786.1	VKS	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAA91086.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAB41452.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
BAA32430.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
CAD32945.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAR01217.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Clustal Consensus	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Position	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
CAB06786.1	AGTKKYG	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAA91086.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAB41452.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
BAA32430.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
CAD32945.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAR01217.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Clustal Consensus	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Position	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
CAB06786.1	GDVIK	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAA91086.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAB41452.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
BAA32430.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
CAD32945.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAR01217.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Clustal Consensus	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Position	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
CAB06786.1	NQ	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAA91086.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAB41452.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
BAA32430.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
CAD32945.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
AAR01217.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Clustal Consensus	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

**ภาพที่ 4.3** การออกแบบไพรเมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ catalytic domain เอนไซม์ชุดลูกลิดสกลุ่มที่ 48 จากฐานข้อมูล : *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725 (CAB06786.1), *C. saccharolyticus* (AAA91086.1), *Cl. cellulolyticum* H10 (AAB41452.1), *Cl. josui* (BAA32430.1), *Paenibacillus barcinonensis* (CAD32945.1) และ *Ruminococcus albus* 8 (AAR01217.1) โดยกรอบสี่เหลี่ยมคือขอบบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่เลือกสำหรับการออกแบบไพรเมอร์, (\*) ลำดับโปรตีนที่มีความเหมือนกัน 100%, (:) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และ (.) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันปานกลาง (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิฉะนั้นให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ได้มาจากการทำ multiple sequence alignment codon ของกรดอะมิโน ซึ่งมีการเรียงตัวของ นิวคลีโอไทด์ได้หลายรูปแบบเพราะเป็น nucleotide sequence ที่ได้มาจากการแปลง amino acid sequence กลับมาเป็น nucleotide sequence จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมทุกรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Ratanasut. 2013) นอกจากนี้ยังได้เลือกใช้ inosine ที่มีการจับอยู่ 3 แบบคือ I-U, I-A และ I-C ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) โดยนิวคลีโอไซด์ เป็นสารที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลเพนโทสกับเบสไนโตรเจนเท่านั้น มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -N-glycosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล (Liu and Nichols. 1994) เพื่อเพิ่มโอกาสในการจับลำดับเบสได้หลากหลายขึ้น โดยมีรหัสสำหรับ degenerate primer ดังตารางที่ 4.1 ทำให้ได้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ ส่วนหัวของชิ้นส่วนยีน forward primer ชื่อ Cel48\_F1: 5'-GARGCICCN GAYTA YGGN CAY-3' กับส่วนท้ายของชิ้นส่วนยีน reverse primer ชื่อ Cel48\_R1: 5'-GAICCN GGR TCISSRTANACIGG-3' ซึ่งคาดว่าจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,200 bp

ตารางที่ 4.1 ผลการออกแบบ degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ เซลลูเลสกลุ่มที่ 48

ก. forward primer (Cel48\_F1)

Amino acid sequence	E	A	P	D	Y	G	H
Codon	GAA	GCN	CCN	GAC	TAC	GGN	CAC
	G			T	T		T
Single letter code (primer)	GAR GCI CCN GAY TAY GGN CAY						

ข. reverse primer (Cel48\_R1)

Amino acid sequence	P	V	Y	R	D	P	G	S
				A				
Codon	CCN	GTN	TAC	CGN	GAC	CCN	GGN	TCN
			T	GCN	T			
Single letter code (primer)	CCN	GTN	TAY	SSN	GAY	CCN	GGN	TCN
Reverse complement (primer)	GAI CCN GGR TCN SSR TAN ACI GG							

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.3 คัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์กลุ่มที่ 48 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ผลการคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลล์กลุ่มที่ 48 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 ที่ออกแบบและใช้อุณหภูมิในขั้นตอน primer annealing ที่แตกต่างกันสี่อุณหภูมิ คือ 45, 50, 55 และ 60°C ตามลำดับ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดที่คาดหวังคือประมาณ 1,200 bp โดยแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากอุณหภูมิในการ annealing ที่ 50°C มีความชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 4.4)



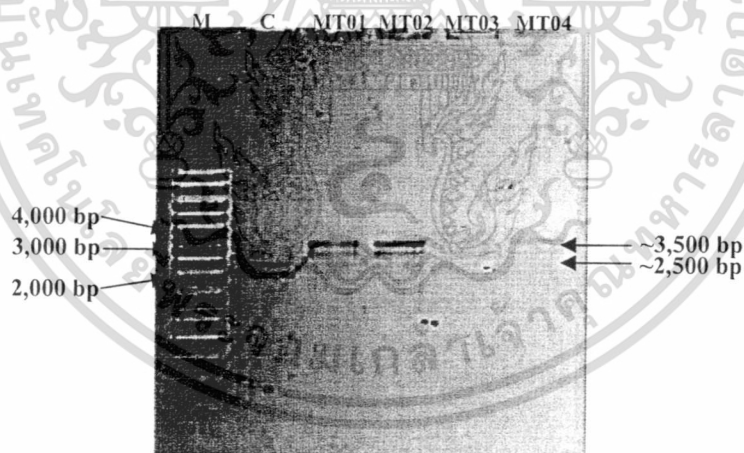
ภาพที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), C คือ Negative Control ที่ไม่มีจีโนมิกดีเอ็นเอ pTZ57R/T และ 1-4 คือผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้อุณหภูมิ primer annealing ที่ 45, 50, 55 และ 60°C ตามลำดับ

#### 4.1.4 การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์

จากการโคลนผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดได้ลงในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas, USA) แล้วถ่ายเข้าสู่คอมพิเทนดเซลล์ของ *E. DH5 $\alpha$*  ด้วยวิธี heat shock และทำการคัดเลือกโคโลนีที่ถูกแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเซลล์กลุ่มที่ 48 ด้วยวิธี blue/white screening ผลปรากฏว่าพบโคโลนีสีขาว 4 โคโลนี ซึ่งคาดว่าจะมีเป็นโคโลนีเป้าหมายในงานอาหาร เนื่องจาก pTZ57R/T มีบริเวณ lacZ gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase โดยการย่อย X-gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วยผลผลิตพีซีอาร์ ที่บริเวณ lacZ gene จะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

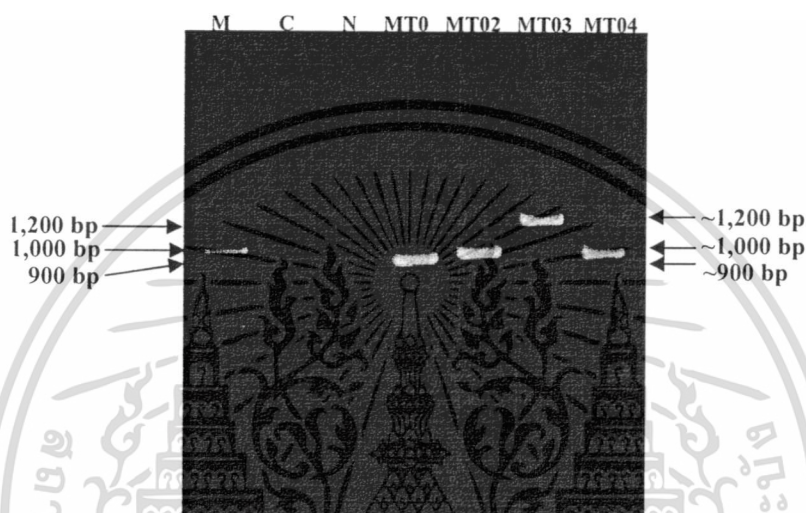
ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เป็นผลให้ไม่เกิดการย่อย X-gal จึงได้โคโลนีสีขาวแทน (Fermentas, Canada) จึงนำโคโลนีสีขาวของโคลนทั้ง 4 คือ Cel48MT01, Cel48MT02, Cel48MT03, และ Cel48MT04 ไปตรวจสอบด้วยวิธีสกัดแยกพลาสมิด โดยพลาสมิดที่ทำการโคลนสำเร็จควรมีขนาดประมาณ 4,000 bp เพราะยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 1,200 bp รวมกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ที่มีขนาด 2,886 bp ทั้งนี้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอสามารถเกิดรูปร่างได้ 3 แบบ คือ supercoiled มีขนาดเล็กที่สุดจึงเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด ส่วน nicked circular จะมีความใหญ่กว่า และ linear จึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า โดยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่เป็นสัดส่วนเท่ากับค่า logarithm ของน้ำหนักโมเลกุล (ชัยชนม์. 2556) จากผลการตรวจสอบพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยเจลอะกาโรส พบว่าพลาสมิดที่มีการแทรกสอดของชิ้นยีนมีขนาดประมาณ 3,000 และ 3,500 bp และพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ที่ไม่มีการแทรกของชิ้นส่วนยีน (negative control) มีขนาดประมาณ 2,000 และ 2,500 bp (ภาพที่ 4.5) จากการเทียบขนาดพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T กับพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการแทรกสอดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ มีขนาดของยีนต่างกันประมาณ 1,000 bp จึงคาดว่าโคลนทั้ง 4 มีการแทรกสอดของชิ้นยีน Cel48 และเมื่อตรวจสอบ



ภาพที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีสีขาว โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder, C คือ พลาสมิด pTZ57R/T, MT01 คือ พลาสมิดโคลนที่ 1 ชื่อ Cel48MT01, พลาสมิดโคลนที่ 2 ชื่อ Cel48MT02, พลาสมิดโคลนที่ 3 ชื่อ Cel48MT03 และ พลาสมิดโคลนที่ 4 ชื่อ Cel48MT04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมิดที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส เพื่อยืนยันว่ามีการแทรกของชิ้นส่วนยีน Cel48 ภายในเวกเตอร์ pTZ57R/T โดยใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดระหว่าง 900-1,200 bp (ภาพที่ 4.6) ซึ่งมีเพียงโคลนเดียวที่มีขนาดของชิ้นยีนตามที่คาดหวัง คือ โคลนที่ 3 จากนั้นนำทั้ง 4 โคลน ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็ก โทร โฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder, C คือ Control ที่ไม่มีพลาสมิดเวกเตอร์, N คือ Negative Control ที่มีเฉพาะพลาสมิด pTZ57R/T, MT01 คือ พลาสมิดโคลนที่ 1 ชื่อ Cel48MT01, MT02 คือ พลาสมิดโคลนที่ 2 ชื่อ Cel48MT02, MT03 คือ พลาสมิดโคลนที่ 3 ชื่อ Cel48MT03 และ MT04 คือ พลาสมิดโคลนที่ 4 ชื่อ Cel48MT04

#### 4.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ว่ามีการแทรกของชิ้นส่วนยีนภายในเวกเตอร์ pTZ57R/T อย่างแน่ชัดแล้วจึงนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base, Malaysia) ผลที่ได้จากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนดังกล่าวพบว่า โคลน Cel48MT03 มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,126 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าโคลน Cel48MT03 มีค่าความเหมือน (identity) เท่ากับ 84% ของยีน GH 48 จากเชื้อ *R. champanellensis* type strain 18P13T draft genome (FP929052.1), 77% ของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cel48MT03 กับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ Blastn ในฐานข้อมูลของ NCBI

Description	Gene	Source	Accession	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>R. champanelensis</i> type strain 18P13T draft genome	GH 48	<i>R. champanelensis</i> 18P13	FP929052.1	293	370	67%	2e-75	84%
Uncultured organism clone 1466158_16310 gene complete cds	carbohydrate-active enzyme (SARM_0053)	cow rumen	HQ706057.1	854	854	100%	0.0	77%
<i>R. albus</i> 7 complete genome	cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	Ruminal Bacterium	CP002403.1	331	401	83%	1e-86	70%
<i>R. albus</i> complete cds	GH 48 cellulase	<i>R. albus</i>	AB557697.1	331	401	83%	1e-86	70%
<i>R. albus</i> strain 20	Cel48A gene	rumen cellulolytic bacterium	FM872296.1	315	393	83%	7e-80	70%
<i>R. albus</i> complete cds	Cel48A gene	<i>R. albus</i> 8	AY422811.1	309	388	83%	3e-80	70%

carbohydrate-active enzyme (SARM\_0053) จากเชื้อ Uncultured organism clone 1466158\_16310 complete cds (HQ706057.1) และ 70% ของยีน cellulose 1,4-beta-cellobiosidase จากเชื้อ *R. albus* 7 complete genome (CP002403.1), ยีน GH 48 cellulase จากเชื้อ *R. albus* complete cds (AB557697.1), ยีน Cel48A จากเชื้อ *R. albus* strain 20 (FM872296.1) และ ยีน Cel48A ของเชื้อ *R. albus* complete cds (AY422811.1) ตามตารางที่ 4.2 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โคลน Cel48MT03 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,126 bp มีความเหมือนกับยีนในกลุ่ม เซลลูเลสมากกว่าหรือเท่ากับ 70% (Tajima *et al.* 1999) จึงคาดเดาได้ว่า Cel48MT03 น่าจะเป็นยีน เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 และพบว่าเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของโคลน Cel48MT03 (ภาพที่ 4.7) ทำการเปรียบเทียบการแปลค่าความเหมือนของโปรตีนโดยโปรแกรม Blastp โดยการ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ข้างต้น พบว่า โคลน Cel48MT03 มีค่าความเหมือน(identity) ของโปรตีนเท่ากับ 68% ของยีน GH protein จาก เชื้อ *R. flavefaciens* (WP\_009987706.1), 56% ของยีน GH48 จากเชื้อ *uminococcus champanellensis* 18P13 (YP\_007829324) และ 53% ของยีน cellulose 1,4-beta-cellobiosidase จาก เชื้อ *R. albus* 7 (YP\_004105715 ), ยีน Cel48A protein precursor จากเชื้อ *R. albus* (CAS03459.1), ยีน Cel48A จากเชื้อ *R. albus* (AAR01217.1) และ ยีน putative cellulose 1,4-beta-cellobiosidase ของเชื้อ *R. albus* (WP\_002848405) ตามตารางที่ 4.3 และพบว่า กรดอะมิโนของ Cel48MT03 อยู่ใน ส่วนของ Multi-domains ของยีนกลุ่ม GH48 ที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์กลุ่ม endoglucanase EC:3.2.1.4 และ exoglucanase EC:3.2.1.91 (ภาพที่4.8) ซึ่งกรดอะมิโนของ Cel48MT03 มีลำดับ กรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์เหมือนกลุ่มยีนเซลลูเลส ตามภาพที่ 4.9 เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) พบว่าโคลน Cel48MT03 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับยีน GH protein จากเชื้อ *R. flavefaciens* (WP\_009987706.1) และ GH48 จากเชื้อ *uminococcus champanellensis* 18P13 (YP\_007829324) (ภาพที่ 4.10) และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน บอกได้ว่ายีน Cel48MT03 คือยีนในกลุ่ม GH48 ซึ่งสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่ง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cel48MT03 อยู่ในกลุ่มยีนเซลลูเลส ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ของ Cel48MT03 จึงเป็นยีนเซลลูเลสในกลุ่ม GH48 ซึ่งได้ทำการระบุว่าโคลน Cel48MT03 เป็นยีนที่ได้ จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ ที่ทำการคัดเลือกมาจากเมทาจีโนมิกส์เอ็นเอ และเป็น ดีเอ็นเอรวมของแบคทีเรียที่อยู่ภายในกระเพาะรูเมน

## Cel48MT03

1	GAG	GCG	CCG	GAC	TAC	GGT	CAT	GAG	ACA	ACT	TCT	GAG	GCA	ATG	TCT	45
1	Glu	Ala	Pro	Asp	Tyr	Gly	His	Glu	Thr	Thr	Ser	Glu	Ala	Met	Ser	15
46	TAT	ATC	GTA	TGG	ATC	GCT	TCT	ATG	CAC	GAT	GTT	CTC	GCT	AAG	AAG	90
16	Tyr	Ile	Val	Trp	Ile	Ala	Ser	Met	His	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Lys	30
91	GGC	GTT	ATC	GAC	GGA	AGC	GCT	GAT	GCT	CTC	CCC	AAG	GCT	TGG	AAG	135
31	Gly	Val	Ile	Asp	Gly	Ser	Ala	Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Trp	Lys	45
136	ACC	CTT	GAG	GCT	ATG	ATC	CCT	GGC	TGG	TCT	AAG	GCT	TCA	GGC	AGA	180
46	Thr	Leu	Glu	Ala	Met	Ile	Pro	Gly	Trp	Ser	Lys	Ala	Ser	Gly	Arg	60
181	GAC	GAC	ATC	GAG	TAT	GAG	ACT	CTC	TGG	AAG	CAG	GAG	AGA	CTT	AAG	225
61	Asp	Asp	Ile	Glu	Tyr	Glu	Thr	Leu	Trp	Lys	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	75
226	GCT	GAT	CCC	GCT	AAC	GAA	GAG	GAT	AAG	CCC	GAG	AGC	TAC	CCT	GCT	270
76	Ala	Asp	Pro	Ala	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Pro	Ala	90
271	AAG	AAG	GCT	AAC	GGT	GAG	GCT	ATC	AAC	CCC	ATG	TTC	AAG	ACC	TTT	315
91	Lys	Lys	Ala	Asn	Gly	Glu	Ala	Ile	Asn	Pro	Met	Phe	Lys	Thr	Phe	105
316	GCT	TCA	GCT	TAC	GGT	TCA	GAC	AAG	GGC	TAC	TAC	CTC	ATG	AAC	TGG	360
106	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ser	Asp	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asn	Trp	120
361	CTC	GCT	GAC	GTT	GAC	GAC	TGG	TAT	GGC	TTC	GGC	GGC	GGC	AAC	GGC	405
121	Leu	Ala	Asp	Val	Asp	Asp	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	135
406	AAA	TTC	ACA	TTC	ATC	AAC	ACA	TTC	CAG	CGT	GGT	GAG	CAG	GAG	TCC	450
136	Lys	Phe	Thr	Phe	Ile	Asn	Thr	Phe	Gln	Arg	Gly	Glu	Gln	Glu	Ser	150
451	TGT	TTC	GAG	ACT	GTT	CCT	CAT	CCC	TGT	CTT	GAA	GAG	CTC	AAG	TAC	495
151	Cys	Phe	Glu	Thr	Val	Pro	His	Pro	Cys	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Tyr	165
496	AGT	AAC	AAA	GAG	ACC	GGT	ATC	AAG	GGT	ATC	TTC	AAC	GGA	AGC	GAA	540
166	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Ile	Lys	Gly	Ile	Phe	Asn	Gly	Ser	Glu	180
541	GTT	CCT	TCT	CAG	TAT	GCG	TTC	ACA	AAC	GCT	CCT	GAC	GCT	GAG	GAC	585
181	Val	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Ala	Pro	Asp	Ala	Glu	Asp	195
586	CGT	GCT	ATC	CAG	GCT	GTA	TAT	TTC	GCA	AAC	CGC	AAC	GGC	GTT	GAC	630
196	Arg	Ala	Ile	Gln	Ala	Val	Tyr	Phe	Ala	Asn	Arg	Asn	Gly	Val	Asp	210
631	TGC	GGA	GAG	ATT	TCC	GGT	CTT	GCT	GGT	AAG	ATG	GGT	GAC	CAG	TGC	675
211	Cys	Gly	Glu	Ile	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Lys	Met	Gly	Asp	Gln	Cys	225
676	CGT	AAC	GAT	ATG	TTC	GAT	AAG	TAC	TAC	AAG	AAG	CTC	GGC	TGC	CAG	720
226	Arg	Asn	Asp	Met	Phe	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Leu	Gly	Cys	Gln	240
721	AAC	ATC	AAC	CCT	GAG	TCA	GCA	GGC	TTC	GAC	AGC	CAG	CAC	TTC	CTC	765
241	Asn	Ile	Asn	Pro	Glu	Ser	Ala	Gly	Phe	Asp	Ser	Gln	His	Phe	Leu	255
766	ATG	TCA	TGG	TAT	ACT	TCA	TGG	GGC	GGA	GCT	CTT	ACT	GCT	GAA	TAC	810
256	Met	Ser	Trp	Tyr	Thr	Ser	Trp	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	Glu	Tyr	270
811	GGC	AAT	TAC	AGC	TGG	GCT	TGG	CAG	ATC	GGC	TGC	TCA	CAC	TCA	CAT	855
271	Gly	Asn	Tyr	Ser	Trp	Ala	Trp	Gln	Ile	Gly	Cys	Ser	His	Ser	His	285
856	CAG	TTC	TAT	CAG	AAT	CCT	CTC	GCT	GCT	TAC	GGC	CTT	ATC	TAT	GAT	900
286	Gln	Phe	Tyr	Gln	Asn	Pro	Leu	Ala	Ala	Tyr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Asp	300
901	AAG	AGC	ATC	AAC	GGC	GGT	ATG	AAG	GCT	GAA	AAG	GCT	ACC	GAG	GAC	945
301	Lys	Ser	Ile	Asn	Gly	Gly	Met	Lys	Ala	Glu	Lys	Ala	Thr	Glu	Asp	315
946	TAT	AAG	ATG	TCT	CTC	CAG	AGA	CAG	ATC	GAG	CTC	TAT	CAG	TGG	CTC	990
316	Tyr	Lys	Met	Ser	Leu	Gln	Arg	Gln	Ile	Glu	Leu	Tyr	Gln	Trp	Leu	330
991	CAG	TCT	GTT	GAC	GGT	CCT	TTC	GCA	GGC	GGA	TGT	ACA	AAC	TCT	TAC	1035
331	Gln	Ser	Val	Asp	Gly	Pro	Phe	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Asn	Ser	Tyr	345
1036	AGA	GGA	CGT	TAC	GAG	AAG	TAT	CCG	GAA	GGC	TAT	CCT	ACC	TTC	TAT	1080
346	Arg	Gly	Arg	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly	Tyr	Pro	Thr	Phe	Tyr	360
1081	GAT	ATG	GTT	TAT	GTT	CCC	CAC	CCC	GTG	TAT	CCC	GAC	CCA	GGC	TCA	1125
361	Asp	Met	Val	Tyr	Val	Pro	His	Pro	Val	Tyr	Pro	Asp	Pro	Gly	Ser	375

