

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียในกระเพาะหมัก
ของกระบือ

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF
BETA-GLUCOSIDASE GENE FROM BACTERIA IN BUFFALO RUMEN



T128546

ดรรรัตน์ ปิ่นมงคลกุล

DARARAT PINMONGKOLGUL

ฉ.พ.
๑/4267
2556

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....128546
วัน,เดือน,ปี.....๕-๖-๒๕๕๖

๖.....12508391
1.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

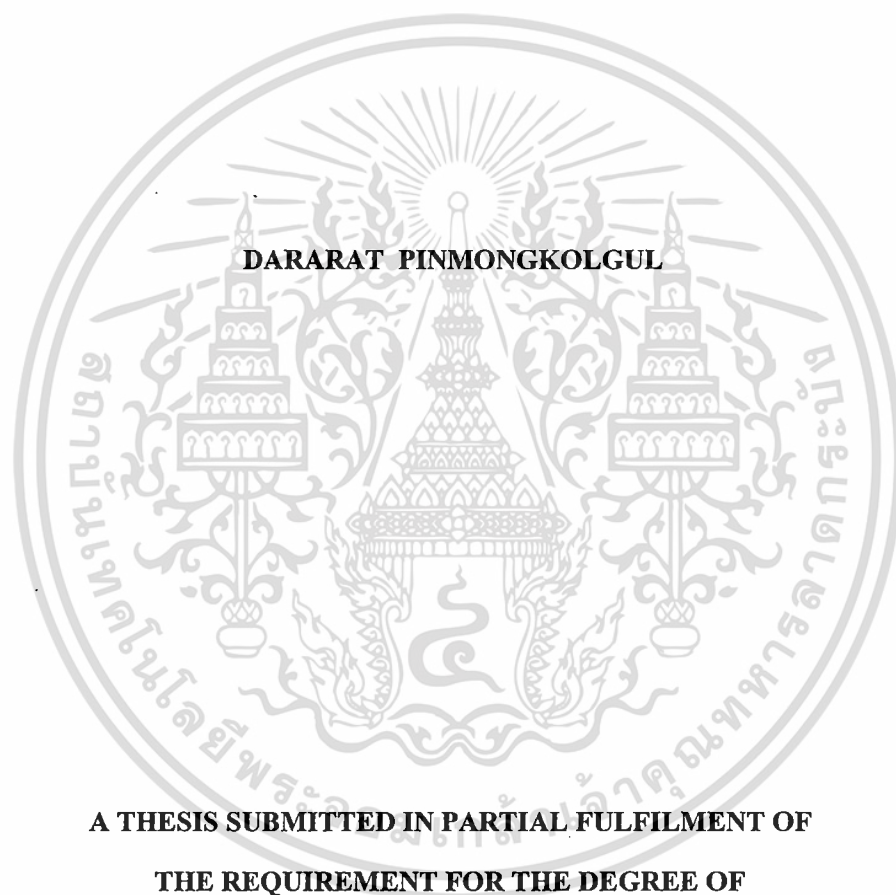
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-AG-M-101-137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF
BETA-GLUCOSIDASE GENE FROM BACTERIA IN BUFFALO RUMEN**



DARARAT PINMONGKOLGUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT 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-101-137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2013

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ
Molecular Cloning and Expression of Beta-glucosidase Gene from Bacteria in Buffalo Rumen

นักศึกษา นางสาวดารารัตน์ ปิ่นมงคลกุล
รหัสประจำตัว 51065802
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.สุพัชรี เนตรพันธุ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว	
ดร.ปรีดา เลิศวัชรสารกุล	
ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์	
ดร.สุพัชรี เนตรพันธุ์	
ผศ.ดร.กนกวรรณ ศรีกิจเกษมวัฒน์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 26 เมษายน 2556 เวลา 09.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้องประชุมหลักสูตรพืชไร่ (ชั้น 3 อาคารนูนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้งานด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่ 23 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ
นักศึกษา	นางสาวดารารัตน์ ปิ่นมงคลกุล
รหัสประจำตัว	51065802
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สุพัชรี เนตรพันธุ์

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ศึกษาการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ ด้วยเทคนิค sequence-driven analysis ซึ่งจากการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิมเมอร์สจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของกลุ่มไกลโคไซค์ไฮโดรเลสแฟมิลี 1 (GH1) พบว่ามีผลผลิตที่เป็นชิ้นส่วนของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจำนวน 2 โคลน คือ Bglu1-1 และ Bglu1-3 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,179 คู่เบส และ 1,190 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 ไปทำการแปลรหัสและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx พบว่าโคลน Bglu1-1 มีค่าความเหมือนมากที่สุดกับเอนไซม์ที่คัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 (YP_002251501.1) เท่ากับ 45% ขณะที่โคลน Bglu1-3 มีค่าความเหมือนมากที่สุดกับเอนไซม์ที่คัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Sorangium cellulosum* 'So ce 56' (YP_001618312.1) เท่ากับ 45% เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค genome walking ได้ยีน Bglu1-3 เต็มเส้นมีขนาด 1,605 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 534 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 kDa และมีความเหมือนมากที่สุดกับ *Sorangium cellulosum* So ce56 (YP_001618312.1) เท่ากับ 48% ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไกลโคไซค์ไฮโดรเลสแฟมิลี 1 เมื่อนำชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 โคลนที่ 9 โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pBAD-TOPO และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* LMG194 พบว่าโปรตีนที่ได้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำ

ได้ และจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ พบว่าสามารถย่อย *p*-nitrophenol ได้ดีที่สุดในที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเวลาที่เหมาะสมคือ 5 นาที โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 47.51 U/mg protein



II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Molecular Cloning and Expression of Beta-glucosidase Gene from Bacteria in Buffalo Rumen
Student	Miss Dararat Pinmongkolgul
Student ID.	51065802
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2012
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanya Jirajaroenrat
Thesis Co-Advisor	Dr. Supatcharee Netrphan

ABSTRACT

This thesis reports the cloning of a beta-glucosidase gene belonging to the glycoside hydrolase family (GHF) 1 from swamp buffalo ruminal bacteria using the sequence-driven analysis technique. The primer sets were designed based on conserved amino acid sequences of beta-glucosidase GHF 1 enzymes reported in the CaZy database. After sequence analysis, the results showed that clone Bglu1-1 contained 1,179 bp whereas Bglu1-3 contained 1,190 bp of nucleotides. The sequences were compared with the beta-glucosidase GHF1 sequence reported in GenBank database using blast program. The results showed that putative sequence of Bglu1-1 shared maximal amino acid identity at 45% to the BgluA enzyme from *Dictyoglomus thermophilus* H-6-12 (YP_002251501.1) whereas that of Bglu1-3 shared maximal amino acid identity at 45% to the Bglu enzyme from *Sorangium cellulosum* 'So ce 56' (YP_001618312.1). The sequence alignment confirmed that the two partial genes are members of beta-glucosidase GH1. Clone Bglu1-3 was then selected to amplify flanking region by genome walking approach. The obtained full length beta-glucosidase gene consisted of 1,605 bp which encoded a putative protein of 534 amino acids. Comparison of the amino acid of Bglu1-3 with protein from GenBank databases showed that Bglu1-3 exhibited 48% identity to beta-glucosidase from *Sorangium cellulosum* 'So ce 56' belonging to GH1. For gene expression studies, the partial gene Bglu1-3/9 was cloned into pBAD-TOPO vector and expressed in *Escherichia coli* LMG194 host strains.

The recombinant protein was expressed as soluble in the intracellular fraction. It exhibited the highest specific activity of 47.51 U/mg protein toward *p*-nitrophenol when incubated at pH 6.0, 40°C and 5 minutes.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ศศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ และ ดร.สุพัชรี เนตรพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร่วม จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ศศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างสูงและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก โครงการพัฒนาบุคลากรวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระหว่าง สวทช.กับ สจล.

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการ เกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาท วิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการ เกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆคนที่ได้ให้คำแนะนำและเป็น กำลังใจให้กันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุน ข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านและคอยเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด จนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ สำเร็จได้ด้วยดี

ดรรรัตน์ ปิ่นมงคลกุล

มีนาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เอนไซม์กลุ่มโกลโคไซด์ไฮโดรเลส.....	3
2.2 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	6
2.2.1 การจัดกลุ่มเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	6
2.2.2 โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	6
2.2.3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	7
2.2.4 แหล่งที่พบเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	10
2.3 การนำเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสไปใช้ประโยชน์.....	15
2.3.1 ประโยชน์ของปฏิกิริยาการเร่งการสลาย (hydrolysis).....	15
2.3.2 ประโยชน์ของปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis).....	15
2.3.3 ประโยชน์ของปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation).....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	17
3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะหมักของกระบือ.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้.....	17
3.1.3 พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้.....	18
3.2 เทคนิคทั่วไปทางชีวโมเลกุล.....	19
3.2.1 การสกัดเมทาจีโอโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย.....	19
3.2.2 การเพิ่มปริมาณยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาแลกโซโพลีเมอเรส.....	19
3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	20
3.2.4 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	20
3.2.5 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation).....	21
3.2.6 การถ่ายถอดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i>	21
3.2.7 การคัดเลือกโคลโลนีที่ได้รับการถ่ายถอดพลาสมิดสายผสมด้วยวิธี size screening.....	21
3.2.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis.....	22
3.2.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด.....	22
3.2.10 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	23
3.2.11 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (competent cell).....	23
3.2.12 การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์.....	23
3.3 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส.....	24
3.3.1 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่ได้มาจากการเพาะเชื้อ (uncultured independent).....	24
3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี Genome walking.....	27
3.4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) ด้วยเทคนิค semi-random , two stepped PCR (ST-PCR).....	28
3.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) โดยใช้ GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA).....	29
3.5 การแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส.....	33
3.5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+).....	33

3.5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> โดยใช้ pBAD TOPO [®] TA Expression Kit.....	35
3.6 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	39
3.6.1 การทดสอบการย่อย 4 or <i>p</i> -Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (<i>p</i> NPG).....	39
3.6.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	39
3.6.3 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH).....	40
3.6.4 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature).....	40
3.6.5 การวิเคราะห์ค่าเวลาที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (optimal time).....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะหมักของ กระบือ.....	41
4.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย.....	42
4.3 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส.....	43
4.3.1 ผลการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่ ได้มาจากการเพาะเชื้อ (uncultured independent).....	43
4.3.2 ผลการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซ เลท ID2R1P2 ที่ได้มาจากรีเพาะเชื้อ (culture dependent).....	57
4.4 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี Genome walking.....	60
4.4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วย เทคนิค semi-random , two stepped PCR (ST-PCR).....	60
4.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) โดย ใช้ GenomeWalker [™] universal kit (Clontech, USA).....	67
4.5 การแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส.....	89
4.5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+)......	89
4.5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> โดยใช้ pBAD TOPO [®] TA Expression Kit.....	101

4.6 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	117
4.6.1 การทดสอบการย่อย 4 or <i>p</i> -Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (<i>p</i> NPG).....	117
4.6.2 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH).....	118
4.6.3 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature).....	119
4.9.4 การวิเคราะห์ค่าเวลาที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (optimal time).....	120

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	122
เอกสารอ้างอิง.....	124
ภาคผนวก ก.....	130
ภาคผนวก ข.....	140
ภาคผนวก ค.....	151
ประวัติผู้เขียน.....	154

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	47
4.2 การจับคู่ไพรเมอร์ของปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	61
4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล.....	85
4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	106
4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	118
4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	120
4.7 แสดงผลการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	121
ตารางภาคผนวกที่	
ก1 การเตรียม polyacrylamide gel.....	134
ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate.....	135
ก3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate.....	135

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของเซลลูโลส..... 4
2.2	กลไกการทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase, Exoglucanase, และ β -glucosidase..... 5
2.3	โครงสร้างสามมิติ (β/α) ₈ -barrel ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก white clover สีชมพู แสดงโครงสร้าง α -helix สีเหลืองแสดงโครงสร้าง β -sheet..... 7
2.4	ปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) แบบ (a) inversion และ (b) retention..... 8
2.5	ปฏิกิริยาไซยาโนจีนิซิส..... 13
3.1	ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากการใช้ GenomeWalker adaptor..... 31
4.1	จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวในกระเพาะหมักของกระบือ โดยตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8%..... 42
4.2	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ BSF และ RIVB..... 43
4.3	ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส..... 44
4.4	ผลสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit.... 44
4.5	ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis..... 45
4.6	ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ..... 46
4.7	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu1-1..... 48
4.8	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu1-2..... 49
4.9	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu1-3..... 50
4.10	การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสของโคลน Bglu1-2 กับโคลน Bglu1-3..... 51

สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.11	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของโคลน Bglu1-1 และโคลน Bglu1-3 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank.....	53
4.12	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW2.....	54
4.13	การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย <i>Bacillus pumilus</i> เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทดลองหาอัตราการเจือจาง (dilution) และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสม.....	57
4.14	การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้อุณหภูมิและอัตราการเจือจางที่เหมาะสม และการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	58
4.15	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC.....	59
4.16	ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา primary PCR ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ.....	62
4.17	ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา secondary PCR ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% โดยใช้ primary PCR เจือจาง 1:50 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ.....	63
4.18	การตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-1 ด้วยวิธี size screening.....	64
4.19	การตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ด้วยวิธี size screening.....	65
4.20	ผลการนำโคลนที่ได้คัดเลือกไว้จากการทำ size screening มาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis.....	65

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.21 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ BamHI และ EcoRI ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล1.0%.....	66
4.22 ผลการเตรียมไลบรารีดีเอ็นเอจากเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอ.....	68
4.23 การออกแบบ reverseไพรเมอร์ด้าน 5' upstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และ โคลน Bglu1-3.....	69
4.24 ผลผลิตพีซีอาร์ของ Bglu1-1 จากปฏิกิริยา secondary PCR.....	70
4.25 ผลผลิตพีซีอาร์ของ Bglu1-3 จากปฏิกิริยา secondary PCR.....	71
4.26 ผลการทำ gel extraction ของผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล0.8 %.....	72
4.27 ผลการทำ size screening ของยีน Bglu1-1(upstream) จาก master plate ของไลบรารี PvuII.....	73
4.28 ผลการทำ size screening ของยีน Bglu1-3(upstream) จาก master plate ของไลบรารี StuI.....	73
4.29 การนำพลาสมิดที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC.....	74
4.30 การออกแบบ forwardไพรเมอร์ด้าน 3' downstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bglu1-3.....	75
4.31 การตรวจสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยอะกาโรสเจล1.0%.....	76
4.32 การสกัดผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	77
4.33 นำผลผลิต secondary PCR ที่ได้จากการสกัดแยกออกจากเจลให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา secondary PCR อีกครั้ง.....	78
4.34 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยในขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส.....	79
4.35 สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดของบริษัท Favorgen® .	79
4.36 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ภายในพลาสมิดเวคเตอร์ ด้วยวิธี size screening.....	80
4.37 ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8 %.....	81

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.38	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....
	82
4.39	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ BamHI และ EcoRI.....
	82
4.40	การสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดของบริษัท QIAGEN®
	83
4.41	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน กับฐานข้อมูลโปรตีนในฐานข้อมูล GenBank.....
	84
4.42	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Bglu1-3_FL1 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank.....
	86
4.43	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน Bglu1-3_FL1 กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Pfam.....
	88
4.44	ผลการวิเคราะห์ signal peptide ของ Bglu1-3_FL1 ด้วยโปรแกรม signal P 3.0.....
	89
4.45	การออกแบบไพรเมอร์แบบ mature gene ด้าน forward เพื่อที่จะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+).
	90
4.46	การออกแบบไพรเมอร์แบบ mature gene ด้าน reverse เพื่อที่จะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+).
	90
4.47	การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบ mature gene.....
	91
4.48	ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งกำหนดเวลาในขั้นตอน extention เป็น 2 นาที.....
	92
4.49	ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วยอะกาโรสเจล 1.0%.
	93
4.50	ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งกำหนดเวลาในขั้นตอน extention เป็น 2 นาที.....
	94
4.51	ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....
	95

สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.52 ผลการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เพื่อเตรียมทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจาก เจล.....	96
4.53 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu1-1.....	97
4.54 ผลการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์จากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu1-3.....	98
4.55 ผลการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อให้บริสุทธิ์.....	98
4.56 การตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+)......	99
4.57 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ <i>NdeI</i> และ <i>HindIII</i>	99
4.58 ผลการตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์จากพลาสมิดลูกผสม (colony PCR).....	101
4.59 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์ จากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu1-3 และทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจล.....	102
4.60 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน Bglu1-3 ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ด้วยไพร เมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R.....	103
4.61 การคำนวณหาขนาดของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชิ้นที่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>NcoI</i> โดยใช้ โปรแกรม Serial Cloner V2.1.....	104
4.62 การนำโคลนจำนวน 11 โคลน ซึ่งแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pBAD-TOPO มาทำการตัด ด้วยเอนไซม์ <i>NcoI</i>	105
4.63 การสกัดพลาสมิดของโคลนที่ 4 และ 9 เพื่อให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen).....	105
4.64 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ total cell ด้วย 12% SDS-PAGE.....	107
4.65 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ total cell ด้วย 12% SDS-PAGE.....	108
4.66 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของตะกอนเซลล์.....	109
4.67 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของตะกอนเซลล์.....	109
4.68 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ soluble.....	110

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.69 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ soluble.....	110
4.70 ผลการตรวจสอบการทำโคโลนีพีซีอาร์ของ Bglu1-3/4 ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R.....	111
4.71 ผลการตรวจสอบการทำโคโลนีพีซีอาร์ของ Bglu1-3/9 ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R.....	112
4.72 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ total cell.....	113
4.73 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ total cell.....	113
4.74 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของตะกอนเซลล์.....	114
4.75 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของตะกอนเซลล์.....	114
4.76 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/4 ในส่วนที่เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein).....	115
4.77 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/9 ในส่วนที่เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein).....	116
4.78 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/4 ในส่วนของโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion protein).....	116
4.79 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/9 ในส่วนของโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion protein).....	117
4.80 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	119
4.81 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	120
4.82 กราฟแสดงค่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส.....	121

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่	หน้า
ก1 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	136
ก2 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pET28a(+)	137
ก3 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pBAD TOPO.....	138
ข1 การออกแบบไพรเมอร์ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 1.....	141
ข2 การออกแบบไพรเมอร์ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 3.....	143
ข3 การออกแบบไพรเมอร์ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 9.....	145
ข4 การออกแบบ reverse ไพรเมอร์ด้าน 5' upstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และ โคลน Bglu1-3 สำหรับการทำให้ genome walking.....	147
ข5 การออกแบบ forward ไพรเมอร์ด้าน 3' downstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โคลน Bglu1-3 สำหรับการทำให้ genome walking.....	148
ข6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Bglu1-3_FL1 เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโน.....	149

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

<i>p</i> NPG	4 or <i>p</i> -Nitrophenol β-D-Glucopyranoside
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G	Gram
GH	Glycoside hydrolase
IPTG	Isopropyl-β-D thiogalactoside
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Lubia-Bertani
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
ng	Nanogram
ng/μl	Nanogram per microlitre
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside
μg	Microgram
μg/μl	Microgram per microlitre
μg/ml	Microgram per millilitre
μl	Microlitre
μM	Micromolar
μMole	Micromole
°C	Degree Celsius
%	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในประเทศไทยนั้นประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ก่อให้เกิดผลพลอยได้จากวัสดุอินทรีย์ที่เหลือทิ้ง อาทิเช่น ฟางข้าว ชังข้าว โปด กากชานอ้อย รวมถึงเปลือกผลไม้ต่างๆจากร้านค้าและโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องต่างๆ ในปัจจุบัน ได้มีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในหลายๆด้าน แต่ข้อจำกัดในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญในวัสดุอินทรีย์เหล่านั้นคือเอนไซม์เซลลูเลสที่นำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวมีราคาแพง ส่งผลให้ต้นทุนในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปประยุกต์ใช้ให้เกิดมูลค่านั้นสูงขึ้นตามไปด้วย

ปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งมาจากหลายแหล่งที่มา และจากการศึกษาพบว่า ในกระเพาะหมักของกระบือมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด โดยพบว่าแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุด ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักจะสามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพืชที่กระบือกินเข้าไป และจากงานวิจัยของ วิทิตา สาริต โกวิทหทัย (2554) ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มไกลโคไซค์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 5 จากกระเพาะหมักของกระบือได้ จึงคาดว่าแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือจะสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสคอมเพล็กซ์ (cellulase complex) และเป็นเอนไซม์ร่วมที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและเซลโลไบโอแซคคาไรด์ ให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคสได้

ดังนั้นงานวิจัยดังกล่าวจึงมุ่งเน้นในการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส เพื่อเป็นการหาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์และช่วยลดต้นทุนการผลิต เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพ โดยการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกและทดสอบการทำงานในเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ การย่อยสลายชีวมวล และเพื่อประโยชน์ในงานด้านอื่นๆต่อไป (Li et al. 2009)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกยีนที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้ 4 ขั้นตอน คือ

- 1) เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือปลักและสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้งหมด
- 2) การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
- 3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยเทคนิค genome walking
- 4) ศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
- 5) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

1.5 ระยะเวลาในการวิจัย

ใช้ระยะเวลาดำเนินงานตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2552 – กันยายน 2555

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะหมักของกระบือ
2. สามารถผลิตโปรตีนเบต้ากลูโคซิเดสจากยีนที่คัดแยกได้

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์กลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

เอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์โบไฮเดรต 2 โมเลกุลหรือมากกว่า หรือระหว่างคาร์โบไฮเดรตและโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต สามารถจำแนกเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสโดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน จากข้อมูลในระบบเอนไซม์ของ Carbohydrate Active Enzyme Database (CaZy) ซึ่งแบ่งเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family (GHF) ออกเป็นแฟมิลี โดยอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนและพบว่าทั้งหมด 130 แฟมิลี

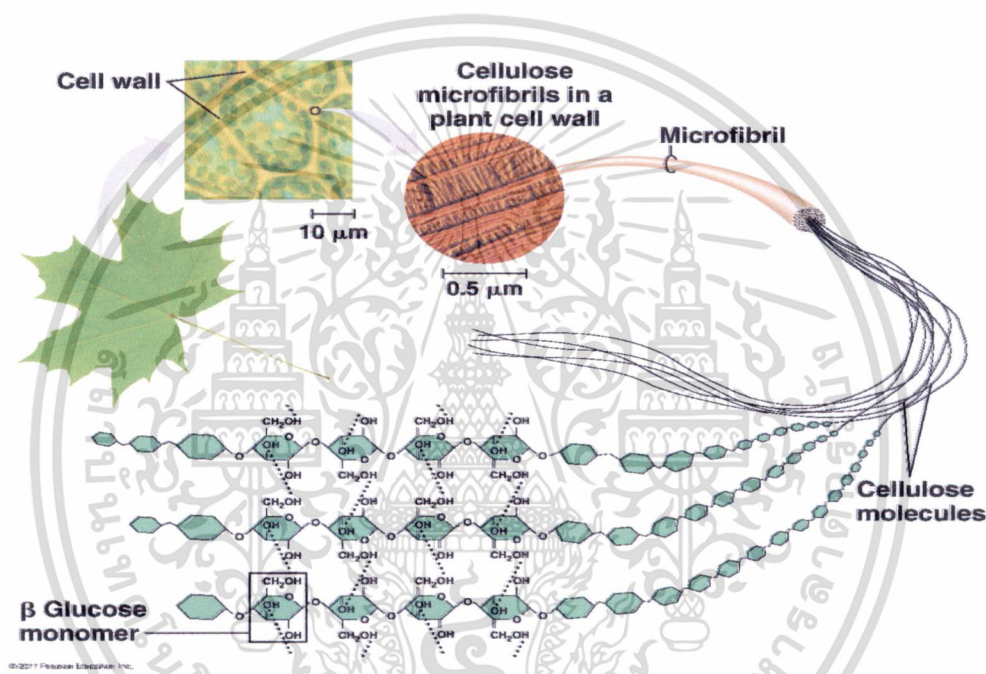
การจำแนกเอนไซม์กลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างสามมิติของโปรตีน เรียกว่า clan สามารถแบ่งได้เป็น 14 clan คือ GH-A ถึง GH-N ใน clan GH-A เอนไซม์มีโครงสร้างแบบ $(\beta/\alpha)_8$ -barrel พบว่ามีสมาชิกมากที่สุด 18 แฟมิลี และพบว่า clan GH-D, GH-H และ GH-K มีโครงสร้างสามมิติแบบเดียวกัน, clan GH-B, GH-C, GH-E, GH-F, GH-I, GH-J และ GH-N มีโครงสร้างหลักแบบ β sheet, clan GH-G, GH-L และ GH-M มีโครงสร้างสามมิติแบบ $(\alpha/\alpha)_6$ -barrel (Naumoff, 2011)

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสมีกัลไกการทำงานหลัก 2 แบบ คือ retaining และ inverting (Henrissat and Davies, 1997) โดยทั้งสองกลไกมีลักษณะต่างกันว่า anomeric carbon ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ได้จากปฏิกิริยาการกระตุ้นของเอนไซม์ เอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสที่มีกลไกแบบ retaining ได้แก่แฟมิลี 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 22, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39 และ 42 ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ที่มีกลไกแบบ inverting ได้แก่แฟมิลี 6, 8, 9, 14, 15, 19, 24, 37, 43, 44, 45, 46, 47 และ 48 ตามลำดับ

2.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ และเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โดยโครงสร้างของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ beta-1,4-glycosidic linkage ในแต่ละโมเลกุลของเซลลูโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน กับโมเลกุลของกลูโคสอีกสายหนึ่งตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ในบริเวณที่เรียงตัวกันอย่างหลวมๆจะเรียกว่า amorphous หรือ paracrystalline ส่วนบริเวณที่มีเซลลูโลสเรียงตัวกันอย่าง

เป็นระเบียบ เรียกว่า crystalline cellulose (Atalla and VanderHart.1984) ซึ่งจะเชื่อมกับออกซิเจนของพันธะไกลโคซิดิกของโมเลกุลอื่นด้วยพันธะไฮโดรเจนที่เกาะกันอย่างแน่นหนา การจัดเรียงตัวแบบนี้จะทำให้เซลล์พืชลดการสูญเสียน้ำ และทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์บางชนิดได้ การเรียงตัวกันของเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นแบบ flat-ribbon และระหว่างชั้นของโมเลกุลจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณ amorphous จะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณ crystalline โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส และจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส (Anonymous. 2012a)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) จัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase ซึ่งจะตัดจำเพาะบริเวณพันธะ β -1,4-glycosidic bond ระหว่างคาร์โบไฮเดรตสองโมเลกุลหรือมากกว่าสองโมเลกุล การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเข้าจับจำเพาะกับสารตั้งต้นหรือสับสเตรตตามระบบการแบ่งกลุ่มของ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB, 2004) ได้เป็น 3 ชนิด คือ

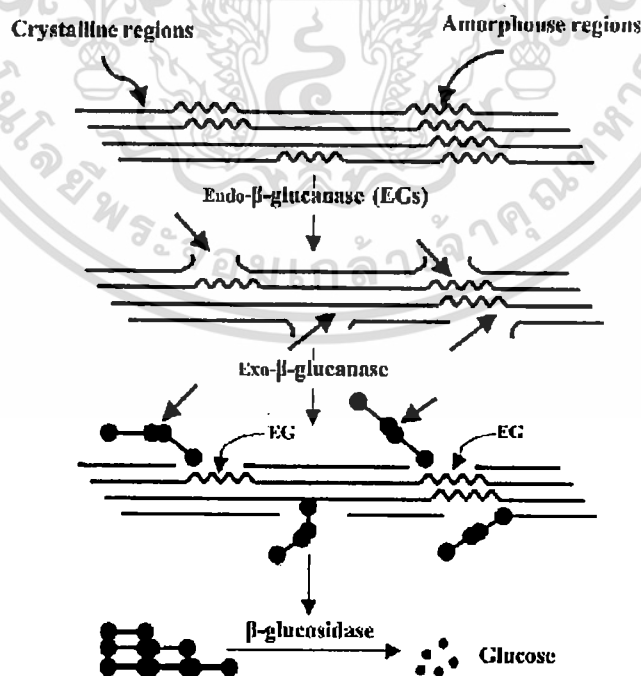
1. β -exoglucanase (EC 3.2.1.91) หรือ exo-cellobiohydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยปลายบริเวณ crystalline ทำให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น เช่น เซลโลไบโอส (cellulose) และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้ผลผลิตเป็นกลูโคส โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ทำได้โดยทดสอบการทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง (filter paper)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ อะไวเซล (avicel) เป็นต้น เอนไซม์ที่ย่อย avicel ได้จะเรียกว่า avicelase เอนไซม์ที่มีการย่อยแบบเอกโซกลูแคนเนสสามารถพบได้ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5, 6, 7, 9 และ 48 (Henrissat and Davies. 1997)

2. beta-endoglucanase (EC 3.2.1.4) หรือ endo-1,4- β -D-glucanase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เข้าย่อยแบบสุ่มภายในสายของเซลลูโลสในบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบ ทำให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลสายสั้นๆ เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้ผลผลิตเป็นกลูโคส โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ทำได้โดยทดสอบการย่อยกับสับเตรต carboxymethylcellulose (CMC) เอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยแบบเอนโดกลูแคนเนสพบอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 19, 26, 44, 45, 48, 51, 61, 74, 124 และ NC (Henrissat and Davies. 1997)

3. beta-glucosidase (EC 3.2.1.21) หรือ cellobiase เป็นเอนไซม์ร่วมที่มีบทบาทสำคัญทำหน้าที่ช่วยย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลไบโอแซคคาไรด์ให้เป็นกลูโคส ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ท้ายสุด คือ กลูโคส (Slater. 2005) โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ทำได้โดยทดสอบการทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) เป็นต้น (Wike *et al.* 1983) เอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยแบบเบต้ากลูโคซิเดสสามารถพบได้ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 1, 3, 5, 9, 30 และ 116 (Henrissat and Davies. 1997)



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของ endoglucanase, exoglucanase, และ β -glucosidase (Anonymous. 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (beta-glucosidase)