#### ภาพที่ 4.7 การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cel48MT03 ให้เป็นกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ความเหมือนลำดับกรดอะมิโนของ Cel48MT03 กับฐานข้อมูลของโปรตีนจากการ Blastp ในฐานข้อมูลของ NCBI

Description	Gene	Source	Accession Protein	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>R. flavefaciens</i>	GH 48 protein	<i>R. flavefaciens</i>	WP_009987706.1	525	524	100%	5e-176	68%
<i>uminococcus champanelensis</i>	GH 48	<i>R. champanelensis</i>	YP_007829324	401	401	100%	5e-129	56%
18P13		18P13						
<i>R. albus</i> 7	cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	cellulolytic ruminal bacterium	YP_004105715	361	361	100%	7e-113	53%
<i>R. albus</i>	Cel48A protein precursor	rumen cellulolytic bacterium	CA.S03459.1	359	359	100%	3e-112	53%
<i>R. albus</i> 8	Cel48A	<i>R. albus</i> 8	AAR01217.1	358	358	100%	9e-112	53%
<i>R. albus</i>	putative cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	<i>R. albus</i>	WP_002848405	358	358	100%	9e-112	53%

## Conserved domains on [Cel17625]

[View concise result](#)

Cel48MT03

**Graphical summary** [show options](#)

Query seq. Multi-domains Glyco\_hydro\_48

**List of domain hits**

Description	Pssmid	Multi-dom	E-value
Glyco_hydro_48 [pfam02011] Glycosyl hydrolase family 48. Members of this family are endoglucanase EC:3.2.1.4 and exoglucanase EC:3.2.1.91 enzyme	216844	yes	4.72e-97
Glycosyl hydrolase family 48; Members of this family are endoglucanase EC:3.2.1.4 and exoglucanase EC:3.2.1.91 enzymes that cleave cellulose or related substrate.			

Cd Length: 615 Bit Score: 304.43 E-value: 4.72e-97

```

10      20      30      40      50      60      70      80
17625  1  EAPDYGHETTSEAMetSYIVWIASMethdvlakKGVIDGSADALPKAWKTLFAMeTIPGWSKASGRDDIEYETlwkqerl 80
Cdd:pfam02011 36  EAPDYGHETTSEAF--SYLWLEAM-----YGRLTGDWSGFNKAWDVMPKY-MIPTETDQPTNSSYNPNK----- 97

90      100     110     120     130     140     150     160
17625  81  KADPANEEDKFESEYPAKKAAGEAINPMETFKTPASAYGSDKGYVLMetNWLADYDWTYGGF---EGNGKFTFINTFQRGE 157
Cdd:pfam02011 98  RAPIAPEPECPFSMYPQLDFGVFVGSDDPIHNELRSTVGPSPD-VYGM--HMLLDVNDWYGGFarpGAATGPSYINTFQRGE 174

170     180     190     200     210     220     230     240
17625  158 QESCFETVHPCLEELAYSNKkEtSIRKGFNGSEVPS-QYAFINAPDAEDRAIQAVYFANRNGVDG---EISGLAGK-ME 232
Cdd:pfam02011 175 QESVWETVPEQSWDEFYGGK-NFLDLDFPKDASVAKWKYINAPDADARAVQATYWANQWAKEQgkaadvSSYVAKAAK 253

250     260     270     280     290     300     310     320
17625  233 TGDQCRNDMetFDKYYSKLGCCQnINPESAGFDSQHPIMetSWYTSWGGALTAeygnySWANQIGCSHSHQFYQNPFLAAYG 312
Cdd:pfam02011 254 MGDYLRAYM--FDKYF&KIGTST--QAGTGYDSAHYLL--SWYIANGGGIDT----GWAWRIGSSHAHFYQNPMAAWA 322

330     340     350     360     370     380     390     400
17625  313 LlydkSINGGMETFAERATEDYKMeTSLQRQIELELYQWLQSVDPFAGGCTNSYRGRYEKYPEGYPTFYDmetVxVPHPVY 392
Cdd:pfam02011 323 L-----STDSDFKPKSPNGASDWA--KSLKRQLEFYQWLQSAEGALAGGATNSWNGRYEAPAGTSTFYGM--GYTEHPVY 394

.....*
17625  393 PDPGS 397
Cdd:pfam02011 395 ADPGS 399
    
```

ภาพที่ 4.8 การตรวจสอบโครงสร้างและการผลิตยีน ของลำดับอะมิโน Cel48MT03 ในฐานะข้อมูลจากการ Blastp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



AAR01217.1	WTNGNAGDNSKHYLMNWTYSWGGALKGTGQN--WCWQIGCSHAHEFYQNPLAAYALLTD-	383
WP_002848405.1	WTNGNAGDNSKHYLMNWTYSWGGALKGTGQN--WCWQIGCSHAHEFYQNPLAAYALLTD-	388
CAS03459.1	WTNGNAGDNSKHYLMNWTYSWGGALKGTGQN--WCWQIGCSHAHEFYQNPLAAYALLTD-	388
YP_004105715	WSNGNAGDNSKHYLMNWTYSWGGALKGTGQN--WCWQIGCSHAHEFYQNPLAAYALLTD-	389
WP_009987706.1	ITSPSAGMDSKHYLMAWYTAWGGALTASYGNKAWAQIGCSHSHQFYQNPLAAYGLLYDK	311
YP_007829324.1	KNSPSTGYDSCHYLMAWYTSWGGAQDGS-----WAWQIGCSHAHQFYQSPLAAYALLYDT	390
Cel48MT03	INPESAGFDSQHFLMSWYTSWGGALTAEYGNYSWAWQIGCSHSHQFYQNPLAAYGLLYDK	301
Consensus	- . : * : * * : * * * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * : *	
AAR01217.1	-LSSGMKADGAKQDYQKSLEERQLEFYLWLQSKDGP IAGGATNSYKGRYETYPSPGVPTFYG	442
WP_002848405.1	-LSSGMKADGAKQDYQKSLEERQLEFYLWLQSKDGP IAGGATNSYKGRYETYPSPGVPTFYG	447
CAS03459.1	-LSSGMKADGAKQDYQKSLEERQLEFYLWLQSKDGP IAGGATNSYKGRYETYPSPGVPTFYG	447
YP_004105715	-LSSGMKADGAKADYKKSLEERQLEFYLWLQSSNGPIAGGATNSYKGRYETYPSPGVPTFYG	448
WP_009987706.1	NMNSGMKAKADADADYKESLKRQIEMYLWLQSKGPPFAGGCTNSYKGRYETYPADLPTFYD	371
YP_007829324.1	GLNSAMKAEGATKDYTTSLRQLEFYQWLQSDADGPPFAGGATNCWNGDYMTYTSQVPTFYD	450
Cel48MT03	SINGGMKAEKATEDYKMSLRQIELYQWLQSVDPFAGGCTNSYKGRYETYPGYPTFYD	361
Consensus	: . . . * * * . . * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * : *	
AAR01217.1	MMYVEHPVYADPGSNHWTGNQVWAVQRLAELYYVWKQN--GDNTGVRPFGMSMEAALQI	500
WP_002848405.1	MMYVEHPVYADPGSNHWTGNQVWAVQRLAELYYVWKQN--GDNTGVRPFGMSMEAALQI	505
CAS03459.1	MMYVEHPVYADPGSNHWTGNQVWAVQRLAELYYVWKQNR--GDNTGVRPFGMSMEAALQI	506
YP_004105715	MMYVEHPVYADPGSNHWTGNQVWAVQRLAELYYVWVKN--GDNTGVRPFGMSMEAALQI	506
WP_009987706.1	MVFEVHPVYADPGS-----	385
YP_007829324.1	MAYVEHPVYADPGSNHWIGNQVWATQRLAELYYVKTGDGASKGAVKPGGLTIEDTLKSL	510
Cel48MT03	MVYVEHPVYADPGS-----	375
Consensus	* : * * * * . * * * *	
AAR01217.1	LDKWCAWFVNNTVLTSDGDFYMPNSLDWQGPDSWNG--SATSNGLSCTISGYGNTDLG	558
WP_002848405.1	LDKWCAWFVNNTVLTSDGDFYMPNSLDWQGPDSWNG--SATSNGLSCTISGYGNTDLG	563
CAS03459.1	LDKWCAWFVNNTVLTSDGDFYMPNSLDWQGPDSWNG--SATSNGLSCTISGYGNTDLG	564
YP_004105715	LDKWCAWFVNNTVLTSDGDFYMPSTLDWNGKPDWNG--KATSNGLSCKITGYGNSDLG	564
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	LDRVWAFIENTTLTDDGDYAI PATLDWSGPATWTGTYNENANSGLTCTITATGSSDLG	570
Cel48MT03	-----	
Consensus	-----	
AAR01217.1	CVSSLANTLLYYAKAKGVKGS DINGMTYSSVGGKFNYNIEGASNVKAGTKTYTANDSALP	618
WP_002848405.1	CVSSLANTLLYYAKAKGVKGS DINGMTYSSVGGKFNYNIEGASNVKAGTKTYTANDSALP	623
CAS03459.1	CVSSLANTLLYYAKAKGVKGS DINGMTYSSVGGKFNYNIEGASNVKAGTKTYTANDSALP	624
YP_004105715	CISLANTLTYAKAKGVKATDIKGLTAASVGGSFNENIEGASNAKAGSKTY SANDSALP	624
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	CVSSLANTLIYYAKAVGTKSSEIS-----ADATSLG	601
Cel48MT03	-----	
Consensus	-----	
AAR01217.1	KASLYLAKELIDRSWALGRDDLGMSTRTEHNPSLARFFSQTWVIPENYNGTMPNGDKLANG	678
WP_002848405.1	KASLYLAKELIDRSWALGRDDLGMSTRTEHNPSLARFFSQTWVIPENYNGTMPNGDKLANG	683
CAS03459.1	KASLYLAKELIDRSWALGRDDLGMSTRTEHNPSLARFFSQTWVIPENYNGTMPNGDKLANG	684
YP_004105715	KASLYLAKELIDRSWALGRDNYGMSRTEHNPSLARFFSQTWVIPESYNGTMPNGDALKNG	684
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	GKALYLAQQLLDREWELGRDDIGLSRTEHNGSLSRMFNEEVWIPSSYNGKTPYGDTLANG	661
Cel48MT03	-----	
Consensus	-----	

ภาพที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel48MT03 กับลำดับกรดอะมิโนฐานข้อมูล:

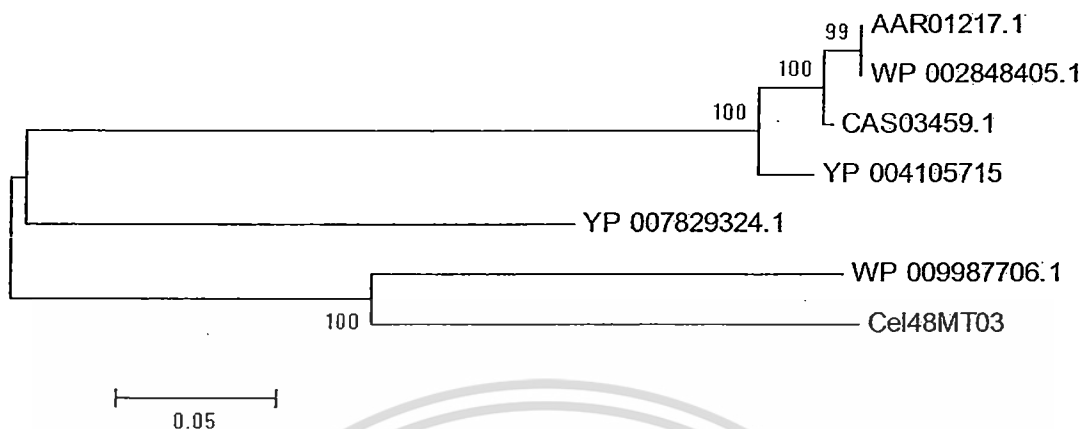
*R. flavefaciens* (WP\_009987706.1), *uminococcus champanellensis* 18P13 (YP\_007829324), *R. albus* 7 (YP\_004105715 ), *R. albus* (CAS03459.1), *R. albus* (AAR01217.1) และ *R. albus* (WP\_002848405) โดย ( \* ) ลำดับโปรตีน identical ที่มีความเหมือนกัน 100%, ( : ) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และ ( . ) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันปานกลาง (ต่อ)

AAR01217.1	ATFESIRTMYEGNCAGTPTSTEAINLVKELKAAYNKDVQNGAKWDSKYSASDPEGQAQIA	738
WP_002848405.1	ATFESIRTMYEGNCAGTPTSTEAINLVKELKAAYNKDVQNGAKWDSKYSASDPEGQAQIA	743
CAS03459.1	ATFESIRTMYEGNCAGTPTSTEAINLVKELKAAYNKDVQNGAKWDSKYSASDPEGQAQIA	744
YP_004105715	ATFESIRTMYTGKCAQTQTSNETVALVEKLRAAKKDVANGAKWTSKYSASDAEQQAELA	744
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	ATFSSIRSMYL-----QDEKYMELKNAFDSTG-----	688
Cel48MT03	-----	
Consensus		
AAR01217.1	GFKNVAKVDLNYHREFWHAGDDMMALGVMANLYGKELTPEPT-DDKTYPTNIKVAYSEQYH	797
WP_002848405.1	GFKNVAKVDLNYHREFWHAGDDMMALGVMANLYGKELTPEPT-DDKTYPTNIKVAYSEQYH	802
CAS03459.1	GFKNVAKVDLNYHREFWHAGDDMMALGVMANLYGDELSPVPPEEKTYPTNIKVTYSEQFH	804
YP_004105715	KFKNVGNVDLNYHREFWHAGDDLAMGVMATLYPDMGNPIPY-----PTNVKANYSTQYH	798
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	---STESVELNYHREFWHAGDILMALGTMQLY-----PEVTPGGSTQGG	729
Cel48MT03	-----	
Consensus		
AAR01217.1	QMRFTWDKVKNADKYGIAYLAGKWRIQTSNITTNSTYSPKNMTPGMSYKVAIAARVNGT	857
WP_002848405.1	QMRFTWDKVKNADKYGIAYLAGKWRIQTSNITTNSTYSPKNMTPGMSYKVAIAARVNGT	862
CAS03459.1	QMRFTWDKVKNADKYGIAYLAGKWRIQTSNITTNSTYSPKNMTPGMSYKVAIAARVNGT	864
YP_004105715	QIQFVWDKVEGADKYGIAYLAGKWVQTNNITTNSTYVTPKNLTPGMYKVAIVAAARVNGQ	858
WP_009987706.1	-----	
YP_007829324.1	DDNLYGDVDCNGKVEINDVLLSRYVAQDSTIPNPPSAQGLKNADCKYDGTIDADDITAI	789
Cel48MT03	-----	
Consensus		

ภาพที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel48MT03 กับลำดับกรดอะมิโนฐานข้อมูล:

*R. flavefaciens* (WP\_009987706.1), *uminococcus champanellensis* 18P13 (YP\_007829324), *R. albus* 7 (YP\_004105715), *R. albus* (CAS03459.1), *R. albus* (AAR01217.1) และ *R. albus* (WP\_002848405) โดย ( \* ) ลำดับโปรตีน identical ที่มี ความเหมือนกัน 100%, ( : ) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และ ( . ) ลำดับโปรตีน identical ที่แตกต่างกันปานกลาง (ต่อ)

จากการวัดค่าคลุกกลืนแสดง พบว่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Cel48PT6 เกิดขึ้นใน ปริมาณที่น้อย ซึ่งอาจมีผลมาจากโปรตีนที่ผลิตได้จากยีน Cel48PT6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ *E.coli* Top10 ซึ่ง Invitrogen (2009) รายงานว่า เมื่อแบคทีเรีย *E.coli* Top10 มีการผลิตโปรตีนได้น้อย อาจ เป็นผลมาจาก โปรตีนเป็นพิษต่อ host เนื่องจากการผลิตโปรตีนในปริมาณมากจนเกินไป จึงเกิด การหยุดสังเคราะห์โปรตีนลงเพื่อให้เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ การผลิตโปรตีนจึงมีน้อยลง ดังนั้นจึงเปลี่ยนไปใช้ *E. coli* สายพันธุ์อื่นที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ด้วยการ โอนถ่ายเข้าสู่ *E. coli* LMG194 (ให้มาพร้อมในชุด pBad Topo) ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการผลิต โปรตีนได้มากกว่า *E.coli* top10 เนื่องจาก *E. coli* LMG194 จะไปชะลอการสังเคราะห์โปรตีนของ เวกเตอร์ pBAD TOPO ให้มีการผลิตโปรตีนในปริมาณน้อยๆ ซึ่งทำให้เซลล์อยู่รอดได้ จึงไม่เกิดการ หยุดสังเคราะห์โปรตีนที่ต้องการศึกษา



**ภาพที่ 4.10** การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของโคลน Cel48-MT03 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากเชื้อ *R. flavefaciens* (WP\_009987706.1), *Uminococcus champanellensis* 18P13 (YP\_007829324), *R. albus* 7 (YP\_004105715), *R. albus* (CAS03459.1), *R. albus* (AAR01217.1) และ *R. albus* (WP\_002848405) โดยโปรแกรม MEGA5 ด้วยวิธี Neighbor-Joining ตัวเลขที่จุดตัด (Node) แสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

#### 4.1.6 การทำ genome walking เพื่อหายีนเซลลูเลสเต็มเส้น

เมื่อยืนยันแน่ชัดแล้วว่าชิ้นส่วนยีน Cel48MT03 ที่ได้เป็นยีนใหม่ ในเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ตามที่คาดหวังจึงได้ใช้วิธี genome walking ด้วยเทคนิค ligation-mediated PCR (Clontech, USA) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนที่เหลือเพื่อให้ได้ยีนเต็มเส้น โดยยีนเซลลูเลสในกลุ่มที่ 48 คาดว่าจะมีขนาดประมาณ 2,000–3,000 bp (Ramirez–Ramirez, *et al.* 2008, Xiao-Zhou, *et al.* 2009) ซึ่งเริ่มจากการสร้างไลบรารีของเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอแบบที่เรีย ในกระเพาะรูเมนของกระบือโดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* แล้วเชื่อมต่อชิ้นส่วน ดีเอ็นเอที่ได้ ด้วย GenomeWalker adaptor (Clontech, USA) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ AP1 และ AP2 (Clontech, USA) จากนั้นออกแบบ GSP1 และ GSP2 ให้จำเพาะกับปลายด้าน 5' ของโคลน Cel48MT03 โดยระบุทิศทางการออกจากยีน เนื่องจากเทคนิคนี้จะใช้การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส สองครั้งในแต่ละไลบรารี เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการสังเคราะห์ส่วนของยีนที่ต้องการ โดย primary PCR จะใช้ outer primer (AP1 และ GSP1) และ secondary PCR จะใช้ nested primer (AP2

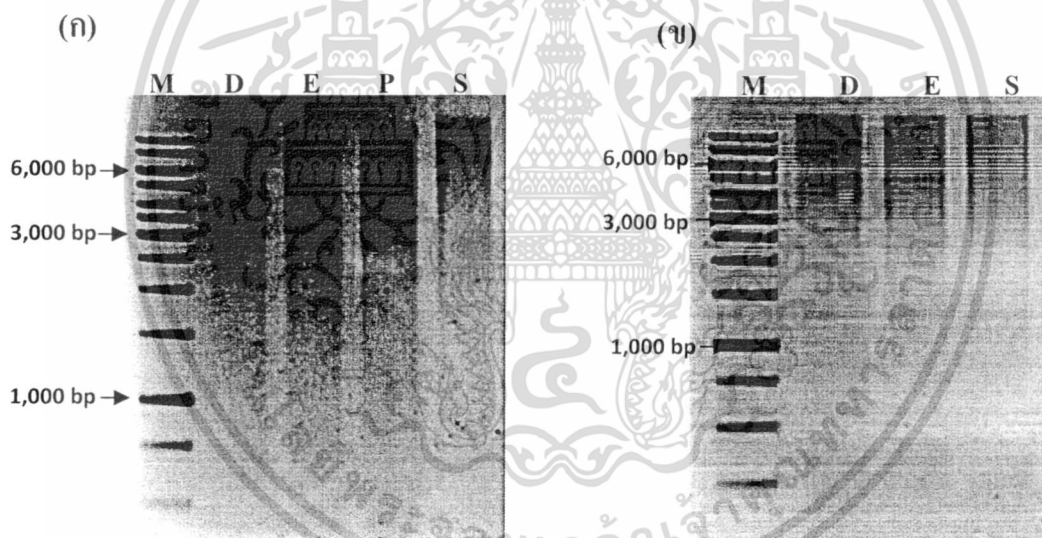
และ GSP2) ซึ่งควรจะเกิดการสังเคราะห์ส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง adaptor และส่วนปลาย 5' ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าผูกพันไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลน Cel48MT03 ที่ใช้ออกแบบ GSP2 ไปทางด้าน up-stream แต่เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยามาโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำการเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนยีนที่มีอยู่ พบว่าไม่มีโคลนใดที่มีชิ้นส่วนของยีนเซลล์ลูเลสที่ต้องการทั้งนี้มียาระเอียดในการทำดังนี้คือ

#### 4.1.6.1 ผลการเตรียมเมทาจีโอโนมิกไลบรารี

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรส 0.8 % (ภาพที่ 4.11 ก) พบว่าลักษณะดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* เป็นปื้น (smear) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอถูกตัดให้มีขนาดเล็กลง และมีหลายขนาดแตกต่างกันซึ่งเป็นไปได้



ภาพที่ 4.11 การวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของเมทาจีโอโนมิกดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) ขณะที่ D, E, P และ S คือเมทาจีโอโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ตามลำดับ

(ก) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ที่บ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(ข) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI*, *EcoRV* และ *StuI* ที่บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามที่ต้องการ ส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *DraI*, *EcoRV* และ *StuI* พบว่ายังปรากฏลักษณะของแถบดีเอ็นเอเข้มที่ด้านบนจึงทำการบ่มเอนไซม์ต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส 0.8% (ภาพที่ 4.11 ข) พบว่าดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะเป็นปื้นมากขึ้น

#### 4.1.6.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนด้าน 5'-up-stream

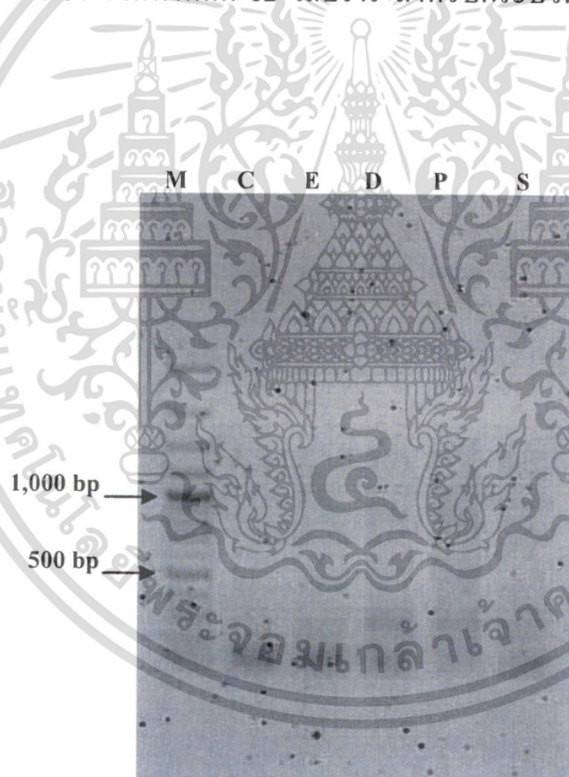
ทำการ walking โคลน Cel48MT03 โดยออกแบบ up-stream ไพรเมอร์ ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูกกลุ่มที่ 48 จาก Uncultured bacterium clone CO4-G1 (GQ265338.1), Uncultured bacterium clone CO4-G22 (GQ265343.1), Uncultured bacterium clone CO5-G10 (GQ265345.1), Uncultured bacterium clone CO6-G35 (GQ265347.1), *Cl. straminisolvens* strain CSK1 (GQ487568.1), *R. albus* Cel48A (AY422811.1) และ *R. albus* cel48A (FM872296.1) กับโคลนยีน Cel48MT03 จากนั้นเลือกลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนยีนที่อยู่บริเวณปลายด้าน 5' ที่มีความแตกต่างจากยีนอื่นๆ มากที่สุดเพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยบริเวณที่เลือกสำหรับ GSP1 (primary PCR) จะอยู่ก่อน GSP2 (secondary PCR หรือ nested PCR) เข้าไปด้านในตัวยีน เมื่อออกแบบให้เป็น reverse primer แล้วได้ผลคือ Cel48MT03\_up1: 5'-TCCAGAGAGAGTCTCATACTCGATGTCGTCT-3' ที่มี MW 9,486 และ Tm 58°C (GSP1) กับ Cel48MTO3\_up2: 5'-CCCTTCTTAGCGAGAACATCGTGCATAGAAGC-3' ที่มี MW 9,793 และ Tm 59.3°C (GSP2) (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.12)

#### ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์สำหรับการทำ genome walking

Primer	Sequence (5'->3')	Description
Cel48MT03_up1	TCCAGAGAGAGTCTCATACTCGATGTCGTCT	up-stream walking of (GSP1)
Cel48MTO3_up2	CCCTTCTTAGCGAGAACATCGTGCATAGAAGC	up-stream walking of (GSP2)

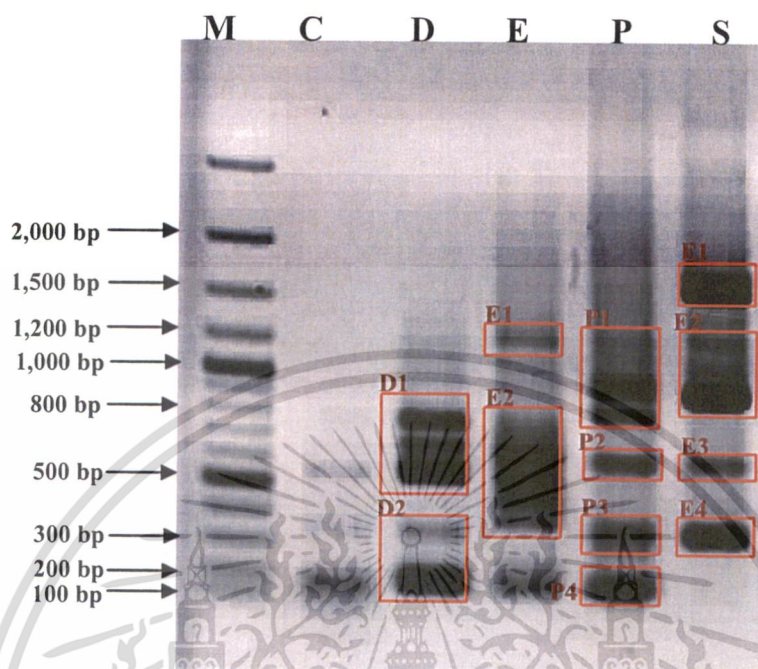


ต้นแบบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรอบที่ 2 (secondary PCR) เพื่อเลือกชิ้นยีนให้มีความจำเพาะกับโคลน Cel48MT03 มากขึ้น ด้วยการใช้ไพรเมอร์ AP2 กับ Cel48MT03\_up2 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส 1% ซึ่งยีนที่คาดหวังมีขนาดระหว่าง 500-700 bp ซึ่งพบว่าโคลน จากการทำพีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ หลากหลายขนาด ในแต่ละไลบรารี (ภาพที่ 4.14) กล่าวคือไลบรารี *DraI* ที่ขนาดประมาณ 100-200 bp (D2) และ 500-800 bp (D1), *EcoRI* ที่ขนาดประมาณ 100 bp, 300-700 bp (E2) และ 1,200 bp (E1), *PvuII* ที่ขนาดประมาณ 200 bp (P4), 300-400 bp (P3), 600 bp (P2) และ 800-1,200 bp (P1) และแถบดีเอ็นเอในไลบรารี *StuI* ที่ขนาดประมาณ 300 bp (S4), 600 bp (S3), 900-1,200 bp (S2) และ 1,500 bp (S1) โดยได้สรุปขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ไว้ในตารางที่ 4.5 ซึ่งนำแต่ละไลบรารีไป purify gel ตั้งแต่ D1-S4 รวมทั้งหมด 12 ไลบรารี สำหรับกระบวนการถ่ายถอดชิ้นยีนเข้าสู่ระบบ pET 28a(+)



ภาพที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรอบที่ 1 (secondary PCR) ของ Cel48MT03 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder (Fermentas), C คือ negative control ที่ไม่มีการใส่จีโนมิกดีเอ็นเอ, ให้ E, D, P, S เป็นจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย D คือ ไลบรารี *DraI*, E คือ ไลบรารี *EcoRV*, P คือ ไลบรารี *PvuII* และ S คือ ไลบรารี *StuI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสรอบที่ 2 (secondary PCR) ของ Cel48MT03 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder (Fermentas), C คือ negative control, D คือ ไลบรารี *DraI*, E คือ ไลบรารี *EcoRV*, P คือ ไลบรารี *PvuII* และ S คือ ไลบรารี *StuI* กรอบสี่เหลี่ยมคือ การตัดแยกเจลของไลบรารี D-E ออกเป็นกลุ่มย่อย ตั้งชื่อเป็น D1-S4 สำหรับทำการ purify gel โดย D1-S4 คือผลผลิตพีซีอาร์ที่ต่อมาได้ทำการโคลนและส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลตามวิธีข้อ 3.1.4.3 แล้วโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T และถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5 $\alpha$  ซึ่งใช้วิธี blue/white Screening คัดเลือกโคลนเป้าหมายที่คาดว่ามีการแทรกของจีนยีน โดยสุ่มเลือกโคลนเป้าหมายซึ่งมีโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบการแทรกสอดของจีนส่วนของยีน ด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์ในการยืนยันผล ดังภาพที่ 4.15 พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในแต่ละไลบรารี โคลนมีขนาดหลากหลายและมีความใกล้เคียงกับจีนยีนที่ได้ทำการเชื่อมต่อเข้าไป จากนั้นจึงสุ่มเลือกตัวแทนของโคลนแต่ละกลุ่ม ที่มีขนาดดีเอ็นเอแตกต่างกันส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้พบว่าไม่มีจีนส่วนของยีนเซลล์ลูกกลุ่มที่ 48 จึงได้ทำการโคลนซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่

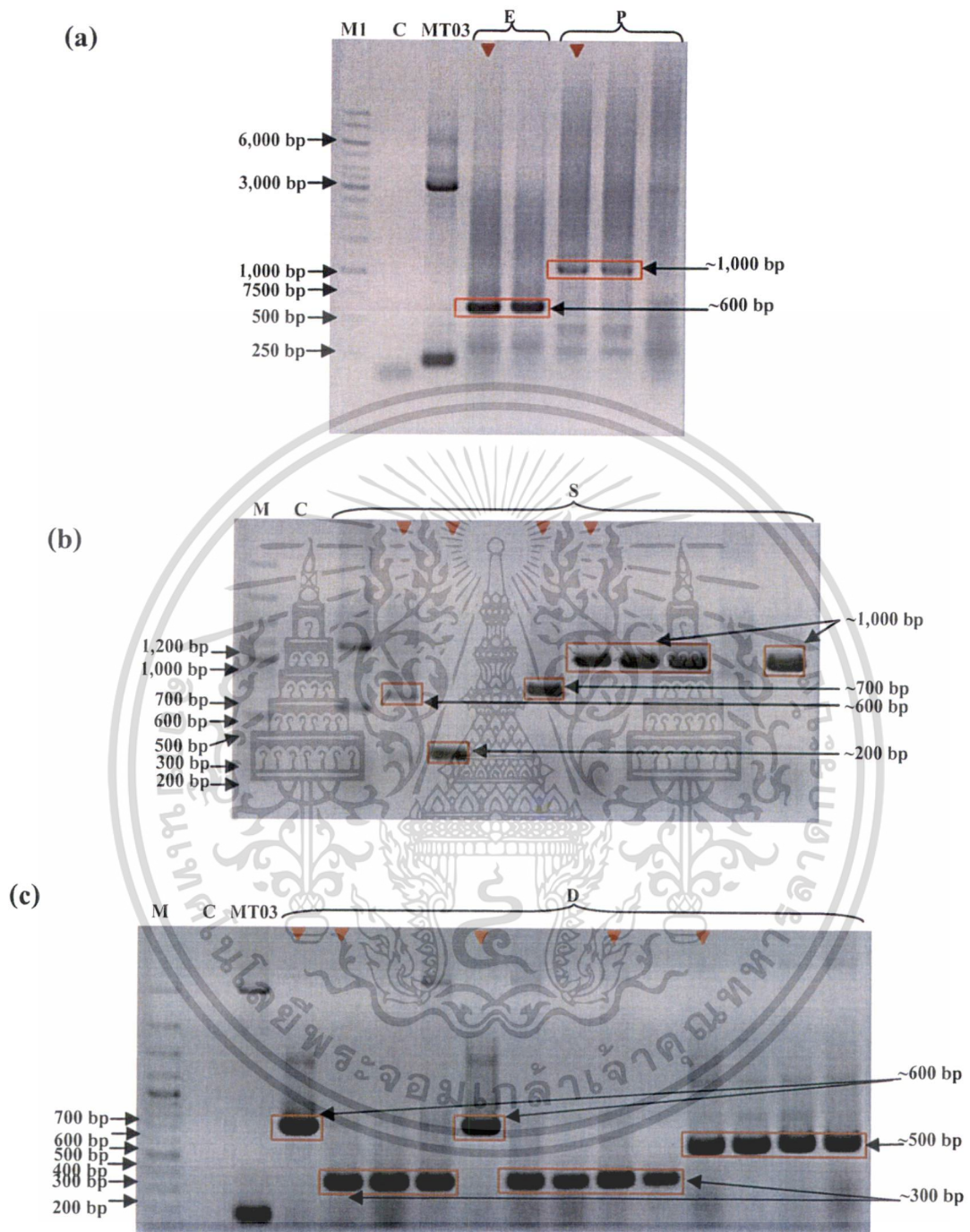
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพลีเมอร์สโอบที่ 2 (secondary PCR) ชุดเดิม และตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกด้วยการทำปฏิกิริยา ลูกลูโซโพลีเมอร์สเช่นเดียวกับการโคลนในครั้งแรก ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ตารางที่ 4.5 สรุปขนาดดีเอ็นเอผลผลิต ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอร์สในแต่ละไลบรารี ที่ทำ

Library	purify PCR product	Size (bp)
<i>DraI</i>	D1	500-800
	D2	100-200
<i>EcoRV</i> Library	E1	1,200
	E2	300-700
<i>PvuII</i> Library	P1	800-1,200
	P2	600
	P3	300-400
	P4	200
<i>StuI</i> Library	S1	1,500
	S2	900-1,200
	S3	600
	S4	300