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (beta-glucosidase) (E.C.3.2.1.21) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ รา และ แบคทีเรีย เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) พันธะเบต้ากลูโคซิดิก (β -glucosidic bond) ที่เชื่อมระหว่างกลูโคสกับน้ำตาล หรือระหว่างกลูโคสกับหมู่ที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสแต่ละหน่วยย่อย (subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55-65 kDa มีพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 5-6 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่มาจากแหล่งต่างกัน จะมีความจำเพาะต่อไกลโคโคน (glycone) คล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันที่ความจำเพาะต่ออะไกลโคโคน (aglycone) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ความหลากหลายของหน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Esen. 1993)

2.2.1 การจัดกลุ่มเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) แฟมิลี 1,3,5,9,30 และ 116 (Henrissat and Davies. 1997) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีกรดกลูตามิก (glutamic acid, Glu) สองตัวทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และ nucleophile กลไกการเร่งปฏิกิริยาเป็นแบบ retention คือ ไม่มีการเปลี่ยนโครงสร้างของพันธะกลูโคซิดิกที่เชื่อมกับ anomeric carbon และเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโครงสร้างแบบ (β/α)₈-barrel ด้วยเหตุนี้จึงจัดอยู่ใน clan GH-A

2.2.2 โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

เอนไซม์ลินามารสเป็นเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่พบในพืช white clover (ICBG) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) แฟมิลี 1 ตัวแรกที่พบโครงสร้าง 3 มิติ จากโครงสร้างผลึกพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีการม้วนพับแบบ (β/α)₈-barrel ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสต่างๆ ไป โดยมี Glu183 และ Glu397 เป็นตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์สูงในแฟมิลีนี้ ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และ nucleophile ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้อยู่บริเวณด้าน C-terminus ของโพรง (β/α)₈-barrel ซึ่งบริเวณนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนพวกที่มีขั้ว และกรดอะมิโนที่มีหมู่อะโรมาติกเป็นจำนวนมากและกรดอะมิโนเหล่านี้มักพบได้ทั่วไปภายในบริเวณจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition site) โดยที่ Glu183 และ Glu397 จะอยู่ตรงบริเวณจับกับน้ำตาล (sugar-binding site) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้อยู่ห่างกัน 5.2 อังสตรอม (Å) (Barrett *et al.* 1995)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสามมิติ (β/α)₈-barrel ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก white clover ถีชมพู แสดงโครงสร้าง α -helix สีเหลืองแสดงโครงสร้าง β -sheet Barrett *et al.* 1995)

2.2.3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

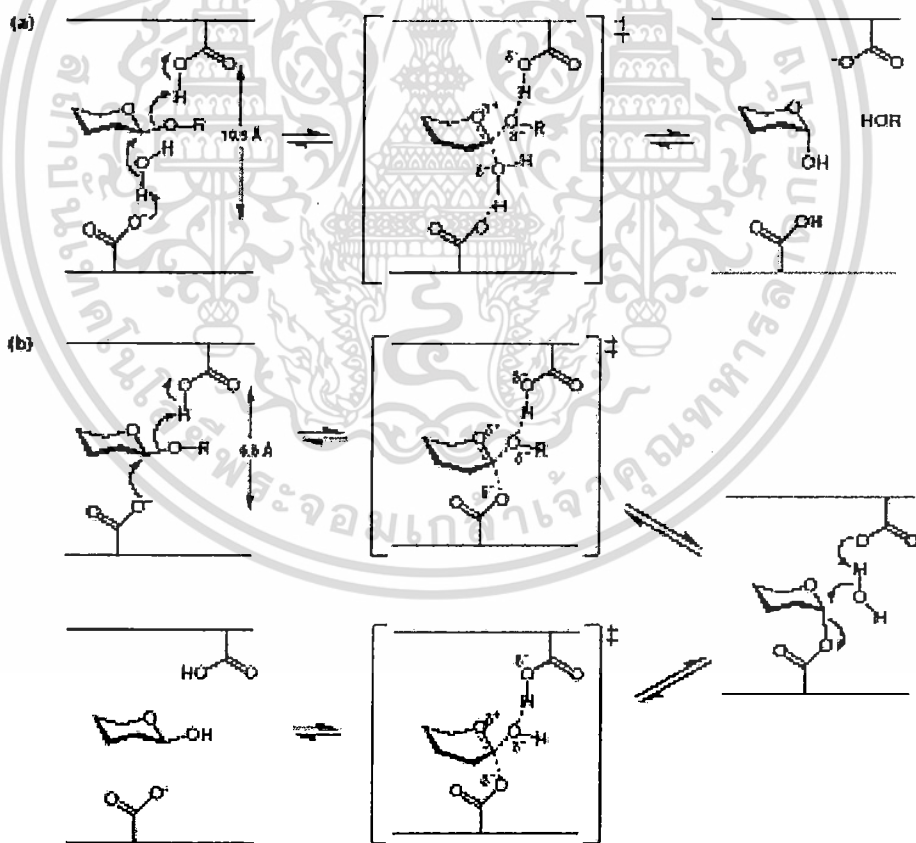
2.2.3.1 ปฏิกิริยาการสลาย

กลไกการเร่งการสลายของปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส สามารถเกิดขึ้นได้ 2 แบบคือ inversion และ retention โดยทุกเอนไซม์ที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกันจะเกิดปฏิกิริยาในรูปแบบเดียวกัน (ภาพที่ 2.4) ปฏิกิริยาการสลายแบบ inversion จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวเป็น acid และ base catalysts ซึ่งวางอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันประมาณ 10.5 อังสตรอม และยอมให้โมเลกุลของสับสเตรทและน้ำมาจับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลได้พร้อมกัน โดยหมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น acid catalyst จะให้โปรตอนกับออกซิเจนที่ต่อกับพันธะไกลโคซิดิก พร้อมทั้งการตัดพันธะ (glycosidic oxygen) ในขณะที่หมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น base catalyst จะรับโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำ ซึ่งเข้ามาเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon เกิดการสลายพันธะไกลโคซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์คือ น้ำตาลที่มี anomeric configuration เปลี่ยนแปลงไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ single-displacement และ transition state จะมีลักษณะเป็นออกโซคาร์บอเนียมไอออน (oxocarbenium ion)

ในขณะที่ปฏิกิริยาการสลายแบบ retention จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวทำหน้าที่เป็น acid/base catalysts และ nucleophile ซึ่งวางอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันประมาณ 5.5 อังสตรอม เกิดปฏิกิริยาแบบ double displacement ผ่าน glycosyl-enzyme intermediate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) หมู่คาร์บอกซิลตัวที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid catalysts ให้โปรตอนแก่ออกซิเจนที่ต่อกับพันธะไกลโคซิดิก พร้อมๆกับการตัดพันธะ ส่วนหมู่คาร์บอกซิลอีกหมู่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งไปสร้างพันธะโควาเลนต์กับ anomeric carbon ของน้ำตาลเกิดเป็น glycosyl-enzyme intermediate

2) หมู่คาร์บอกซิลที่สูญเสียโปรตอน (side-chain carboxylate) จะทำหน้าที่เป็น base catalyst โดยดึงโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำซึ่งเข้ามาเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon และน้ำตาลจะหลุดออกมาจากพันธะโควาเลนต์กับหมู่คาร์บอกซิลที่เดิมทำหน้าที่เป็น nucleophile ผลลัพธ์ที่ได้จะมี anomeric configuration เหมือนเดิม ซึ่งทั้ง 2 ขั้นตอนที่เกิดขึ้นผ่าน transition states ที่มีลักษณะเป็นออกโซคาร์บอนเนียมไอออน (David *et al.* 2000)



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) แบบ (a) inversion และ (b) retention (David *et al.* 2000)

2.2.3.2 ปฏิริยาการย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) และปฏิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation)

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสบางชนิดสามารถเร่งปฏิริยาการย้อนการสลายและการย้ายหมู่กลูโคสได้ นอกเหนือไปจากปฏิริยาเร่งการสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล oligosaccharide และ alkyl glucoside ตามลำดับ (Svasti *et al.* 2003)

โดยปกติแล้วการทดลองเกี่ยวกับการเร่งปฏิริยาการย้อนการสลายสามารถทำได้โดยใช้น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ความเข้มข้นสูง (60-85 เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิสูงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พวบน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ จากการบ่มเอนไซม์ตัดโคซิเนสกับ 50 เปอร์เซ็นต์ (w/w) D-glucose pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นน้ำตาลเจนทิโอไบโอส (gentiobiose) (β -1,6) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในวันแรก และพวบน้ำตาลไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) หลังจากผ่านไป 3 วัน (Srisomsap *et al.* 1999) เมื่อใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากอัลมอนด์สามารถสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) และไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท (Ajisaka *et al.* 1987) สำหรับเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังสามารถสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลคู่ได้เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตต่างกันจะมีความสามารถในการเร่งปฏิริยาการย้อนการสลายได้ต่างกัน (Svasti *et al.* 2003)

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสนอกจากจะสามารถเร่งปฏิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิริยาการย้อนการสลายได้แล้ว เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสบางชนิดยังสามารถเร่งปฏิริยาการย้ายหมู่กลูโคส ซึ่งเป็นการย้ายกลูโคสจากตัวให้ เช่น pNP-Glc ไปยังตัวรับตัวอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ได้อีกด้วย ซึ่งปฏิริยานี้สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารพวก alkyl glucoside ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะสามารถเร่งปฏิริยาการย้ายหมู่กลูโคสในสิ่งมีชีวิต (Hommalai *et al.* 2005) และได้มีการทดลองทำการบ่มเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังกับ pNP-Glc ความเข้มข้น 15 mM และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ (แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และแอลกอฮอล์ตติยภูมิ) ในบัฟเฟอร์ McIlvain pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังสามารถสังเคราะห์ alkyl glucoside ได้ดีกับแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด (Svasti *et al.* 2003) ซึ่งตรงข้ามกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จากพะยูนและอัลมอนด์ที่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้เลย แต่สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ผลิตภัณฑ์ 70-90 เปอร์เซ็นต์ และ 8-23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Lirdprapamongkol and Svasti., 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ glycosyl donor ตัวอื่นนอกจาก pNP-Glc เช่น pNP-Fuc, เซลโลไบโอส และเจนทิโอไบโอส เป็นตัวให้ และใช้ hexan-1-ol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวรับ พบว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง พะยูง และอัลมอนด์ สามารถใช้ *p*NP-Fuc เป็น donor ในการสังเคราะห์ hexyl glucoside ได้ และที่น่าสนใจคือเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากอัลมอนด์สามารถใช้ทั้งเซลโลไบโอส และเจนติโอไบโอสเป็นตัวให้ได้ ขณะที่เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพะยูงใช้เจนติโอไบโอสเป็นตัวให้ได้เพียงตัวเดียว และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังไม่สามารถใช้เซลโลไบโอส และเจนติโอไบโอสเป็นตัวให้ได้เลย (Svasti *et al.* 2003)

2.2.4 แหล่งที่พบเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากสิ่งที่มีชีวิตที่ต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากพืช ส่วนมากจะแตกต่างกันในส่วนของหมู่อะไกลโคน (Esen. 1993) ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพะยูง หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์ดัลโคชินเนส (dalcochinase) มีสับสเตรทธรรมชาติเป็นไอโซฟลาโวนอยด์เบต้ากลูโคไซด์ (Svasti *et al.* 1999) เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง หรือเอนไซม์ลินามาราส (linamarase) มีสับสเตรทธรรมชาติเป็นไซยาโนจินิก กลูโคไซด์ (Eksittikul and Chulavatnatol. 1988) เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากข้าวโพดมีสับสเตรทธรรมชาติเป็น 2-O- β -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin (DIMBOAGlc) เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากข้าวฟ่างมีสับสเตรทธรรมชาติเป็น *p*-hydroxy-(*S*)-mandelonitrile- β -D-glucose (dhurriin) (Cicek *et al.* 2000)

2.2.4.1 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพืช

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่พบในพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการมากมาย เช่น การเจริญเติบโตของพืช การป้องกันโรคและศัตรูพืช โดยจะปล่อยอะไกลโคน (aglycone) ที่เป็นพิษจากสารประกอบกลูโคไซด์ เช่น hydroxamic acid, coumarins, thiocyanates, terpenes, saponins และ cyanide เป็นต้น (Cicek *et al.* 2000) กระบวนการไซยาโนจีนซิส (cyanogenesis) ที่พบในพืชมากกว่า 3,000 ชนิด เป็นกระบวนการสลายสารประกอบไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucosides) ให้กลายเป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส กระบวนการนี้เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งไฮโดรเจนไซยาไนด์จะไปยับยั้งการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ที่บริเวณนั้น และไฮโดรเจนไซยาไนด์ยังมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์อีกด้วย นอกจากนี้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนพืช โดยการเร่งปฏิกิริยาการสลายฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปของสารประกอบกลูโคไซด์ให้อยู่ในรูปฮอร์โมนอิสระ เช่น กรดแอบไซซิก (abscisic acids),

ออกซิน (auxin) , ไซโตไคนิน (cytokinin) และจิบเบอเรลลิน (gibberellins) เป็นต้น (Opassiri *et al.* 2003)

ในปี 1995 Surarit และคณะได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในเมล็ดพืชพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 50 ชนิด จาก 17 แฟมิลี พบว่าเมล็ดพะยุง (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์จากพืชชนิดอื่น โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเร่งการสลายเท่ากับ 5.0 และสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนการสลายได้ เมื่อป้อนเอนไซม์กับน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ความเข้มข้นสูงๆ และเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นพบว่าที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (w/w) D-glucose สามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ (disaccharide) และไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) ได้

เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วย isoelectric focusing และ Sephadex G-150 chromatography และทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จะมีค่า K_m ต่อ *p*-Nitrophenyl- β -D-glucoside (*p*-NPG) เท่ากับ 5.4 mM ค่า k_{cat}/K_m เท่ากับ $57,300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ และมีค่า V_{max} เท่ากับ 423 nkat/ml ในสภาพธรรมชาติเอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 330 kDa และในสภาพเสียสภาพจะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 kDa จึงเชื่อว่าเอนไซม์ชนิดนี้น่าจะประกอบด้วย 4-6 subunits จากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าดัลโคชินเนส (dalcochinase) พบว่าสารประกอบปรอท สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงคิดว่ากรดอะมิโนพวกที่เป็นกรดน่าจะมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสารประกอบปรอทจะไป chelate กับกรดอะมิโนที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ยังได้หากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในส่วนต่างๆ ของต้นพะยุง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดในเมล็ด จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการสลายสับสเตรทที่อยู่ในเมล็ดของต้นพะยุง (Srisomsap *et al.* 1996)

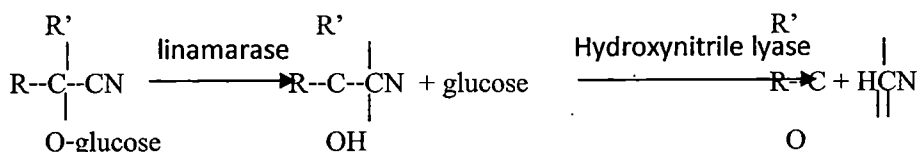
จากนั้น Svasti และคณะ (1999) ได้ศึกษาหาสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ดัลโคชินเนสพบว่าสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ได้แก่ 12-dihydroamorphigenin-8'-O- β -D-glucoside เมื่อถูกสลายโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์คือกลูโคสและ 12-dihydromorphigenin ซึ่งเป็นสารประกอบพวกไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) จึงได้มีการตั้งชื่อใหม่ว่าดัลโคชินิน (dalcochinin) ตามชื่อของพืชคือ *Dalbergia cochichinensis* Pierre และเรียกชื่อสับสเตรทใหม่ว่า dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่า K_m ต่อ dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside เท่ากับ 1.68 mM และค่า V_{max} เท่ากับ 452 nkat/ml ในเมล็ดพะยุง พบสับสเตรท ชนิดนี้มากถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ด และมีเอนไซม์ดัลโคชินเนส 0.03

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ด เนื่องจากคัลโคซิโนมีโครงสร้างคล้ายกับโรทีโนน (rotenone) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการหายใจ จึงคาดว่าสับสเตรทนี้น่าจะมีบทบาทในการป้องกันแมลงและศัตรูพืชอื่นๆ

Cairns และคณะ (2000) ได้หาลำดับเบสไปโตด์ของเอนไซม์คัลโคซิเนส และทำการโคลน cDNA ของคัลโคซิเนส พบว่า cDNA ของเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 547 residues ซึ่งประกอบด้วย propeptide 23 residues ซึ่งเป็น signal peptide ที่จะส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และ mature protein ทั้งหมด 524 residues จากการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนพบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซยาโนจินิกเบต้ากลูโคซิเดส (cyanogenic β -glucosidase) จาก white clover และจัดอยู่ใน glycoside hydrolase family 1 ซึ่งมีความเหมือนกันถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และมี Glu182 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และมี Glu396 ทำหน้าที่เป็น nucleophile จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่า K_m และ V_{max} ต่อ *p*-NPG ใกล้เคียงกับเอนไซม์จากเมล็ดพืชยูคาลิปตัส รายงานไว้ และสามารถสลายสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ได้

ลินามารส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่พบในพืชมากกว่า 3,000 สปีชีส์ รวมถึงมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลักของคน และสัตว์ที่อยู่ในประเทศเขตร้อนชื้น สับสเตรทของลินามารสเป็นสารประกอบพวกไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด ได้แก่ ลินามาริน (2-hydroxyisobutyronitrile- β -D-glucopyranoside) และ โลคัสตราลิน (2-hydroxy-2-methylbutyronitrile- β -D-glucopyranoside) (Ekstittikul and Chulavatnatol. 1988) ลินามารินเป็นสับสเตรทที่พบมากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของสารประกอบไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ทั้งหมด สารประกอบไซยาโนจินิกกลูโคไซด์เป็นสารที่ไม่มีพิษ และร่างกายสามารถขับออกได้ทางปัสสาวะ แต่เมื่อสารพวกนี้ได้รับการกระตุ้นจะแตกตัว และปลดปล่อยไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ออกมาซึ่งเป็นสารพิษ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดบาดแผลโดยการเข้าทำลายของสัตว์กินพืช หรือจุลินทรีย์ จึงคาดว่ากระบวนการนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองในพืช (Keresztessy *et al.* 2001) และเรียกกระบวนการเหล่านี้ว่าไซยาโนจีนีซิส (cyanogenesis) ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดดังนี้

- 1) ลินามารินจะถูกสลายโดยลินามารส ได้เป็นกลูโคส และ hydroxynitrile
- 2) hydroxynitrile จะถูกสลายต่อโดย hydroxynitrile lyase ได้เป็นคีโตน และไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งกระบวนการนี้อาจเกิดขึ้นได้เอง (Hughes. 1993)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาไฮยาโนจีนีซิส (Hughes. 1993)

2.2.4.2 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอนไซม์กลูโคซิรีโบซิเดส (glucocerebrosidase) ซึ่งมีสับสเตรทธรรมชาติคือ สปีงโกซิลกลูโคไซด์ (sphingosylglucosidase) และกลูโคซิลซีราไมด์ (glucosylceramide) หากร่างกายขาดเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำให้เกิดการสะสมของสารทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Gaucher ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรม ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีอาการโลหิตจาง เหนื่อยง่าย ฟกช้ำง่าย และมีแนวโน้มที่จะมีเลือดไหลไม่หยุดเมื่อเกิดบาดแผล บางทีอาจมีอาการตับและตับอ่อนโตร่วมด้วย การรักษาโรคนี้ในสมัยก่อนจะใช้เอนไซม์กลูโคซิรีโบซิเดสที่สกัดได้จากรกของมนุษย์ฉีดให้แก่ผู้ป่วยโดยตรง ซึ่งการรักษาแบบนี้มีราคาสูง ปัจจุบันได้นำวิธีการรักษาแบบยีนบำบัด (gene therapy) มาใช้แทนการรักษาแบบดั้งเดิม (Esen. 1993)

2.2.4.3 เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์

ในจุลินทรีย์มีเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสซึ่งอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลส คอมเพล็กซ์ (cellulose complex) ทำหน้าที่เร่งการสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ซึ่งกลูโคสที่ได้จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในสิ่งมีชีวิต และเป็นวัตถุดิบในกระบวนการอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการผลิตอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Esen. 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าในกระเพาะหมักซึ่งเป็นกระเพาะแรกของสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ากระเพาะอื่นๆ และมีสภาพเป็นถังหมักขนาดใหญ่ นั้นเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์จำนวนมากอาศัยอยู่ โดยจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์มาทำหน้าที่เปลี่ยนอาหารที่กินเข้าไปให้เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เหมาะสมกับการที่สัตว์จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเปลี่ยนเป็นเนื้อและนม ดังนั้นจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักจึงนับว่ามีความสำคัญมากในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทางชีวภาพด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics) มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียซึ่งพบว่ามีจำนวนมากที่สุดในกระเพาะหมักของกระบือ (บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2541) จากรายงานการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาวิจัยโดย Howard and White. (1998) พบว่าสามารถทำการถ่ายถอดยีนเซลลูเลสจากไลบารีดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Ruminococcus albus* 8 ที่สร้างขึ้นโดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3A* และคัดแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่า 9 kb ด้วยซูโครส 10-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ λ DASH และถ่ายถอดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* P2392 จากนั้นนำโคลนที่ได้ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหาร CMC, MUC(4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside), OBR-HEC (Ostazin brilliant red – hydroxyethyl cellulose) และตรวจสอบการผลิต reducing sugar จากโคลนที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีจำนวน 3 โคลนที่แปรรหัสได้เป็นเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) , 3 โคลนที่สามารถแปรรหัสได้เป็นเอนไซม์เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) และจำนวน 1 โคลนที่สามารถแปรรหัสได้เอนไซม์ผสมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดสรวมอยู่ด้วย

Tajima *et al.* (2001) ที่ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ATCC 23769 โดยใช้ Primer2:GGWCARGCCRTRMCCGAACGSRWASAKCGSKT และ Primer3:GGCCATGTATGAGGAGGATGATCG ที่ออกแบบมาจากลำดับอนุรักษ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสได้ พบว่าสามารถทำการคัดเลือดยีนเบต้ากลูโคซิเดสในกลุ่มไกลโคไซค์ไฮโดรเลส แฟมิลี 3 ซึ่งมีขนาด 2,200 คู่เบสได้

Guo *et al.* (2008) ได้ทำการคัดแยกยีนเบต้ากลูโคซิเดส จากเมทาจีโนมิกที่ได้จากกระเพาะหมักของกระบือ พบว่ามีจำนวน 8 โคลนจากทั้งหมดจำนวน 118 โคลน ที่มีการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าในจำนวนนี้มี 1 โคลนที่นำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบเป็นยีนในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และมีขนาด 2,223 คู่เบส โดยได้ตั้งชื่อยีนดังกล่าวว่า umcel3G ในขณะที่ Jianget *et al.* (2009) ได้ทำการคัดแยกยีนเบต้ากลูโคซิเดสชนิดใหม่ จากเมทาจีโนมิกของจุลินทรีย์ในดิน และตั้งชื่อยีนดังกล่าวว่า bgIIc ซึ่งยีนดังกล่าวมีขนาด 1,443 คู่เบส

Liu *et al.* (2009) ได้ทำการคัดแยกยีนเซลลูโลสชนิดใหม่จากสิ่งแวดล้อม 4 ชนิดคือ ดินในบริเวณป่าไม้ มูลช้าง กระเพาะรูเมนของโค และต้นไม้ที่เน่าเปื่อย พบว่าสามารถคัดแยกยีนเบต้ากลูโคซิเดส ในกลุ่มไกลโคไซค์ไฮโดรเลส(GH) แฟมิลี 3 ได้จากกระเพาะหมักของโค และจากดินในป่า

Wang *et al.* (2009) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่จากมูลของ Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูง เพื่อนำมาโคลนยีน *CelL15* และ *CelL73* โดยการออกแบบไพรเมอร์เทียบกับฐานข้อมูล GenBank (gi: 154183738 และ gi: 599673) ซึ่งลำดับแรกขนาด 1,500 เบสเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนลำดับที่สองขนาด 730 เบสเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์เบต้ากลูแคนไฮโดรไลสซึ่ง ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งสองถูกโคลนลงใน pET-28a เพื่อให้เห็นออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) พบว่าความสามารถในการย่อยเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์ทั้งสองไว้ด้วยกัน อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีการจำแนกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส(GH) แฟมิลี 9 จากกระเพาะหมักของกระป๋อง

2.3 การนำเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสามารถเกิดได้ทั้งปฏิกิริยาเร่งการสลาย ปฏิกิริยาย้อนการสลาย และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (Svasti *et al.* 2003) ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง รวมถึงช่วยในการสลายเซลลูโลสสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล ใช้ปฏิกิริยาการเร่งการสลายเพื่อสังเคราะห์สารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์ และอัลทิลกลูโคไซด์ต่างๆมากมาย ซึ่งข้อดีของการสังเคราะห์ทางเอนไซม์คือ สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว และผลิตภัณฑ์ที่ได้มี stereospecificity และมี regioselectivity สูง ในขณะที่การสังเคราะห์ทางเคมีมีความยุ่งยากกว่า เนื่องจากน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสับสเตรทมีหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ ดังนั้นจึงต้องมีหมู่ที่ทำหน้าที่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้ และต้องเอาหมู่ป้องกันนี้ออก (Palcic. 1999)

2.3.1 ประโยชน์ของปฏิกิริยาการเร่งการสลาย (hydrolysis)

การสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส จะได้กลูโคสเพียงเล็กน้อย และได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเซลโลไบโอส ซึ่งจะเป็นตัวไปยับยั้งปฏิกิริยา และทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสลดลง นักวิจัยพบว่า สามารถเติมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายเซลโลไบโอสให้ได้เป็นกลูโคส และเนื่องจากเซลโลไบโอสสามารถละลายน้ำได้ เพราะฉะนั้นจึงอาจใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในรูปแบบที่มีการตรึง ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ถูกตรึงจะเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นานหลายเดือน ทำให้สามารถใช้ย่อยสลายเซลโลไบโอสอย่างต่อเนื่องโดยไม่สูญเสียประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงอาจเติมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการเตรียมเอนไซม์ทางการค้า (commercial cellulase) สำหรับการย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือใช้เปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ถูกตรึงไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้อีก เช่น ใช้ในการสังเคราะห์กลูโคไซด์ และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น (Esen. 1993)

2.3.2 ประโยชน์ของปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis)

โอลิโกแซคคาไรด์เป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-10 โมเลกุล เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และไกลโคลิปิด (glycolipid) ของผิวเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงาน เช่น เซลโลไบโอสและแป้ง ซึ่งคุณสมบัติเฉพาะตัวของโอลิโกแซคคาไรด์ คือ ไม่สามารถย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ เช่น bifidobacteria ซึ่งเป็น normal flora ที่มีอยู่ในลำไส้ใหญ่ และด้วยคุณสมบัตินี้ จึงได้นำโอลิโกแซคคาไรด์มาใช้เป็นสารให้ความหวานที่ให้แคลอรีต่ำ (Tomomatsu, 1994) นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบของ prebiotic food โอลิโกแซคคาไรด์ที่นิยมใช้คือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide) ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharides) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galactooligosaccharides) และโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (soybean oligosaccharides) ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยได้ใช้ปฏิกิริยาย้อนการสลายของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโอลิโกแซคคาไรด์มาใช้เป็นวัคซีน และยารักษาโรคต่างๆ มากมาย เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้มาเลเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* จะปล่อยสารพิษพวกคาร์โบไฮเดรตออกมา ดังนั้นจึงได้มีการเลียนแบบโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตตัวนี้เพื่อนำไปทำเป็นวัคซีน แล้วทำการทดลองฉีดในหนู พบว่าหนูที่ได้รับวัคซีนเมื่อสัมผัสกับเชื้อทำให้หนูไม่ตาย (Hewitt and Seeberger, 2001) นอกจากนี้ นักวิจัยได้ใช้ปฏิกิริยาย้อนการสลายของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการผลิตยา เช่น น้ำตาลแลคตูโลส (lactulose) ซึ่งพบว่ามีความสำคัญในการผลิตยารักษาโรคท้องผูกเรื้อรัง โดยการย่อยสลายแลคตูโลสจะช่วยดึงน้ำเข้าไปยังลำไส้ ทำให้มีการระบาย (Boons, 1996)

2.3.3 ประโยชน์ของปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation)

Lirdprapamongkol and Svasti (2000) ได้ใช้ปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ และอัลคิลกลูโคไซด์ เนื่องจากสารประกอบไกลโคไซด์มีลักษณะเป็น amphipathic molecule คือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่มีขั้ว และอะไมด์ไฮดรอกซิลที่ไม่มีขั้ว ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นจึงมีการใช้ไกลโคไซด์เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งไกลโคไซด์ธรรมชาติบางตัว เช่น saponin มีคุณสมบัติเป็นสารลดความตึงผิวธรรมชาติ แต่ไม่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้ใช้ ดังนั้นจึงให้ความสำคัญกับไกลโคไซด์ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ เช่น อัลคิลกลูโคไซด์ จำพวก octyl β -D-glucoside, decyl β -D-glucoside และ dodecyl β -D-glucoside เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภท non-ionic surfactants ชนิดใหม่ เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ง่ายด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และมีการระคายเคืองต่อตาและผิวหนังน้อย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รายละเอียดของอุปกรณ์ และการเตรียมสารละลายที่ใช้ทำการทดลองสำหรับทำการโคลน ยีนที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะหมักของกระบือ

เก็บตัวอย่างจากกระเพาะหมักของกระบือจำนวน 5 ตัว จากโรงฆ่าสัตว์ที่จังหวัดอยุธยา โดยนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้นที่ทำกรฆ่าเชื้อ แบ่งใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำของเหลวที่ได้ จากกระเพาะหมักแบ่งใส่หลอด 15 มิลลิลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำส่วนบนทิ้ง จะเหลือตะกอนกากอาหารที่ก้น หลอดมีสีเขียว และตะกอนของแบคทีเรียอยู่ชั้นบนเป็นชั้นสีขาวขุ่นอมเหลือง นำส่วนตะกอน แบคทีเรียมาทำละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารให้เข้า กันดี จากนั้นดูดของเหลวที่ได้ แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างของเหลว ที่ -80 องศาเซลเซียส (ศรีธัญญา สถิตมณวิวัฒน์. 2551)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านใช้สำหรับการ โคลนยีนทั่วไป เพื่อเลี้ยงเก็บ recombinant clone

เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta(DE3) (Novagen,) เป็นสายพันธุ์ที่แยกมาจาก BL21 โดยออกแบบให้เพิ่มการแสดงออกโปรตีนของยูคาริโอต (eukaryotic protein) ซึ่ง 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) ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการ โคลนยีนเพื่อศึกษาการ แสดงออก (expression host) โดยใช้คู่กับเวกเตอร์ pET28a(+) ซึ่ง *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta(DE3) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ chloramphenicol

เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ TOP10 สายพันธุ์นี้มีจีโนไทป์ (genotype) เป็น araBAD- และ araEFG+ และจะมีการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน mcrA, mcrB และ mrr ซึ่งจะสามารถ encode ให้เกิด restriction system สำหรับดีเอ็นเอที่มี methyl group หมายความว่าสามารถ โคลนดีเอ็นเอที่มี หมู่มethyl ที่มาจากดีเอ็นเอของ mammalian และ ดีเอ็นเอพืช โดยไม่เกิดการย่อยดีเอ็นเอ นอกจากนี้ ยังพบว่า *E.coli* สายพันธุ์ TOP10 สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α และยังพบ

โคโลนีที่มีขนาดใหญ่กว่าอีกด้วย TOP10 cell จะให้ประสิทธิภาพในการโคลนที่สูงกว่า ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส โดยเป็นเซลล์เข้าบ้านที่นิยมใช้คู่กับพลาสมิดเวกเตอร์ pBAD TOPO ซึ่ง *E.coli* สายพันธุ์ TOP10 นี้จะไม่มียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นในการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายถอดพลาสมิดถูกผสมจะอาศัยยีนต้านทานยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดเวกเตอร์

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ LMG194 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin และ tetracycline ได้แต่ที่นิยมใช้คือ streptomycin ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์ LMG194 จะใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส (expression host) ใช้คู่กับพลาสมิดเวกเตอร์ pBAD TOPO ในกรณีที่ยีนมีการแสดงออกน้อย (low basal level expression) หรือกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (toxic cell) ซึ่งไม่สามารถใช้ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ได้

เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท ID2R1P2 ซึ่งพบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (มานิสา. 2555) ได้มาจากการแยกเชื้อจากของเหลวในกระเพาะหมักของกระบือ ใช้ในส่วนของ การทดลองเรื่องการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้มาจากวิธีการเพาะเชื้อ (culture dependent) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวิธีที่นำมาใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดส ควบคู่กับวิธีการโคลนยีนจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่ได้มาจากการเพาะเชื้อ (uncultured independent) ซึ่งแบคทีเรีย ไอโซเลท ID2R1P2 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

3.1.3 พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้

หลักการในการเลือกใช้เวกเตอร์ขึ้นอยู่กับความต้องการในการนำโปรตีนไปประยุกต์ใช้ ข้อมูลเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิดและวิธีการโคลน ซึ่งในการทดลองต้องการได้โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein) ซึ่งมีปลายด้านหนึ่งติดอยู่กับ His*tag เพื่อสะดวกในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และช่วยชี้ว่าโปรตีนของเรามีการแสดงออก (express) หรือไม่ ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส เวกเตอร์ที่ใช้ในการวิจัยมี 2 ชนิดคือ pET28a(+) และ pBAD TOPO (ภาคผนวก ก) ซึ่งเวกเตอร์ pET28a(+) เป็นเวกเตอร์สำหรับใช้ในการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin โดยเวกเตอร์กลุ่มนี้จะมี T7 promoter ซึ่งเป็น strong promoter และได้ ori (origin of replication) มาจาก pBR322 ซึ่งมีการจำลองตัวสูง และเป็นระบบที่สามารถใช้กับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างกว้างขวาง และ Tag แต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่องานแตกต่างกัน เช่น T7*Tag และ His*Tag มีเพื่อการตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ในการทำเทคนิค western blotting นอกจากนี้ T7*Tag และ His*Tag ยังมีประโยชน์ในกระบวนการทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ ส่วนเวกเตอร์ pBAD TOPO (Invitrogen, USA) เป็นเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออก ซึ่งมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin อาศัยการทำงานของ araBAD promoter ซึ่งเป็น arabinose operon คือ promoter จะถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระตุ้นให้ทำงานด้วยน้ำตาล arabinose หลักการคือ araBAD promoter จะถูกควบคุมการทำงานแบบที่เรียกว่า positive และ negative regulated จาก regulatory protein คือ AraC เมื่อมีน้ำตาล arabinose จะทำให้ AraC จับเป็นกลุ่มกับน้ำตาล arabinose ซึ่งทำให้ไม่มีการ form เป็น loop กัน ขวางการทำงานของ promoter ได้ เมื่อ promoter ทำงานก็จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่สนใจได้ต่อไป ซึ่งระบบการสังเคราะห์โปรตีนแบบนี้เหมาะกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นพิษกับเซลล์ และสามารถใช้น้ำตาล arabinose ซึ่งมีราคาไม่สูงมากมาใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนได้แทนระบบ T7 expression system ซึ่ง IPTG ที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นให้ T7 promoter ทำงานนั้นมีราคาค่อนข้างสูง

3.2 เทคนิคทั่วไปทางชีวโมเลกุล

3.2.1 การสกัดเมทาจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักได้ดัดแปลงมาจากวิธีที่รายงานโดย Tajima *et al.* (1999) โดยนำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Extraction buffer (ภาคผนวก ก) และ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ เก็บของเหลวส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) และ 5.3 M NaCl ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol และล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 20-40 ไมโครลิตร และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยก ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-1.9 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือไม่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer 16SrRNA ที่ออกแบบโดย Kanokratana *et al.* (2004) คือ BSF primer : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ REVB primer : 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะยาว 1,500 คู่เบส แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเพิ่มปริมาณยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เข้มข้น 200 ng สารละลาย 1X Taq Buffer (500mM KCl, 100mM Tris - HCl, 0.1% Triton™ X-100) สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 μ M สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2

mM ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้นอย่างละ 1 μ M เอนไซม์ *Taq*DNA Polymerase (Vivantis, US) 0.1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยื่นเป้าหมายโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler: (Biometra, Germany) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนคือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงเพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์ได้อย่างเหมาะสม (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการจับตัวกันกับตัวอย่างอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เมื่อปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสทำได้โดยเตรียมเจลอะกาโรความเข้มข้น 0.8-1.0% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TAE pH 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเทเจลลงในถาดเจล (Gel tray) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X Loading dye ในอัตราส่วน 5:1 โดยใช้ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) และ 1 kb ladder (Fermentas) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene genius : Bio Imaging System, Germany)

3.2.4 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด แล้วเติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่เก็บได้) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ปริมาตร 2ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน

Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 μ l ใน Spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นติพีวีจ์หลอดใหม่เติม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.2.3

3.2.5 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.2.4 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ 10 μ l ประกอบด้วย 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 ที่ 16 องศาเซลเซียส) พลาสมิดเวกเตอร์ 55 ng, T4 DNA Ligase (Fermentas) ความเข้มข้น 5 ยูนิต, ผลผลิตพีซีอาร์ 150 ng และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.6 การถ่ายทอดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli*

การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำเซลล์เจ้าบ้านปริมาตร 100 μ l มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ ในข้อที่ 3.2.5 ปริมาตร 10 μ l ใส่ในเซลล์เจ้าบ้าน (Competent cell) ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ml และนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ย (Spread) บนจานเพาะเลี้ยงอาหารแข็ง LB ที่มี ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.2.7 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายทอดพลาสมิดสายผสมด้วยวิธี size screening

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ สำหรับเวกเตอร์ pTZ57R/T จะมีการเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 0.2 μ g/ml และ Isopropyl- β -D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.2 mM/ml ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เนื่องจาก

pTZ57R/T (Fermentas) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะทำการย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกด้วยผลผลิตพีซีอาร์ที่บริเวณ *lacZ* gene จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เป็นผลให้ได้โคโลนีสีขาวแทน จากนั้นนำมาทำ master plate และคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening โดยการใช้ไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จิ้มที่โคโลนีแล้วใส่ลงใน lysis buffer (ภาคผนวก ก) เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นนำมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.2.3

3.2.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

โดยนำโคลนที่คัดเลือกมาจากการทำ size screening มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะ 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 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเติม Alkaline lysis II (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 μ l ผสมให้เข้ากัน กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนปริมาตร 600 μ l ใส่ไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ต่อมาเติม isopropanol ปริมาตร 600 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 μ l ทำการตรวจสอบพลาสมิดถูกผสมที่สกัดได้โดยใช้เจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.2.3

3.2.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด

เลือกโคลนที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะ เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในกลุ่มมือของ QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) โดยเติมสารละลาย Resuspension ปริมาตร 250 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติมสารละลาย Lysis ปริมาตร 250 μ l จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย Neutralization ปริมาตร 350 μ l แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAprep® Spin Miniprep Kit แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่เติมสารละลาย EB ปริมาตร 40 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.2.3

3.2.10 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ 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

3.2.11 การเตรียมเซลล์เข้าบ้าน (competent cell)

ทำการเตรียมเซลล์เข้าบ้านตามวิธีการของ Inoue *et al.* (1990) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นเจือโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 ml ซึ่งมียาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นนำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปิดเครื่อง 1 ml ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 ml แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิอีกครั้งที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.3-0.4 วางไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 0.1M MgCl₂ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนรอบที่สอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนเหลว ละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะกอนด้วย 0.1M CaCl₂ บนน้ำแข็ง จากนั้นใส่กลีเซอรอล 100% ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 30% ผสมอย่างเบามือโดยใช้ปิเปต แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 100 μ l นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.12 การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์

การเตรียมเวกเตอร์ pET28a(+) โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์แต่ละชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสมิด จากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.2.9 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำการตัดแบบ double digest ซึ่งในปฏิกิริยา 50 μ l ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 μ g, 1X restriction enzyme buffer, restriction enzyme 10 ยูนิต(U) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด PCR Purification Mini sample Kit (Favorgen®)

3.3 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

3.3.1 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่ได้มาจากการเพาะเชื้อ (uncultured independent)

3.3.1.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาชิ้นส่วนของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

ออกแบบไพรเมอร์ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 1,3 และ 9 (ภาคผนวก ข) โดยเทียบจากลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) รายละเอียดมีดังนี้ เบต้ากลูโคซิเดส แฟมิลี 1 จากข้อมูลดังนี้ *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus* [AAA22266.1], *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 [CAA42814.1], *Clostridium cellulovorans* [AAQ00997.1], *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* [CAA31087.1], *Paenibacillus polymyxa* [AAA22264.1] และ *Bifidobacterium breve* [BAA19881.1] Forward Primer ที่ได้คือ β gluc1_F1 5'-ACIGCNGCITAYCARATHGARGG-3' และ Reverse Primer ที่ได้คือ β gluc1_R1 5'-GCCAYT CRAARTTRTCCATIA-3' เบต้ากลูโคซิเดส แฟมิลี 3 ออกแบบจากข้อมูล *Clostridium stercorarium* [CAB08072.1], *Clostridium thermocellum* [CAA33665.1], *Ruminococcus albus* [AAC05445.1], *Aeromicrobium erythreum* [AAU93797.1] และ *Streptomyces coelicolor* A3(2) [CAB56688.1] Forward Primer ที่ได้คือ β gluc3_F1 5'-GARTAYTTYWSIGARGAYCCNTA-3' Reverse Primer ที่ได้คือ β gluc3_R1 5'-GTRTAISWIARICCRTGNCCRAA-3' เบต้ากลูโคซิเดส แฟมิลี 9 ออกแบบจากข้อมูลคือ *Clostridium thermocellum* [AAC06139.1], *Clostridium*

thermocellum [AAR87745.1], *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [AAK78540.1] และ *Ruminococcus albus* [AAR01216.1] Bgluc9_F1 5'-TGGTAYGAYGCIGGNGAYCAYGG-3' และ Bgluc9_R1 5'-TTCCARTTIAYNGT DATYTCRTT-3'

3.3.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.3.1.1 ซึ่งปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรสปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 200 ng สารละลาย 1X Taq Buffer (500mM KCl, 100mM Tris – HCl, 0.1% TritonTM X-100) สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 μ M สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 2 mM ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้นอย่างละ 1 μ M เอนไซม์ TaqDNA Polymerase (Vivantis, US) 0.1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCyclerTM thermal cycler: (Biometra, Germany) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลายาวในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนคือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงเพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์ได้อย่างเหมาะสม (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการจับตัวกันกับตัวอย่างอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เมื่อปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ตามวิธีการในข้อ 3.2.3 และทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการในข้อ 3.2.4

3.3.1.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสและการถ่ายถอดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.3.1.2 มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการในข้อ 3.2.5 โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Ins TAcloneTM PCR Cloning Kit (Fermentas, Canada) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นถ่ายถอดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะตามวิธีการในข้อ 3.2.6 โดยทำการเพาะเลี้ยงพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง LB ที่มี Ampicillin 100 μ g/ml, Idopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.2 mM/ml และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-

B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำงานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการสุ่มคัดเลือกโคลนที่ได้รับการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเบต้ากาแลคโตซิเดส ตามวิธีการในข้อ 3.2.7 แล้วนำโคลนที่ถูกคัดเลือกมาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis และสกัดด้วยชุดสกัดอีกครั้ง ตามวิธีการในข้อ 3.2.8 และ 3.2.9 ตามลำดับ แล้วทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ M13F และไพรเมอร์ M13R-pUC (First Base, มาเลเซีย)

3.3.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากาแลคโตซิเดส

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX (basic local alignment search tools) (Altschul *et al.*, 1990) จากฐานข้อมูล NCBI เข้าถึงทางอินเทอร์เน็ตได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ทำการเปรียบเทียบความเหมือน(% identity) หรือความคล้าย (% similarity) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสกับเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อหาบริเวณ conserve sequence ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) ทำการสร้างภาพของการเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) โดยวิธีการ Neighbor-Joining method และกำหนดค่า bootstrap test =1000 เพื่อยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ได้เป็นยีนในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลี 1 จากนั้นสุ่มเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับฐานข้อมูลน้อยกว่า 80% มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากาแลคโตซิเดสต่อไป

3.3.2 การโคลนยีนเบต้ากาแลคโตซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 ที่ได้มาจากวิธีเพาะเชื้อ (culture dependent)

3.3.2.1 การออกแบบไพรเมอร์ของเชื้อไอโซเลท ID2R1P2

ในการทดลองนี้จะใช้ไพรเมอร์ Bpum-bgl1/1F และ Bpum-bgl1/1R ซึ่งออกแบบไว้โดย ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ซึ่งได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 (*Bacillus pumilus*) ABV64183.1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ (มานิสสา บุพตา, 2555) ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์ดังนี้ Bpum-bgl1/1F_5'ATG AACAGAATCGAGATTCCAA3' และ Bpum-bgl1/1R_5'CTATCGATAGTTGACTTCTGTTT3'

3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไอโซเลท ID1R1P2 ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์เรส

เริ่มจากทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำมาเจือจางให้เป็น serial dilution โดยกำหนดความเข้มข้นระหว่างดีเอ็นเอและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 1:10 , 1:100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

และ 1:1,000 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 45 , 50 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบว่าที่อุณหภูมิใดมีการเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที (ยีนมีขนาด 1,434 bp) จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ จากนั้นคงอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วย 1.0% อะกาโรสเจล ตามวิธีการในข้อ 3.2.3 แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการข้อ 3.2.4

3.3.2.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตของเชื้อไอโซเลท ID1R1P2 และการถ่ายทอดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.3.2.2 มาทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ตามวิธีการข้อ 3.2.5 และ 3.2.6 ทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายเพื่อมาทำ master plate ด้วยวิธี blue/white screening จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีการแทรกของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายด้วยวิธี size screening ตามวิธีการข้อ 3.2.7 และเข้คอีกครั้งด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC ทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการข้อ 3.2.9 และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base , Malaysia)

3.3.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID1R1P2

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX (basic local alignment search tools) (Altschul *et al.*, 1990) จากฐานข้อมูล NCBI เข้าถึงทางอินเทอร์เน็ตได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ทำการเปรียบเทียบความเหมือน(% identity) หรือความคล้าย (% similarity)

3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี Genome walking

ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสนี้ ได้ทำการทดลองทั้งหมด 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค semi-random, two stepped PCR (ST-PCR) วิธีที่ 2 เป็นการใช้ชุด GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA) ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคจะเป็นการทำ genome walking เพื่อหาส่วนต่อจากชิ้นส่วนยีนเดิมที่ได้จากข้อ 3.3.1

3.4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) ด้วยเทคนิค semi-random , two stepped PCR (ST-PCR)

3.4.1.1 การออกแบบ specific primer

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากข้อ 3.3.1.4 มาออกแบบ specific primer เพื่อหาส่วนต่อจากชิ้นส่วนยีนดังกล่าว โดยออกแบบ forward primer จากปลายทางด้าน 3'(downstream) และ reverse primer จากปลายทางด้าน 5'(upstream) ของชิ้นส่วนยีนที่เป็นต้นแบบ โดยทำการออกแบบด้านละ 2 ไพรมเมอร์ คือ GSP1 กับ GSP2 ทำเช่นเดียวกันทั้งสองด้าน

3.4.1.2 การทำ semi-random , two stepped PCR (ST-PCR)

การหาส่วนต่อของชิ้นส่วนยีนเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full length gene) ด้วยวิธี semi-random , two stepped PCR (ST-PCR) ตามวิธีของ Huo *et al.* (2007) โดยในการทำ primary PCR จะใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะเส้นที่ 1 คู่กับ semi-random primer (SP1 , BMP1 , BMP2) ที่มีความแตกต่างกันทางปลายด้าน 3' ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวจะช่วยเพิ่มโอกาสในการจับกันแบบสุ่มของไพรมเมอร์บนจีโนมที่อื่นของแบคทีเรีย เมื่อทำ primary PCR เสร็จแล้วจะเพิ่มความจำเพาะโดยการทำ secondary PCR หรือ nested PCR โดยใช้ไพรมเมอร์เส้นที่ 2 คู่กับไพรมเมอร์ ST2 เพื่อยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ได้เป็นส่วนของยีนในบริเวณที่ต้องการ

การทำ primary PCR มีปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng , สารละลาย 1X *Taq* buffer (75mM Tris-HCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Tween20) with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dNTP ความเข้มข้น 200 μ M , specific primer (GSP1) ความเข้มข้น 0.5 μ M , semi-random primer (ST1 , BMP1 และ BMP2) ความเข้มข้น 0.5 μ M , MgCl_2 1.5 μ M และ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas[®]) ความเข้มข้น 1U แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นเป็น 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นเริ่มวงรอบของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวนทั้งสิ้น 6 รอบ จึงเริ่มปฏิกิริยาในวงรอบที่สอง โดยกำหนดอุณหภูมิเป็น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 25 วงรอบ จึงถือว่าการสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตในเจลอะกาโรส 1.0%

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่าของความเข้มข้นเริ่มแรก จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจางนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกิริยา nested PCR รอบที่สอง โดยในรอบนี้จะใช้ไพรเมอร์ GSP2 คู่กับไพรเมอร์ ST2 โดยในปฏิกิริยา 25 μ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจาง 1 μ l , สารละลาย 1X *Taq* buffer (75mM Tris-HCl , 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Tween 20) with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dNTP ความเข้มข้น 200 μ M , ไพรเมอร์ GSP2 ความเข้มข้น 0.5 μ M , ไพรเมอร์ ST2 ความเข้มข้น 0.5 μ M , MgCl_2 1.5 μ M และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas[®]) ความเข้มข้น 1 U จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 วนรอบ จึงถือว่าสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.2.3 จากนั้นคัดเลือกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการทำการสกัดออกจากเจลให้บริสุทธิ์ แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T และถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีเป้าหมายมาทำเป็น master plate แล้วคัดเลือกเบื้องต้นด้วยวิธี size screening แล้วคัดเลือกซ้ำอีกครั้งด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI จากนั้นเลือกโคลนแล้วทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ เพื่อทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) โดยใช้ GenomeWalker[™] universal kit (Clontech, USA)

3.4.2.1 การตัดจีโนมดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดจีโนมดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นส่วนที่มีปลายเป็นปลายทู่ (blunt end) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อ adaptor ของชุด Genome Walker[™] universal kit (clontech,USA) ได้ด้วยเอนไซม์ *Dra*I , *Eco*RV , *Pvu*II และ *Stu*I โดยคาดหวังว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะจะสุ่มตัดบนจีโนมดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กับชิ้นส่วนยีน จนสามารถเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ โดยในแต่ละปฏิกิริยา 100 μ l ประกอบด้วย จีโนมดีเอ็นเอ 0.7 μ g , 10X restriction enzyme buffer , restriction enzyme 10U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาเขย่าด้วย vortex ที่ความเร็วรอบต่ำ (slow speed) เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำกลับเข้าสู่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ ด้วยอะกาโรสเจล 0.6 %

3.4.2.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด PCR Purification Mini sample Kit (Favorgen®, USA) โดยนำจีโนมิกที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในข้อ 3.4.2.1 มาเติมสารละลาย FADF buffer ปริมาตร 5 เท่าของปฏิกิริยา จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดที่ผสมกันใส่ลงใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube วางทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ได้ทิ้งแล้วล้าง column ด้วย Wash buffer 750 μ l ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์หลอดใหม่ โดยตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 40 μ l โดยหยดผ่านตรงกลางเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิส 1.0 % เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

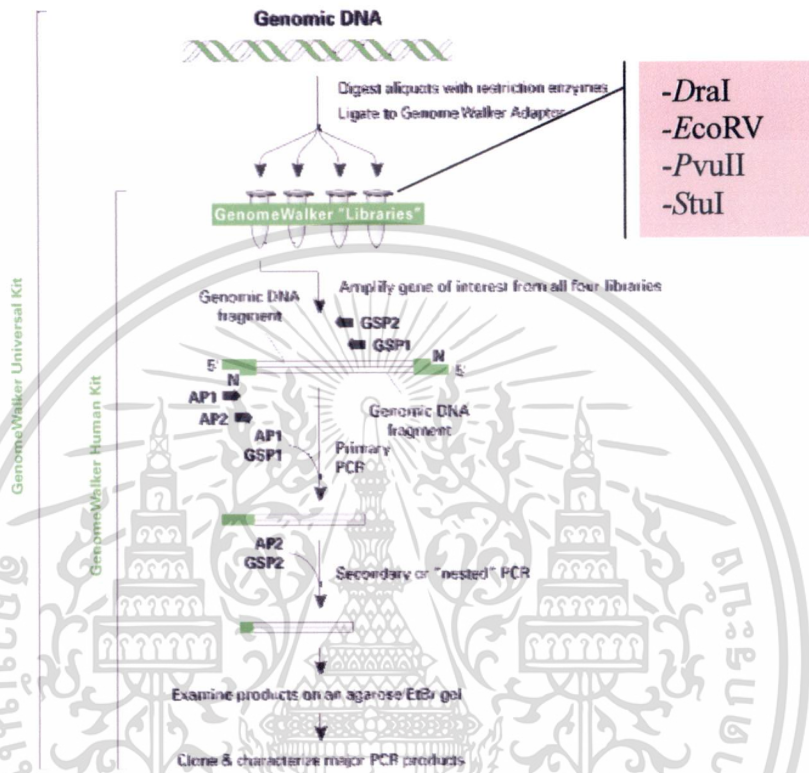
3.4.2.3 การเชื่อมต่อ digested DNA กับ GenomeWalker adaptor

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดและทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3.4.2.2 มาเชื่อมต่อกับ GenomeWalker adaptor (Clontech, USA) โดยในปฏิกิริยา 8.0 μ l ประกอบด้วย digested DNA 4.0 μ l , 25 μ M GenomeWalker adaptor 1.9 μ l , 10X ligation buffer 1.6 μ l และเอนไซม์ T4 DNA ligase (6U) 0.5 μ l ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.4.2.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ในปฏิกิริยา Primary PCR ต้องอาศัยไพรเมอร์ AP1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Adaptor คู่กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิมเส้นที่ 1 (GSP1) เสร็จแล้วเพิ่มความจำเพาะ (specific) โดยการทำ Secondary PCR หรือ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AP2 คู่กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิมเส้นที่ 2 (GSP2) ดังภาพที่ 3.1 โดยในปฏิกิริยา primary PCR 25.0 μ l ประกอบด้วย 1X *Tth* PCR reaction buffer (40mM Tris-HCl (pH 9.3 at 25 °C) , 15 mM KOAc , 0.02% Triton X-100) , 1X advantage genomic polymerase mix (0.10-0.20 units/ μ l *Tth* DNA polymerase , 0.01 μ g/ μ l *Tth* Start antibody, 1.0% glycerol , 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 4.6 mM KCl , 1.1 mM Mg(OAc)₂ , 0.2 mM dNTP , 0.2 mM AP1 และ 0.2 mM GSP1 ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยวงรอบแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 7 วงรอบ จากนั้นเริ่มวงรอบที่สอง โดยกำหนด

อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 32 วนรอบ แล้วคงอุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียสต่ออีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ในเจลอะกาโรส 1.0%



ภาพที่ 3.1 ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากการใช้ GenomeWalker adaptor (Clontech laboratory. 2007)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก primary PCR แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่าของความเข้มข้นเริ่มแรก เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใน secondary PCR ในปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย 1X *Tth* PCR reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 9.3 at 25°C), 15 mM KOAc, 0.02% Triton X-100) , 1X advantage genomic polymerase mix (0.10 - 0.20 units/ μ l *Tth* DNA polymerase, 0.01 μ g/ μ l *Tth* Start antibody, 1.0% glycerol , 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.6 mM KCl) , 1.1 mM Mg(OAc)₂ , 0.2 mM dNTP , 0.2 mM AP2 และ 0.2 mM GSP2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยวนรอบแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 5 วนรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเริ่มวงรอบที่สอง โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิ เป็น 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 25 วงรอบ จากนั้นคงอุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ต่อ อีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ในเจลอะกาโรส 1.0 % คัดเลือกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ(ในกรณีมีผลผลิตพีซีอาร์หลาย ขนาด)วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรส 1.0% จากนั้นสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำ ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Gel Purification Kit (Favorgen®) ตามวิธีการในข้อ 3.4.2.2

3.4.2.5 การโคลนและคัดเลือกโคลนส่วนต่อของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.4.2.4 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas) แล้วจึงโคลนลงสู่เซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* คัดเลือก โคลนีเป้าหมายด้วยเทคนิค blue/white screening เลือกมาทำเป็น master plate จากนั้นทำ size screening จาก master plate เพื่อจะสุ่มสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis ตามวิธีการในข้อ 3.2.7 จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการใน ข้อ 3.2.3 แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรก โดยการนำพลาสมิดที่สกัด ได้มาทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC แล้วนำไปตรวจสอบขนาด ของดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส 1.0 % ภายใต้กระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 คู่เบส แล้วจึงนำไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดของบริษัท QIAGEN® เพื่อทำให้ บริสุทธิ์ แล้วนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (First Base, Malaysia)

3.4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกมาด้วยไพรเมอร์ M13F และ ไพรเมอร์ M13R-pUC จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ทั้งทางด้านปลาย 5' (upstream) และปลาย 3' (downstream) มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีนเบต้ากลูโคซิเดส เดิมด้วยโปรแกรม Contig Express (InfoMax, Inc.200) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ที่ได้ เพื่อหาจุดเริ่มต้น (start codon) และจุดสิ้นสุดของยีน (stop codon) ซึ่งในกรณีที่ยังไม่พบ จุดเริ่มต้น และจุดสิ้นสุดของยีน ต้องทำการหาส่วนต่อของยีนเพิ่มเติมตามวิธีการข้อ 3.4.2.1-3.4.2.6 จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่สมบูรณ์

3.5 การแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

3.5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+)

3.5.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์แบบ mature gene

3.5.1.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ mature gene

โดยนำลำดับอะมิโนของยีนที่สมบูรณ์ ซึ่งลำดับอะมิโนดังกล่าวได้มาจากการทำ genome walking จากข้อ 3.4.2 นำมาเข้าโปรแกรม Signal P เพื่อทำการตัดส่วนที่เป็น signal peptide ออก จากนั้นทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดในชิ้นส่วนยีนของเรา แต่ตัดที่เวกเตอร์ ณ ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a(+) (นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม webcutter2.0) ซึ่งไพรเมอร์ mature gene ของยีน Bglucl1 ด้าน forward คือไพรเมอร์ bgl1mat_pET28F_His 5' GGAATTCATATGTCAAGCCCGCCGACCTGG 3' เลือเอนไซม์ NdeI และด้าน reverse คือไพรเมอร์ bgl1mat_pET28R_His 5' CCCAAGCTTTCAAAGGATTTCCCGTTGCT 3' เลือเอนไซม์ HindIII

3.5.1.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากจีโนมดีเอ็นเอ

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งจะใช้จีโนมดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งได้ทดลองหาความเข้มข้นของจีโนมดีเอ็นเอที่ใช้โดยการเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ ในปฏิกิริยาถูกโซโพลีเมอเรส ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยจีโนมดีเอ็นเอ, 10X buffer(s), 200 μ M dNTP, ไพรเมอร์ bgl1mat_pET28F_His และไพรเมอร์ bgl1mat_pET28R_His ความเข้มข้นสุดท้าย 10 μ M, Taq DNA polymerase 1 U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาคู่ยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing โดยการทดลองที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน extension เป็น 72 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1.30 นาที และ 2 นาที เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา กำหนดจำนวนรอบทั้งสิ้น 35 รอบ จากนั้นคงอุณหภูมิต่อที่ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 นาที จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา แต่เนื่องจากการทดลองดังกล่าวไม่ประสบความสำเร็จจึงได้ยุติการทดลองไว้เพียงเท่านี้ จากนั้นจะทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส (partial gene) ที่ได้จากข้อ 3.3.1.4