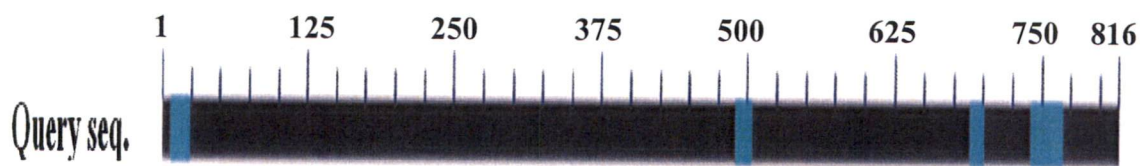
การโคลนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกพบว่าไม่มีโคลนใดที่มีชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสที่ต้องการ ดังนั้นการค้นหายีนเซลลูเลสเต็มเส้นด้วยวิธี genome walking จึงหยุดลง อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนยีน Cel48MT03 ที่ได้มา ยังจัดอยู่ในกลุ่มยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ซึ่งจากการเทียบข้อมูลยีนในฐานข้อมูลยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ที่ทำการตรวจสอบแล้วว่าเป็น partial gene ที่มี catalytic domain ของยีน GH48 ซึ่งชิ้นส่วนยีน Cel48MT03 มีความเหมือนกับยีน GH 48 protein จากเชื้อ *R. flavefaciens* (WP\_009987706.1) ซึ่งมี catalytic domain ยาวประมาณ 870 อะมิโน และจากการ BlastX พบว่าข้อมูลโปรตีนตัวที่เหมือน Cel48MT03 มากที่สุด แยกมาจาก metagenome ของ uncultured organism (ADX05724.1) ใน cow rumen ที่ลักษณะเป็น Single domain ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Cel48 มีความยาว 816 อะมิโน จากโปรตีนทั้งสองตัว Catalytic domain เต็มเส้น ประมาณ 800 อะมิโน ส่วนยีน Cel48MT03 เมื่อถอดรหัสจะได้ประมาณ 375 อะมิโน ซึ่งจะขาดไปประมาณ 400 อะมิโน ตามภาพที่ 4.16 ซึ่งอาจจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์หลังการชักนำให้มีการผลิตโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 4.15** ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดย M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder (Fermentas), M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder (Fermentas), MT03 คือ พลาสมิดเวกเตอร์ cel48MT03, C คือ negative control, D คือ ไลบรารี *DraI*, E คือ ไลบรารี *EcoRV*, P คือ ไลบรารี *PvuII* และ S คือ ไลบรารี *StuI* ส่วนที่ถูกสรุขี้คือโคลนที่เลือกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Multi-domains

Glyco\_hydro\_48 (ADX05724.1)

Multi-domains

Glyco\_hydro\_48 (Cel48MT03)

ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบ single domain ในส่วน catalytic domain ที่แยกมาจาก metagenome ของ uncultured organism (ADX05724.1) ใน cow rumen และ catalytic domain ของ Cel48MT03

จากรายงานวิจัยพบว่าเฉพาะ catalytic domain สามารถมีการแสดงออกของเอนไซม์ เซลลูเลสที่ทำงานได้ เช่นงานวิจัยของ บุญฉวีภรณ์ รุ่งรัตนกลิน (2545) ที่โคลนเฉพาะโดเมน เซลลูเลสของยีน Cel9\_B แล้วทำการแสดงออกในยีสต์ *K. Lactis* สายพันธุ์ GG799 และพบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสับเสตรทได้ และในงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษา cellobiohydrolase กลุ่มที่ 48 ที่ไม่มี cellulosome พบว่ายีน CpCel48 สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ในระบบของเวกเตอร์ pET20b ได้เช่นกัน

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น การชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ด้วยการตัดแต่ง โมเลกุลของยีนออกในบางส่วน สามารถชักนำให้ยีนเพิ่มประสิทธิภาพ ในการแสดงออกของ โปรตีนได้ จึงคาดว่าเฉพาะส่วน partial gene ของยีนเซลลูเลส Cel48MT03 ที่โคลนได้ในครั้งนี้ที่มี catalytic domain ของกลุ่มยีน GH48 น่าจะสามารถเกิดการแสดงออกของเอนไซม์ในแบคทีเรีย *E. coli* ได้เช่นกัน จึงนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การโคลนยีน Cel48 จากพลาสมิดลูกผสม Cel48MT03 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) และ pBAD TOPO

### 4.2.1 การโคลนยีน Cel48 โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+)

#### 4.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ในการโคลนยีน Cel48 จากพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากข้อ 4.1 เข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+) ได้คัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีน Cel48 จากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในยีนด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/>) ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดขึ้นยีนแต่ตัดเวกเตอร์ที่ตำแหน่ง cloning site ซึ่งตำแหน่งตัดเอนไซม์ที่เลือกคือตำแหน่งตัดสำหรับเอนไซม์ *NcoI* (CC ATGG) ในด้าน forward และ *XhoI* (CTC GAG) สำหรับด้าน reverse จึงออกแบบไพรเมอร์ที่เพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการโคลน โดยไพรเมอร์สำหรับด้าน forward คือ Cel48-pET28-F: 5'-CATGCCATGGTTGAGGCGCCGACTACGGT-3' สำหรับด้าน reverse ได้แก่ Cel48-Pet28-R: 5'-CGGCTCGAGTGAGCCTGGGTCGGGATACA-3' (ภาพที่ 4.17) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้อุณหภูมิขึ้นตอน primer annealing ที่ 50°C แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังคือประมาณ 1,100 bp (ภาพที่ 4.18) จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอ มาสกัดออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 3.1.4.3

ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อผลิตชิ้นยีนสำหรับการเชื่อมต่อในระบบ pET28a(+) จะต้องมีการออกแบบตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตรงไพรเมอร์และไม่มีการตัดในชิ้นยีน เพื่อให้ชิ้นยีนสามารถเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ได้ โดยเมื่อทำการตัดชิ้นยีนแล้วยีนที่ทำการต่อเข้าพลาสมิดเวกเตอร์จะต้องมีการสร้างกรดอะมิโนได้ถูกเฟรมตรงตำแหน่งเฟรมที่ 1 ของชิ้นยีน (Novagen, Germany) จากการตรวจสอบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่ไม่มีการตัดในชิ้นยีน และสามารถตัดพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ที่ตำแหน่ง Multiple cloning site คือเอนไซม์ *XhoI* และ *NcoI* ส่วน 5'-CATG และ 5'-CGG คือส่วนของหางไพรเมอร์ที่เพิ่มเข้ามาเพื่อให้อุณหภูมิในการทำกระบวนการ annealing มีความเสถียรมากขึ้น โดยปลาย 5' และ 3' ที่เพิ่มเข้ามามีการออกแบบโดย

เทียบจากการ align ยีน Cel48MT03 กับยีนในกลุ่ม GHF48 ให้สามารถจับลำดับเบสที่คาดว่าเป็น ยีน Cel48MT03 ที่ขาดหายไปได้

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
	.... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....									
AY422811.1	TCTGTCACAGAACAATGGTGGTTCAGGCTCTTTCGGTATCCCTTACCCTCAAGAGAAGAAGTTATCATCGAGGCTCCTGACTACGGTCATGAGACTACA									
FM872296.1	TCTGTCAAAGAACAATGGTGGTTCAGGCTCTTTCGGTATCCCTTACCCTCAAGAGAAGAAGTTATCATCGAGGCTCCTGACTACGGTCATGAGACTACA									
GQ265338.1	-----GGAATTCGGTACCCTCCATAGAAA	CAT	TGTTGGT	TGAAGCACCTGATTATGGTCATCAGACCACA						
GQ265343.1	-----GGAATTCGGTACCCTCCATAGAAA	CAT	TGTTGGT	TGAAGCACCTGATTATGGTCATCAGACCACA						
GQ265345.1	-----GGAATTCGGTACCCTCTATTGAAA	CAT	TGATTGT	TGAAGCTCCTGACTATGGTCACGTTACAACC						
GQ265347.1	-----GGAATTCGGTACCCTCTATTGAAA	CAT	TGATTGT	TGAAGCTCCTGACTATGGTCACGTTACAACC						
GQ487568.1	-----GGAATTCGGTACCCTCTATTGAAA	CAT	TGATTGT	TGAAGCTCCTGACTATGGTCACGTTACAACC						
HQ706057.1	TCTCAGTTCGCAGACAAACGGCTCAGGCT---	TCGGTATCCCTTACCCTCAGTAGAGACAT	TCATCGTTGAAGCTCCTGACTACGGTCATGAGACAAC							
Cel48MT03	-----							TGAGGCGCGGACTACGGT	CATGAGACAAC	

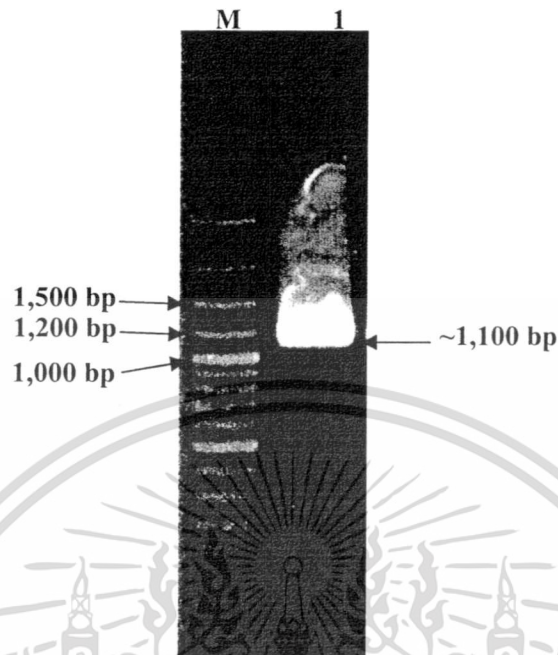
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	.... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....									
AY422811.1	CCTTCGGGCGTTCCTACCTTCTATGGTATGATGATGTTGAGCACCTGTATATGCTGACCCGGGTTCCAACCACTGACAGGTAACCAAGGATGGGCTG									
FM872296.1	CCTTCGGGCGTTCCTACCTTCTATGGTATGATGATGTTGAGCACCTGTATATGCTGACCCGGGTTCCAACCACTGACAGGTAACCAAGGATGGGCTG									
GQ265338.1	CCTGCCGGCAAAGCACTTTTACGATATGGCCTATGATTACCAACCTGTGTACCATGACCCCTCCAAGCAATAATTGGTTCCGGAATCCAGGCAT-----									
GQ265343.1	CCTGCCGGCAAAGCACTTTTACGATATGGCCTATGATTACCAACCTGTGTACCATGACCCCTCCAAGCAATAATTGGTTCCGGAATCCAGGCAT-----									
GQ265345.1	CCTGCAGGTAATCAACATTCATGGTATGGCATAATGTTCCGCACCTGTATATGCTGACCCCTGGAAGTAACGAATGTTCCGGAATCCAGGCAT-----									
GQ265347.1	CCTGCAGGTAATCAACATTCATGGTATGGCATAATGTTCCGCACCTGTATATGCTGACCCCTGGAAGTAACGAATGTTCCGGAATCCAGGCAT-----									
GQ487568.1	CCTGCAGGTAATCAACATTCATGGTATGGCATAATGTTCCGCACCTGTATATGCTGACCCCTGGAAGTAACGAATGTTCCGGAATCCAGGCAT-----									
HQ706057.1	CCTTCAGGCCACGCTACATTCATGATATGGTTACGTTCCACATCCTGTATACGCTGACCCCTGGTTCAAACCACTGATCGGTAACCAAGGATGGTCAA									
Cel48MT03	CGGAAGGCTATCCTACCTTCATGATATGGTTATGTTCCCAACCCCGTGTATCCGACCCAGGCTCA-----									

ภาพที่ 4.17 การออกแบบไพรเมอร์ Cel48-pET28-F และ Cel48-Pet28-R โดยลำดับเบสไฮไลต์ สีเหลืองสำหรับการออกแบบ Cel48-pET28 forward และ reverse ส่วน ไฮไลต์สีฟ้า คือส่วนปลาย 5' และ 3' ของไพรเมอร์ที่ทำนายว่าสามารถทำการจับขึ้นยีน Cel48MT03 ที่ขาดหายไปได้

#### 4.2.1.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

นำยีน Cel48 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว และเวกเตอร์ pET28a(+) มาทำการตัดจุดเชื่อมต่อของยีนด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* เพื่อใช้ในการโคลน แล้วนำทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.1.11.3 (ภาพที่ 4.19)

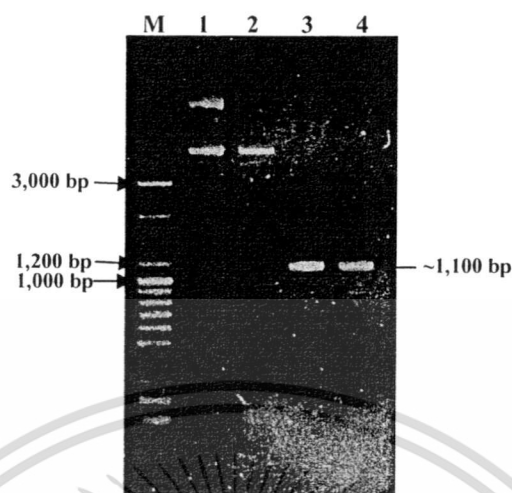
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48-pET28-F และ Cel48-pET28-R โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), lane 1 ผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ primer annealing 50°C

จากนั้นทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pET28a(+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  หลังจากเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคลนโดยสุ่มเลือกโคลนนี้มาทำ size screening ทำการเปรียบเทียบพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการแทรกสอดชิ้นยีน Cel48pET กับพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) โดยพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการแทรกสอดชิ้นยีน จะต้องมีความยาวพลาสมิดเวกเตอร์ใหญ่กว่าพลาสมิด pET28a(+) จากนั้นสุ่มเลือกโคลนที่แสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอสูงกว่าขนาดของพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) โดยวิธี size screening ทำการสุ่มเลือกโคลนที่มีขนาดพลาสมิดเวกเตอร์ใหญ่กว่า 5,369 bp ขึ้นไป ได้แก่ โคลน 8, 10, 13, 14, 24, 29, 30, 31, 32, 35, 39, 41, 45, 50, 52 และ 55 มาเช็กโคลนนี้พีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F และ Cel48\_R ซึ่งขนาดของยีนเป้าหมายคือ 1,126 bp จากนั้นได้เลือกโคลนที่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวมา 3 โคลน คือ

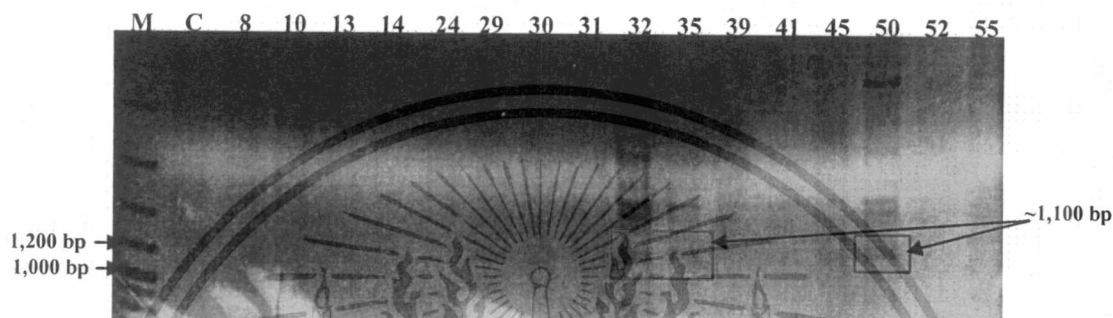
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดได้จากเจลและทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng) , lane 1 คือ เวกเตอร์ pET28a(+) ที่ยังไม่ผ่านการตัดเอนไซม์, lane 2 คือ เวกเตอร์ pET28a(+) ที่ผ่านการตัดเอนไซม์, lane 3 คือ Cel48 ที่ยังไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ และ lane 4 คือ Cel48 ที่ผ่านการตัดเอนไซม์

โคลนที่ 32, 35 และ 50 (ภาพที่ 4.20) มาสกัดพลาสมิดและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบยืนยันว่ายังเป็น *Cel48MT03* และมีการสร้างโปรตีนได้ตลอดสายหรือไม่ สำหรับการตรวจสอบการผลิตโปรตีนโดยไปถ่ายโอนเข้าสู่ expression host ต่อไป ผลจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ไม่มีชิ้นส่วนของ *Cel48MT03* แทรกสอดอยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) จึงทำการสร้างพลาสมิดลูกผสมซ้ำอีกครั้ง โดยเริ่มจากขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ จากเวกเตอร์ *Cel48MT03* ซึ่งหลังจากการเชื่อมพลาสมิดลูกผสม พบว่าไม่มีการเชื่อมต่อชิ้น *Cel48MT03* กับเวกเตอร์ pET28a(+) จึงได้หยุดการทดลองระบบ pET28a(+) เพียงเท่านี้ ซึ่งการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิดเวกเตอร์ไม่สำเร็จ อาจเป็นผลมาจากการตัดชิ้น *Cel48MT03* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบด้วยตาเปล่าได้ว่าปลายสายของดีเอ็นเอ มีการตัดของชิ้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือไม่ ซึ่งปลายสายของดีเอ็นเอ *Cel48MT03* หลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ อาจเกิดการขาดหายไป ทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สามารถตัดชิ้น *Cel48MT03* ให้มีปลายสายจำเพาะกับพลาสมิดเวกเตอร์ได้ อีกทั้งจากการตรวจสอบการสังเคราะห์ไพรเมอร์พบว่า

ทางบริษัทมีการผลิตลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ได้ไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ปลายสายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งตัดเอนไซม์ไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถตัดชิ้นยีน Cel48MT03 เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ได้ จึงเปลี่ยนไปทำการโคลนในระบบเวกเตอร์ pBAD TOPO แทน



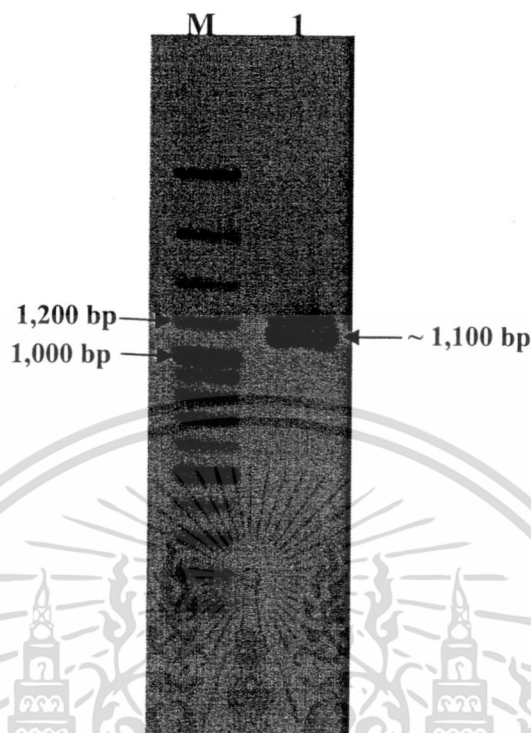
ภาพที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของโคลนบีพีซีอาร์ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), C คือ พลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ที่ไม่มีการแทรกสอดของชิ้นยีน, ตัวเลข คือ หมายเลขของโคลนแต่ละโคลน และสี่เหลี่ยม คือ ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาดประมาณ 1,100 bp

#### 4.2.2 การการโคลนยีน Cel48 ใน *E. coli* Top10 โดยเวกเตอร์ pBAD TOPO

##### 4.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การแทรกสอดชิ้นยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pBAD TOPO เป็นการเชื่อมต่อชิ้นยีนแบบปลายทู่ โดยตำแหน่ง cloning side ของ pBAD TOPO มีเอนไซม์ topoisomerase เป็นตัวเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนกับเวกเตอร์ ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์สามารถเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBAD TOPO ได้เลย (Invitrogen, 2009) ดังนั้นในการสร้างยีนเซลล์ลอส Cel48 จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน Cel48 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้อุณหภูมิขั้นตอน primer annealing ที่ 55°C แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังคือประมาณ 1,126 bp (ภาพที่ 4.21) จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอสกัดออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 3.1.4.3

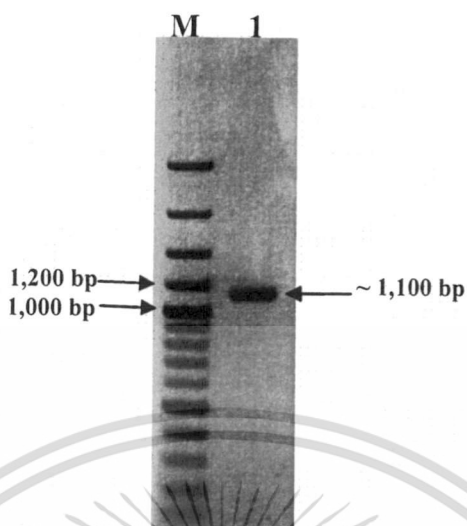
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทราฟริซีส์ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), lane I ผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ primer annealing 55°C

#### 4.2.2.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

นำยีน Cel48 ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.1.11.3 (ภาพที่ 4.22) และเวกเตอร์ pBAD TOPO มาทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* pBAD TOPO หลังจากเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้โคลนทั้งหมด 8 โคลน นำโคลนทั้งแปดมาทำ colony PCR และทำการคัดเลือกโคลนที่มีขนาดประมาณ 1,000-1,200 bp คือโคลนที่ 1, 4, 5, 6 และ 8 (ภาพที่ 4.23) ทำการสกัดพลาสมิดและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจยืนยันว่าเป็นยีนเดิม และมีการสร้างโปรตีนได้ตลอดสายหรือไม่



ภาพที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของการทำยีนให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.1.11.3 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), lane 1 คือยีน Cel48 จากโคลน Cel48MT03



ภาพที่ 4.23 ผลผลิตโคลนพีซีอาร์ของ *E.coli* op10 ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), C คือ Control *E. coli* Top10 ที่ไม่มีการแทรกสอดพลาสมิดเวกเตอร์ และหมายเลข 1-8 คือโคลน 1-8 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.2.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแปลรหัสเป็นโปรตีน ด้วยโปรแกรม Translate tool ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) พบว่า มีเพียงโคลนเดียวคือโคลนที่ 6 ที่มีการอ่านค่าลำดับกรดอะมิโนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cel48MT03 ได้ถูกเฟรมและมีการแทรกสอดขึ้นยีนได้ถูกทิศทาง ทำการตั้งชื่อยีนว่า Cel48PT6 ซึ่งเป็นยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 48 ได้ รวมทั้งพบ his taq ที่ส่วนท้ายของยีน ตามภาพที่ 4.24 โดยโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 47 kD

1	ATG GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT GAA	45
1	Met Gly Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Glu	15
46	GCG CCG GAC TAT GGA CAT GAG ACA ACT TCT GAG GCA ATG TCT TAT	90
16	Ala Pro Asp Tyr Gly His Glu Thr Thr Ser Glu Ala Met Ser Tyr	30
91	ATC GTA TGG ATC GCT TCT ATG CAC GAT GTT CTC GCT AAG AAG GGC	135
31	Ile Val Trp Ile Ala Ser Met His Asp Val Leu Ala Lys Lys Gly	45
136	GTT ATC GAC GGA AGC GCT GAT GCT CTC CCC AAG GCT TGG AAG ACC	180
46	Val Ile Asp Gly Ser Ala Asp Ala Leu Pro Lys Ala Trp Lys Thr	60
181	CTT GAG GCT ATG ATC CCT GGC TGG TCT AAG GCT TCA GGC AGA GAC	225
61	Leu Glu Ala Met Ile Pro Gly Trp Ser Lys Ala Ser Gly Arg Asp	75
226	GAC ATC GAG TAT GAG ACT CTC TGG AAG CAG GAG AGA CTT AAG GCT	270
76	Asp Ile Glu Tyr Glu Thr Leu Trp Lys Gln Glu Arg Leu Lys Ala	90
271	GAT CCC GCT AAC GAA GAG GAT AAG CCC GAG AGC TAC CCT GCT AAG	315
91	Asp Pro Ala Asn Glu Glu Asp Lys Pro Glu Ser Tyr Pro Ala Lys	105
316	AAG GCT AAC GGT GAG GCT ATC AAC CCC ATG TTC AAG ACC TTT GCT	360
106	Lys Ala Asn Gly Glu Ala Ile Asn Pro Met Phe Lys Thr Phe Ala	120
361	TCA GCT TAC GGT TCA GAC AAG GGC TAC CAC CTC ATG AAC TGG CTC	405
121	Ser Ala Tyr Gly Ser Asp Lys Gly Tyr His Leu Met Asn Trp Leu	135
406	GCT GAC GTT GAC GAC TGG TAT GGC TTC GGC GGC AAC GGC AAA	450
136	Ala Asp Val Asp Asp Trp Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Asn Gly Lys	150
451	TTC ACA TTC ATC AAC ACA TTC CAG CGT GGT GAG CAG GAG TCC TGT	495
151	Phe Thr Phe Ile Asn Thr Phe Gln Arg Gly Glu Gln Glu Ser Cys	165
496	TTC GAG ACT GTT CCT CAT CCC TGT CTT GAA GAG CTC AAG TAC AGT	540
166	Phe Glu Thr Val Pro His Pro Cys Leu Glu Glu Leu Lys Tyr Ser	180
541	AAC AAA GAG ACC GGT ATC AAG GGT ATC TTC AAC GGA AGC GAA GTT	585
181	Asn Lys Glu Thr Gly Ile Lys Gly Ile Phe Asn Gly Ser Glu Val	195
586	CCT TCT CAG TAT GCG TTC ACA AAC GCT CCT GAC GCT GAG GAC CGT	630
196	Pro Ser Gln Tyr Ala Phe Thr Asn Ala Pro Asp Ala Glu Asp Arg	210

ภาพที่ 4.24 ผลการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน Cel48PT6 ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนและส่วนท้ายของยีนมีการสร้าง His taq โปรตีน

631	GCT ATC CAG GCT GTA TAT TTC GCA AAC CGC AAC GGC GTT GAC TGC	675
211	Ala Ile Gln Ala Val Tyr Phe Ala Asn Arg Asn Gly Val Asp Cys	225
676	GGA GAG ATT TCC GGT CTT GCT GGT AAG ATG GGT GAC CAG TGC CGT	720
226	Gly Glu Ile Ser Gly Leu Ala Gly Lys Met Gly Asp Gln Cys Arg	240
721	AAC GAT ATG TTC GAT AAG TAC TAC AAG AAG CTC GGC TGC CAG AAC	765
241	Asn Asp Met Phe Asp Lys Tyr Tyr Lys Lys Leu Gly Cys Gln Asn	255
766	ATC AAC CCT GAG TCA GCA GGC TTC GAC AGC CAG CAC TTC CTC ATG	810
256	Ile Asn Pro Glu Ser Ala Gly Phe Asp Ser Gln His Phe Leu Met	270
811	TCA TGG TAT ACT TCA TGG GGC GGA GCT CTT ACT GCT GAA TAC GGC	855
271	Ser Trp Tyr Thr Ser Trp Gly Gly Ala Leu Thr Ala Glu Tyr Gly	285
856	AAT TAC AGC TGG GCT TGG CAG ATC GGC TGC TCA CAC TCA CAT CAG	900
286	Asn Tyr Ser Trp Ala Trp Gln Ile Gly Cys Ser His Ser His Gln	300
901	TTC TAT CAG AAT CCT CTC GCT GCT TAC GGC CTT ATC TAT GAT AAG	945
301	Phe Tyr Gln Asn Pro Leu Ala Ala Tyr Gly Leu Ile Tyr Asp Lys	315
946	AGC ATC AAC GGC GGT ATG AAG GCT GAA AAG GCT ACC GAG GAC TAT	990
316	Ser Ile Asn Gly Gly Met Lys Ala Glu Lys Ala Thr Glu Asp Tyr	330
991	AAG ATG TCT CTC CAG AGA CAG ATC GAG CTC TAT CAG TGG CTC CAG	1035
331	Lys Met Ser Leu Gln Arg Gln Ile Glu Leu Tyr Gln Trp Leu Gln	345
1036	TCT GTT GAC GGT CCT TTC GCA GGC GGA TGT ACA AAC TCT TAC AGA	1080
346	Ser Val Asp Gly Pro Phe Ala Gly Gly Cys Thr Asn Ser Tyr Arg	360
1081	GGA CGT TAC GAG AAG TAT CCG GAA GGC TAT CCT ACC TTC TAT GAT	1125
361	Gly Arg Tyr Glu Lys Tyr Pro Glu Gly Tyr Pro Thr Phe Tyr Asp	375
1126	ATG GTT TAT GTT CCC CAC CCC GTG TAT CCC GAC CCA GGC TCA CTC	1170
376	Met Val Tyr Val Pro His Pro Val Tyr Pro Asp Pro Gly Ser Leu	390
1171	GAG CCG AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC	1215
391	Glu Pro Lys Gly Glu Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu	405
1216	CTC GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT	1260
406	Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His	420
1261	TGA	1263
421	End	421

ภาพที่ 4.24 ผลการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนCel48PT6 ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนและ ส่วนท้ายของยีนมีการสร้าง His tag โปรตีน (ต่อ)

มีงานวิจัยที่พบว่ากลุ่มยีน Cel48A บางยีนมีการผลิตโปรตีนในกลุ่ม reducing end-acting cellobiohydrolase (EC 3.2.1.176) ซึ่งโครงสร้างของยีน ไกลโคไรโซโครเลสกลุ่มที่ 48 มีการม้วนพับของโปรตีนแบบ ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> จะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 2 รูปแบบ คือ reducing end-acting cellobiohydrolase (EC 3.2.1.176) และ endo-b-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) (Cazy, 2013)

โดย Ramirez-Ramirez *et al.* (2008) ศึกษาแบคทีเรียจากดินพบเชื้อ *Myxobacter* Sp. AL-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ Cel48 เป็นยีนในกลุ่ม exocellobiohydrolase และได้ชักนำให้มีการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* พบว่าผลผลิตโปรตีนที่ได้จากยีนมีประสิทธิภาพย่อย acid-swollen avicel (ASC) ได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า Specific Activity เท่ากับ 10.5 เมื่อเทียบกับ carboxymethylcellulose (CMC) ที่มีค่า Specific Activity 2.75 และเมื่อตรวจสอบปฏิกิริยากิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์พบว่า His-Cel48 ไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ใน avicel, oligomeric substrates *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-cellobioside (*p*-NP-Glc<sub>2</sub>) และ *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-cellobioside (*p*-NP-Glc<sub>3</sub>)

นอกจากนี้ Zhang *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษา cellobiohydrolase กลุ่มที่ 48 ที่ไม่มี cellulosome จากเชื้อ *Cl. phytofermentans* พบว่าแค่ส่วนของ mature gene คือยีน CpCel48 โดยการชักนำให้มีการสร้างโปรตีนในเวกเตอร์ pET20b สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ได้ครดอะมิโนทั้งหมด 919 อะมิโน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสที่มีการจัดเรียงตัวแบบ amorphouse cellulose คือ 39.5 U/ $\mu$ M ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย Microcrystalline cellulose (Avicel) เท่ากับ 15.1 U/ $\mu$ M ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย Hydroxyethyl cellulose เท่ากับ 4.6 U/ $\mu$ M ส่วน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย Carboxymethyl cellulose (low viscosity CMC) เพียง 2.7 U/ $\mu$ M จึงสรุปว่ายีน CpCel48 มีการทำงานของเอนไซม์อยู่ในกลุ่ม exocellulase

#### 4.2.2.4 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ใน *E. coli* pBAD TOPO

นำโคลน Cel48PT6 มาเพิ่มจำนวนโดยนำแบคทีเรีย starter ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1-2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง โดยให้ค่า OD<sub>600</sub> ของเชื้อประมาณ 0.5 และนำเชื้อที่ได้มาแบ่งเลี้ยงตามปริมาตรที่ต้องการเหนี่ยวนำ จากนั้นเหนี่ยวนำให้ยีนเกิดการแสดงออกโดยใช้ L-arabinose ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ระดับ คือ 0%, 0.00002%, 0.0002%, 0.002% และ 0.02% ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Invitrogen, 2009) จากการคำนวณขนาดโปรตีนด้วยโปรแกรม Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) คาดว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกจะมีน้ำหนักประมาณ 47 kD เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วนำไปตรวจสอบโปรตีนรวมของเซลล์ ที่ทำการเหนี่ยวนำเทียบกับโปรตีนรวมของเซลล์ที่ไม่ได้ทำการเหนี่ยวนำ และโปรตีนรวมของ expression host ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าทุกความเข้มข้นของ L-arabinose ไม่เห็นความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาดประมาณ 47 kD เกิดขึ้น แต่ที่ขนาดประมาณ 50 kD ความหนาของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับ *E. coli* Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose และใน *E. coli* Top 10 มีการผลิตโปรตีนขนาดประมาณ 80 kD ซึ่งในยีน Cel48PT6 ไม่มีการผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่านี้ และยีนขนาด 120 kD ของ Positive clone มีการผลิตโปรตีนที่ความเข้มข้น 0.02% ของ L-arabinose ตามเป้าหมาย (ภาพที่ 4.25) โดย positive clone คือ เวกเตอร์ pBAD-TOPO/LacZ/V<sub>5</sub>-His สำหรับใช้ในการ ตรวจสอบว่า *E. coli* Top10 สามารถชักนำให้มีการสร้าง



ภาพที่ 4.25 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดลูกผสม pBAD TOPO/Cel48PT6 ใน *E. coli* Top10 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของ L-arabinose ที่ระดับต่างๆ คือ 0.00-0.02% วิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE โดยที่ M คือ โปรตีนมาตรฐาน, pBAD TOPO/Cel48PT6, Top 10 คือ เชื้อ *E. coli* Top 10 ที่ไม่มีการแทรกสอดพลาสมิดเวกเตอร์และไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose และ ECP คือ Expression control plasmid ของเชื้อ *E. coli* Top 10 ที่มี pBAD-TOPO/LacZ/V<sub>5</sub>-His

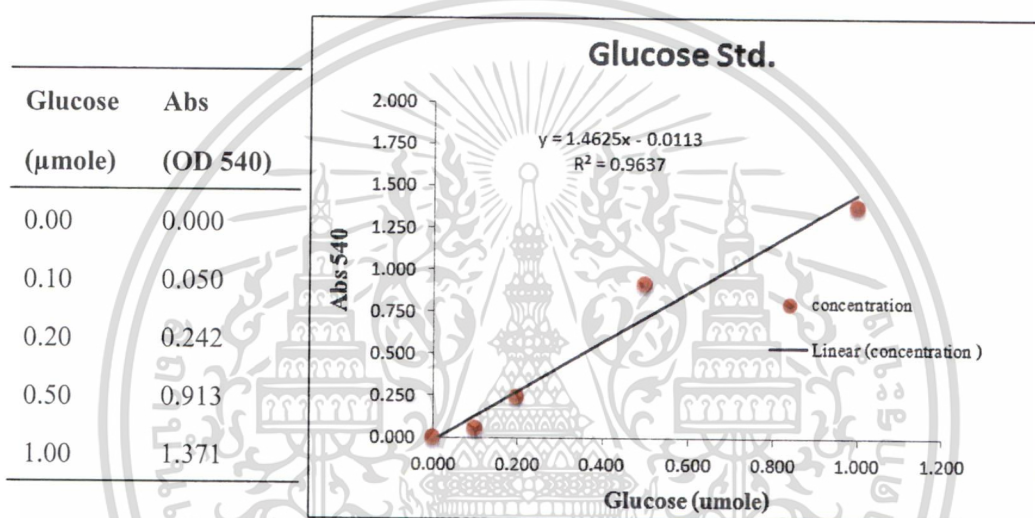
โปรตีนได้หรือไม่ โดยตรวจสอบได้จากการชักนำเชื้อ *E. coli* Top10 ที่มี pBAD-TOPO/LacZ/V<sub>5</sub>-His ด้วย L-arabinose ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02% ถ้าเชื้อมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผลิตโปรตีนได้ เวกเตอร์จะผลิตโปรตีน  $\beta$ -galactosidase ที่ขนาด 120 kD (Invitrogen, 2009) ซึ่งจากการตรวจสอบ Positive control นี้บอกได้ว่าเชื้อ *E. coli* Top 10 ยังมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ เนื่องจาก pBAD-TOPO/LacZ/V<sub>5</sub>-His ถูกชักนำให้มีการสร้างโปรตีนเมื่อกระตุ้นด้วย L-arabinose ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02% และเมื่อตรวจสอบการผลิตโปรตีนของ Cel48 พบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ L-arabinose 0.00002%-0.02% ไม่พบความแตกต่างของขนาดของโปรตีนแบบชัดเจน เพื่อยืนยันผลว่า Cel48PT6 มีการผลิตโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสได้จริง จึงได้ทำการเลือกตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ด้วยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของโปรตีนจากยีน Cel48PT6 โดยเลือกการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย L-arabinose ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02% เพราะ ณ ตำแหน่งโปรตีนประมาณ 50 kD แถบโปรตีนที่มีความหนา กว่า ความเข้มข้นอื่นอยู่บ้างเล็กน้อย ซึ่งคาดว่าจะมีการผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ดีที่สุด

#### 4.2.1.5 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

จากการเปรียบเทียบลำดับโปรตีน พบว่ายีน Cel48PT6 มีความคล้ายกับยีนที่ผลิต endo-b-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) เช่นยีนจาก *R. albus cel48A gene strain 20* (FM872296.1) และ *R. albus cel48A gene complete cds* (AY422811.1) จึงคาดการณ์ว่ายีน Cel48PT6 จะเป็นเอนไซม์ เซลลูเลสในกลุ่ม endocellulase โดย Reverbel-Leroy *et al.* (1997) ได้ทำสร้างพลาสมิดลูกผสมของ ยีน CelF จากเชื้อ *Cl. cellulolyticum* จากการวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์พบว่ามีการย่อย สลาย CMC เกิดขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบยีนในฐานข้อมูลพบว่า ยีน CelF มีความเหมือนกับยีน endoglucanases CelA และ CelC เนื่องจากแบคทีเรีย *E. coli* มีการผลิตโปรตีนภายในเซลล์ และ เอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มไกลโคไรโคไลส ที่เป็นกลุ่ม  $\beta$ -1,4 bond จะไม่ชอบน้ำ hydrophobic cluster (Parsieglia *et al.*, 1998) จึงทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยสกัดโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ ด้วย lysis buffer L1 ซึ่งบัฟเฟอร์นี้ จะไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีนเมื่อทำการสกัดโปรตีน ออกมาภายนอกเซลล์ เนื่องจากสารละลายเกลือจะมี pH และ ค่า osmotic ที่สมดุล เหมือนกับเซลล์ ของแบคทีเรีย ทำให้โปรตีนที่ถูกสกัดออกมาภายนอกเซลล์ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Dulbecco, 1954) สกัดโปรตีนจาก *E. coli* Top10 ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0 และ 0.02% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดย L-arabinose มีผลต่อการเปลี่ยนสีของค่า reducing sugar จะต้องมีการหักลบค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ทุกครั้ง ในการตรวจหาปริมาณของ reducing sugar ด้วยการนำค่า Enzyme blank มาหักลบ กับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน Cel48PT6 การตรวจสอบการดูดกลืนแสงจะนำโปรตีนรวมที่มี soluble และ insoluble protein รวมกันอยู่ มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการตรวจสอบการกิจกรรมของเอนไซม์ของยีน Cel48PT6 โดยนำโปรตีนรวมของยีน Cel48PT6 ที่สกัดด้วย lysis buffer L1 มาตรวจการย่อย CMC ความเข้มข้น 1% (w/v) ที่ละลายใน สารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH 6 และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที (บุษยัญญู รุ่งรัตนกลิน, 2554) จากนั้นเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) แล้วนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm จากการเทียบหาปริมาณ reducing sugar กับกราฟ น้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน โดย 1 ยูนิตของ เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ให้ reducing sugar 1  $\mu$ M/min ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ (Li *et al.* 2009) (ภาพที่ 4.26) พบว่า ปริมาณ reducing sugar ที่คำนวณได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.094  $\mu$ mole ซึ่งมีค่า กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.039 Unit (ตารางที่ 4.6)