3.5.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเส้น partial gene

3.5.1.2.1 การออกแบบไพรเมอร์จากชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากชิ้นส่วนยีน(partial gene)ที่ได้จากข้อ 3.3.1.4 ทั้ง 2 เส้น คือ Bglu1-1 และ Bglu1-3 โดยทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดในชิ้นส่วนยีนของเรา แต่ตัดที่เวกเตอร์ ณ ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a(+) (นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม webcutter2.0) และทำการติด His-Tag เพื่อช่วยในการเช็คการแสดงออกของยีนเรา และยังมีประโยชน์ในกระบวนการทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ ได้เลือกเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* สำหรับทั้ง 2 ยีน ซึ่งไพรเมอร์สำหรับเส้น partial gene ทั้ง 2 เส้นนี้ ได้ออกแบบไพรเมอร์แบบ degenerate primer 1 คู่ เนื่องจากทั้ง 2 เส้นมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง จึงได้ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1F 5'-GGAATTCCATATGACGGCGGCGTATCARATY-3' สำหรับด้าน forward และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R 5'-CCCAAGCTTTCATGCCCAAYTCRAAGTTRTC-3' สำหรับด้าน reverse

3.5.1.2.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน(partial gene)เบต้ากลูโคซิเดส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยจะใช้พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.3.1.3 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 1 ปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 100 ng, 1X buffer(S), 200 μ M dNTP, ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1F ความเข้มข้น 0.5 μ M และ ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R ความเข้มข้น 0.5 μ M และ *Taq* DNA polymerase 2 U แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จึงเพิ่มอุณหภูมิจนเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิจน 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จึงเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยา แล้วนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1.0 % แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Gel Purification Mini sample Kit (Favorgen[®])

จากนั้นนำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในปฏิกิริยา 50 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอผลผลิต 1.5 μ g, 1X restriction buffer, เอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* อย่าง

ละ 4.5 ยูนิท (U) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Purification Mini sample Kit (Favorgen[®]) ตามข้อ 3.4.2.2

3.5.1.2.3 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียพาหะและการตรวจสอบยีน

นำเวกเตอร์ pET28a(+) และยีน ที่ได้เตรียมจากข้อ 3.1.2 และ 3.5.1.2.2 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 และ โคลนลงสู่ competent cell สายพันธุ์ Rosetta(DE3) ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวมี T7 polymerase รองรับการแสดงออกของเวกเตอร์ที่มี T7 promoter และมี tRNA สำหรับ codon ที่มีน้อย (rare codon) ใน *E.coli* เช่น rare Arg codon , rare Leu codon , rare Ile codon และ rare Pro codon โดยใช้วิธี Heat shock (Sambrook *et al.* 1989) ตามข้อ 3.2.6 จากนั้นนำเซลล์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย คือ อาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin 50 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีมาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เพื่อทำเป็น master plate จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำ master plate ดังกล่าว มาตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (การทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากพลาสมิดลูกผสม) โดยใช้ไพรเมอร์ pET28a- และ ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R เพื่อคัดเลือกลโคณของพลาสมิด Bglu1-1 และ Bglu1-3 ที่มีการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28a(+) ทำการสกัดพลาสมิดและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ pBAD TOPO[®] TA Expression Kit

3.5.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ TOP10

3.5.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์

จะใช้ไพรเมอร์เส้น Bglu1_F1 สำหรับด้าน Forward จากข้อ 3.3.1.1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R จากข้อ 3.5.1.2.1 สำหรับด้าน Reverse ที่ได้เคยออกแบบไว้มาใช้คู่กัน เนื่องจากทั้ง 2 เส้นได้ออกแบบเพื่อครอบคลุมเส้น partial gene และจะใช้ start codon ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO

3.5.2.1.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิด ถูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ในขั้นตอนนี้จะใช้พลาสมิดถูกผสม Bglu1-3 ที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.3.1.4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng , 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3 (ที่ 42 องศาเซลเซียส) , 500 mM KCl , 25 mM MgCl₂ และ 0.01% gelatin) , 10 mM dNTP Mix , 0.5 μ M Forward primer และ 0.5 μ M Reverse primer , Taq DNA polymerase (Vivantis) 1 U ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จึงเพิ่มอุณหภูมิ เป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้ลดอุณหภูมิตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยา แล้วนำปฏิกิริยา ดังกล่าวมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1% แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Gel Purification Mini sample Kit (Favorgen) ตามข้อ 3.2.4

3.5.2.1.3 การโคลนชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสลงสู่แบคทีเรียพาหะและคัดเลือกโคลนด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์จากข้อ 3.5.2.1.2 มาเชื่อมต่อเข้ากับ pBAD-TOPO[®] vector ในปริมาตร 6 μ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ 4 μ l , Salt Solution 1 μ l และ pBAD-TOPO[®] vector 1 μ l ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์นี้ จะทำที่อุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียส เมื่อปีเปิดสารครบทุกตัวผสมกันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว เป็นเวลา 5-10 นาที(ขึ้นอยู่กับขนาดของยีน) จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *E.coli* One Shot[®] TOP10 โดยปีเปิดสารละลายดีเอ็นเอสายผสม 2 μ l ใส่ลงในหลอด *E.coli* TOP10 ปริมาตร 100 μ l ผสมโดยการใช้มือแตะข้างหลอด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อมาเติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 μ l นำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubate shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 μ g/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏ มาทำเป็น master plate โดยเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 μ g/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R เพื่อ

เชื้อในชั้นแรกว่ามีชั้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส ในดีเอ็นเอสายผสมดังกล่าว จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีการในข้อ 3.2.8

3.5.2.1.4 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์

ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pBAD-TOPO[®] TA Expression Kit จะต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์เพื่อเช็คว่าชั้นยีนที่แทรกเข้าไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ถูกทิศทางหรือไม่ (5'-3') เนื่องจากเวกเตอร์ดังกล่าวสามารถเกิดการแทรกของยีนได้ทั้ง 2 ทิศทาง โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO เข้าโปรแกรม webcutter2.0 เลือก 1 เอนไซม์ ที่สามารถตัดยีนเบต้ากลูโคซิเดสได้ 1 ตำแหน่ง และสามารถตัดในเวกเตอร์ได้อีก 1 ตำแหน่ง ซึ่งได้เอนไซม์ NcoI จากนั้นคำนวณขนาดของชั้นส่วนดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดได้ทั้ง 2 ชั้น โดยใช้โปรแกรม Serial Cloner เวอร์ชัน 2.1

ทำการตัดเอนไซม์ โดยในปริมาตร 10 μl ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.2.1.3 , เอนไซม์ NcoI 3 U , 10X Tango buffer แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% แล้วทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด ตามวิธีการข้อ 3.2.9 และทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.5.2.1.5 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.5.2.1.4 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ปริมาตร 2 ml เช้าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1-2 จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100 μl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เช้าที่ความเร็ว 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 เช้าต่อที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE วิธีการในข้อ 3.2.10

3.5.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้

LMG194

3.5.2.2.1 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

นำพลาสมิดจากข้อ 3.5.2.1.4 ทั้ง 2 โคลนคือ Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 มาทำการทรานส์ฟอร์มอีกครั้ง (Re-transform) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host express) LMG194 โดยเปิดสารละลายดีเอ็นเอสายผสม 2 μl ใส่ลงในหลอด *E.coli* LMG194 ปริมาตร 100 μl ผสมโดยการใช้มือแตะข้างหลอด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที 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 ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ และ streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏ มาทำเป็น master plate โดยเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ และ streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R แล้วนำมาเช็กในเจลอะกาโรส 1.0% ตามวิธีการข้อ 3.2.3

3.5.2.2.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.5.2.2.1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RM medium + 0.2% glucose (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ และ streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 2 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1-2 จากนั้นดูดเชื้อ ปริมาตร 100 μl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RM medium + 0.2% glycerol (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ และ streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัด OD_{600} ได้ประมาณ 0.5 จึงทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน ด้วยการเติม L-arabinose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% , 0.02% , 0.002% , 0.0002% และ 0.00002% โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย L-arabinose เขย่าต่อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE วิธีการในข้อ 3.2.10 และทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธีการข้อ 3.5.2.1.6

3.6 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

3.6.1 การทดสอบการย่อย 4 or *p*-Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (*p*NPG)

ในการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ คัดแปลงวิธีจาก Jiong *et al.* (2007) โดยจะใช้ 4 or *p*-Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (*p*NPG) เป็นซับสเตรตจำเพาะของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการทดสอบ เปรียบเทียบกับ *p*-Nitrophenol ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยา โดยเปิดสารละลายซับสเตรต 5mM *p*NPG ใน 0.2M sodium acetate buffer (NaOAc;pH6) 30 μ l ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ 10 μ l บ่มต่อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 1M Na₂CO₃ ปริมาตร 60 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พอลบกำหนดเวลานำออกมาตั้งไว้ในน้ำแข็ง ปิดฝาไม่ให้โดนแสงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดปฏิกิริยา 100 μ l เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้ *p*-Nitrophenol เป็นมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าสมการถดถอย และคำนวณค่า X ที่ได้ จากนั้นนำค่า X ที่ได้มาคำนวณหาค่า international unit (IU) ด้วยสูตร

$$IU = X * \text{dilution factor} / \text{time (min)} * \text{vol (ml)}$$

3.6.2 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 μ l ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีน Biorad protein assay (Biorad, USA) 1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปแสดงกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการถดถอย $y=ax+b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

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

3.6.3 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH)

โดยเริ่มพิจารณาตั้ง ค่า pH 3-8 โดยละลายซับสเตรต 5mM *p*NPG ในสารละลายดังนี้ pH 3-6 จะใช้ sodium acetate buffer ที่ความเข้มข้น 0.2 M และ pH 7 และ 8 จะใช้ sodium phosphate buffer ที่ความเข้มข้น 0.2 M จากนั้นจึงทำการทดสอบเพื่อหาค่า ความเป็นกรด-ด่าง ที่เอนไซม์สามารถทำงาน ได้ดีที่สุดตามปฏิกิริยาดังข้อ 3.6.1

3.6.4 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์(optimum temperature)

หลังจากวิเคราะห์ค่ากรด-ด่าง ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายซับสเตรต ได้ดีที่สุดแล้ว จึงทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงาน ได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์ร่วมกับ ซับสเตรตจะแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบตามวิธีการในข้อ 3.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

3.6.5 การวิเคราะห์ค่าเวลาที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (optimal time)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ เพื่อหาเวลาที่เอนไซม์สามารถทำงาน ได้ดีที่สุด โดยทดสอบด้วยซับสเตรต 5mM *p*NPG ในสารละลาย 0.2M NaOAc pH 6.0 โดยทดสอบที่เวลาแตกต่างกันที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ ด้วยวิธีการเดียวกันจากข้อ 3.6.1 โดยจะใช้ pH และอุณหภูมิ ที่เอนไซม์ทำงาน ได้ดีที่สุดจากข้อ 3.6.3 และ 3.6.4 ตามลำดับ

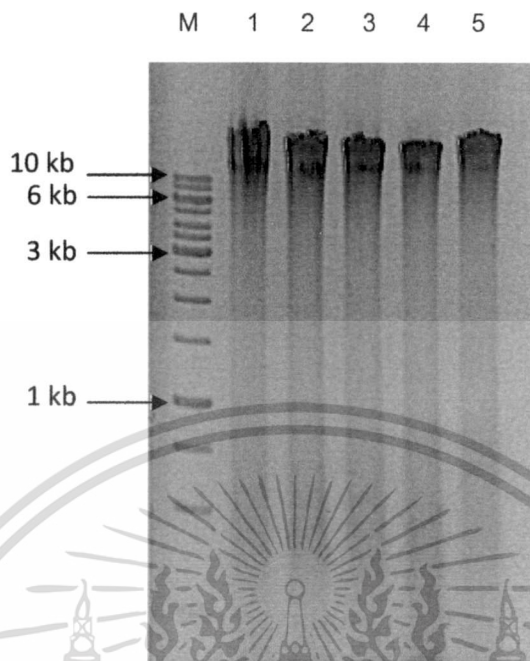
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การคัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระป๋องปลัก โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะหมักของกระป๋องปลักที่เข้ามาในโรงฆ่าสัตว์ หลังจากวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของกลุ่มเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส นำผลผลิตพีซีอาร์ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล นำชิ้นส่วนของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสโดยวิธี Genome walking จากนั้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะหมักของกระป๋อง

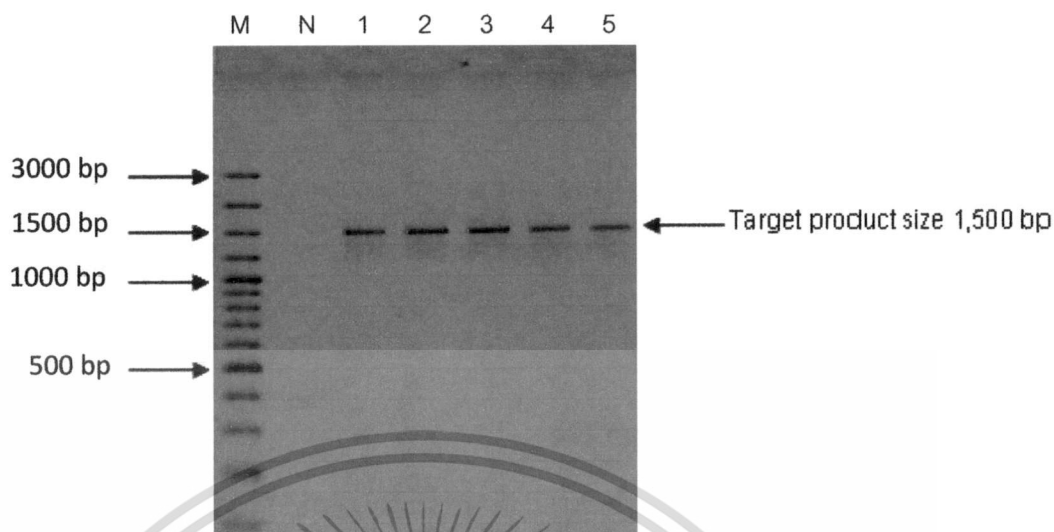
จากการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวที่ได้จากกระเพาะหมักของกระป๋องปลัก เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 1 kb ladder (Fermentas) ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่า 1 kb ladder เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 260 nm (A_{260}) พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นดังนี้ ดีเอ็นเอหลอดที่ 1 (a) = 2506.9 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่ 2 (b) = 1898.4 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่ 3 (c) = 1704.2 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่ 4 (d) = 1341.6 ng/ μ l และดีเอ็นเอหลอดที่ 5 (e) = 1837.9 ng/ μ l (ภาพที่ 4.1) เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวมิค พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.870 , 1.891 , 1.903 , 1.779 และ 1.744 ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์และค่า A_{260}/A_{230} เท่ากับ 1.54 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการนำดีเอ็นเอไปใช้ในการวิจัยต่อไป



ภาพที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวในกระเพาะหมักของกระบือ ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder, ดีเอ็นเอหลอดที่1 = 2506.9 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่2 = 1898.4 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่3 = 1704.2 ng/ μ l , ดีเอ็นเอหลอดที่4 = 1341.6 ng/ μ l และดีเอ็นเอหลอดที่5 = 1837.9 ng/ μ l

4.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบว่าดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการวิจัยได้ และมีส่วนที่เป็นดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ด้วย โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ 16S rRNA ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ยาว 1,500 bp (ภาพที่ 4.2) ตามที่ประมาณการไว้



ภาพที่ 4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA ทำการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder 100 ng , Lane N คือ negative control, Lane 1 ถึง 5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ

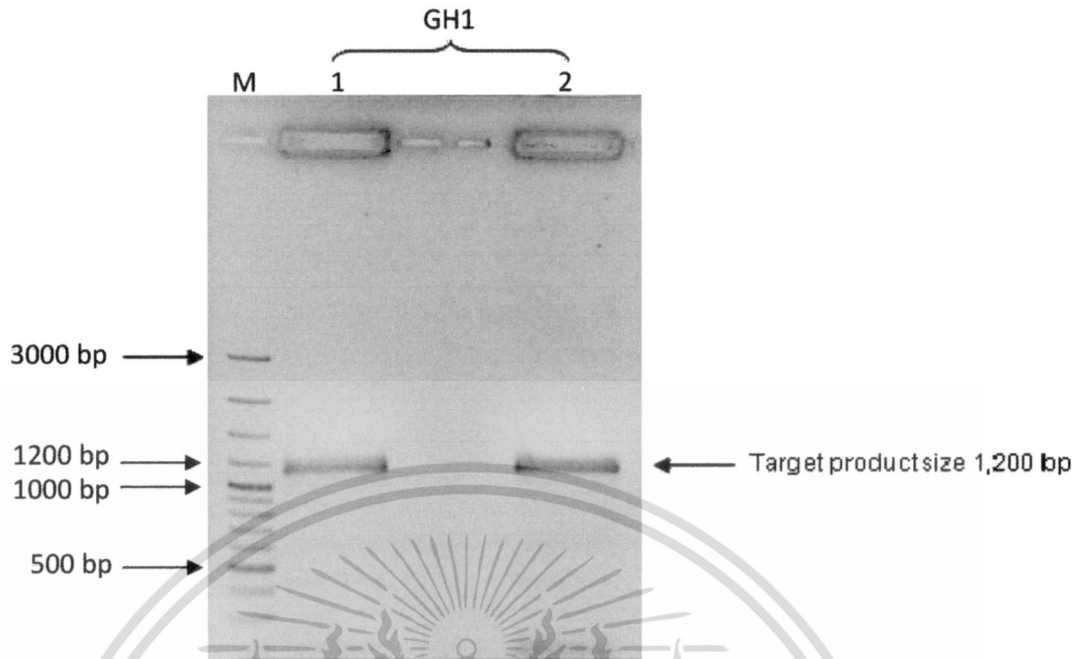
4.3 การโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

4.3.1 ผลการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่ได้มาจากการเพาะเชื้อ (uncultured independent)

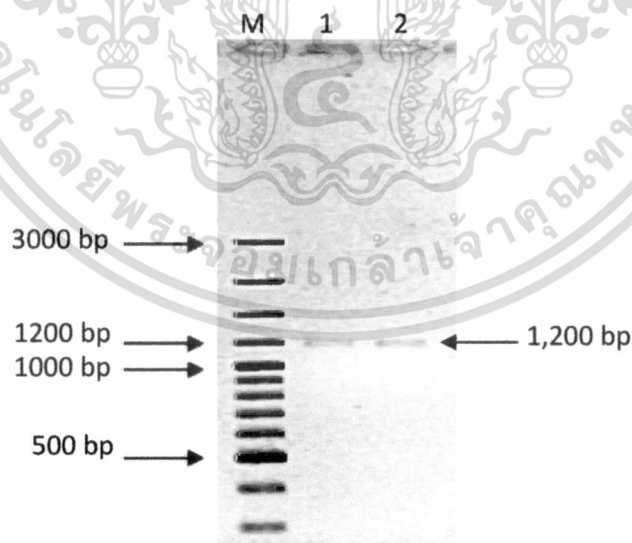
4.3.1.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส GH1, GH3 และ GH9 ในฐานข้อมูล CaZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database) พบว่าเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บน 1.0% เจลอะกาโรส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder พบว่ามีเฉพาะยีนเบต้ากลูโคซิเดส แฟมิลี 1 (Bgluc1) เท่านั้นที่พบแถบแบนของดีเอ็นเอผลผลิตซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 bp (ภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็นขนาดตามที่ประมาณการไว้ จากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH1 ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจางอัตราส่วน 1:50 และ Lane 2 คือ ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจางอัตราส่วน 1:100

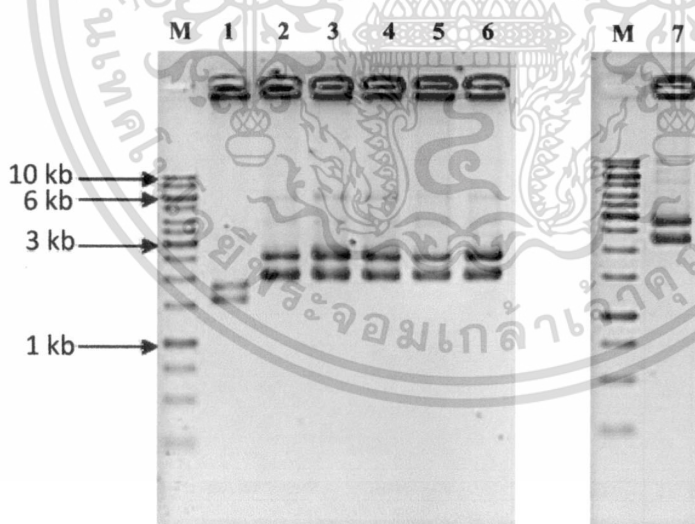


ภาพที่ 4.4 สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 และ 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดออกจากเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

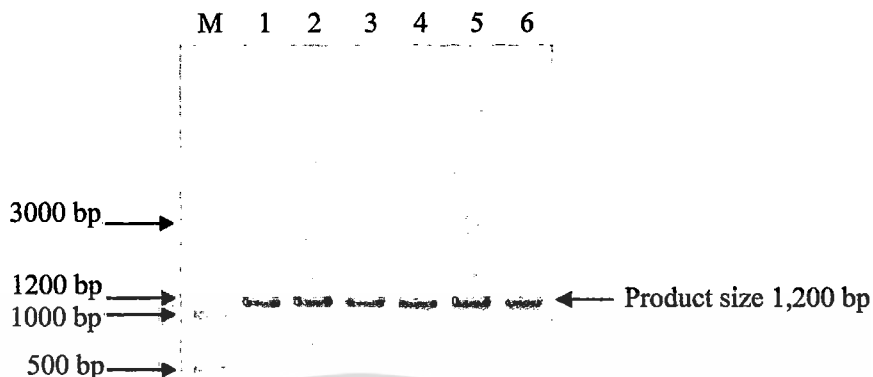
4.3.1.2 การถ่ายถอดชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสและการคัดเลือกโคลน

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส จากข้อ 4.3.1.1 พบว่ามีเฉพาะยีนเบต้ากลูโคซิเดส แฟมิลี 1 เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิต จึงได้นำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวมาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวก ก) แล้วนำพลาสมิดสายผสม ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) *E. coli* DH5 α จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าปรากฏโคโลนีขึ้นจำนวนมาก จึงได้ทำการคัดเลือกโคโลนี เป้าหมายด้วยเทคนิค blue/white screening โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามีการเชื่อมต่อระหว่างเวกเตอร์และชิ้นส่วนยีนได้สำเร็จ นำมาทำ master plate แล้วทำ size screening จากนั้นสุ่มเลือกโคลนทั้งหมดจำนวน 3 โคลนเพื่อมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis โดยแต่ละโคลนทำการสกัดพลาสมิดจำนวน 2 ซ้ำ ตั้งชื่อว่า Bglu1-1.1, Bglu1-1.2, Bglu1-2.1, Bglu1-2.2 และ Bglu1-3.1 กับ Bglu1-3.2 (ภาพที่ 4.5) จากการตรวจสอบโดยการนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเช็การเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนยีนและเวกเตอร์ แล้วนำปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% (ภาพที่ 4.6) พบว่าทุกโคลนมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 1,200 bp ซึ่งเป็นขนาดที่เราต้องการ จึงทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด แล้วจึงทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.5 ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas) , Lane 1 คือ negative control , Lane 2-7 คือ โคลน Bglu1-1.1, Bglu1-2.1, Bglu1-3.1 , Bglu1-1.2 , Bglu1-2.2 และ โคลน Bglu1-3.2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้พลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบและตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ โคลนBglu1-1.1, Lane 2 คือ โคลน Bglu1-2.1 , Lane 3 คือ โคลนBglu1-3.1 , Lane 4 คือ โคลนBglu1-1.2, Lane 5 คือ โคลน Bglu1-2.2 Lane 6 คือ โคลนBglu1-3.2

4.3.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

เมื่อตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH 1 ที่ได้แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยคัดเลือกจีโนมที่มีความเหมือนกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่า โคลน Bglu1-1 มีขนาด 1,178 คู่เบส (ภาพที่ 4.7) โคลน Bglu1-2 มีขนาด 1,190 คู่เบส (ภาพที่ 4.8) และโคลน Bglu1-3 มีขนาด 1,189 คู่เบส (ภาพที่ 4.9) ซึ่งโคลน Bglu1-2 นั้นพบว่ามีนิวคลีโอไทด์แทรกเกินมาภายในสาย 1 ตัว (จากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน Bglu1-2 และ Bglu1-3 ด้วยโปรแกรม ClustalW2 จะพบเบสที่เกินมาตำแหน่ง) จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในลำดับต่อไปได้ (ภาพที่ 4.10)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 ไปทำการแปลรหัสและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx พบว่า โคลน Bglu1-1 มีความเหมือน (identity) เมื่อเทียบกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่คัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 (ACI19973), *Halotheomothrix orenii* H 168 (ACL70277), *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 (ACK43071),

Clostridium thermocellum ATCC 27405 (ABN51453) และ *Clostridium thermocellum* JW20 (EFB38583) เท่ากับ 45%, 45%, 43%, 43% และ 43% ตามลำดับ ขณะที่โคลน Bglu1-3 มีค่าความเหมือน (identity) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่คัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Sorangium cellulosum* 'So ce 56' (CAN97832), *Clostridium hathewayi* DSM 13479 (ZP_06116016), *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 (EDM89208), *Cellulosilyticum ruminicola* (ACZ98664) และ *Eubacterium eligens* ATCC 27750 (ACR73677) เท่ากับ 45%, 43%, 39%, 40% และ 40% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

Gene	Accession	Description	Identities
Bglu1-1	YP_00225150.1	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12	45%
	YP_002509272.1	<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	45%
	YP_002353685.1	<i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724	43%
	YP_001036646.1	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	43%
	EFB38583	<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	43%
Bglu1-3	YP_001618312.1	<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'	45%
	ZP_06116016	<i>Clostridium hathewayi</i> DSM 13479	43%
	WP_005428189.1	<i>Ruminococcus obeum</i> ATCC 29174	39%
	ACZ98664	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	40%
	YP_002935811.1	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750	40%

Bglu1-1 **ACGGCGCCGTATCAGATTGAGGGCGCCCTCACGACGACGGCAGAGGGCAGACCATCTGG** 60
T A A Y Q I E G G A H D D G R G D S I W

Bglu1-1 **GACGTTTTCCGCCAAAACGGGCAAAATAAATAACGGAACACGCCGGAGAAAGCGTGC** 120
D V F A A K P G K I N N G N T P E K A C

Bglu1-1 **GACAGCTATCACAGATTTGACAGACACTTACAAAATCTTAAATTACGGCCGTCAACGGC** 180
D S Y H R F D R D L Q N L K F T G V N G

Bglu1-1 **TACCGTATGTCGATATCGTGGTCGCCGTGATGCCGAGGGCAAAAGCCGCCCTCAATCAG** 240
Y R M S I S W S R V M P E G K G A L N Q

Bglu1-1 **GCGGAGTTGACTATTACAAGCGTTGTTTTGACGCCGTGCTCGAGGCGGGCATAAAGCCG** 300
A G V D Y Y K R C F D A L L E A G I K P

Bglu1-1 **AACGTGACGCTTTATCACTGGGATCTGCCGAGGCCGTTGAGGATAAAAACGGCTGGGTG** 360
N V T L Y H W D L P Q A L E D K N G W V

Bglu1-1 **AACAGAGATACGATCAAAATATTTGCCGAATACGCCGATAAAATGTTTTCGCTGTACGGC** 420
N R D T I K Y F A E Y A D K M F S L Y G

Bglu1-1 **GATATAATACCGCTCTGGTCAACGATAAACGAGCCGATCGCGACGTACGTCCGCTACCGG** 480
D I I P L W S T I N E P I A T Y V G Y A

Bglu1-1 **TTAGGCGGTTTTGCCCGGGCAGAACAAACGAAAAAGGGCAATCAGGCCGCCACAAC** 540
L G G F A E G R T N E K E G N Q A R H N

Bglu1-1 **ATACTCGTCGCACACGGCGGGCGTTGACGGCTTCGGCGCTCGGGCGCAAAAGCCGAT** 600
I L V A H S A A V D A F R A S C A K G D

Bglu1-1 **ATCGGCATAGTTATTGATATCTGGAAGCGTCACGCTCTGCGGCACACGGAGGAGATATA** 660
I G I V L D I W K R H A L R D T E E E D I

Bglu1-1 **GCCATAATGATCGACCAGGATGAGCGCAACTGGAAAATTACACCGATCCCGTACTCGCC** 720
A I M I D Q D E R N W K F Y T D P V L G

Bglu1-1 **GGCAGATACAGCGATTATCTGCTCTCGCACCTCGCCTCGGAAGGCACTCTCATGGATATT** 780
G R Y S D Y L L S H L A S E G T L M D I

Bglu1-1 **TACCGCGCCACCTTGCCTCACCGACCCCGGATAGATTTCTACGGGTTAAACGTTTAT** 840
Y D S D L E L T H R P I D F Y G L N V Y

Bglu1-1 **AACCGCGTTCCCGTGACGGCTGACAAAAACACGGAAAGCGGATTTCTCGCAGGGCGGCAA** 900
N R V F V T A D K K D G S G F L A G R Q

Bglu1-1 **TTTCTTAAACAATAAAACCGAATATTATCCCAAAGCGATATACGACCGATACATCTGGT** 960
F L K Q * N R I L S Q G D I R R D T S G

Bglu1-1 **GCACGATTTATATAAACTGCAGATACCGATATATATCACAGAAAACGGCACGTTTTTCAT** 1020
A R F I * T A D T D I Y H R K R H V F H

Bglu1-1 **AGGCAAAAAAAAAGCCCGCACCCGACGGCATGATACGACGACGACAGGATAAAGTATA** 1080
R R K K S A D P T A * * Q T T T G * S I

Bglu1-1 **TCTCCGGAATCTTATCGTGGCTTGAAGAAGCTATCGACGAGGGCTTTGACGTCCGCGCT** 1140
S P D S Y R G L K R L S T R A L T C A A

Bglu1-1 **ATTTTCTGTGGAGCCTCATGGACAACTTTGAAATGGGCA** 1178
I F C G A S W T T L N G

ภาพที่ 4.7 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu

1-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bglu1-2 **ACGGCCGCGTACCAAATCGAGGGCCGCGTGGAACGAGGATGGAAAAAGCCCCAGCATTTGG** 60
 T A A Y Q I E G A W N E D G K G P S I W

Bglu1-2 **GACGATTTCTGCCATGACGCAAGCGCCGCGCACATCAAGCACGGCGACACCCGGCGACATT** 120
 D D F C H D A S A A H I K H G D T G D I

Bglu1-2 **GCCTGCCACAGCTATCACCCGCCGGGGGAGGATGTGCCGCTCATGAAGGAGCACCATATT** 180
 A C D S Y H R R R E D V A L M K E H H I

Bglu1-2 **CAGCGCTACCGTTTTTCCATCAGTTGCCCCCGTGTGATTCCGGAGGGCGTGGGACGGGTC** 240
 Q A Y R F S I S W P R V I P E G V G A V

Bglu1-2 **AACGAAAAAGGCCCTGCGGTTCTACCGACGACTTGGTGAATGAAGTGGTGAATAACGGCATT** 300
 N E K G L R F Y D D L V N E L L K N G I

Bglu1-2 **GAGCCTTTAATCACTCTCTATCACTGGGACCTGCCACGCGCTTTGCAAGCCAAAGGGCGGA** 360
 E P L I T L Y H W D L P S A L Q A K G G

Bglu1-2 **TGGCAGAACCCGCAAAATCGAAAGCTGGTTTGAAGCCTACGCCCGGTCATCGCCGCCCGC** 420
 W Q N P E I E S W F E A Y A R V I A A R

Bglu1-2 **TTCAAAGGCCCGGTAAAGAAATACATGACCATCAACGAACCCCAAGTGGGTCACCTGCCTG** 480
 F K G R V K K Y M T I N E P Q C V T C L

Bglu1-2 **GGTTATGCCATGGCCCTCCACGCCCCCGGGCTAAAAACGGACGAGGAAGGCATGGCCCGC** 540
 G Y G M G L H A P G V K T D E E G M A R

Bglu1-2 **ATTTTCCATCATATCTGCTGTGCCACAGCGCCGCTCAGCGGGCCATCAAGGAAATCGCC** 600
 I F H H I C L C H S A A Q R A I K E I A

Bglu1-2 **GGCCCGGACGCCAGGTGGGATCGTGCCTGCGCAAGCTCTGCTTTCCGGATAAGGAT** 660
 G P D A Q V G I V P C G K L C F P D K D

Bglu1-2 **ACCTCAGAAAAACGGGAAGCCGCTATCAGGCCACGTTCTCCCTCAAAAGAAAGATGGATG** 720
 T S E N R E A A Y Q A T F S L K E R W M

Bglu1-2 **TTCCGCCACAATATCGTGTGGACAGCCTGATTTTACGCCGGTATGAGGACAGCGCACCG** 780
 F A H N I V L D S L I L R R Y E D S A P

Bglu1-2 **GAGCCGTCAAACCTTCCGCAAAAAGATTCCCGCCAGCGAATGGGACGGATGGAGAAAG** 840
 E A V K R F A K T I P A S E W E R M E K

Bglu1-2 **CCGCAATTTATCGCGTCAACGTGTATCGGGGACAGAAAGTGGATGAAAACGGCCAGCCG** 900
 P D F I G V N V Y R G Q K V D E N G Q P

Bglu1-2 **GTGAAGCTGCCCGTGGGTACCCCATGGCCGCTTTCAAATGGGAAATCACCCCGGAGGTG** 960
 V K L P V G Y P M A A E K W E I T P E V

Bglu1-2 **ATGCCCTACGGCCGCTGAATCTGTATAAGCGGTATCATATCCCCCTCTATATTTGGAA** 1020
 M R Y G P L N L Y K R Y H I P L Y I S E

Bglu1-2 **AACGGCCTGTCCTGCAGCGAGTGGTATCCCTGGGACGGGAGGTGCACGATCCCAACCG** 1080
 N G L S C S D V V S L G R A G A R S Q P

Bglu1-2 **CATCGATTTTCTGCACCGTATTTGAGGGAGCTTCCAAAGCTATTCAAGGAGGAGCGGA** 1140
 H R F P A P V F E G A C Q G Y S G G S G

Bglu1-2 **CGTCCGGGCTATATGCACTGGAGCTTCATGGATAAATTCCAGTGGGCA** 1189
 R A G L Y A V E L H G * L R V G

ภาพที่ 4.8 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu

1-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bglu1-3 ACGGCCCGCTACCAAAATCGAGGGCGCGTGAACGAGGATGGAAAAGGCCCCAGCATTGG 60
T A A Y Q I E G A W N E D G K G P S I W

Bglu1-3 GACGATTTCTGCCATGACGCAAGCGCCCGGCACATCAAGCACGGCGACACCGGCGACATT 120
D D F C H D A S A A H I K H G D T G D I

Bglu1-3 GCCTGCGACAGCTATCACCGCCGCGGGAGGATGTGGCGCTCATGAAGGAGCACCATATT 180
A C D S Y H R R R E D V A L M K E H H I

Bglu1-3 CAGGCGTACCGTTTTTCCATCAGTTGGCCCCGTGTGATTCCGGAGGGCGTGGGAGCGGTC 240
Q A Y R F S I S W P R V I P E G V G A V

Bglu1-3 AACGAAAAGGGCCTGCGGTTCTACGACGACTTGGTGAATGAACGCTGAAAAACGGCATT 300
N E K G L R F Y D D L V N E L L K N G I

Bglu1-3 GAGCCTTTAATCACTCTCTATCACTGGGACCTGCCAGCGCTTTTGCAGGCCAAGGGCGGA 360
E P L I T L Y H W D L P S A L Q A K G G

Bglu1-3 TGGCAAAACCCGAAATCGAAAGCTGGTTTGAAGCCTACGCCCGGTCATCGCCGCCCGC 420
W Q N P E I E S W F E A Y A R V I A A R

Bglu1-3 TTCAAAGGGCGGGTAAAGAAATACATGACCATCAACGAAACCCCACTGCGTCACCTGCCTG 480
F K G R V K K Y M T I N E P Q C V T C L

Bglu1-3 GGTATGCGCATGGCCCTCCACGCCCGCGGCTAAAAACGGACGGAAGGCATGGCCCGC 540
G Y G M G L H A P G V K T D E E G M A R

Bglu1-3 ATTTTCCATCATATCTGCTGTGCCACAGCGCCGCTCAGCGGGCCATCAAGGAAATCGCC 600
I F H H I C L C H S A A Q R A I K E I A

Bglu1-3 GGGCCGACGCCAGGTGGGATCGTCCCTCGGGCAAGCTCTGCTTTCCCGATAAGGAT 660
G P D A Q V G I V P C G K L C F P D K D

Bglu1-3 ACCTCAAAAAACGGGAGCCGCCATTCAGGCCACGTTCTCCCTCAAAAGAAAGATGGATG 720
T S E N R E A A Y Q A T F S L K E R W M

Bglu1-3 TTCGCCACAAATATCGTCTGGACAGCCTGATTTTACGCCGGTATGAGGACAGCCGACCG 780
F A H N I V L D S L I L R R Y E D S A P

Bglu1-3 GAGGCGGTGAAACGCTTCGCCAAAACGATTCGCCCGCAAGGATGGGAAACGGATGGAGAG 840
E A V K R F A K T I F A S E W E R M E K

Bglu1-3 CCGGATTTTATCGCCGTCACCGTGTATCGGGGACAGAGGTGGATGAAAAAGGCCAGCCG 900
P D F I G V N V Y R G Q K V D E N G Q P

Bglu1-3 GTGAAGCTGCCGTTGGCTACCCCATGCCCGTTTTCAATGGGAAATCACCCCGGAGGTG 960
V K L P V G Y P M A A F K W E I T P E V

Bglu1-3 ATGCGCTACGGCCGCTCAATCTGTATAAGGGTATCATATCCCCCTCATATTTTCGGAA 1020
M R Y G P L N L Y K R Y H I P L Y I S E

Bglu1-3 AACGGCCTGTCTTGCAGCGACGTGGTATCCCTGGACGGGCAAGGTGCACGATCCCAACCGC 1080
N G L S C S D V V S L D G Q V H D P N R

Bglu1-3 ATCGATTTCTGACCCGCTATTTGAGGGAGCTTGCCAAAGCTATTCAAGGAGGGAGCGGAC 1140
I D F L H R Y L R E L A K A I Q E G A D

Bglu1-3 GTGCGGGGCTATATGCACTGGAGCTTCATGGATAACTTCGAGTGGCA 1188
V R G Y M Q W S F M D N F E W A

ภาพที่ 4.9 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นส่วนโปรตีนเบต้ากลูโคซิเดสโคลน Bglu

1-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bglu1-2 **ACGCCCGCGTACCAAATCGAGGGCGCGTGGAACGAGGATGGAAAAAGCCCCAGCATTGG** 60
T A A Y Q I E G A W N E D G K G P S I W

Bglu1-3 **ACGCCCGCGTACCAAATCGAGGGCGCGTGGAACGAGGATGGAAAAAGCCCCAGCATTGG** 60
T A A Y Q I E G A W N E D G K G P S I W

Bglu1-2 **GACGATTTCTGCCATGACGCAAGCGCCGCCACATCAAGCACGGCGACACCGGCGACATT** 120
D D F C H D A S A A H I K H G D T G D I

Bglu1-3 **GACGATTTCTGCCATGACGCAAGCGCCGCCACATCAAGCACGGCGACACCGGCGACATT** 120
D D F C H D A S A A H I K H G D T G D I

Bglu1-2 **GCCTGCGACAGCTATCACCGCCGGCGGGAGGATGTGGCGTCATGAAGGAGCACCATATT** 180
A C D S Y H R R R E D V A L M K E H H I

Bglu1-3 **GCCTGCGACAGCTATCACCGCCGGCGGGAGGATGTGGCGTCATGAAGGAGCACCATATT** 180
A C D S Y H R R R E D V A L M K E H H I

Bglu1-2 **CAGCGGTACCGTTTTTCCATCAGTTGCCCCGTGTGTTCCGGAGGGCGTGGGAGCGGTC** 240
Q A Y R F S I S W P R V I P E G V G A V

Bglu1-3 **CAGCGGTACCGTTTTTCCATCAGTTGCCCCGTGTGTTCCGGAGGGCGTGGGAGCGGTC** 240
Q A Y R F S I S W P R V I P E G V G A V

Bglu1-2 **AACGAAAAGGGCCTCGCGTTCTACGACGACTTGGTGAATGAACGCTGAAAAACGGCATT** 300
N E K G L R F Y D D L V N E L L K N G I

Bglu1-3 **AACGAAAAGGGCCTCGCGTTCTACGACGACTTGGTGAATGAACGCTGAAAAACGGCATT** 300
N E K G L R F Y D D L V N E L L K N G I

Bglu1-2 **GAGCCTTTAATCACCTCTATCACTGGGACCTGCCACGGCTTTGCAGGCCAAGGGCGGA** 360
E P L I T L Y H W D L P S A L Q A K G G

Bglu1-3 **GAGCCTTTAATCACCTCTATCACTGGGACCTGCCACGGCTTTGCAGGCCAAGGGCGGA** 360
E P L I T L Y H W D L P S A L Q A K G G

Bglu1-2 **TGGCAGAACCCGGAATCGAAAGCTGGTTTGAAGCCTACGCCCGGGTCATCGCCGCCCGC** 420
W Q N P E T E S W F E A Y A R V I A A R

Bglu1-3 **TGGCAGAACCCGGAATCGAAAGCTGGTTTGAAGCCTACGCCCGGGTCATCGCCGCCCGC** 420
W Q N P E T E S W F E A Y A R V I A A R

Bglu1-2 **TTCAAAGGCCGGGTAAAAGAAATACATGACCATCAACGAACCCCAAGTGGTCACTGCCTG** 480
F K G R V K K Y M T I N E P Q C V T C L

Bglu1-3 **TTCAAAGGCCGGGTAAAAGAAATACATGACCATCAACGAACCCCAAGTGGTCACTGCCTG** 480
F K G R V K K Y M T I N E P Q C V T C L

Bglu1-2 **GGTTATGGCATGGCCCTCCACGCCCGCGGCTAAAAACGGACGGAAGGCATGGCCCGC** 540
G Y G M G L H A P G V K T D E E G M A R

Bglu1-3 **GGTTATGGCATGGCCCTCCACGCCCGCGGCTAAAAACGGACGGAAGGCATGGCCCGC** 540
G Y G M G L H A P G V K T D E E G M A R

Bglu1-2 **ATTTTCCATCATATCTGCCCTGTGCCACAGCGCCGCTCAGCGGGCCATCAAGGAAATCGCC** 600
I F H H I C L C H S A A Q R A I K E I A

Bglu1-3 **ATTTTCCATCATATCTGCCCTGTGCCACAGCGCCGCTCAGCGGGCCATCAAGGAAATCGCC** 600
I F H H I C L C H S A A Q R A I K E I A

Bglu1-2 **GGGCCGGACGCCAGGTGGGGATCGTCCCTCGGCCAAGCTCTGCTTTCCGGAATAAGGAT** 660
G P D A Q V G I V P C G K L C F P D K D

Bglu1-3 **GGGCCGGACGCCAGGTGGGGATCGTCCCTCGGCCAAGCTCTGCTTTCCGGAATAAGGAT** 660
G P D A Q V G I V P C G K L C F P D K D

Bglu1-2 **ACCTCAGAAAACCGGCAAGCCCGCTATCAGGCCACGTTCTCCCTCAAAAGAAATGGATG** 720
T S E N R E A A Y Q A T F S L K E R W M

Bglu1-3 **ACCTCAGAAAACCGGCAAGCCCGCTATCAGGCCACGTTCTCCCTCAAAAGAAATGGATG** 720
T S E N R E A A Y Q A T F S L K E R W M

ภาพที่ 4.10 การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโนของชิ้นเบ็ดำกดูโคซิเดสของโคลน Bglu1-2 กับโคลน Bglu1-3 พบว่ามีเบสที่เหมือนกัน 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1055

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bglu1-2 TTCCGCCACAATATCGTGCTGGACAGCCTGATTTTACGCCGGTATGAGGACAGCCACCG 780
 F A H N I V L D S L I L R R Y E D S A P

Bglu1-3 TTCCGCCACAATATCGTGCTGGACAGCCTGATTTTACGCCGGTATGAGGACAGCCACCG 780
 F A H N I V L D S L I L R R Y E D S A P

Bglu1-2 GAGGC GGTGAAACGCTTCGCCAAAACGATTCCC GCCAGCGAATGGGAACGGATGGAGAAG 840
 E A V K R F A K T I P A S E W E R M E K

Bglu1-3 GAGGC GGTGAAACGCTTCGCCAAAACGATTCCC GCCAGCGAATGGGAACGGATGGAGAAG 840
 E A V K R F A K T I P A S E W E R M E K

Bglu1-2 CCGCATTTTATCGGC GTCAACGTGTATCGGGACA GAAGGTGGATGAAAACGGCCAGCCG 900
 P D F I G V N V Y R G G Q K V D E N G Q P

Bglu1-3 CCGCATTTTATCGGC GTCAACGTGTATCGGGACA GAAGGTGGATGAAAACGGCCAGCCG 900
 P D F I G V N V Y R G Q K V D E N G Q P

Bglu1-2 GTGAAGCTGCCCGTGGGCTACCCCATGGCCGCTTTCAAATGGGAAATCACCCCGGAGGTG 960
 V K L P V G Y P M A A F K W E I T P E V

Bglu1-3 GTGAAGCTGCCCGTGGGCTACCCCATGGCCGCTTTCAAATGGGAAATCACCCCGGAGGTG 960
 V K L P V G Y P M A A F K W E I T P E V

Bglu1-2 ATGCGCTACGGGCGCGCTGAATCTGTATAAGCGGTATCATATCCCCCTCTATATTTCCGAA 1020
 M R Y G P L N L Y K R Y H I P L Y I S E

Bglu1-3 ATGCGCTACGGGCGCGCTGAATCTGTATAAGCGGTATCATATCCCCCTCTATATTTCCGAA 1020
 M R Y G P L N L Y K R Y H I P L Y I S E

Bglu1-2 AACGGCCTGTCCTGCAGCGACGTGGTATCCCTGGCAGGGCAGGTGCACGATCCCAACCG 1080
 N G L S C S D V V S L S R A G A R S Q P

Bglu1-3 AACGGCCTGTCCTGCAGCGACGTGGTATCCCTGGCAGGGCAGGTGCACGATCCCAACCG 1080
 N G L S C S D V V S L D G Q V H D P N R

Bglu1-2 CATCGATTTTCCTGCACCGGTATTTGAGGGAGCTTGCCAAAGCTATTCAGGAGGAGCGGA 1140
 H R E P A P F V F E G A C Q G Y S G G S G

Bglu1-3 CATCGATTTTCCTGCACCGGTATTTGAGGGAGCTTGCCAAAGCTATTCAGGAGGAGCGGAC 1140
 I D E L H R Y L R E L A K A I Q E G A D

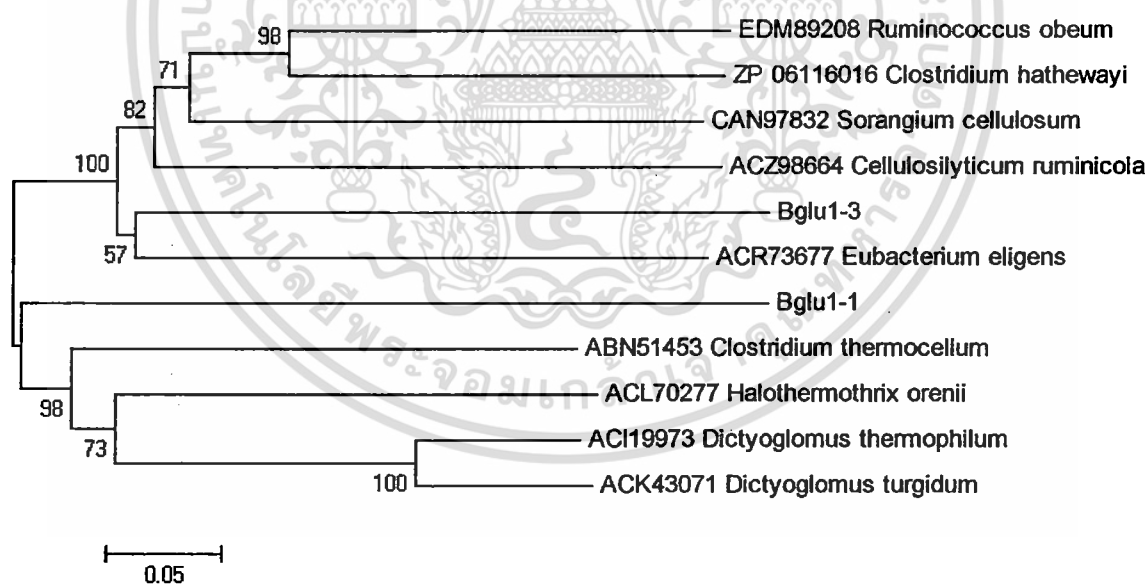
Bglu1-2 CGTGGGGGCTATATGCACTGCAGCTTCATGGATAACTTCGAGTGGCA 1189
 R A G L Y A V E L H G * L R V G

Bglu1-3 GTGGGGGCTATATGCACTGCAGCTTCATGGATAACTTCGAGTGGCA 1188
 V R G Y M Q W S F M D N F E W A

ภาพที่ 4.10 (ต่อ) การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโนของ
 ชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสของโคลน Bglu1-2 กับโคลน Bglu1-3 พบว่ามี
 เบสกวีนินแทรกเกินมา 1ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่1055 (ตำแหน่งที่
 ไฮไลต์สีเหลือง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

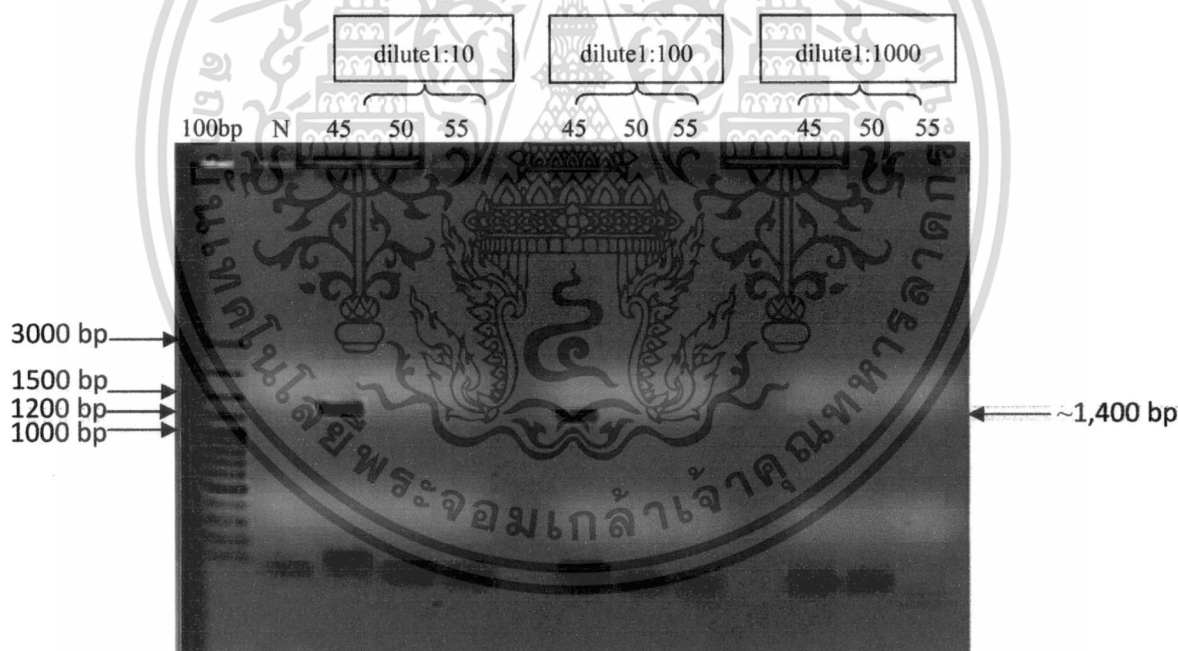
จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ข้างต้นด้วยโปรแกรม ClustalW2 และสร้างภาพด้วยโปรแกรม Bioedit ทำให้เห็นว่า โคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 มีตำแหน่งอนุรักษ์ (consensus region) ของกรดอะมิโนในกลุ่มของยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH 1 จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) คือ [LIVMFSTC] - [LIVFYS] - [LIV] - [LIVMST] - E - N - G - [LIVMFAR] - [CSAGN] จึงสามารถยืนยันได้ว่ายีน Bglu1-1 และ Bglu1-3 นั้นเป็นยีนใหม่ในกลุ่มเบต้ากลูโคซิเดส GH1 (ภาพที่ 4.12) และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของโคลน Bglu1-1 และโคลน Bglu1-3 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม MEGA4 และกำหนดให้ค่า bootstrap test เท่ากับ 1000 ผลการวิเคราะห์พบว่า โคลน Bglu1-1 และ โคลน Bglu1-3 แยกกันอยู่ในกลุ่มย่อย (subgroup) ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (ภาพที่ 4.11) โดยมีค่าความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 57-100% ตามค่าที่ปรากฏบนกิ่ง (branch) ของแผนภาพเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)



ภาพที่ 4.11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของโคลน Bglu1-1 และโคลน Bglu1-3 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม MEGA4 และกำหนดให้ค่า bootstrap test เท่ากับ 1000

4.3.2 ผลการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 ที่ได้มาจากวิธีเพาะเชื้อ (culture dependent)

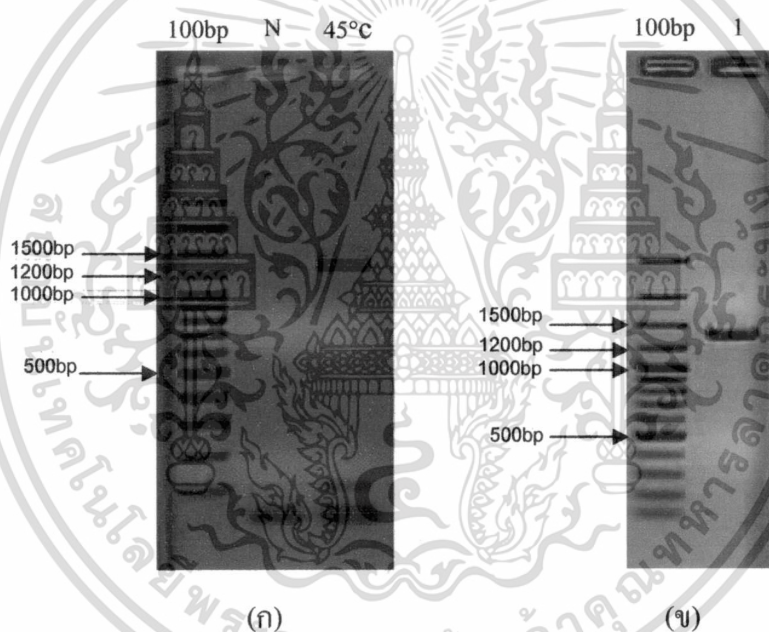
ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 (*Bacillus pumilus*) จากนั้นนำมาเจือจางให้เป็น serial dilution โดยกำหนดความเข้มข้นระหว่างดีเอ็นเอและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 1:10 , 1:100 และ 1:1,000 แล้วทำการหาอัตราการเจือจางของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ Bpum-bgl1/1F และ Bpum-bgl1/1R แล้วทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าจับระหว่างไพรเมอร์กับลำดับเบสคู่สม(annealing) โดยการลดอุณหภูมิเป็น 45 , 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าว มาตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.13) ผลปรากฏว่าในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ dilution 1:10 และ 1:100 ผลผลิตพีซีอาร์จะมีการเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด



ภาพที่ 4.13 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทดลองหาอัตราการเจือจาง (dilution) และ อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder โดย Lane N คือ negative control ซึ่งใช้ dH₂O แทนดีเอ็นเอต้นแบบ และ Lane 45 , 50 และ 55 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 45 ,50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

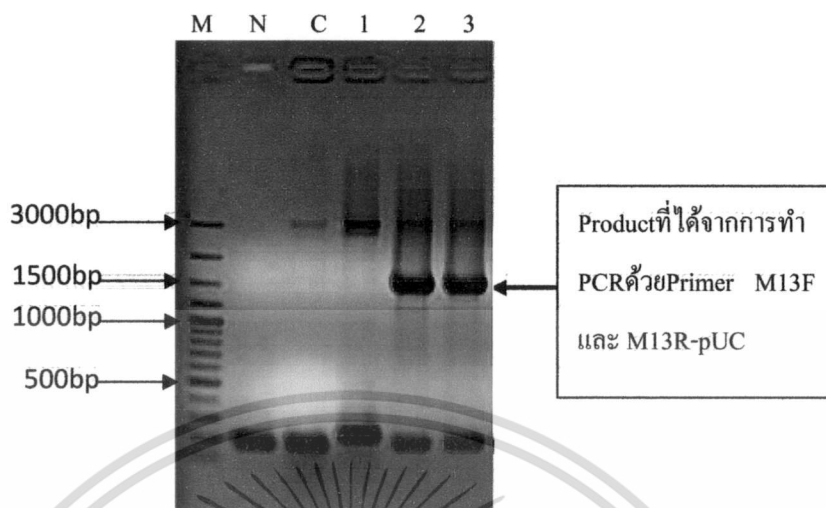
จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอีกครั้ง โดยใช้ DNA dilution 1:10 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในขั้นตอน annealing เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตให้เพียงพอในการนำไปโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ (ภาพที่ 4.14 ก) แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.14 ข) จากนั้นโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายจำนวน 3 โคลนเพื่อมาทำ master plate ด้วยวิธี blue/white screening จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC แล้วนำมาตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจล 1.0% (ภาพที่ 4.15) ทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base , Malaysia)



ภาพที่ 4.14

ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วทำให้บริสุทธิ์ (ก) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้อุณหภูมิและอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ DNA dilution 1:10 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในขั้นตอน annealing เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder ซึ่ง Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ dH₂O แทนดีเอ็นเอแม่แบบ) (ข) การสกัดดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ก) ให้บริสุทธิ์ นำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder ซึ่ง Lane 1 คือ ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ทำการสกัดให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ dH_2O แทนดีเอ็นเอแม่แบบ) , Lane C คือ pTZ57R/T (w/o) control , Lane 1-3คือ ลำดับของโคลนในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

จากภาพผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายพบว่ามีเฉพาะ โคลนที่ 2 และ 3 ที่พบการสอดแทรกของยีนเป้าหมาย จึงได้สุ่มเลือกโคลนที่ 2 มาทำการสกัดพลาสมิดและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไม่ได้มีความเหมือนกับยีนในกลุ่มของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส แต่มีความเหมือนกับ DNA-formamido pyrimidine glycosylase [*Rothia mucilaginosa* ATCC 25296] 33/58 (57%) , hypothetical protein HMPREF0737_00808 [*Rothia mucilaginosa* M508] 33/58 (57%) และ DNA glycosylase [*Arthrobacter* sp. Rue61a] 31/55 (56%) จึงได้ยุติการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 (*Bacillus pumilus*) ไว้แต่เพียงเท่านี้

4.4 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี Genome walking

4.4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยเทคนิค semi-random , two stepped PCR (ST-PCR)

จากขั้นตอนที่ผ่านมา (ข้อ 4.3.1) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส พบว่าจากการเปรียบเทียบข้อมูลยีนที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสมาจำนวน 2 เส้น คือ โคลน Bglu1-1 และ โคลน Bglu1-3 ซึ่งจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนทั้ง 2 มาทำการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ ในเบื้องต้นจะใช้เทคนิค semi-random หรือเรียกอีกอย่างว่า two stepped PCR (ST-PCR) โดยเริ่มทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต่อบริเวณ 5'upstream ก่อน โดยการออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ GSP1 และ GSP2 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน (partial gene) ทำเช่นเดียวกันทั้ง 2 ยีน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก (primary PCR) ด้วยไพรเมอร์ GSP1 คู่กับ ไพรเมอร์ ST1, BMP1 และ BMP2 แล้วทำการเพิ่มความจำเพาะขึ้นด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในรอบที่สอง (nested PCR) โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในรอบแรกมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) และใช้ไพรเมอร์ GSP2 คู่กับไพรเมอร์ ST2 จากนั้นจึงทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์และทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) แล้วทำการคัดเลือกโคลนเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจากการทดลองหาส่วนต่อบริเวณ 5'upstream ด้วยเทคนิค semi-random นี้ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับยีนเบต้ากลูโคซิเดส ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีการทดลอง มาใช้เทคนิค GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA)