จากการวัดค่าดูดกลืนแสง พบว่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Cel48PT6 เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อย ซึ่งอาจมีผลมาจากโปรตีนที่ผลิตได้จากยีน Cel48PT6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* Top10 ซึ่ง Invitrogen (2009) รายงานว่า เมื่อแบคทีเรีย *E. coli* Top10 มีการผลิตโปรตีนได้น้อย อาจเป็นผลมาจาก โปรตีนเป็นพิษต่อ host เนื่องจากมีการผลิตโปรตีนในปริมาณมากจนเกินไปจึงเกิดการผลิตโปรตีนน้อยลง จึงเปลี่ยนไปใช้ *E. coli* สายพันธุ์อื่นที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ด้วยการโอนถ่ายเข้าสู่ *E. coli* LMG194 (ให้มาพร้อมในชุด pBad Topo) ซึ่งจะมี



ภาพที่ 4.26 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ใช้เทียบหาปริมาณ reducing sugar ในระบบ *E. coli* Top10

ตารางที่ 4.6 ผลการเทียบหาปริมาณ reducing sugar (μmole)

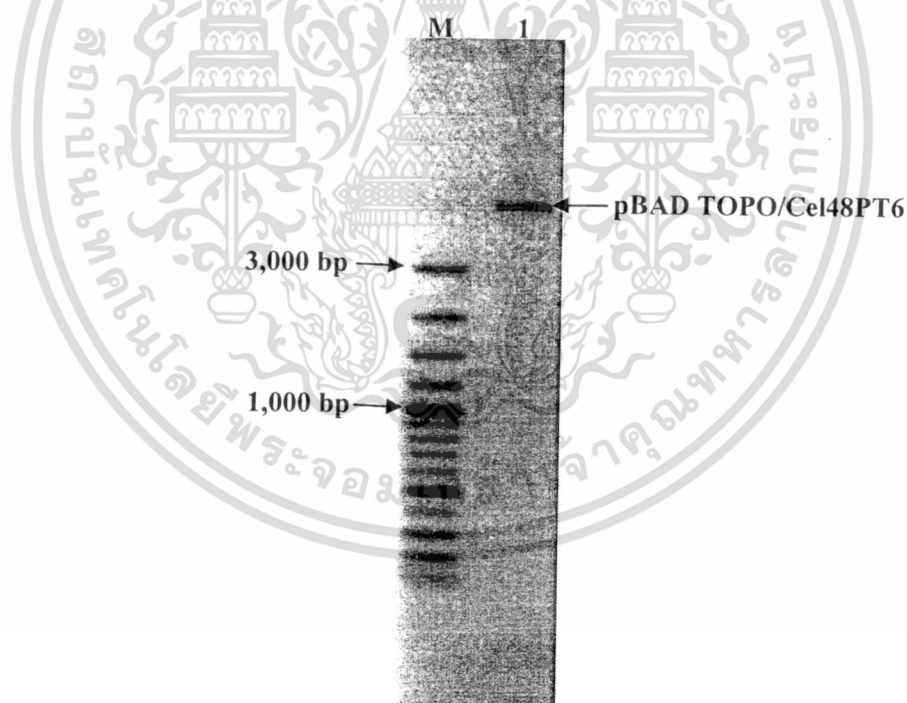
Host	L-arabinose (%)	Abs (OD 540)			Reducing sugar (μmole)	Unit
		Enzyme blank	Sample	Total sample		
<i>E. coli</i> Top10	0	0.052	0.067	0.015	0.030	0.013
<i>E. coli</i> Top10/ Cel48PT6	0.02	0.056	0.103	0.047	0.094	0.039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพในการผลิต โปรตีนได้มากกว่า *E.coli* top10 เนื่องจาก *E. coli* LMG194 จะไปชะลอการสังเคราะห์โปรตีนของ เวกเตอร์ pBAD TOPO ให้มีการผลิตโปรตีนในปริมาณน้อยๆ ซึ่งทำให้เซลล์อยู่รอดได้ จึงไม่เกิดการหยุดสังเคราะห์โปรตีน ที่ต้องการศึกษา

#### 4.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cel48MT03 ใน *E.coli* LMG194 โดยเวกเตอร์ pBAD TOPO

ทำการสกัดพลาสมิด Cel48PT6 ด้วยวิธีตามข้อ 3.2.2.9 แล้วถ่ายโอนยีนเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* LMG194 และทำการตรวจสอบการแทรกสอดของพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ คัดเลือกโคลนที่มียีน Cel48PT6 จากนั้นทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์



ภาพที่ 4.27 ผลการวิเคราะห์อเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ของการทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์ ตามข้อ 3.2.2.9 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), 1 คือพลาสมิด pBAD TOPO/Cel48PT6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

นำพลาสมิดเวกเตอร์ลูกผสม pBAD TOPO/Cel48PT6 ที่สกัดจากวิธีข้อ 3.2.2.9 (ภาพที่ 4.27) ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* LMG194 เลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ streptomycin เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคลนมาทั้งหมด 8 โคลน โดยนำโคลนทั้งแปดมาทำ colone PCR ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายยาว 1,126 bp จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.28 พบว่าโคลนที่ 5 มีการปรากฏขนาดของชิ้นยีนที่ต้องการชัดเจนที่สุด ได้ทำการคัดเลือกโคลนที่ 5 ที่มีการแทรกสอดของเวกเตอร์ไปตรวจสอบการชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนต่อไป



ภาพที่ 4.28 ผลการวิเคราะห์ห่อเล็กโทร โพรไฟล์ซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ของผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ Cel48\_F1 และ Cel48\_R1 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (100 ng), C คือ *E. coli* LMG194 m ไม่มีการแทรกสอดพลาสมิดเวกเตอร์, 1-8 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากแต่ละโคลนของ *E. coli* LMG194/Cel48PT6 ที่อุณหภูมิ primer annealing 55°C

#### 4.2.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ใน *E. coli* LMG194

เหนี่ยวนำให้ยีนเกิดการแสดงออกโดยเลี้ยงหัวเชื้อ *E. coli* LMG194/Cel48PT6 ในอาหารเหลว RM+Glucose เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการชักนำให้ผลิตโปรตีนโดยนำหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเลี้ยงในอาหาร LM+Glycerol เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้ OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.5 และใช้ L-arabinose กระตุ้นให้เชื้อสร้างโปรตีนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ คือ 0, 0.002%, 0.02% และ 0.2% ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และคาดการณ์ว่าใน Cel48PT6 จะมีการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาดประมาณ 47 kD เมื่อทำการตรวจสอบ โปรตีนรวมของ Cel48PT6 ที่ทำการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose เทียบกับโปรตีนรวมของ Cel48PT6 ที่ไม่ได้ทำการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose และ โปรตีนรวมของ expression host จากการสกัดโปรตีน



ภาพที่ 4.29 การแสดงออกของโปรตีนรวมจากพลาสมิดลูกผสม pBAD TOPO/Cel48PT6 จากการสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer L1 ใน *E. coli* LMG ทำการวิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE โดยที่ M คือ โปรตีนมาตรฐาน, LMG คือ *E. coli* LMG194 ที่ไม่มีการแทรกสอดพลาสมิดเวกเตอร์ และไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย L-arabinose, LMG/Cel48PT6 คือ *E. coli* LMG194 ที่มีแทรกสอดพลาสมิดเวกเตอร์ Cel48PT6 และ 0, 0.002, 0.02, 0.2 คือ การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย L-arabinose ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.002, 0.02 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

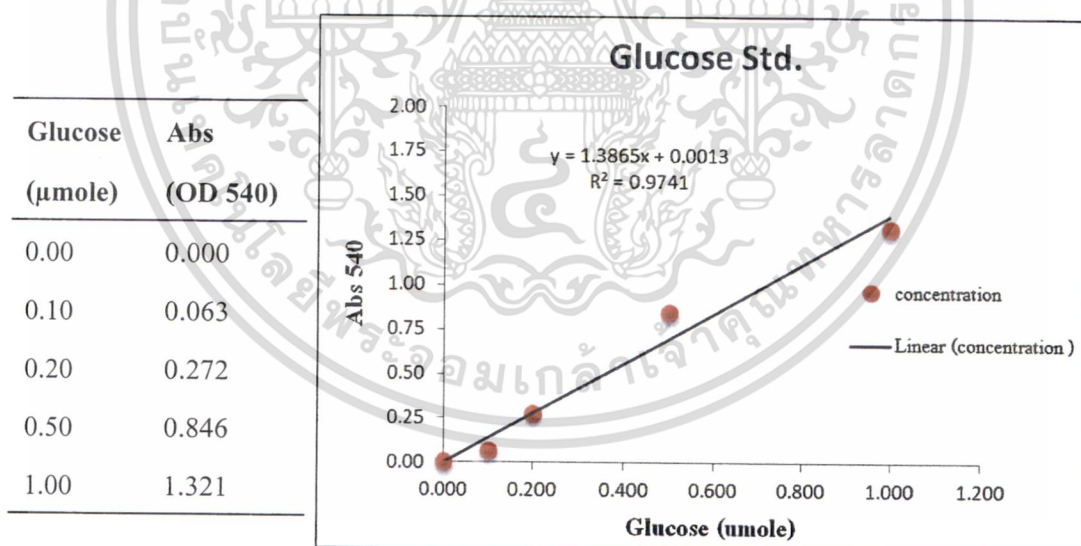
ด้วย Lysis buffer L1 จากการทำ SDS-PAGE พบว่าทุกความเข้มข้นของ L-arabinose ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาดประมาณ 47 kD เกิดขึ้น แต่เมื่อดูส่วนประกอบรวมของโปรตีนรวมพบความแตกต่างของการผลิตขนาดของโปรตีนที่ต่างกัน ที่ชัดเจนคือตำแหน่งประมาณ 30 kD และที่โปรตีนขนาดประมาณ 40 kD ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ L-arabinose 0.02% และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.2% มีขนาดของโปรตีนต่างๆ ปรากฏอยู่ (ภาพที่ 4.29) เนื่องจากมีขนาดของโปรตีนที่ต่างจาก *E. coli* LMG194 ที่ไม่ได้ชักนำให้มีการแสดงออก อยู่ที่ขนาดประมาณ 30 และ 40 kD ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นโปรตีนของยีนเซลลูเลสที่ได้จากยีน Cel48PT6 จึงได้เลือกใช้ ความเข้มข้นสุดท้ายของ L-arabinose ที่ 0.02 % มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

#### 4.2.2.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

ทำการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์จากโปรตีนรวม ของ *E. coli* LMG194/ Cel48PT6 ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose เข้มข้นสุดท้าย 0.02% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วย lysis buffer L1 ตามข้อ 4.2.1.5 ทำการทดสอบการทำงานโดยการย่อย CMC ความเข้มข้น 1% (w/v) และ Avcil ความเข้มข้น 1% (w/v) ที่ละลายในสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH 6 และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm แล้วเทียบหาปริมาณ



ภาพที่ 4.30 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ใช้เทียบหาปริมาณ reducing sugar

reducing sugar กับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ภาพที่ 4.30) พบว่าปริมาณ reducing sugar จากการย่อย CMC ที่คำนวณได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.075 μmole ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.011 Unit และ การย่อย Avicel กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.027 μmole ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.004 Unit (ตารางที่ 4.7) จากการวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 48 จากยีน Cel48PT6 ที่ผลิตจากเชื้อ *E.coli* LMG194 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยมาก

ตารางที่ 4.7 ผลการเทียบหาปริมาณ reducing sugar ( $\mu\text{mole}$ )

Sub. Strate	L-arabinose (%)	Abs (OD 540)			Reducing sugar ( $\mu\text{mole}$ )	Unit
		Enzyme	Sample	Total		
		blank	sample	sample		
CMC	0.02	0.056	0.103	0.047	0.075	0.011
Avicel	0.02	0.058	0.075	0.017	0.027	0.004

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยมากจึงไม่สามารถบอกได้ว่า ยีนเซลลูเลสจากยีน Cel48PT6 ที่แทรกสอดในพลาสมิดเวกเตอร์ pBAD TOPO มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไม่ อย่างไรก็ตามจากวิทยานิพนธ์ ไม่พบน้ำหนักของโปรตีนที่แตกต่างจาก control บน SDS-PAGE อาจเป็นไปได้ใน 2 ประเด็นคือ มีการสร้างโปรตีนแต่มีการแสดงออกน้อยมาก หรือไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเลยในระบบที่ทำการทดสอบ จึงควรทำการค้นหายีนส่วนที่เหลือให้เต็มเส้น และทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี western blot เพื่อตรวจสอบว่ามีการผลิตโปรตีนหรือไม่ มีขนาดเท่าใด โดยใช้ anti-His เป็นโพรบตรวจจับ หรือทดสอบหาระบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่เหมาะสมต่อไป

## บทที่ 5

# สรุปผลการทดลอง

### 5.1 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส

การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ ด้วยไพรมอร์ที่ออกแบบจากลำดับส่วนอนุรักษ์ของยีนไกลโคไรเซคไฮโดรเลสกลุ่มที่ 48 พบว่าชิ้นส่วนของยีนจากการทำ ปฏิกริยาพีซีอาร์ มีขนาดประมาณ 1,200 bp เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์โคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคลนเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลพบว่ามียีน Cel48MT03 เป็นยีนส่วน catalytic domain ของยีน GH48 ซึ่งชิ้นส่วนยีน Cel48MT03 มีความเหมือนกับยีน GH48 protein จากเชื้อ *R. flavefaciens* (WP\_009987706.1) และจากการ Blastx พบว่าข้อมูลโปรตีนตัวที่เหมือน Cel48MT03 มากที่สุด แยกมาจาก metagenome ของ uncultured organism (ADX05724.1) ใน cow rumen ที่ลักษณะเป็น single domain ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Cel48 และมี catalytic domain เต็มเส้นประมาณ 800 อะมิโน ส่วนยีน Cel48MT03 เมื่อถอดรหัสจะได้ประมาณ 375 อะมิโน ซึ่งจะขาดไปประมาณ 400 อะมิโน ซึ่งอาจจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงทำการตรวจเช็คกิจกรรมของเอนไซม์

### 5.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Cel48MT03 ด้วยวิธี Genome walking พบว่าไม่สามารถหาลำดับของยีนได้ แต่จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีน Cel48-MT03 มีส่วนของ catalytic domain ของยีนไกลโคไรเซคไฮโดรเลสกลุ่มที่ 48 จึงใช้ยีน Cel48MT03 เป็นยีนต้นแบบในการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

### 5.3 การแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli*

นำยีน Cel48MT03 มาทำการแสดงออกโดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) โดยการเชื่อมต่อยีน Cel48MT03 กับเวกเตอร์ pET28a(+) ไม่ประสบความสำเร็จ จึงไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ในระบบนี้ได้

จากนั้นทำการเปลี่ยนการวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์มาใช้ระบบ เวกเตอร์ pBAD TOPO โดยการเชื่อมต่อยีน Cel48MT03 กับเวกเตอร์ pBAD TOPO พบว่า เวกเตอร์ pBAD TOPO/Cel48PT6 มีการผลิตโปรตีนได้ถูกต้องโดยไม่มีการอ่านผิดเฟรม แต่ขนาดของโปรตีนที่คาดหวังคือ 47 kd ซึ่งจากการตรวจสอบขนาดของโปรตีนบน SDS-PAGE ไม่พบโปรตีนขึ้นที่ตำแหน่ง 47 kd แต่โปรตีนที่ผลิตได้จากเวกเตอร์ pBAD TOPO ใน *E. coli* Top10 มีความแตกต่างกับโปรตีน pBAD TOPO/Cel48PT6 ที่ผลิตโดย *E. coli* Top10 อยู่ คือไม่เห็นความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาดประมาณ 47 kd แต่ที่ขนาดประมาณ 50 kd ความหนาของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับ *E. coli* Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose และใน *E. coli* Top 10 มีการผลิตโปรตีนขนาดประมาณ 80 kd ซึ่งในยีน Cel48PT6 ไม่มีการผลิตโปรตีนที่ไซส์นี้ อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของยีน Cel48PT6 โดยการย่อย CMC พบว่าปริมาณ reducing sugar ที่คำนวณได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.094  $\mu\text{M}$  จึงเปลี่ยน host เป็น *E. coli* LMG194 เนื่องจาก *E. coli* LMG194 มีความสามารถในการผลิตโปรตีนได้ดีกว่า *E. coli* Top10 ในกรณีที่ยีนขึ้นนั้นๆ อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือมีขนาดใหญ่ จึงคาดหวังว่า *E. coli* LMG194 จะสามารถผลิตโปรตีน Cel48PT6 ที่ขนาด 47 kd ได้ แต่เมื่อทำการถ่ายฝากเวกเตอร์ pBAD TOPO/Cel48PT6 เข้าสู่ *E. coli* LMG194 ยังคงไม่พบโปรตีนที่ขนาด 47 kd แต่พบโปรตีนที่ขนาด ประมาณ 30 kd และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของยีน Cel48PT6 โดยการย่อย CMC พบว่าปริมาณ reducing sugar ที่คำนวณได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.075  $\mu\text{M}$  และเมื่อตรวจสอบการย่อย Avicel กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเพียง 0.027  $\mu\text{mole}$  ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยมากจึงไม่สามารถบอกได้ว่า ยีนเซลลูเลสจากยีน Cel48PT6 ที่แทรกสอดในพลาสมิดเวกเตอร์ pBAD TOPO มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไม่

ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปสามารถตรวจสอบการผลิตโปรตีนของยีน Cel48PT6 ได้ด้วยวิธี western blot hybridization เนื่องจากยีน Cel48PT6 มี His<sub>6</sub> อยู่ตรงตำแหน่ง NH<sub>2</sub>-terminal อย่างไรก็ตาม จากวิทยานิพนธ์ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE อาจเป็นไปได้ใน 2 ประเด็นคือมีการสร้างโปรตีนแต่มีการแสดงออกน้อยมาก หรือไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเลย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระบบที่ทำการทดสอบ จึงควรทำการคั่นหาชิ้นส่วนที่เหลือให้เต็มเส้น และทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี western blot เพื่อตรวจสอบว่ามีการผลิตโปรตีนหรือไม่ มีขนาดเท่าใด โดยใช้ anti-His เป็นโพรบตรวจจับ หรือทดสอบหาระบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่เหมาะสมต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

จรัญ จันทนาลักษณ์. 2527. *ควายในระบบไร่นาไทย*. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

ฉลอง วชิราภกร. 2541. *โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น*. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชญากา นิมสุวรรณ. 2550. “การแพ้โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ : วิธีการตรวจสอบและเทคโนโลยีการแก้ไข.” *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 1(2) : 11-24.