4.4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์

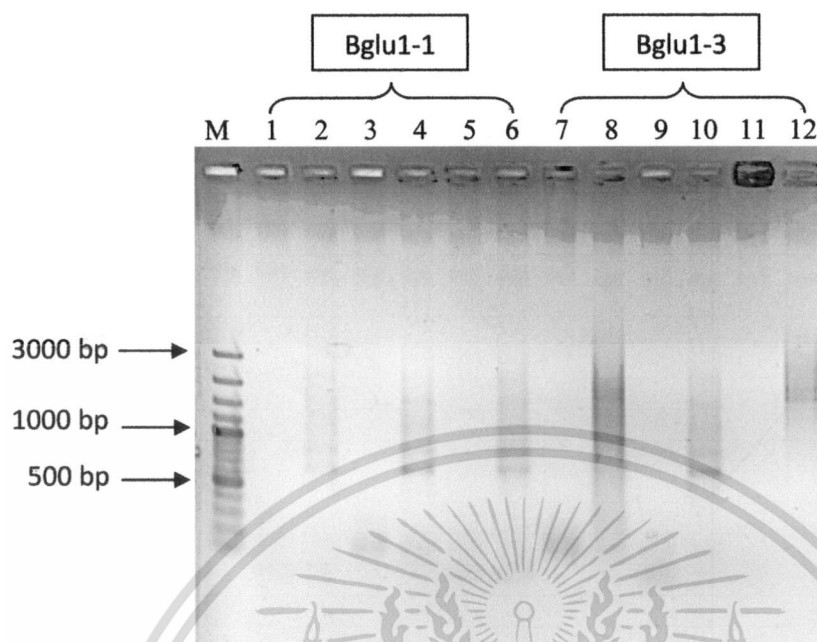
ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 กับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx (Altschul *et al.*, 1990) เข้าถึงทางอินเทอร์เน็ตได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> สุ่มเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนฐานข้อมูล เพื่อนำมาออกแบบ specific primer เพื่อหาส่วนต่อจากชิ้นส่วนยีนที่ได้ โดยทำการออกแบบ reverse primer จากปลายทางด้าน 5' (upstream) ของชิ้นส่วนยีนที่เป็นต้นแบบ ซึ่งออกแบบมา 2 ไพรเมอร์ที่ชื่อว่า Bglu1_1up1(GSP1), Bglu1_1up2(GSP2) และ Bglu1_3up1 (GSP1) กับ Bglu1_3up2(GSP2)

ตารางที่ 4.2 การจับคู่ไพรเมอร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

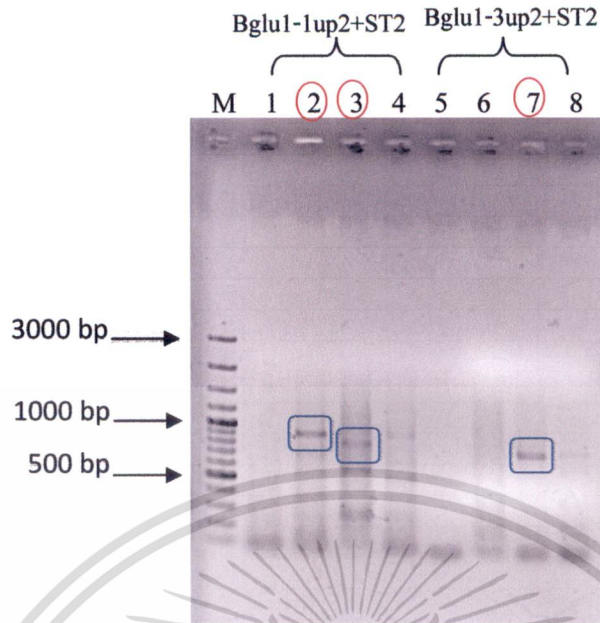
Primary PCR (GSP1 + semi-random primer)	Secondary PCR (GSP2 + nested primer)
Bglu1-1up1 + ST1	
Bglu1-1up1 + BMP1	Bglu1-1up2 + ST2
Bglu1-1up1 + BMP2	
Bglu1-3up1 + ST1	
Bglu1-3up1 + BMP1	Bglu1-3up2 + ST2
Bglu1-3up1 + BMP2	

4.4.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-random , two stepped PCR (ST-PCR)

ในการทำ primary PCR จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ 200 ng เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์ GSP1 คู่กับ semi-random primer (ST1, BMP1 และ BMP2) จากการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรส 1.0% พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลายขนาด (ภาพที่ 4.16) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ของทุกปฏิกิริยาใน primary PCR มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ secondary PCR (nested PCR) ด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่าของความเข้มข้นเริ่มแรก โดยในรอบนี้จะใช้ไพรเมอร์ GSP2 คู่กับไพรเมอร์ ST2 (nested primer) นำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตในเจลอะกาโรส 1.0 % (ภาพที่ 4.17) พบว่าในยีน Bglu1-1 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏใน 2 ปฏิกิริยา คือ ในปฏิกิริยาที่ใช้ไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + ST1 มีขนาดประมาณ 900 bp , Bglu1-1up1 + BMP1 มีขนาดประมาณ 800 bp ในขณะที่ยีน Bglu1-3 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏในปฏิกิริยาที่ใช้ไพรเมอร์ Bglu1-3up1 + BMP1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 bp จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ให้บริสุทธิ์



ภาพที่ 4.16 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา primary PCR ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่ง Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), Lane 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + ST1, Lane 4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + BMP1, Lane 6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + BMP2, Lane 8 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-3up1 + ST1, Lane 10 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-3up1 + BMP1 และ Lane 12 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bglu1-3up1 + BMP2



ภาพที่ 4.17 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา secondary PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% โดยใช้ primary PCR เจือจาง 1:50 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งตัวเลขที่วงกลมไว้คือ ปฏิกิริยาที่ได้คัดเลือกเพื่อนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ แล้วทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ต่อไป โดย Lane M คือ 100 bp Plus DNA ladder, Lane 1 และ 5 คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-1up1 + ST1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ, Lane 3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-1up1 + BMP1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ, Lane 4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-1up1 + BMP2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ, Lane 6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-3up1 + ST1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ, Lane 7 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-3up1 + BMP1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Lane 8 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ปฏิกิริยา Bglu1-3up1 + BMP2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

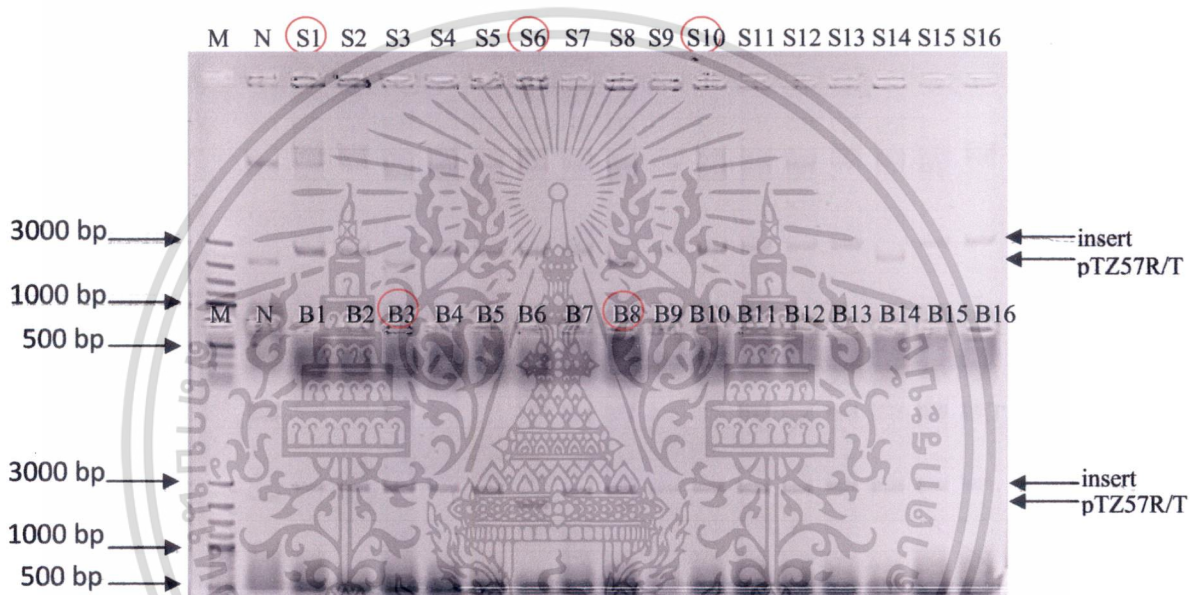
4.4.1.3 การตรวจสอบและการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ไทป์

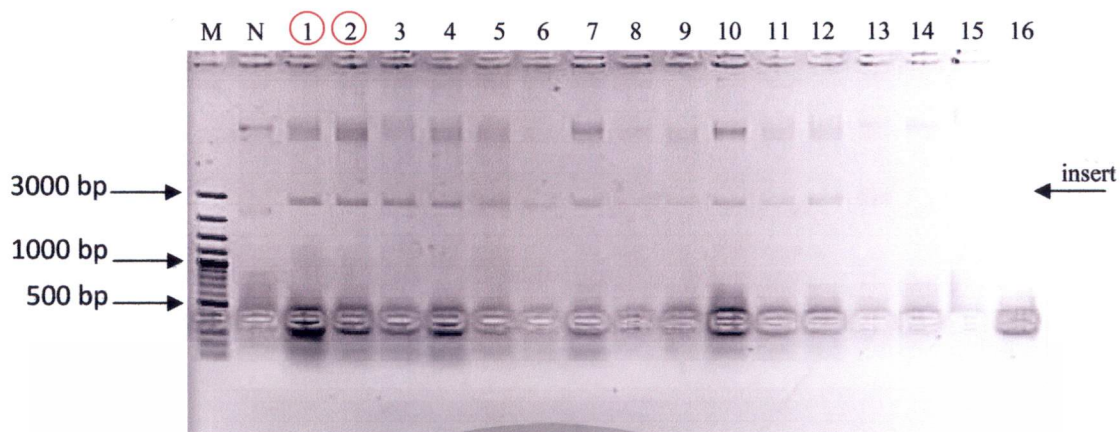
เมื่อทำการสกัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้คัดเลือกไว้จากข้อ 4.4.1.2 ให้บริสุทธิ์แล้วจากนั้นนำมาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกของชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี blue/white screening พบว่ามีโคโลนีเป้าหมายจำนวนมาก จึงทำการสุ่มเก็บโคโลนีดังกล่าวมาทำเป็น master plate แล้วทำการคัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

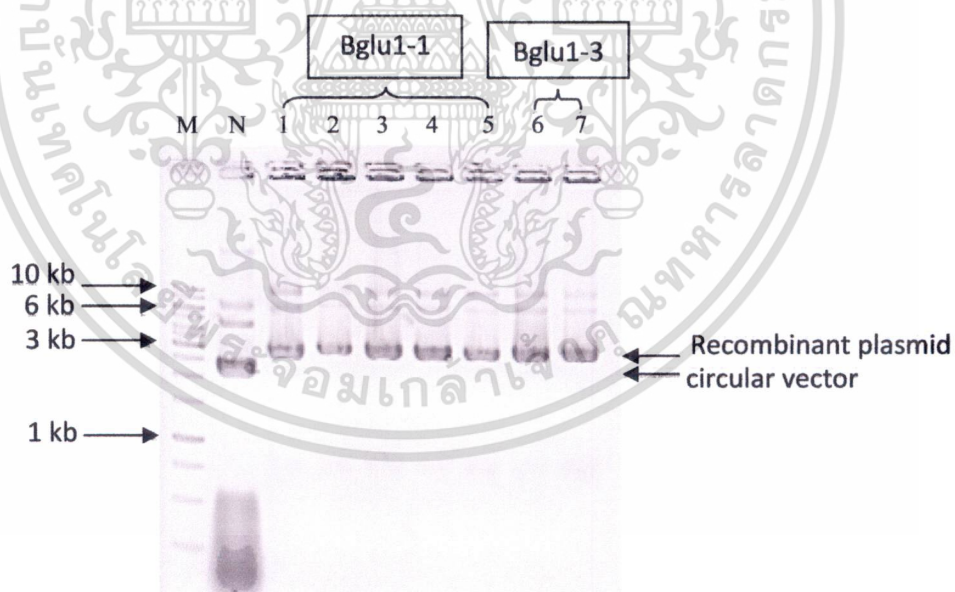
เบื้องต้นด้วยวิธี size screening (ภาพที่ 4.18 และ 4.19) พบว่าทั้ง Bglu1-1 และ Bglu1-3 มีโคลนจำนวนมากที่เกิดการแทรกของยีน จึงได้สุ่มคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีการแทรกของยีนมาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (ภาพที่ 4.20) แล้วจึงตัดด้วยเอนไซม์ BamHI และ EcoRI ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% (ภาพที่ 4.21) พบว่าในยีน Bglu1-1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp จำนวน 3 โคลน และยีน Bglu1-3 จำนวน 2 โคลน จึงได้คัดเลือกยีนละ 1 โคลน เพื่อทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.18 การตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-1 ด้วยวิธี size screening พบว่ามีโคลนจำนวนมากที่มีการแทรกของชิ้นส่วนยีน โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), Lane N คือ circular vector (w/o control), Lane S1-S16 คือ ลำดับของโคลนที่ใช้ไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + ST1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Lane B1-B16 คือ ลำดับของโคลนที่ใช้ไพรเมอร์ Bglu1-1up1 + BMP1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ คัดเลือกโคลนที่ทำสัญลักษณ์วงกลมไว้มาทำการสกัดพลาสมิด

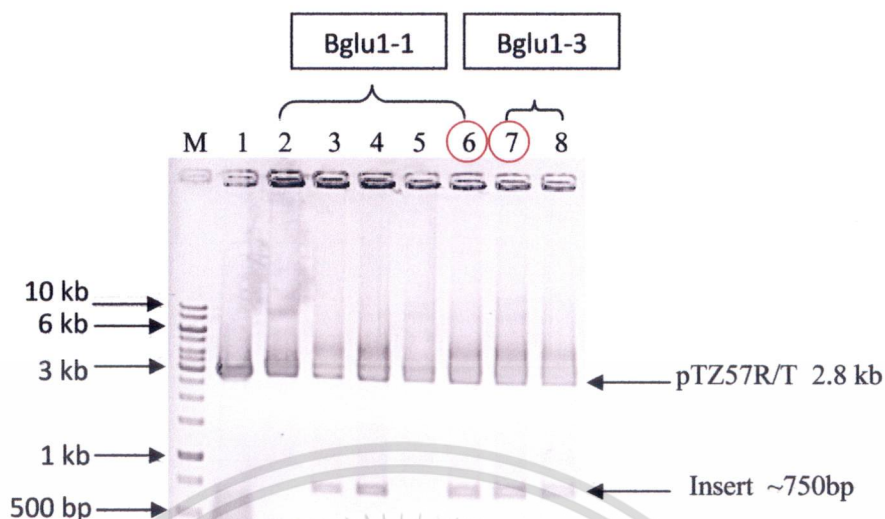


ภาพที่ 4.19 การตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ด้วยวิธี size screening พบว่าโคลนจำนวนมากมีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) , Lane N คือ circular vector (w/o control) และ Lane 1-16 คือ ลำดับของโคลนที่ทำการตรวจสอบ เลือกโคลนที่ทำสัญลักษณ์วงกลมไว้มาทำการสกัดพลาสมิด



ภาพที่ 4.20 ผลการนำโคลนที่ได้คัดเลือกไว้จากการทำ size screening มาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas) , Lane N คือ circular vector (w/o control) และ Lane 1-7 คือลำดับของโคลนที่คัดเลือกมาสกัดพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% ซึ่ง Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder (100 ng) , Lane 1 คือ เวกเตอร์ pTZ57R/T ที่ไม่มีการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนยีน , Lane 2-6 คือ พลาสมิดลูกผสมของยีน *Bglu1-1* และ Lane 7-8 คือ พลาสมิดลูกผสมของยีน *Bglu1-3* ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้วงกลมตัวเลขไว้เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

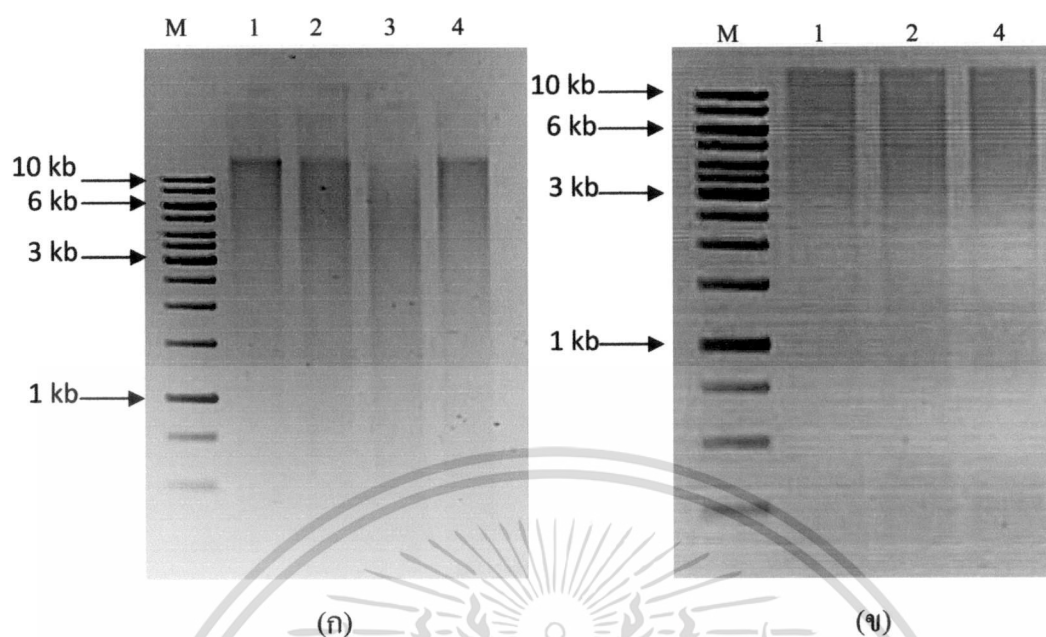
หลังจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 โคลน ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนเบต้ากลูโคซิเดสในฐานข้อมูล และไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน *Bglu1-1* และโคลน *Bglu1-3* ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งพบว่าโคลนของยีน *Bglu1-1* มีความเหมือน(identity) กับ *Zea perennis* genomic DNA containing putative promoter and 5' UTR region of *mads19* gene, allele *Perennis* (HE657295.1) เท่ากับ 100% และโคลนของยีน *Bglu1-3* มีความเหมือน(identity) กับ Cloning vector pDN19, complete sequence (AF327711.1) เท่ากับ 99% ดังนั้นการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสด้วยวิธี semi-random หรือ two stepped PCR (ST-PCR) จึงยุติลงเพียงเท่านี้ จากนั้นจะทำการค้นหายีนที่สมบูรณ์โดยใช้ GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA) ในลำดับต่อไป

4.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (genome walking) โดยใช้ GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA)

เริ่มจากนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อสร้างเป็นไลบรารีดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ GenomeWalker Adaptor แล้วทำการเพิ่มขยายส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptor (AP1 และ AP2) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายของยีนที่เราทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง adaptor และส่วนของยีนที่เราทราบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นแล้ว ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอใดที่ไม่มียีนนั้นอยู่จะมีการสร้างเป็นรูปแบบที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (suppressed PCR)

4.4.2.1 ผลการเตรียมเมทาจีโนมิกไลบรารี

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI* , *EcoRV* , *PvuII* และ *StuI* แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 0.8 % อะกาโรสเจล (ภาพที่ 4.22 ก) พบว่าลักษณะดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* มีลักษณะเป็นปื้น (smear) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอถูกตัดให้มีขนาดแตกต่างกันหลายขนาดและหลายชิ้นส่วน ซึ่งเป็นไปตามที่ต้องการ จึงหยุดปฏิกิริยาการตัดของเอนไซม์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แต่ในขณะเดียวกัน จีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* , *EcoRV* และ *StuI* ยังปรากฏลักษณะมีแถบเข้มที่ด้านบน จึงทำการตัดเอนไซม์ต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 0.8 % เจลอะกาโรส (ภาพที่ 4.22 ข) พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะเป็นปื้นมากขึ้น



ภาพที่ 4.22 ผลการเตรียมไลบรารีดีเอ็นเอจากเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) , Lane 1-4 คือ ลำดับของเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* , *EcoRV* , *PvuII* และ *SstI* ตามลำดับ
(ก) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* , *EcoRV* , *PvuII* และ *SstI* ที่บ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง
(ข) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* , *EcoRV* และ *SstI* ที่บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

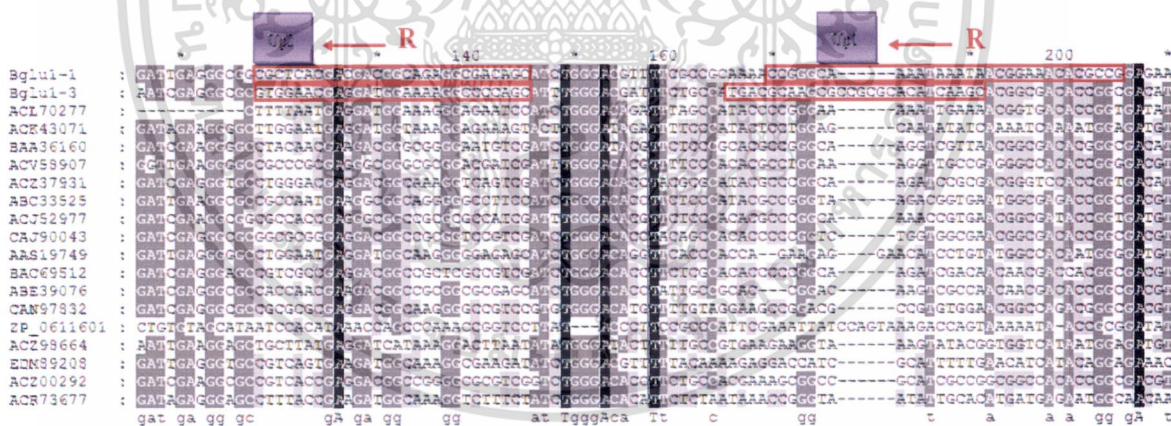
4.4.2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนด้าน 5'upstream

4.4.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ใช้ไพรเมอร์ GSP1 และ GSP2 (gene-specific primers) ที่ออกแบบไว้จากข้อ 4.4.1.1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนด้วย GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA) ตั้งแต่ต้นมาใช้คู่กับไพรเมอร์ AP1 และ AP2 (adaptor primer) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ของโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลยีนในกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) ได้แก่ *Halothermothrix orenii* H 168 (ACL70277) , *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 (ACK43071) , *Bacillus* sp. (BAA36160) , *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* DSM 446 (ACV58907) , *Sphaerobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

thermophilus DSM 20745 (ACZ37931) , *Hahella chejuensis* KCTC 2396 (ABC33525) , *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 = JCM 1222 (ACJ52977) , *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (CAJ90043) , thermostable beta-glucosidase [synthetic construct].(AAS19749) , *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (BAC69512) , *Rhodopseudomonas palustris* BisB5 (ABE39076) , *Sorangium cellulosum* So ce56 (CAN97832) , *Clostridium hathewayi* DSM13479 (ZP_06116016) , *Cellulosilyticum ruminicola* (ACZ98664) , *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 (EDM89208) , *Thermomonospora curvata* DSM 43183 (ACZ00292) , *Eubacterium eligens* ATCC 27750 (ACR73677) ซึ่งได้เป็น Bglu1_1up1 : 5' CGGCGTGTTCGGTTATTTATTTGCCCCG 3' กับ Bglu1_1up2 : 5' GCTGTCGCCTCTG CCGTCGTCGTGAGCG 3' เป็น GSP1 และ GSP2 ของโคลน Bglu1-1 ตามลำดับ และ Bglu1_3up1 : 5' GCTTGATGTGCGCGGCGCTTGCGTCA 3' กับ Bglu1_3up2 : 5' GCTGGGG CCTTTTCCATCCTCGTTCCAC 3' เป็น GSP1 และ GSP2 ของโคลน Bglu1-3 ตามลำดับ



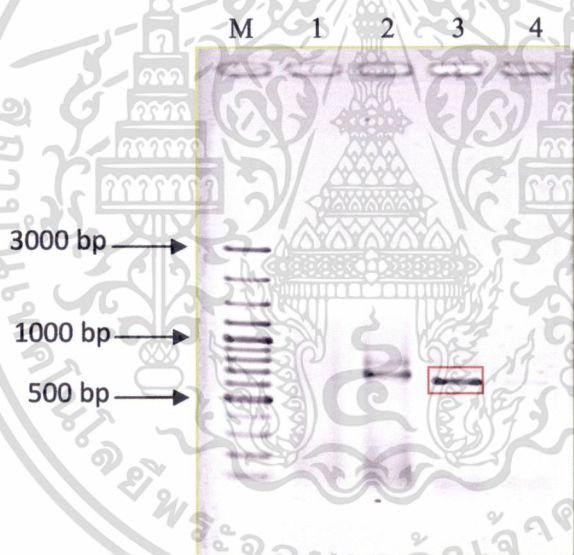
ภาพที่ 4.23 การออกแบบ reverseไพรเมอร์ด้าน 5' upstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-1 และโคลน Bglu1-3 (ภาคผนวก ข)

4.4.2.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

หลังจากสร้างเป็นไลบรารีดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับ GenomeWalker Adaptor แล้ว ทำการเพิ่มขยายส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่ง

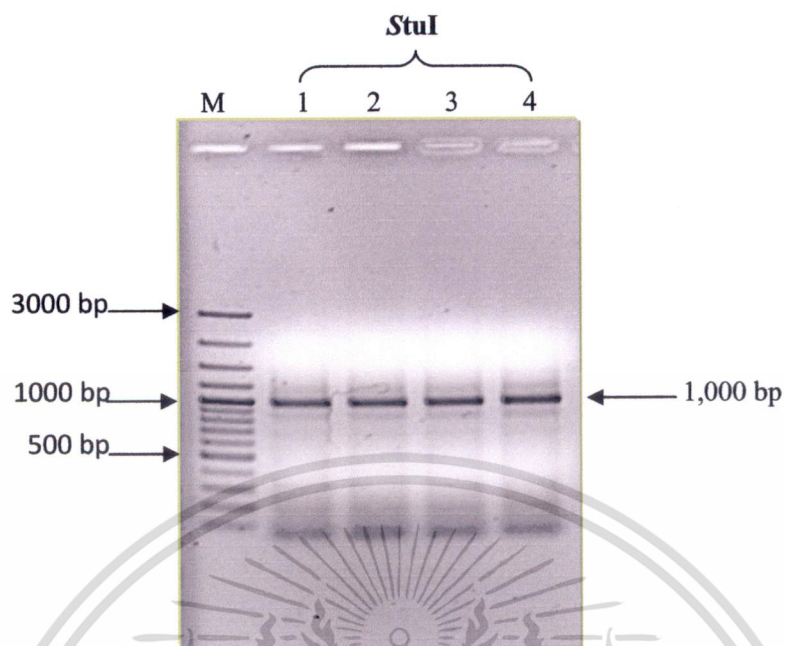
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

primary PCR จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptor (AP1) คู่กับ ไพรเมอร์ GSP1 ได้แก่ ไพรเมอร์ Bglu1-1up1 สำหรับยีนBglu1-1 และใช้ไพรเมอร์ AP1 คู่กับไพรเมอร์ Bglu1-3up1 สำหรับยีน Bglu1-3 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยา primary PCR มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา secondary PCR (nested PCR) ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptor (AP2) คู่กับ ไพรเมอร์ GSP2 ได้แก่ ไพรเมอร์ Bglu1-1up2 สำหรับยีนBglu1-1 และใช้ไพรเมอร์ AP2 คู่กับไพรเมอร์ Bglu1-3up2 สำหรับยีน Bglu1-3 ซึ่งการทำ secondary PCR จะทำให้เราได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น จากการทดลองในยีน Bglu1-1 เมื่อทำ secondary PCR แล้วพบแถบดีเอ็นเอผลผลิตอยู่หลายแถบ แต่ได้เลือกโลบารีที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ชัด (ภาพที่ 4.24) ในขณะที่ยีน Bglu1-3 พบแถบดีเอ็นเอผลผลิตเพียงโลบารีเดียวคือ โลบารี *StuI* เท่านั้น (ภาพที่ 4.25)



ภาพที่ 4.24 ผลผลิตพีซีอาร์ของ Bglu1-1 จากปฏิกิริยา secondary PCR โดยใช้ผลผลิตจาก primary PCR เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0 % โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp Plus DNA ladder, Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากโลบารี *DraI*, Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากโลบารี *EcoRV*, Lane 3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากโลบารี *PvuII*, Lane 4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากโลบารี *StuI* ซึ่งจะเลือกโลบารี *PvuII* เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอผลผลิตชัดเจนนที่สุด (~650 bp)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



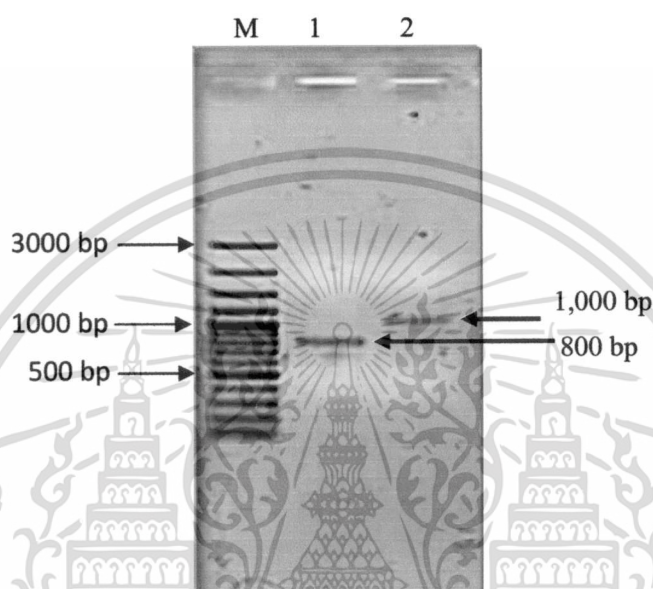
ภาพที่ 4.25 ผลผลิตพีซีอาร์ของ Bglu1-3 จากปฏิกิริยา secondary PCR โดยใช้ผลผลิตจาก primary PCR เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder พบว่ามีเฉพาะ ไลบารี *StuI* เท่านั้น ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 1,000 bp

4.4.2.2.3 การโคลนและคัดเลือกโคลนส่วนของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