ชัยชนม์ หลักทอง. 2556. *รูปร่างและการเคลื่อนที่ของ DNA*. [Online]. Available: <http://tchaichon.blogspot.com/2013/01/dna.html>. 03/04/2013

ทองเถียน บัวจุม, (ผู้เรียบเรียง). 2551. *โภชนศาสตร์สัตว์เบื้องต้น*. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2527. *โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง*. ภาคสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

บุษยฉัญจ์ รุ่งรัตนกลิน. 2554. “การโคลนและการแสดงออกของยีนเซลล์ลูเลสจากจุลินทรีย์ในรูเมน กระบือ.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. *เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เมธา วรรณพัฒน์, พงศธร คงมัน, วงศ์ประสิทธิ์ จันทคุณ และ เรืองยศ พิลาจันทร์. 2552. “การศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยเยื่อใยในกระเพาะรูเมนระหว่างกระบือปลักและโคเนื้อโดยเทคนิค Real-time PCR.” ใน *การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. ขอนแก่น. หน้า 112-114

วิโรจน์ จันทรัตน์. 2540. *กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เคี้ยวเอื้อง*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ไวยุติ๊ะ เหตุเหล่าะ. Copy right 2013. *สารชีวโมเลกุล (biomolecule)*. [Online]. Available : <http://www.thaigoodview.com/node/21065?page=0,4>. 17/05/2013

ศรัณยา สถิตย์มันวิวัฒน์. 2551. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*).” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า  
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริยะ สะวานนท์. 2551. จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน.  
ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต  
กำแพงแสน.
- เสาวนีย์ สถิตธรรม. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม  
: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Anonymous. 2012. **Material and methods**. [Online]. Available: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/bickelmann-constanze-2011-06-30/HTML/chapter2.html.01/01/2012>
- Atalla, R.H. and VanderHart, D.L. 1984. "Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms". **Science**. 223:283-285.
- Baik, M.G., Ha, J.K., Kim, W.Y. and Ham, I.K. 1997. "Effects of different levels of concentrate in complete rations on nutrient digestibility and ruminal metabolites in sheep and growth performance in Korean native bulls." **Asian-Aus. J. Anim. Sci.** 10: 371-377.
- Barak, Y., Bayer, E.A., Lamed, R., Morais, S. and Vazana, Y. 2010. **Interplay between *Clostridium thermocellum* Family 48 and Family 9 Cellulases in Cellulosomal versus Noncellulosomal States**. [Online]. Available: <http://aem.asm.org/content/76/10/3236.full.04/03/2012>
- Bayer, E.A., Goldman, M., Kenig, R., Lamed, R., Shoham, Y. and Xu, Q. 2004. **Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* Cellulosome: Description of a Cell Surface-Anchoring Scaffoldin and a Family 48 Cellulase**. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC344227/>. 12/02/2011
- Bayer, E.A., Shimon, L.J.W., Shoham, Y. and Lamed, R. 1998. "Cellulosomes-Structure and Ultrastructure." **J Struct Biol.** 124 : 221-234.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Beguin, P. 1990. "Molecular biology of cellulose degradation." **Annu. Rev. Microbiol.** 44:219-248.
- Begum, F., Absar, N. and Alam, M. S. 2009. "Purification and Characterization of Extracellular Cellulase from *A. oryzae* ITCC-4857.01." **J. App. Sci. Res.** 5(10): 1646-1651.
- Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997. "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications". **Biotechnol Adv.** 97:15:583-620.
- CAZy database. 2013. **Glycoside hydrolase family classification.** [Online]. Available: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. 20/05/2013
- CAZy pedia. 2012. **Glycoside hydrolase family 48.** [Online]. Available: [http://www.cazy.org/pedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_48](http://www.cazy.org/pedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_48). 15/05/2013
- Cinar, I. 2005. "Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids." **P. Biochemistry.** 40: 945-949.
- Coleman, G.S., Laurie, J.I., Bailey, J.E. and Holdgate, S.A. 1976. "The cultivation of cellulolytic protozoa isolated from the rumen." **J Gen Microbiol.** 95(1) : 144-150.
- Cui, Z., He, J., Li, S. and Wang, S. 2007. **Self-Formed Adaptor PCR: a Simple and Efficient Method for Chromosome Walking.** [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951051/>. 20/03/2010
- Deng, W.Xi.D. and Mao, H. 2008. "The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review." **Mol. Biol. Rep.** 35:265-274.
- Desvaux, M. 2005. "The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*." **Enzyme Microb Technol.** 37 : 373-385.
- Devillard, E., Goodheart, D.B., Karnati, S.K., Bayer, E.A., Lamed, R., Miron, J., Nelson, K.E. and Morrison, M. 2004. **Ruminococcus albus 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both**

- of which possess a novel modular architecture. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679233>. 08-05-2012
- Dulbecco, R. and Vogt, M. 1954. "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses." *J Exp Med.* 99(2) : 167-182.
- EMBL-EBI. 2013. ClustalW. [Online]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. 20/05/2013
- Evrogen J.S.C. 2010. Genome walking. [Online]. Available: <http://www.evrogen.ru/technologies/genome-walking.shtml>. 05/03/2010
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M. and Lvy, Y. 1987. **Nature of cellulosis material, Cellulose hydrolysis.** Springer-Verlay. Berlin. Heideltery. Publisher.
- Gal, L., Gaudin, C., Belaich, A., Pages, S., Tardif, C. and Belaich, J.P. 1997. "CelG from *Clostridium cellulolyticum*: a Multidomain Endoglucanase Acting Efficiently on Crystalline Cellulose." *J. Bacteriol.* 179(21) : 6595–6601.
- Giovannoni, S. J., Lanoil, B. D., Stein, J. L., DeLong, E. F., Urbach, E. and Vergin, K. L. 1998. **Screening of a Fosmid Library of Marine Environmental Genomic DNA Fragments Reveals Four Clones Related to Members of the Order Planctomycetales.** [Online]. Available: <http://aem.asm.org/content/64/8/3075.full>. 14/06/2011
- Girard, C. and Jouanin, L. 1999. "Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*." *Insect Biochem Mol Biol.* 29(12) : 1129-1142.
- Henrissat, B. 1991. "A classification of glycosyl hydrolases beased on amino acid sequence similasrities." *Biochem. J.* 280 : 309-316.
- Henrissat, B., and Davies, G. 1997. "Structure and sequence-base classification of glycoside hydrolase." *Curr Opin Struc Biol.* 7 : 637-644.
- Henrissat, B., Coutinho, P.M., Rancurel, C. and Lombard, V. 2012. *Carbohydrate-Active Enzymes Database.* [Online]. Available : [http:// www.cazy.org/](http://www.cazy.org/).

- Henrissat, B., Coutinho, P.M., Rancurel, C. and Lombard, V. 2012. **Carbohydrate-Active Enzymes Database**. [Online]. Available : [http:// www.cazy.org/](http://www.cazy.org/). 20/05/2013
- Hungate, R.E. 1966. **The Rumen and Its Microbes**. Academic Press Inc., U.S.A.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." **Gene**. 1: 23-28.
- Invitrogen. 2009. pBAD TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit. [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbadtopo\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbadtopo_man.pdf). 20/05/2013
- Ioelevich, M. 2008. "Nanostructured cellulose: Review." *BioResources*. 3(4) : 1403-1418.
- Jaeger, K.E., Leggewie, C., Raasch, C., Streit, W.R., Uesbeck, A. and Voget, S. 2003. **Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome**. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201203/>. 20/03/2010
- Kanokratana, P., Chanapan, S, Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand." **J. Basic Microbiol.** 44:430-444.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. 2008. "A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine." **Curr. Microbiol.** 57: 503-507.
- Kikuchi, T., Shibuya, H. and Jones, J. T. 2005. "**Molecular and biochemical characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria.**" [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1184544/>. 20/03/2012
- Kostiukovski, V.A., Okunev, O.N. and Tarakanov, B.V. 1990. "Anaerobic cellulolytic fungi from cattle rumen." **Mikrobiologija**. 59(6): 1067-74.
- Kottwitz, B. and Schambil, F. 2005. "**Cellulase and cellulose containing detergent.**" US Pat. 20050020472.

- Lamed, R. 2008. "Molecular microbiology and biotechnology." [Online]. Available: <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/lamed/lamed.html>. 10/03/2012.
- Levine, J.S., editor. 1996. *Biomass burning and global change : Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa*. Vol. 1. USA : The MIT Press.
- Li, W., Huan, X., Zhou, Y., Ma, Q. and Chen, Y. 2009. "Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*)." **Biochem Biophys Res Commun.** 383 : 397-400.
- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M. and Chen, Y.L. 2008. "Cloning of the Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated *Bacillus subtilis* and its Expression in *Escherichia coli*." **Mol Biotechnol.** 40 : 195-201.
- Lin, C., Urbance, J.W. and Stahl, D.A. 2009. *Acetivibrio cellulolyticus* and *Bacteroides cellulosolvens* are members of the greater clostridial assemblage. [Online]. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR\\_025918.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_025918.1). 10/09/2012.
- Linton, S.M., Greenaway, P. and Towle, D.W. 2006. "Endogenous production of endo-beta-1,4-glucanase by decapod crustaceans." **J Comp Physiol B.** 176(4):339-348.
- Liu, H. and Nichols, R. 1994. "PCR amplification using deoxyinosine to replace an entire codon and at ambiguous positions." *Biotechniques.* 16(1) : 24-26.
- Maciel, B.M., Santos, A.C.F., Dias, J.C.T., Vidal, R.O., Dias, R.J.C. Gross, E., Cascardo, J.C.M. and Rezende, R.P. 2009. "Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste." **Genet Mol. Res.** 8(1): 375-388.
- Mackie, R.I. and White, B.A. 1997. **Gastrointestinal Microbiology**. Vol.1 Chapman and hall, New York, N.Y.
- Malherbe, S. and Cloete, T.E. 2002. "Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications." *Rev Environ Sci Biotechnol.* 1 : 105-114.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Anal Chem.* 31(42) : 6-8.

- Moat, A.G. and Foster, J.W. 1995. **Microbial Physiology**. 3rd ed., Printed in the U. S. A.
- Oyeleke, S.B. and Okusanmi, T.A. 2008. "Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants." **Afr. J. Biotechnol.** 7(10): 1503-1504.
- Pages, S., Belaich, A., Fierobe, H. P., Tardif, C., Gaudin, C., and Belaich, J. P. 1999. "Sequence analysis of scaffolding protein CipC and ORFXp, a new cohesin-containing protein in *Clostridium cellulolyticum*: comparison of various cohesin domains and subcellular localization of ORFXp." **J Bacteriol.** 181(6) : 1801-1810.
- Pastor, F.I.J., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L. and Diaz, P. 2001. "Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp BP-23: evaluation of its performance in pulp refining." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55 : 61-68.
- Ramirez-Ramirez, N., Romero-García, E.R., Calderón, V.C., Avitia, C.I., Téllez-Valencia, A. and Pedraza-Reyes, M. 2008. **Expression, characterization and synergistic interactions of Myxobacter Sp. AL-1 Cel9 and Cel48 glycosyl hydrolases.** [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325747>. 16/03/2010.
- Ratanasut, K. 2013. **PCR and Primer Design.** [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/kumprocourses/pcrandprimerdesign>. 04/03/2013
- Reese, E.T. Ralph, G.H.S. and Hillel, S.L. 1950. "The biological degradation of soluble cellulose derivative and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis." **J. Bacteriol.** 59(4) : 485-497.
- Reverbel-Leroy, C., Pages, S., Belaich, A., Belaich, J.P. and Tardif, C. 1997. "The Processive Endocellulase CelF, a Major Component of the *Clostridium cellulolyticum* Cellulosome: Purification and Characterization of the Recombinant Form". **J. Bacteriology.** 46-52
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1990. "Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction from *Trichoderma longibrachiatum*." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (8): 2535-2539.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniants, T. 1989. "Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nded". **Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA**

- Sekar, V. 1987. "A rapid screening procedure for the identification of recombinant bacterial clones." **BioTechniques**. 5(1): 11-13.
- Shoseyov, O. and Warren, R.J. 1997. "Cellulose binding domains- a novel fusion technology for efficient, low cost purification and immobilization of recombinant proteins." **Innovations**. 7 : 1-3.
- Smisek, D.L. and Hoagland, D.A. 1989. "Agarose gel electrophoresis of high molecular weight, synthetic polyelectrolytes." **Macromolecules**. 22(5): 2270-2277.
- Soetaert, W. and Waegeman, H. 2011. "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering". **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**. 38: 1891-1910
- Sukuma, R.K., Singhanian, R.R. and Pandey, A. 2005. "Microbial cellulase-production, application and challenges." **J. Sci. Ind. Res**. 64: 832-844.
- Taguchi, H., Hagiwara, D., Genma, T., Karita S., Kimura, T., Sakka, K., and Ohmiya, K. 2004. "Cloning of the *Ruminococcus albus cel5D* and *cel9A* Genes Encoding Dockerin Module-containing Endoglucanases and Expression of *cel5D* in *Escherichia coli*." **Biosci Biotechnol Biochem**. 68(7) : 1557–1564.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M. and Benno, Y. 1999. "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." **FEMS Microbiol Ecol**. 29 : 159–169.
- University of Arkansas. 2011. **cellulose and microfibrils**. [Online]. Available: [http://www.ualr.edu/~botany/cellulose\\_microfibrils.jpeg](http://www.ualr.edu/~botany/cellulose_microfibrils.jpeg). 09/10/2012.
- Vercoe, P.E., Spight, D.H. and White, B.A. 1995. "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *celD* beta-glucanase gene from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1". **Can J Microbiol**. 41(1):27-34

- Wachenheim, D.E. and Patterson, J.A. 1992. "Anaerobic production of extracellular polysaccharide by *Butyrivibrio fibrisolvens* nyx." **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 385-391.
- Walter, M. 2011. **Common Features of Digestive Systems.** [Online]. Available : [http://bio.serv.fiu.edu/~walterm/GenBio2004/new\\_chap43\\_digestion/digestion.htm](http://bio.serv.fiu.edu/~walterm/GenBio2004/new_chap43_digestion/digestion.htm).
- Wanapat, M. and Rowlinson, P. 2007. "Nutrition and feeding of swamp buffalo: feed resources and rumen approach." [Online] Available:<http://home.kku.ac.th/metha/Nutrition%20and%20Feeding%20of%20Swamp%20Buffalo.pdf>. 05/05/2555.
- Weimer, P. 1996. **Ruminal Cellulolytic Bacteria.** [Online]. Available: [http://www.dfrc.wisc.edu/Research Summaries/ind\\_meet/dfrc8.pdf](http://www.dfrc.wisc.edu/Research%20Summaries/ind_meet/dfrc8.pdf). 20/01/2012.
- Wolfenden, R. and Snider, M.J. 2001. "The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts." **Acc Chem Res.** 34 : 938-945.
- Xia, L. and Cen, P.L. 1999. "Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry." **Process Biochem.** 34: 909-912.
- Xia, W., Liu, P. and Liu, J. 2008. "Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases". **Bio. Technol.** 99:6751-6762.
- Xie, G., Bruce, D.C., Challacombe, J.F., Chertkov, O., Detter, J.C., Gilna, P., Han, C.S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G.L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L.S., Brettin, T.S., Henrissat, B., Wilson, D.B., and McBride, M.J. 2007. "Genome Sequence of the Cellulolytic Gliding Bacterium *Cytophaga hutchinsonii*." **Appl Environ Microbiol.** 73(11) : 3536 – 3546.
- Zhang, X.Z., Zhang, Z., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Yang, Y. and Zhang, Y.H. 2010. "The noncellulosomal family 48 cellobiohydrolase from *Clostridium phytofermentans* ISDg: heterologous expression, characterization, and processivity". **App. Micro. Biotechnol.** 86: 525-533



ภาคผนวก ก

อุปกรณ์และการเตรียมสารในการทำวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. อุปกรณ์ในการทำวิจัย

- 1) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 2) เครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (MyCycler™ thermal cycler: Biometra, Germany)
- 3) เครื่อง vortex
- 4) heat block
- 5) เครื่องส่อง UV
- 6) เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene genius: Bio Imaging System, Germany)
- 7) เครื่อง incubate shaker
- 8) micro pipette
- 9) pipette tip
- 10) micro tube
- 11) PCR tube
- 12) ตู้แช่เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C, -20°C และ -80°C
- 13) ตู้บ่มเชื้อ
- 14) ตู้ Laminar flow
- 15) ไมโครเวฟ
- 16) spectrophotometer (Ultraspec 1100pro: Amersham Biosciences, UK)
- 17) เครื่องชั่งสาร
- 18) Low Temperature Circulator
- 19) water bath
- 20) เครื่อง gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การเตรียมสารละลาย

### 2.1) Extraction buffer สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ (Tajima *et al.* 1999)

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM	EDTA (pH 8.0)
100 mM	Sodium phosphate buffer (pH 8.0)
1.5 M	NaCl
1%	Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

### 2.2) 50X TAE buffer (Tris-acetate) (Smisek and Hoagland. 1989)

242 g	Tris-base
57.1 ml	Acetic acid
100 ml	0.5 M EDTA (pH 8)

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1 ลิตร

### 2.3) 6X loading buffer (Smisek and Hoagland. 1989)

0.25%	Bromophenol blue
30%	Glycerol

### 2.4) Ethidium bromide 0.5 µg/ml

ละลาย 0.5 mg ethidium bromide ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ml เก็บในขวดสีชา(ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียมสารละลาย)

## 2.5) Transformation Buffer (TB) สำหรับการเตรียม Competent cell (Inoue *et al.* 1990)

10 mM	PIPES
55 mM	MnCl <sub>2</sub>
15 mM	CaCl <sub>2</sub>
250 mM	KCl

## 2.6) 1M isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) (Sambrook *et al.* 1989)

เตรียม Stock IPTG โดยละลาย 2 g IPTG ในน้ำ 8 ml หลังจากละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย filter ขนาด 0.22  $\mu$ M เก็บที่ -20°C

## 2.7) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) (Sambrook *et al.* 1989)

ละลาย 20 mg X-gal ใน Dimethylformamide 400  $\mu$ l แล้วเก็บในหลอดที่กันแสงที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

## 2.8) Lysis buffer สำหรับการทำ size screening (Sekar. 1987)

5 mM	EDTA
10%	Sucrose
0.25%	SDS
0.05%	Bromophenol blue
100 mM	NaOH
10 mM	KCl

**2.9) Lysis buffer L1 หรือ Phosphate buffered saline สำหรับสกัดโปรตีน (Dulbecco and Vogt, 1954)**

140 mM	NaCl
2.7 mM	KCL
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1.8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.3)

**2.10) 10X M9 salts**

60 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
30 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 g	NaCl
10 g	NH <sub>4</sub> Cl

ละลายสารประกอบด้วยน้ำ 900 ml จากนั้นทำการปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 10 M NaOH จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 L และทำการนิ่งมาเชื้อ

**2.11) 20% Arabinose**

0.2 g	Arabinose
-------	-----------

ทำการละลายสาร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ จากนั้นกรองด้วย filter ขนาด 0.22 μM เก็บที่ -20 °C

### 3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1) Luria-Bertani broth (LB broth)

10 g	Tryptone
5 g	Yeast-extract
10 g	NaCl

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 3.2) Luria-Bertani agar (LB agar)

10 g	Tryptone
5 g	Yeast-extract
10 g	NaCl
15 g	Agar

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Agar ในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม Agar และ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 3.3) RM Medium + Glucose

1X	M9 Salts (0g 10X M9 salts)
2%	Casamino acid
0.2%	glucose
1 mM	MgCl <sub>2</sub>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม RM Medium 1 L ทำการละลาย 20 g Casamino acid 20 g ในน้ำ 890 ml ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 10X M9 Salts 100 ml, 1 M MgCl<sub>2</sub> 1ml และ 20% glucose ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 1 เดือน

### 3.4) RM Medium + Glycerol

1X	M9 Salts (0ก 10X M9 salts)
2%	Casamino acid
0.2%	glycerol
1 mM	MgCl <sub>2</sub>

การเตรียม RM Medium 1 L ทำการละลาย 20 g Casamino acid 20 g ในน้ำ 890 ml ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 10X M9 Salts 100 ml, 1 M MgCl<sub>2</sub> 1ml และ 20% glycerol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 1 เดือน

### 3.5) SOB media

2%	Tryptone
0.5%	Yeast-extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ ปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

- 1) Ampicillin 100 µg/ml
- 2) Chloramphenicol 34 µg/ml
- 3) Kanamycin 50 µg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่  
ต้องการ จากนั้นกรองด้วย filter ขนาด 0.22 µM เก็บที่ -20 °C

#### 5. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAG (Sambrook and Russell, 2001)

##### 5.1) Destaining buffer

200 ml	Methanol
200 ml	Acetic acid
1,600 ml	น้ำกลั่น

##### 5.2) 5X protein sample buffer

1.9 ml	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
0.5 ml	0.5M Tris-HCl pH 6.8
0.4 ml	Glycerol
0.8 ml	10% SDS
0.2 ml	2 Mercaptonethanol
0.2 ml	1% Bromophenol blue

### 5.3) 10X protein running buffer

30 g	Tris-base
144 g	Glycine
10 g	SDS
1,000 ml	น้ำกลั่น

### 5.4) Coomassie Brilliant Blue stain

2 g	Coomassie Brilliant Blue powder
1 L	Methanol
200 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

### 5.5) Polyacrylamide gel

Separating gel ใช้ 12% polyacrylamide gel และ stacking gel ใช้ 5% polyacrylamide gel โดยสารที่ใช้แสดงในตารางภาคผนวก ก1

ภาคผนวก ก1 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม Polyacrylamide gel

สาร	Separating gel	Stacking gel
น้ำกลั่น	3.4 ml	5.7 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2.5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
30% Acrylamide	4 ml	1.7 ml
10% Ammonium persulfate	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 5.6) 10% ammonium persulfate

ละลาย ammonium persulfate 100 mg ในน้ำกลั่น 1 ml

## 6. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

### 6.1) 0.1 M Sodium acetate pH 6

13.608 g Sodium acetate  
700 ml น้ำกลั่น

ปรับ pH ให้เป็น 6 ด้วย HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

### 6.2) 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

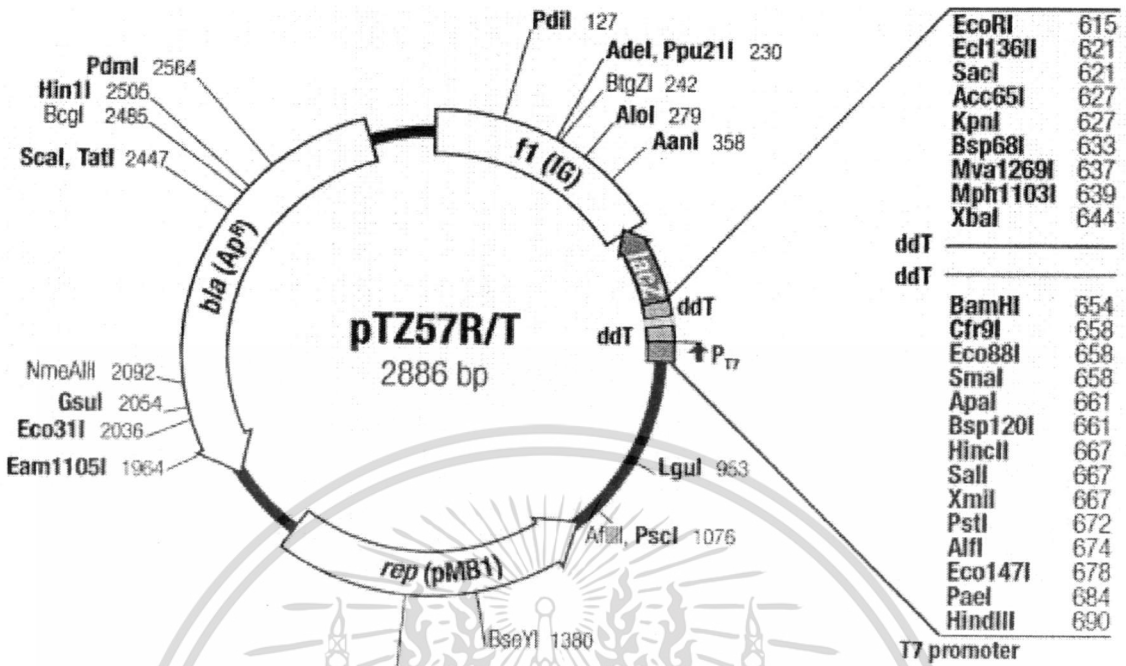
10.6 g 3,5-dinitrosalicylic acid  
19.8 g NaOH  
306 g Potassium sodium tartate  
8.3 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
7.6 ml Phenol  
1,416 ml น้ำกลั่น (อุ่น)



ภาคผนวก ข

แผนที่เวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



										Mph1103I								
M13pUC sequencing primer (1-20), 17-mer (#S0100)										615	EcoRI	Ecl136II	Acc65I	Bsp68I	Mva1269I			
5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC CTC GCG AAT GCA																		
3' C ATT TTG DTG CCG GTC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GAG CGC TTA CGT																		
LacZ ← Val Val Ala Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Glu Arg Ile Cys																		
										XbaI	650							
TCT AGA T ddT PCR										651	AT	CGG ATC CCG GGC CCG TCG ACT GCA						
AGA TCT A ddT product										ddT	TA	GCC TAG GGC CCG GGC ACC TGA CGT						
Arg Ser										Ile	Pro	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Cys
										AflI								
										Eco147I		PaeI	HindIII	695				
GAG GCC TGC ATG CAA GCT TTC CCG ATA GCG AGT CGT ATT AGA GCT TGG CGT																		
CTC CGG ACG TAC GTT CGA AAG GGA TAT CAC TCA GCA TAA TTT CGA ACC GCA																		
Leu Gly Ala His Leu Ser Glu Arg Tyr His Thr Thr Asn Ser Ser Pro Thr																		
AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 5'																		
TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'																		
M13pUC reverse sequencing primer (1-26), 17-mer (#S0101)																		
Ile Met Thr Met																		

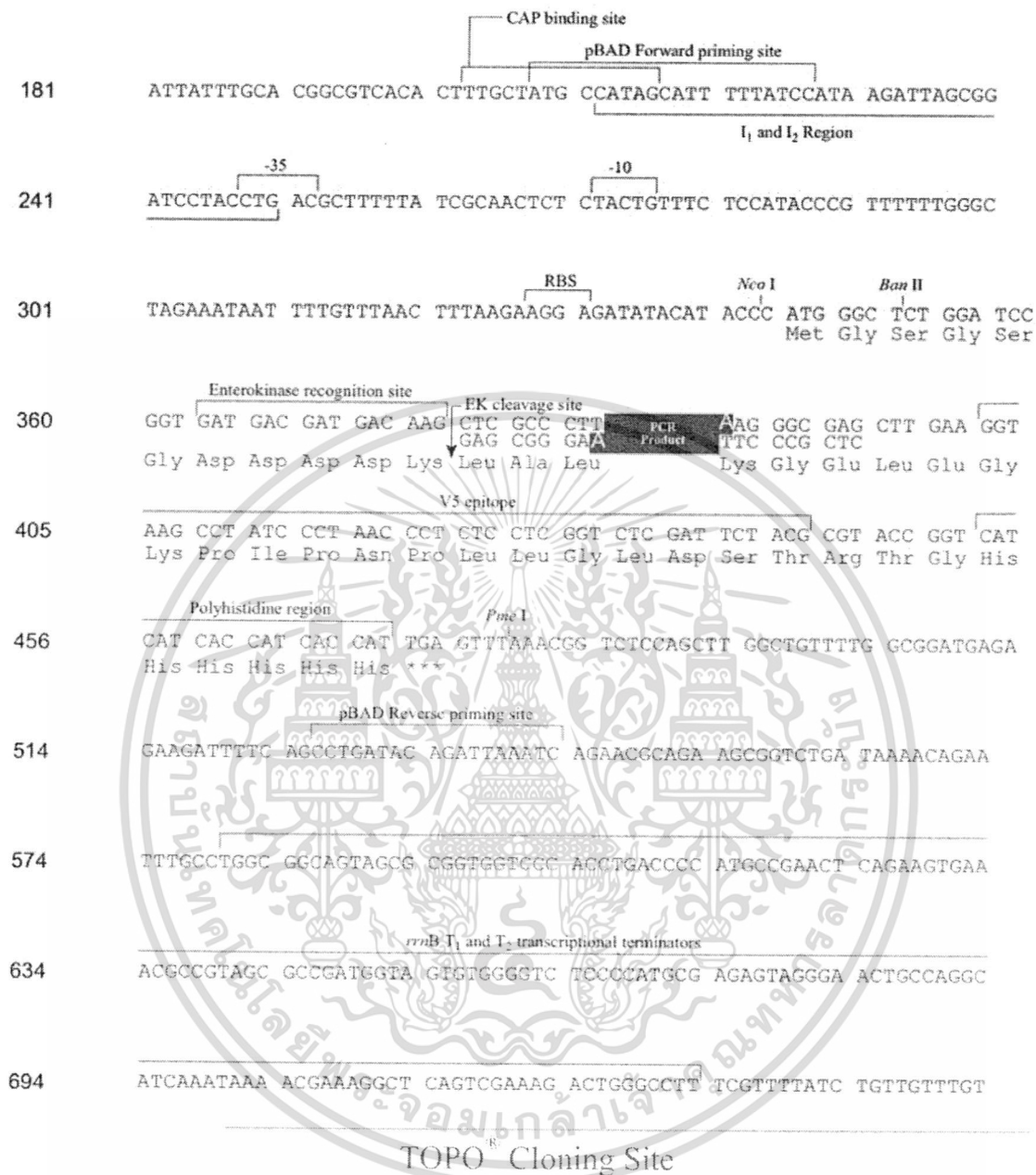
ภาพภาคผนวก ข 1 แผนที่เวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก ข 4 แผนที่เวกเตอร์ pBAD TOPO แสดงตำแหน่ง TOPO cloning site (invitrogen, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Cel48MT03

GAGGCGCCGGACTACGGTCATGAGACAACTTCTGAGGCAATGTCTTATATCGTATGG  
 ATCGCTTCTATGCACGATGTTCTCGCTAAGAAGGGCGTTATCGACGGAAGCGCTGAT  
 GCTCTCCCAAGGCTTGGAAGACCCTTGAGGCTATGATCCCTGGCTGGTCTAAGGCTT  
 CAGGCAGAGACGACATCGAGTATGAGACTCTCTGGAAGCAGGAGAGACTTAAGGCT  
 GATCCCGCTAACGAAGAGGATAAGCCCGAGAGCTACCCTGCTAAGAAGGCTAACGG  
 TGAGGCTATCAACCCCATGTTCAAGACCTTTGCTTCAGCTTACGGTTCAGACAAGGGC  
 TACTACCTCATGAACTGGCTCGCTGACGTTGACGACTGGTATGGCTTCGGCGGGCGGC  
 AACGGCAAATTCACATTCATCAACACATTCCAGCGTGGTGAGCAGGAGTCCTGTTC  
 GAGACTGTTCCCTCATCCCTGTCTTGAAGAGCTCAAGTACAGTAACAAAGAGACCGGT  
 ATCAAGGGTATCTTCAACGGAAGCGAAGTTCCTTCTCAGTATGCGTTCACAAACGCT  
 CCTGACGCTGAGGACCGTGCTATCCAGGCTGTATATTCGCAAACCGCAACGGCGTT  
 GACTGCGGAGAGATTTCCGGTCTTGCTGGTAAGATGGGTGACCAGTGCCGTAACGAT  
 ATGTTTCGATAAGTACTACAAGAAGCTCGGCTGCCAGAACATCAACCCTGAGTCAGCA  
 GGCTTCGACAGCCAGCACTTCCTCATGTCATGGTATACTTCATGGGGCGGAGCTCTTA  
 CTGCTGAATACGGCAATTACAGCTGGGCTTGGCAGATCGGCTGCTCACACTCACATC  
 AGTTCTATCAGAATCCTCTCGCTGCTTACGGCCTTATCTATGATAAGAGCATCAACGG  
 CGGTATGAAGGCTGAAAAGGCTACCGAGGACTATAAGATGTCTCTCCAGAGACAGAT  
 CGAGCTCTATCAGTGGCTCCAGTCTGTTGACGGTCCTTTTCGAGGCGGATGTACAAAC  
 TCTTACAGAGGACGTTACGAGAAGTATCCGGAAGGCTATCCTACCTTCTATGATATG  
 GTTATGTTCCCCACCCCGTGTATCCCGACCCAGGCTCA

## 2. นิวคลีโอไทด์ Cel48PT6

ATGGGCTCTGGATCCGGTGATGACGATGACAAGCTCGCCCTTGAAGCGCCGGACTAT  
 GGACATGAGACAACCTTCTGAGGCAATGTCTTATATCGTATGGATCGCTTCTATGCACG  
 ATGTTCTCGCTAAGAAGGGCGTTATCGACGGAAGCGCTGATGCTCTCCCCAAGGCTT  
 GGAAGACCCTTGAGGCTATGATCCCTGGCTGGTCTAAGGCTTCAGGCAGAGACGACA  
 TCGAGTATGAGACTCTCTGGAAGCAGGAGAGACTTAAGGCTGATCCCGCTAACGAAG  
 AGGATAAGCCCGAGAGCTACCCTGCTAAGAAGGCTAACGGTGAGGCTATCAACCCC  
 ATGTTCAAGACCTTTGCTTCAGCTTACGGTTCAGACAAGGGCTACCACCTCATGAACT  
 GGCTCGCTGACGTTGACGACTGGTATGGCTTCGGCGGGCAACGGCAAATTCACAT  
 TCATCAACACATTCCAGCGTGGTGAGCAGGAGTCCTGTTTCGAGACTGTTCCCTCATCC  
 CTGTCTTGAAGAGCTCAAGTACAGTAACAAAGAGACCCGGTATCAAGGGTATCTTCAA  
 CGGAAGCGAAGTTCCTTCTCAGTATGCGTTCACAAACGCTCCTGACGCTGAGGACCG  
 TGCTATCCAGGCTGTATATTTGCAAACCGCAACGGCGTTGACTGCGGAGAGATTTT  
 CGGTCTTGCTGGTAAGATGGGTGACCAGTGCCGTAACGATATGTTTCGATAAGTACTA  
 CAAGAAGCTCGGCTGCCAGAACATCAACCCTGAGTCAGCAGGCTTCGACAGCCAGCA  
 CTTCCCTCATGTCATGGTATACTTCATGGGGCGGAGCTCTTACTGCTGAATACGGCAAT  
 TACAGCTGGGCTTGGCAGATCGGCTGCTCACACTCACATCAGTTCATCAGAATCCTC  
 TCGCTGCTTACGGCCTTATCTATGATAAGAGCATCAACGGCGGTATGAAGGCTGAAA  
 AGGCTACCGAGGACTATAAGATGTCTCTCCAGAGACAGATCGAGCTCTATCAGTGGC  
 TCCAGTCTGTTGACGGTCCTTTCGCAGGCGGATGTACAAACTCTTACAGAGGACGTTA  
 CGAGAAGTATCCGGAAGGCTATCCTACCTTCTATGATATGGTTTATGTTCCCCACCCC  
 GTGTATCCCGACCCAGGCTCACTCGAGCCGAAGGGCGAGCTTGAAGGTAAGCCTATC  
 CCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATT  
 GA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. ลำดับโปรตีน CEI48MT03

EAPDYGHETTSEAMSYIVWIASMHDVLAKKGVIDGSADALPKAWKTLEAMIPGWSKAS  
 GRDDIEYETLWKQERLKADPANEEDKPESYPAKKANGEAINPMFKTFASAYGSDKGYL  
 MNWLADVDDWYGFGGGNGKFTFINTFQRGEQESCFETVPHPCLEELKYSNKETGIK GIF  
 NGSEVPSQYAFTNAPDAEDRAIQAVYFANRNGVDCGEISGLAGKMGDQCRNDMFDKYY  
 KKLGCQNINPESAGFDSQHFLMSWYTSWGGALTAEYGNYSWA WQIGCSHSHQFYQNPL  
 AAYGLIYDKSINGGMKAEKATEDYKMSLQRQIELYQWLQSV DGPFAGGCTNSYRGRYE  
 KYPEGYP TFYDMVYVPHPVYDPDGS

### 4. ลำดับโปรตีน Cel48PT6

MetGSGSGDDDDKLALEAPDYGHETTSEAMetSYIVWIASMetHDVLAKKGVIDGSADALP  
 KAWKTLEAMetIPGWSKASGRDDIEYETLWKQERLKADPANEEDKPESYPAKKANGEAI  
 NPMetFKTFASAYGSDKGYHLMetNWLADVDDWYGFGGGNGKFTFINTFQRGEQESCFE  
 TVPHPCLEELKYSNKETGIK GIFNGSEVPSQYAFTNAPDAEDRAIQAVYFANRNGVDCGE  
 ISGLAGKMetGDQCRNDMetFDKYYKKLGCQNINPESAGFDSQHFLMetSWYTSWGGALT  
 AEYGNYSWA WQIGCSHSHQFYQNPLAAYGLIYDKSINGGMetKAEKATEDYKMetSLQR  
 QIELYQWLQSV DGPFAGGCTNSYRGRYEKYPEGYP TFYDMetVYVPHPVYDPDGSLEPKG  
 ELEGKIPNPLLGLDSTRTGHHHHHHSStop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอรทัย ศรีมูล
วัน/เดือน/ ปีเกิด	27 กันยายน พ.ศ.2528
ที่อยู่	16 หมู่ 16 ตำบลแม่ฮ้อ อำเภอบ้านจั่น จังหวัดเชียงราย 10250
ประวัติการศึกษา	2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ O. Srimoon, K. Jirajaroenrat and K. Srikitkasemwat. 2010. "Molecular Cloning of a Family 48 Cellulase Gene from Metagenomic DNA in Buffalo Ruminant Fluid" In Proceedings of 16 th AAS and 1st ISAT: Sufficiency Agriculture. August 25-27 Bangkok. Thailand.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้