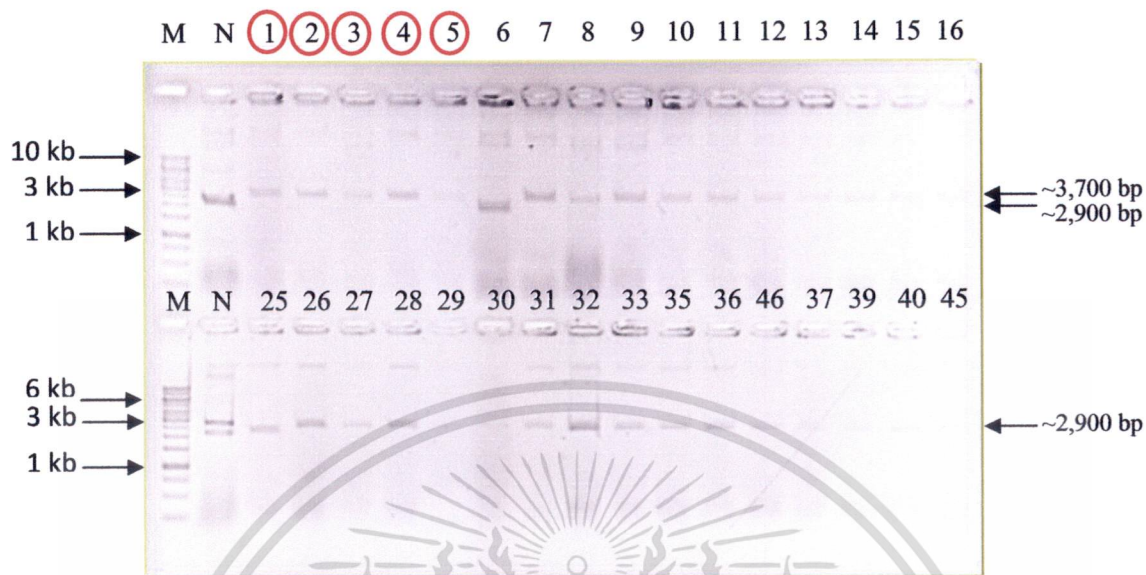
เมื่อคัดเลือกไลบารีของแต่ละโคลนแล้ว จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์จากทั้ง 2 ปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี gel extraction (ภาพที่ 4.26) พบว่าไลบารี *PvuII* ของยีน Bglu1-1 มีขนาด 800 bp และ ไลบารี *StuI* ของยีน Bglu1-3 มีขนาด 1,000 bp จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 α พบว่าทั้ง 2 โคลนปรากฏโคโลนีจำนวนมาก จึงได้ทำการสุ่มเก็บโคโลนีจากการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white screening โดยคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายซึ่งเป็นโคโลนีสีขาวมาทำเป็น master plate แล้วตรวจสอบโคลนที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี size screening จาก master plate (ภาพที่ 4.27 และ 4.28) พบว่ายีน Bglu1-1 และ Bglu1-3 มีโคลนจำนวนมากที่พบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน จึงได้สุ่มเลือกตัวแทนของแต่ละยีนมาจำนวน 5 โคลน ซึ่งโคลนที่ได้รับการคัดเลือกนี้จะมีขนาดใหญ่กว่าโคลนที่มีเฉพาะพลาสมิด pTZ57R/T (w/o) ซึ่งไม่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนใดๆ มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรก โดยการทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล 1.0% ภายใต้กระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

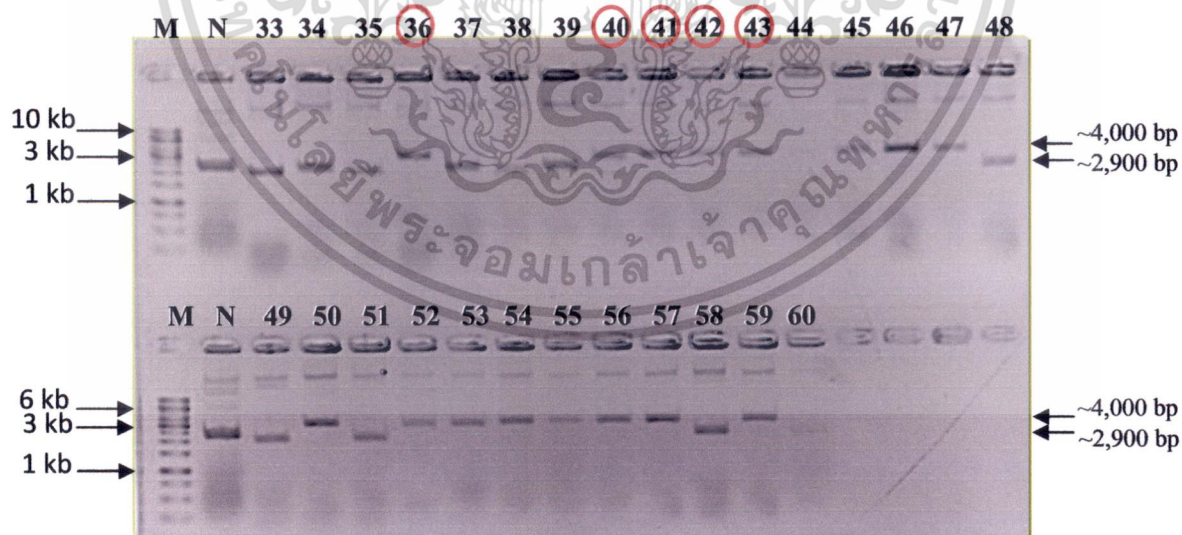
ขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (ภาพที่ 4.29) พบแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่เราต้องการคือ ประมาณ 800 bp (สำหรับไลบารี *PvuII* ของยีน *Bglu1-1*) และ 1,000 bp (สำหรับไลบารี *StuI* ของยีน *Bglu1-3*) จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดของบริษัท QIAGEN® เพื่อให้บริสุทธิ์แล้ว ตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.26 ผลการทำ gel extraction ของผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือไลบารี *PvuII* ของยีน *Bglu1-1* มีขนาด 800 bp และ Lane 2 คือไลบารี *StuI* ของยีน *Bglu1-3* มีขนาด 1000 bp

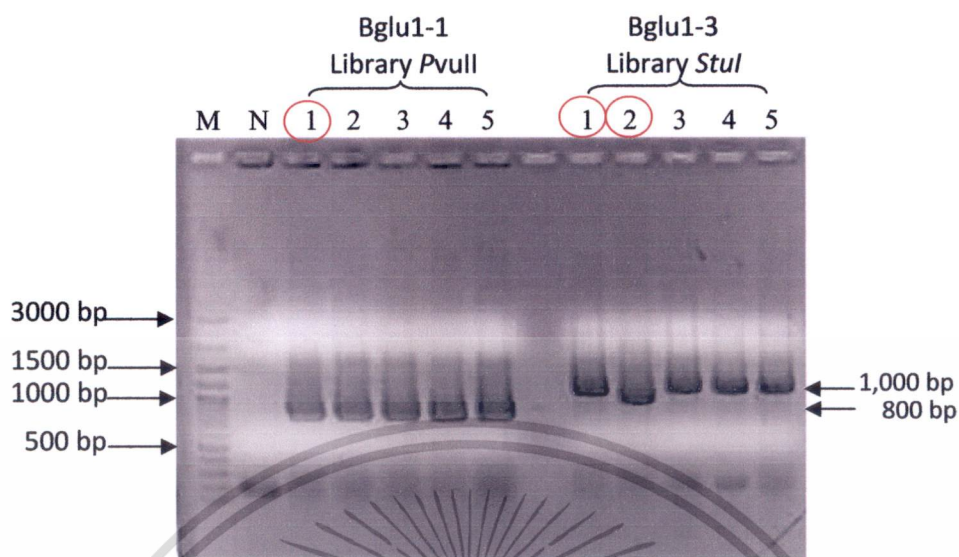


ภาพที่ 4.27 ผลการทำ size screening ของยีน Bglu1-1(upstream) จาก master plate ของไลบารี *PvuII* เพื่อจะสุ่มสกัดพลาสมิด ตามช่องที่วงกลมสีแดงไว้ โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, Lane N คือ pTZ57R/T (w/o control) และ Lane 1-45 คือ ตัวเลขลำดับการโคลน



ภาพที่ 4.28 ผลการทำ size screening ของยีน Bglu1-3(upstream) จาก master plate ของไลบารี *StuI* เพื่อจะสุ่มสกัดพลาสมิด ตามช่องที่วงกลมสีแดงไว้ โดย Lane M คือ เอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, Lane N คือ pTZ57R/T (w/o control) และ Lane 33-60 คือตัวเลขลำดับการโคลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 ผลการนำพลาสมิดที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% ภายใต้กระแสไฟฟ้าโดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder, Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) พบแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่เราต้องการคือประมาณ 800 และ 1,000 bp

จากการทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC ดังกล่าว ได้คัดเลือกโคลนตามที่วงกลมในรูปมาทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยไลบรารี *PvuII* ของ Bglu1_1 Lane 1 ตั้งชื่อว่า Bglu1_1up3 ส่วนไลบรารี *StuI* ของ Bglu1_3 Lane 1 ตั้งชื่อว่า Bglu1_3up36 และ Lane 2 ตั้งชื่อว่า Bglu1_3up40

4.4.2.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาคผนวก ข) ปรากฏว่ามีเฉพาะโคลน Bglu1_3up36 เท่านั้นที่สามารถรวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 (partial gene) แล้วเกิด overlap กันขึ้น และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1_3up36 รวมกับ Bglu1-3 เดิม (cap contig) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการ blastx กับฐานข้อมูล จะพบว่ามีความเหมือน (identities) กับ 5 อันดับแรกคือ *Sorangium cellulosum* So ce56 (CAN97832) 197/414 (48%) , *Cellulosilyticum ruminicola* (ACZ98664) 188/412(46%) , *Eubacterium eligens* ATCC 27750 (ACR73677) 194/426(46%) , *Phycisphaera mikurensis* NBRC102666 (BAM04503) 187/418(45%) และ *Lentisphaera araneosa* HTCC2155 (EDM24761) 184/413(45%)

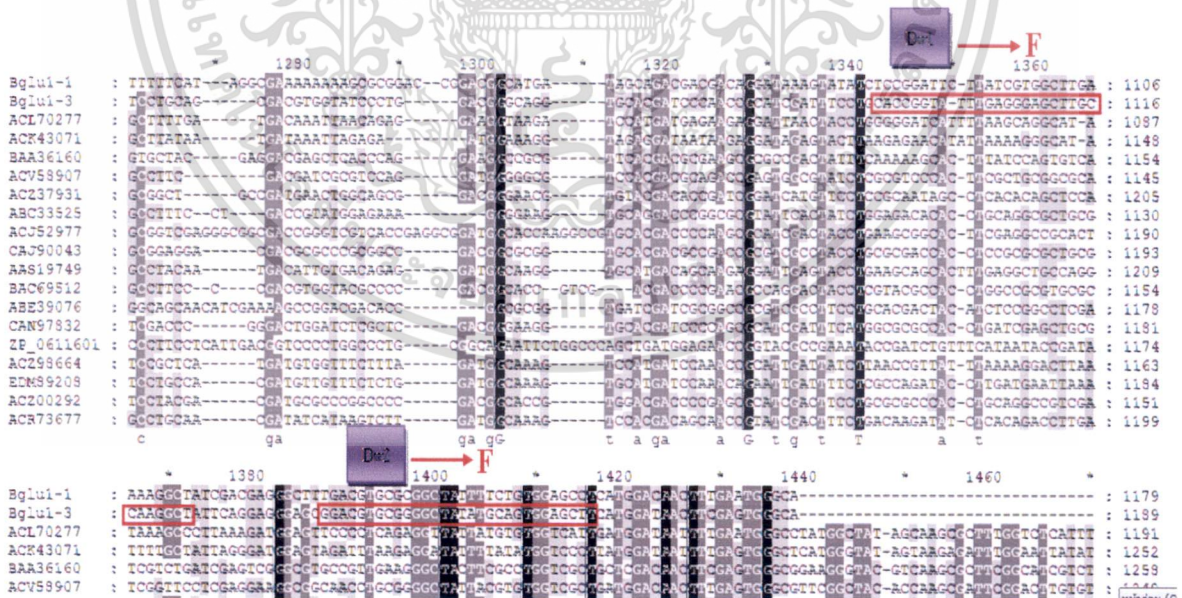
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนด้าน 3'downstream

จากขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้าน 5'upstream พบว่ามีเฉพาะยีน Bglu1-3up36 เท่านั้น ที่สามารถรวมกับชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 เดิมได้ (เส้น partial gene) ในขณะที่ยีน Bglu1-1 ไม่สามารถหาส่วนต่อของยีนได้ จึงได้ยุติการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Bglu1-1 ดังนั้นในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนทางด้าน 3'downstream จึงได้ทำการทดลองเฉพาะยีน Bglu1-3 เท่านั้น

4.4.2.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์เช่นเดียวกับข้อ 4.4.2.2.1 โดยเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Bglu1-3 กับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx (Altschul et al., 1990) เข้าถึงทางอินเทอร์เน็ตได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> สุ่มเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนฐานข้อมูลน้อยกว่า 80% เพื่อนำมาออกแบบ specific primer เพื่อหาส่วนต่อจากชิ้นส่วนยีนที่ได้ โดยทำการออกแบบ forward primer จากปลายทางด้าน 3'(downstream) ของชิ้นส่วนยีนที่เป็นต้นแบบ ซึ่งออกแบบมา 2 ไพรเมอร์ให้ชื่อว่า Bgluc1_3Dw1 (GSP1) กับ Bgluc1_3Dw2(GSP2) (ภาพที่ 4.30)

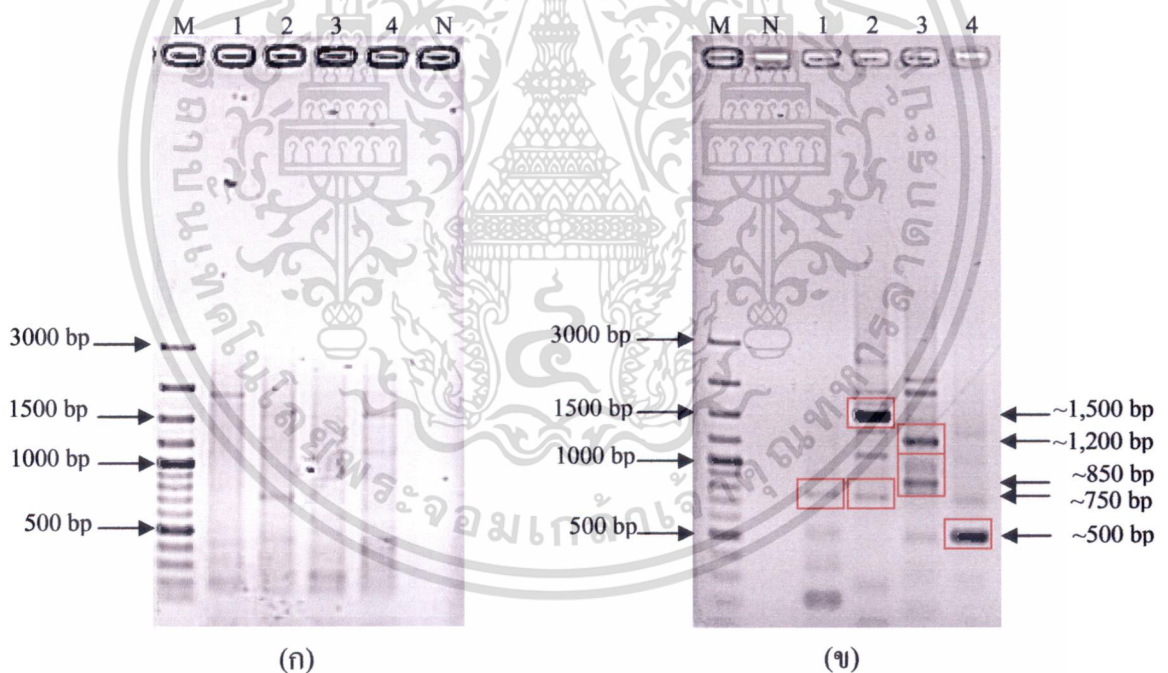


ภาพที่ 4.30 การออกแบบ forward ไพรเมอร์ด้าน 3' downstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bglu1-3 (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนและคัดเลือกโคลนส่วนต่อของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส Bglu1-3

โดยในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนในด้าน 3'downstream จะทำวิธีการเดียวกันกับข้อ 4.4.2.2 ซึ่งจะนำผลผลิตจาก Primary PCR (ภาพที่ 4.31 ก) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่าของความเข้มข้นแรก เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใน Secondary PCR นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดด้วยอะกาโรสเจล 1.0% (ภาพที่ 4.31 ข) พบว่าหลังจากทำ secondary PCR ทุกไลบรารีปรากฏแถบของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน จึงได้ทำการคัดเลือกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ในแต่ละไลบรารี ตามกรอบสี่เหลี่ยมที่ล้อมรอบไว้ โดยการทำปฏิกิริยา secondary PCR อีกครั้งเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณ จากนั้นทำการสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้คัดเลือกออกจากเจลให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8% (ภาพที่ 4.32)

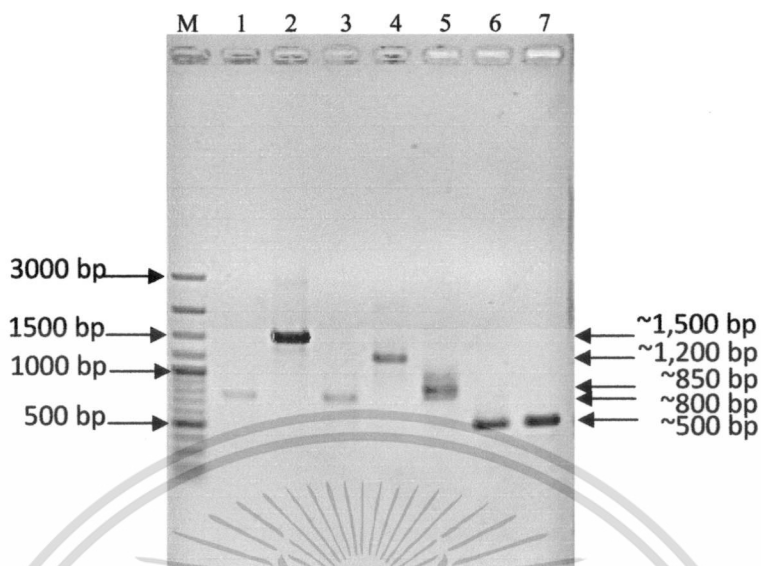


ภาพที่ 4.31 ผลการตรวจสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ) และ Lane 1-4 คือ ลำดับของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยดีเอ็นเอไลบรารี *DraI* , *EcoRV* , *PvuII* และ *StuI* ตามลำดับ

(ก) คือ ปฏิกิริยา primary PCR

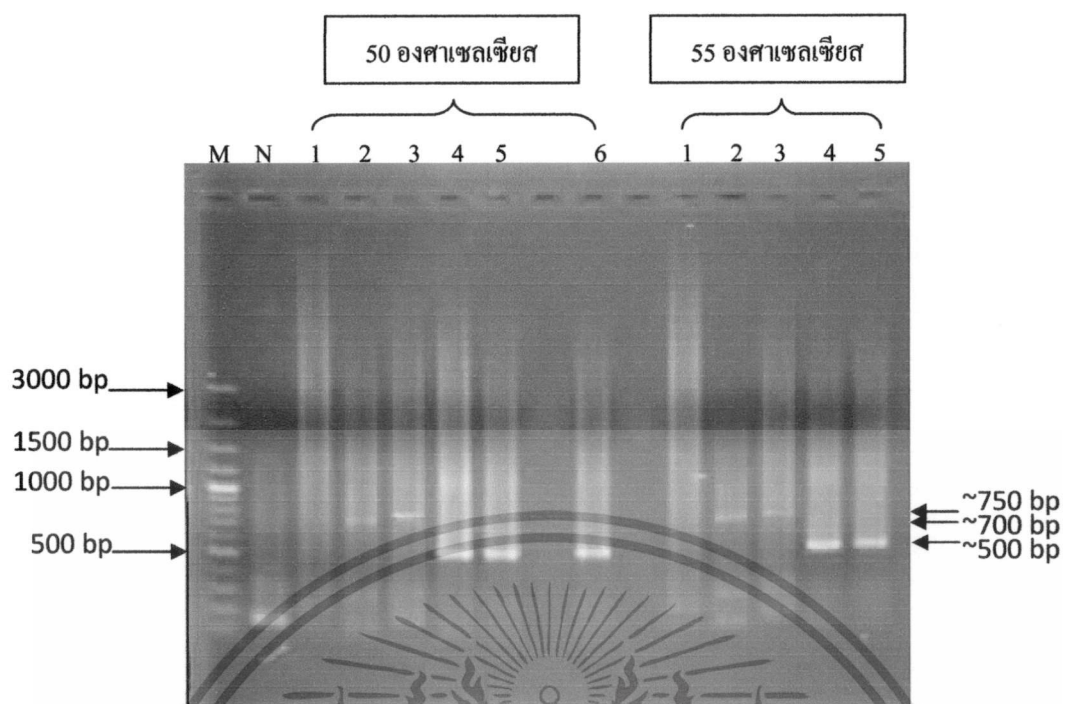
(ข) คือ ปฏิกิริยา secondary PCR (nested PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

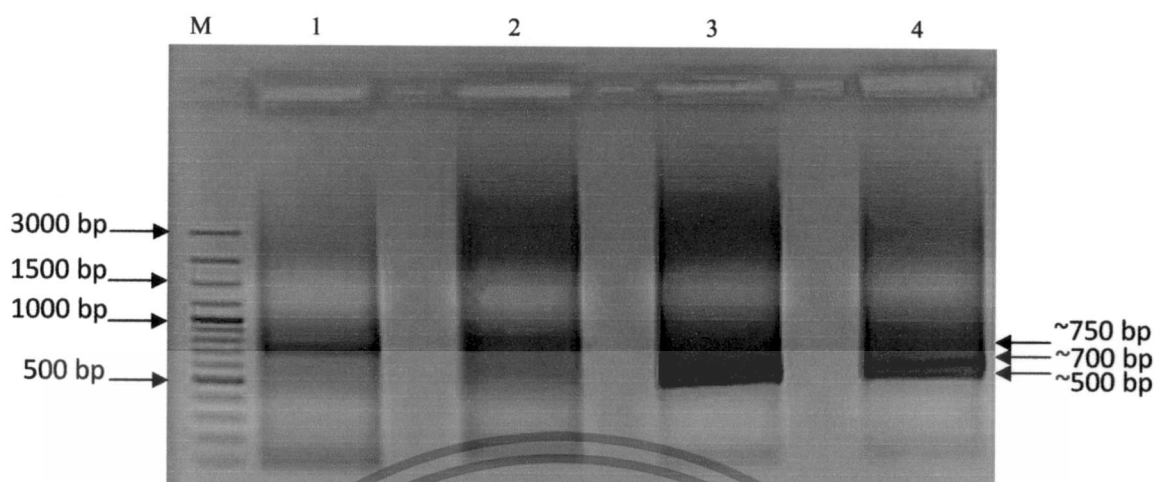


ภาพที่ 4.32 ผลการสกัดผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์(gel extraction) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% โดย Lane M คือ 100 bp Plus DNA ladder, Lane 1 คือ ไลบารี *DraI* ขนาด ~800 bp, Lane 2 คือ ไลบารี *EcoRV* ขนาด ~1,500 bp, Lane 3 คือ ไลบารี *EcoRV* ขนาด ~800 bp, Lane 4 คือ ไลบารี *PvuII* ขนาด ~1,200 bp, Lane 5 คือ ไลบารี *PvuII* ขนาด ~850 bp, Lane 6 คือ ไลบารี *StuI* มีขนาด ~500 bp และ Lane 7 คือ ไลบารี *StuI* มีขนาด ~500 bp

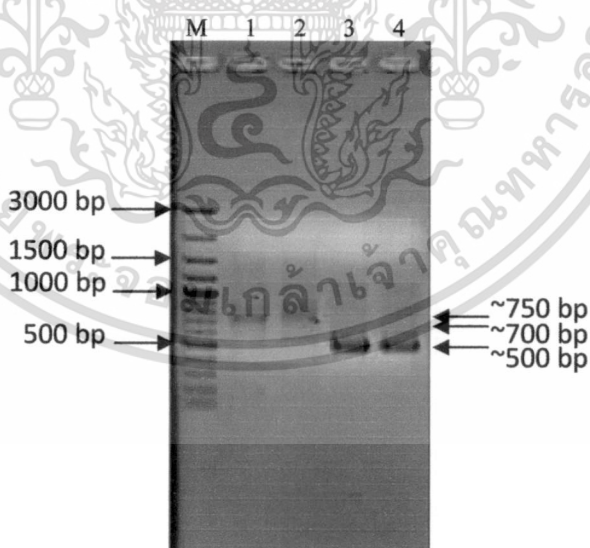
จากนั้นนำผลผลิต secondary PCR ที่ทำการสกัดแยกออกจากเจลให้บริสุทธิ์แล้ว มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา secondary PCR อีกครั้ง (re-amplify) โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบว่าที่อุณหภูมิใดจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0% (ภาพที่ 4.33) ผลที่ได้หลังจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าทั้ง 2 อุณหภูมิได้ผลไม่แตกต่างกัน จึงได้เลือกอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทำปฏิกิริยา secondary PCR อีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต (ภาพที่ 4.34) และสกัดผลผลิตออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% (ภาพที่ 4.35)



ภาพที่ 4.33 ผลการนำผลผลิต secondary PCR ที่ได้จากการสกัดแยกออกจากเจลให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา secondary PCR อีกครั้ง (re-amplify) โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder, Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ), Lane 1 คือ ไลบารี *DraI*, Lane 2 คือ ไลบารี *EcoRV*, Lane 3 คือ ไลบารี *PvuII* และ Lane 4-6 คือ ไลบารี *StuI*



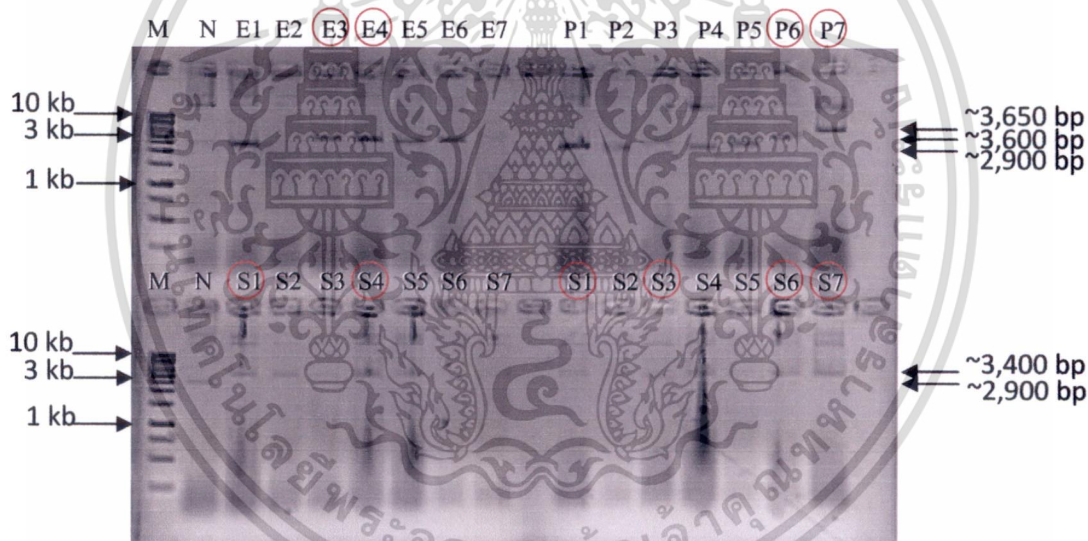
ภาพที่ 4.34 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยในขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไลบารี *EcoRV* , Lane 2 คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไลบารี *PvuII* ซึ่ง Lane 3 และ 4 คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไลบารี *StuI*



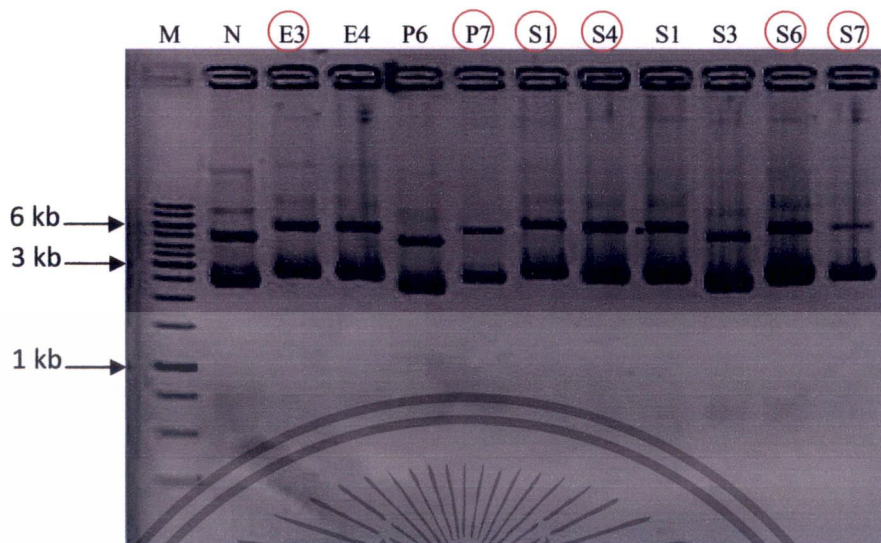
ภาพที่ 4.35 สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดของบริษัท Favorgen® โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ ผลการสกัดผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของไลบารี *EcoRV* , Lane 2 คือ ผลการสกัดผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของไลบารี *PvuII* ซึ่ง Lane 3 และ 4 คือ ผลการสกัดผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของไลบารี *StuI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 α พบว่าทั้ง 4 โคลนปรากฏโคโลนีจำนวนมาก จึงได้ทำการสุ่มเก็บโคโลนีจากการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white screening โดยคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายซึ่งเป็นโคโลนีสีขาวมาทำเป็น master plate แล้วตรวจสอบหาโคลนที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน โดยการสุ่มเลือกโคลนเป้าหมายมาจำนวน 7 โคลนจากแต่ละไลบรารีมาทำการตรวจสอบด้วยวิธี size screening จาก master plate (ภาพที่ 4.36) พบว่าในการโคลนยีน Bglu1-3 มีโคลนจำนวนมากที่พบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน จึงได้สุ่มเลือกตัวแทนของแต่ละไลบรารีมาจำนวนทั้งหมด 10 โคลน ซึ่งโคลนที่ได้รับการคัดเลือกนี้จะมีขนาดใหญ่กว่าโคลนที่มีเฉพาะพลาสมิด pTZ57R/T (w/o) ซึ่งไม่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนใดๆ มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (ภาพที่ 4.37)



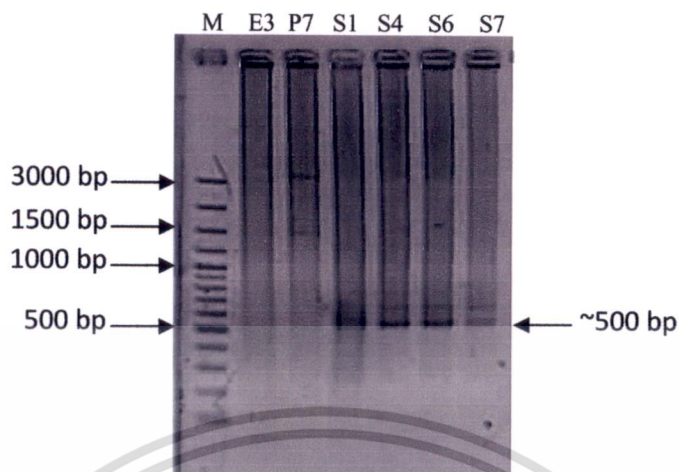
ภาพที่ 4.36 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ภายในพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยวิธี size screening โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder , Lane N คือ circular vector (w/o control), Lane E1-E7 คือ ลำดับของโคลนจากไลบรารี *EcoRV* ที่สุ่มเลือกมาตรวจสอบ , Lane P1-P7 คือ ลำดับของโคลนจากไลบรารี *PvuII* ที่สุ่มเลือกมาตรวจสอบ และ Lane S1-S7 คือ ลำดับของโคลนจากไลบรารี *StuI* ที่สุ่มเลือกมาตรวจสอบ ทำการสุ่มเลือกโคลนที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนมาจำนวน 10 โคลน ตามลำดับที่ได้ทำสัญลักษณ์วงกลมไว้ เพื่อนำไปทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis



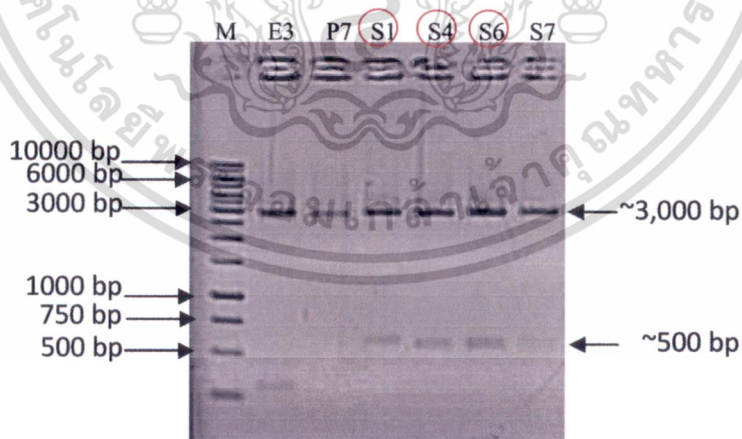
ภาพที่ 4.37 ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8 % พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีขนาดแตกต่างกัน โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder, Lane N คือ circular vector (w/o control), Lane E3-E4 คือ ตัวแทนโคลนที่ได้จากไลบารี *EcoRV*, Lane P6-P7 คือ ตัวแทนโคลนที่ได้จากไลบารี *PvuII* และ Lane S ที่ลำดับต่างๆ คือตัวแทนโคลนที่ได้จากไลบารี *StuI* ทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่ได้ทำสัญลักษณ์วงกลมไว้เพื่อนำไปตรวจสอบต่อไป

แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้และคัดเลือกไว้มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรก โดยการทำปฏิกิริยาถูกไซโฟลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ AP2 และ GSP2 แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล 1.0% ภายใต้กระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (ภาพที่ 4.38) พบว่ามีเฉพาะไลบารี *StuI* เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่เราต้องการคือประมาณ 500 bp จึงได้ทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งเพื่อความแม่นยำก่อนการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้วิธีการตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *EcoRI* แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8% (ภาพที่ 4.39) พบว่าผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีเฉพาะไลบารี *StuI* เท่านั้น ที่ปรากฏแถบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดแยกออกจากเวกเตอร์ และมีขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ จึงได้คัดเลือกโคลนที่ได้จากไลบารี *StuI* จำนวน 3 โคลน มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดของบริษัท QIAGEN® เพื่อทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจล 0.8% (ภาพที่ 4.40) แล้วคัดเลือกให้เหลือจำนวน 2 โคลน เพื่อตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



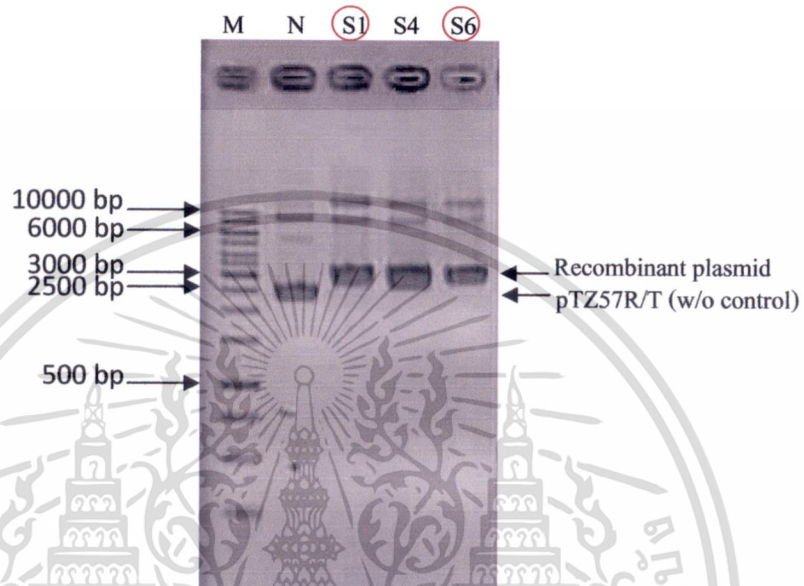
ภาพที่ 4.38 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน *Bglu1-3* ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ AP2 และ GSP2 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% พบว่ามีเฉพาะไลบารี *StuI* เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่เราต้องการคือประมาณ 500 bp โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane E3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคลนของไลบารี *EcoRV* , Lane P7 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคลนของไลบารี *PvuII* และ Lane S ที่ลำดับต่างๆ คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคลนของไลบารี *StuI*



ภาพที่ 4.39 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีน *Bglu1-3* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *EcoRI* ซึ่ง Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder , Lane E3 คือ โคลนของไลบารี *EcoRV* , Lane P7 คือ โคลนของไลบารี *PvuII* และ Lane S ที่ลำดับต่างๆ คือ โคลนของไลบารี *StuI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ามีเฉพาะไลบารี *StuI* เท่านั้น ที่ปรากฏแถบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดแยกออกจากเวกเตอร์ และมีขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ คัดเลือกมาจำนวน 3 โคลนเพื่อทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์



ภาพที่ 4.40 ผลการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดของบริษัท QIAGEN® ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจล 0.8% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder, Lane N คือ pTZ57R/T (w/o control), Lane S1, S4 และ S6 คือ โคลนที่ได้จากไลบารี *StuI* ทำการคัดเลือกให้เหลือจำนวน 2 โคลน ตามที่ทำสัญลักษณ์วงกลมไว้เพื่อตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตั้งชื่อว่า Bglu1-3_Dw1 และ Bglu1-3_Dw2 ตามลำดับ

4.4.2.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 โคลนที่ได้ มาทำการวิเคราะห์พบว่าทั้งสองโคลนมีลำดับเบสเหมือนกัน จึงได้เลือกเส้น Bglu1-3_Dw1 มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส Bglu1_3up36+partial gene ที่ได้ในขั้นตอนแรก ด้วยโปรแกรม ContigExpress (InfoMax, Inc.200) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล พบว่ายีน Bglu1-3_FL1 มีขนาดเท่ากับ 1,605 bp และมีความเหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family1 โดยพบว่ามี ความเหมือน (identities) กับ 5 อันดับแรก คือ *Cellulosilyticum ruminicola* (82%), *Paenibacillus terrae* HPL-003 (81%), *Caldilinea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน Bglu1-3 มีความเหมือน(Identities) กับ 5 อันดับแรกคือ *Sorangium cellulosum* So ce56 (YP_001618312.1), *Cellulosilyticum ruminicola* (gi_280977893), *Vibrio shilonii* AK1 (ZP_01865898.1), *Acaryochloris* sp. CCMEE 5410 (ZP_09247561.1) และ *Treponema primitia* ZAS-1 (ZP_0971 7576.1) ดังนี้ 48%, 47%, 45%, 43% และ 43% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล

Gene	Accession	Description	Identities
Bglu1-3_FL1	YP_001618312.1	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	218/453 (48%)
	gi_280977893	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	213/451 (47%)
	ZP_01865898.1	<i>Vibrio shilonii</i> AK1	205/451 (45%)
	ZP_09247561.1	<i>Acaryochloris</i> sp. CCMEE 5410	195/450 (43%)
	ZP_09717576.1	<i>Treponema primitia</i> ZAS-1	196/454 (43%)

4.4.2.3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างของยีน

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน Bglu1-3_FL1 ไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Pfam พบว่ายีน Bglu1-3_FL1 มีความเหมือนกับเอนไซม์กลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 1 (glycoside hydrolase family 1; GH1) (ภาพที่ 4.43) ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 86-532 และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนเบต้ากลูโคซิเดส Bglu1-3_FL1 พบว่าโครงสร้างของยีนประกอบด้วยส่วนของ signal peptide ตั้งแต่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 38 และส่วนที่เป็น cleavage site มีตำแหน่งอยู่ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 38 and 39: ASA-SS (ภาพที่ 4.42) และมีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserve sequence) คือ [LIVMFSTC] - [LIVFYYS] - [LIV] - [LIVMST] - E - N - G - [LIVMFAR]-[CSAGN]



ภาพที่ 4.42 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Bglu1-3_FL1 กับลำดับกรดอะมิโนของ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW2 กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มของยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH1 จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) คือ [LIVMFSTC] - [LIVFYS] - [LIV] - [LIVMST] - E - N - G - [LIVMFAR]- [CSAGN]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

ZP_01865898.1      THFDWPITPEALKWGTEFLYERYNKP- I IVTENGLS  NDWVSLDGRVHDTTRIDFLHRYL 384
|ZP_09247561.1    TTMDWVPTPEALYWGPRFFIYERYQLP- IVITENGMANCDWVHQDQGVHDPQRIDFLARYL 383
YP_001618312.1    TAFEWSVTPECLYWGPRFFYERYKRP- IVITENGLS  RDWISLDGKVHDPQRIDFMRHL 390
gi_280977893      TAIGWEITPEALYWGAKESSDRYHLP- YYITENGMSAHDVVSLDGVHDPNRIDYLNRYL 384
Bglu1_3_FL1       AAFKWEITPEVMRYGPLNLYKRYHIP- LYISENGLSCSDVSLDGVHDPNRIDFLHRYL 467
ZP_09717576.1    TDMGWEVNPEGMYDLLKWIHSRYNPP- V IITENGAA  NDWVNVEGVKDDPNRIDYLYRYL 384
: : * :.* :      .** : * : :.*.*. ** : * :

```

```

ZP_01865898.1      LGLKEAAANGVDIMGYFQWSILDNFEWAEGYKQRFGLVHVDYETMKRTPKESALWYKSVI 444
|ZP_09247561.1    QAYSRAIKDGI EARGYFLWSIMDNFEWAFGYDKRFGLIYVDYETQQRTLKDSAYWYKDVI 443
YP_001618312.1    IELRRAIAEGAVVNGYFHWSILDNFEWAHGYKHRFGLVVDYPTGRRVLKDSAHWYRELI 450
gi_280977893      KGLKRAASEGVDVRGYFTWSFLDNFEWAKGYADRFGLVYVDYETQKRTVKDSAYWYQTVI 444
Bglu1_3_FL1       RELAKAIQEGADVRYGVMQWSFMDNFEWASGYEERFGLIHVDYESLVRTPKDSARWYAQVI 527
ZP_09717576.1    AOVHKAIQEGVPVQGYVWCFCDNFEWAKGLSKRFGLIYVDYDTQKRTPKESAYWYAEI 444
. * : *      ** * : ***** * .*** : .*** : * . * : ** * * : *

```

```

ZP_01865898.1      ESNGASLGETSALQGWMKPSDFNRNTC 471
|ZP_09247561.1    ASNGQML----- 450
YP_001618312.1    ASNGATLGG----- 459
gi_280977893      ASNGENL----- 451
Bglu1_3_FL1       DSNGEIL----- 534
ZP_09717576.1    KNNGY----- 449
. **

```

ภาพที่ 4.42 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Bglu1-3_FL1 กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW2 กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งอนุกรมของกรดอะมิโนในกลุ่มของยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH1 จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) คือ [LIVMFSTC] - [LIVFYS] - [LIV] - [LIVMST] - E - N - G - [LIVMFAR]-[CSAGN]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found **1** Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope			Alignment			HMM			E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	To	Start	End	From	To	length	Bit score			
Glyco_hydro_1	Glycosyl hydrolase family 1	Domain CL0058		86	532	88	531	3	454	455	473.9	3.1e-142	439,439,439,439	<input type="checkbox"/>	

Comments or questions on the site? [Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk](mailto:pfam-help@sanger.ac.uk). Our cookie policy.
The Wellcome Trust

ภาพที่ 4.43 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน Bglu1-3_FL1 กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Pfam

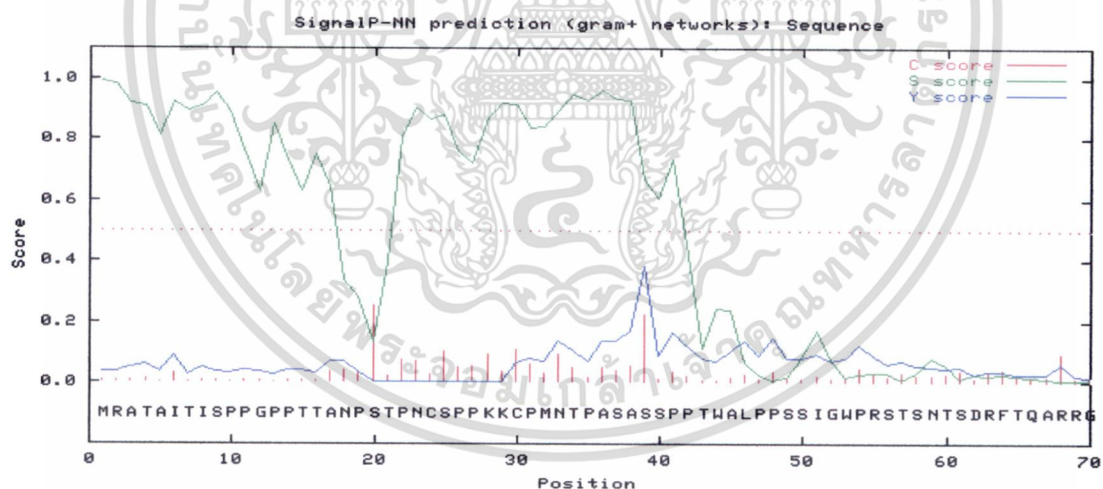
4.5 การแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

4.5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+)

4.5.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์แบบ mature gene

4.5.1.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ mature gene

โดยนำลำดับอะมิโนของยีนที่สมบูรณ์ ซึ่งลำดับอะมิโนดังกล่าวได้มาจากการทำ genome walking จากข้อ 4.4.2.3.3 นำมาเข้าโปรแกรม SignalP 3.0 เพื่อทำการตัดส่วนที่เป็น signal peptide ออก จากนั้นทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดในชิ้นส่วนยีน แต่ตัดที่เวกเตอร์ ณ ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a(+) ซึ่งไพรเมอร์แบบ mature gene ของยีน Bglu1-3_FL1 ได้แก่ไพรเมอร์ bgl1mat_pET28F_His คู่กับไพรเมอร์ bgl1mat_pET28R_His ได้เลือกเอนไซม์ *NdeI* และเอนไซม์ *HindIII* โดยจะทำการตัดแบบ double digest และได้ทำการเลือกโปรตีน His*Tag ในบริเวณปลาย N-terminal ซึ่งจะทำการเติม stop codon จากยีน Bglu1-3_FL1 ไว้หน้าตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *HindIII* เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่มีโปรตีน His*Tag ของเวกเตอร์ต่อท้าย

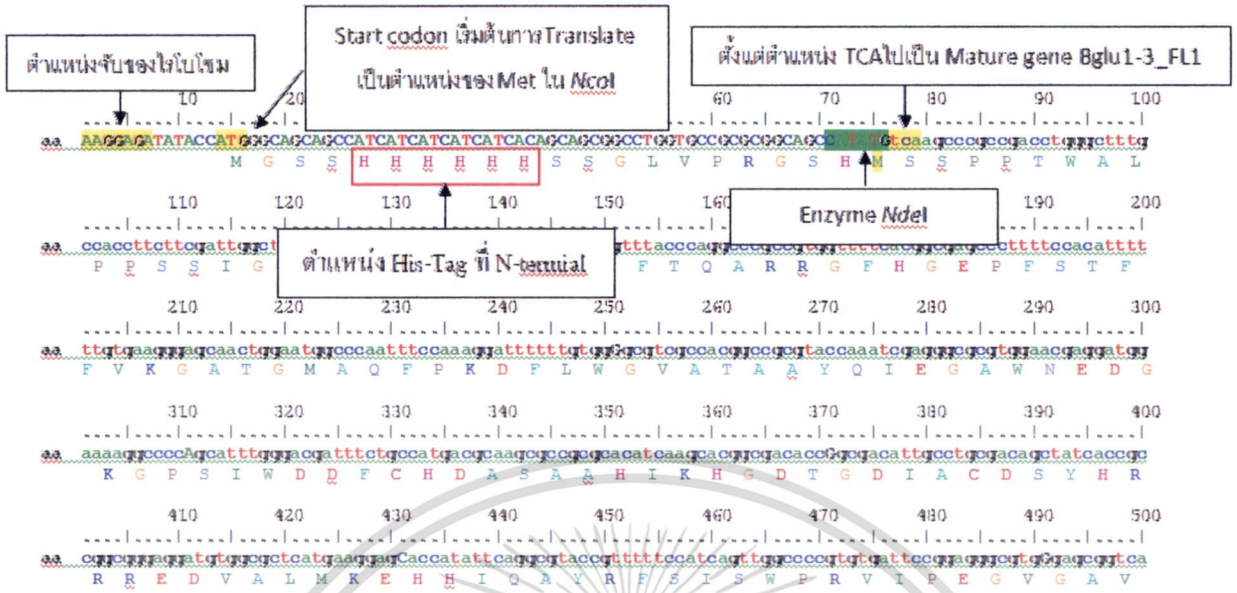


[data](#)

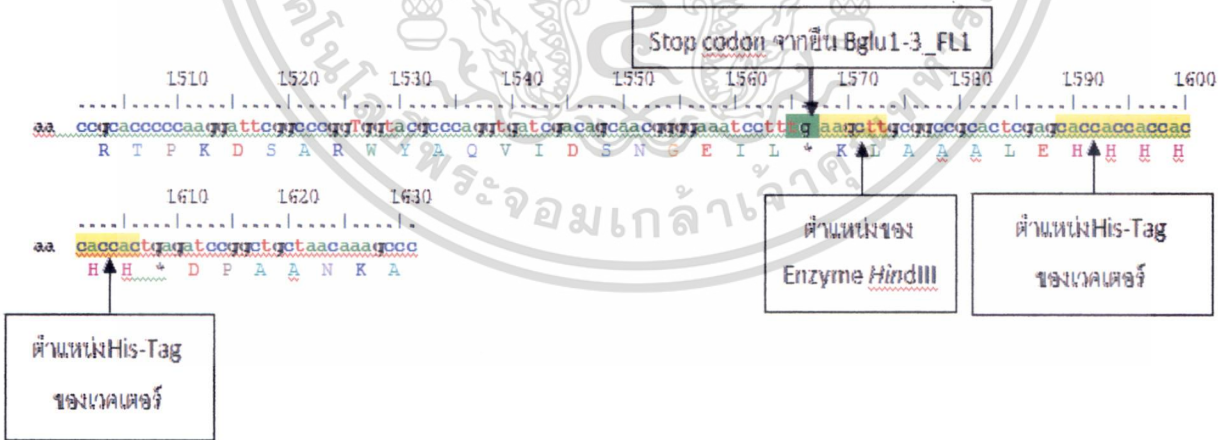
```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 20 0.254 0.52 NO
max. Y 39 0.381 0.32 YES
max. S 1 0.990 0.97 YES
mean S 1-38 0.794 0.51 YES
D 1-38 0.588 0.45 YES
# Most likely cleavage site between pos. 38 and 39: ASA-SS
```

ภาพที่ 4.44 ผลการวิเคราะห์ signal peptide ของ Bglu1-3 ด้วยโปรแกรม signal 3.0 โดยเอนไซม์ protease มีบริเวณตัดในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 38 and 39: ASA-SS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.45 การออกแบบไพรเมอร์แบบ mature gene ด้าน forward เพื่อที่จะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+) โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Bglu1-3_FL1 มาทำการตัดส่วนที่เป็น signal peptide ออกจากนั้นจะใช้ start codon ของเอนไซม์ในเวกเตอร์เป็นตำแหน่งเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัส (translation) โดยทำการติดโปรตีน His*Tag ไว้ที่บริเวณปลาย N-terminal

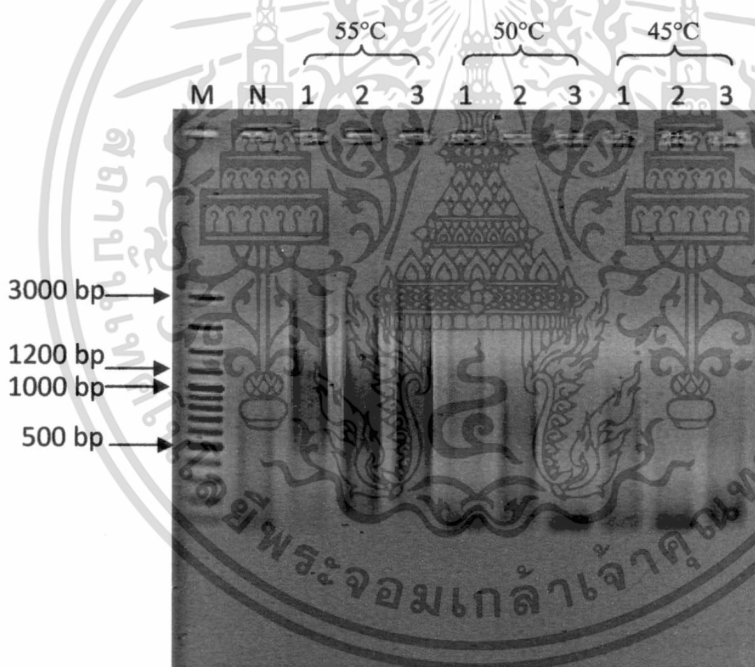


ภาพที่ 4.46 การออกแบบไพรเมอร์แบบ mature gene ด้าน reverse เพื่อที่จะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+) ซึ่งจะใช้ stop codon ของยีน Bglu1-3_FL1 เป็นตำแหน่งสิ้นสุดกระบวนการแปลรหัส (translation) ทำให้โปรตีนฮิสทีดิน (Histidine tag) ที่อยู่บริเวณปลาย C-terminal ไม่สามารถถูกแปลรหัสออกมาพร้อมกับโปรตีนลูกผสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

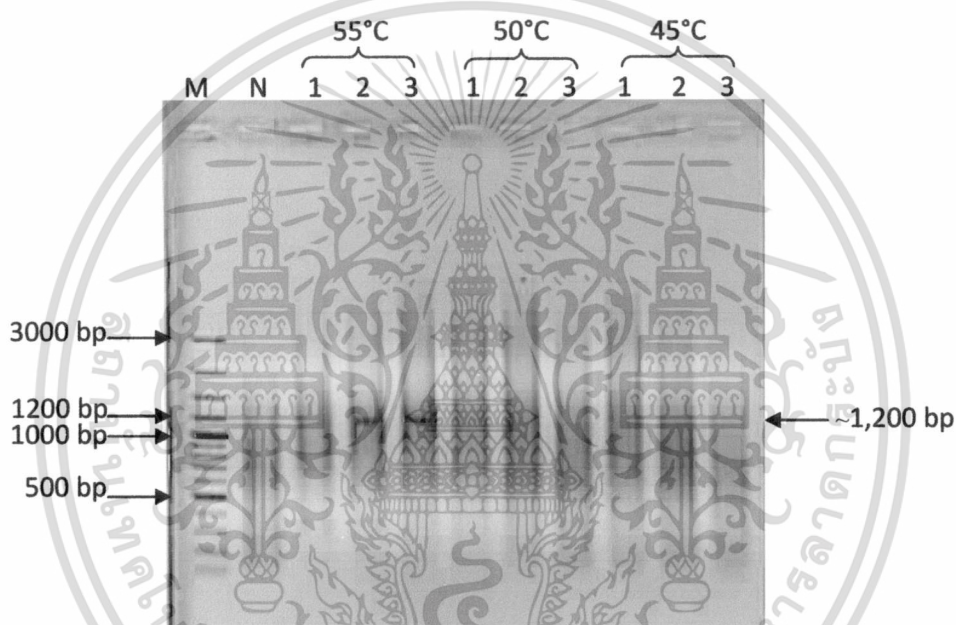
4.5.1.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากจีโนมดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์แบบ mature gene

นำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ อัตราส่วน 1:10 , 1:100 และ 1:1000 จากนั้นนำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing โดยครั้งแรกทำการทดลองที่อุณหภูมิ 45 ,50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน extension เป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำมาตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.47) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอผลผลิตปรากฏอยู่ที่ปฏิกิริยาซึ่ง กำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบในอัตราการเจือจางอยู่ที่ 1:10



ภาพที่ 4.47 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบ mature gene กำหนดเวลาในขั้นตอน extension เป็นเวลา 1.30 นาที โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ dH₂O แทนดีเอ็นเอแม่แบบ) , Lane 1,2 และ 3 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง อัตรา 1:10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงได้ทดลองปรับเปลี่ยนเวลาในขั้นตอน extension จากเดิม 1.30 นาที เป็น 2 นาที (เนื่องจาก ยีนยาวประมาณ 1,200 bp) โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับครั้งก่อนคือ 45 , 50 และ 55 องศาเซลเซียส แต่ทดลองปรับเปลี่ยนอัตราการเจือจางของดีเอ็นเอแม่แบบ จากที่เดิมปรากฏแถบ ผลผลิตที่อัตราการเจือจาง 1:10 ซึ่งครั้งนี้จะใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง 1:10 ,1:20 และ 1:30 ในการ ทำปฏิกิริยา เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.48) พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในขั้นตอน annealing โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจางอัตรา 1:10 และ 1:20 มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอผลผลิต

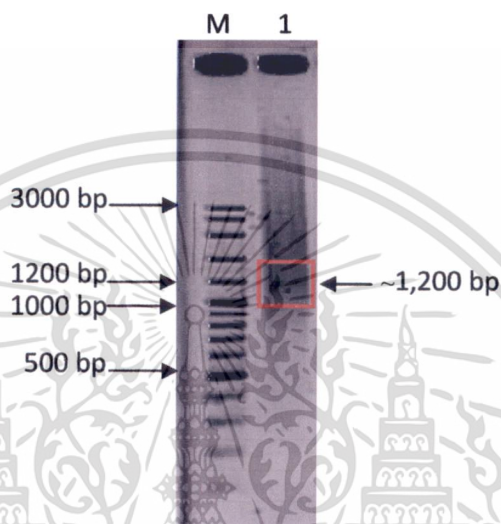


ภาพที่ 4.48 ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย อะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งกำหนดเวลาในขั้นตอน extension เป็น 2 นาที โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ dH₂O แทนดีเอ็นเอแม่แบบ) , Lane 1 , 2 และ 3 คือ อัตราการเจือจางของดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในปฏิกิริยากำหนดคือ 1:30 ,1:20 และ 1:10 ตามลำดับ

จากการทดสอบการปรับเปลี่ยนเวลาในขั้นตอน extension จาก 1.30 นาที เป็น 2 นาที พบว่าแถบผลผลิตมีลักษณะชัดเจนขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ดีเอ็นเอแม่แบบอัตราการเจือจางที่ 1:10 อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส และกำหนดเวลาในขั้นตอน extension เป็นเวลา 2 นาที มาใช้ในการทำปฏิกิริยาอีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลผลิต เพื่อจะทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลแล้วทำให้บริสุทธิ์ เพื่อจะใช้ในการโคลนยีน ซึ่งพบว่าในขั้นตอนที่จะสกัดดีเอ็นเอออกจาก

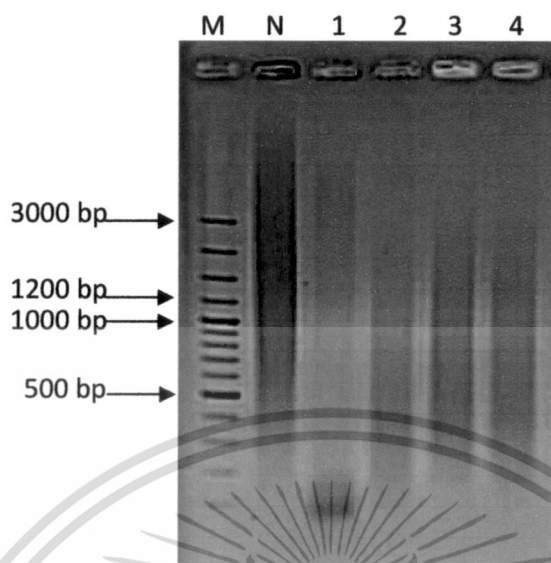
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจล แลบดีเอ็นเอผลผลิตที่ปรากฏมีลักษณะบางไม่ชัดเจน ทำให้เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่สกัดได้มา ทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8% ไม่พบแลบดีเอ็นเอใดปรากฏอยู่เลย จึงได้ทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสอีกครั้ง แล้วนำปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0% (ภาพที่ 4.49) ปรากฏแลบดีเอ็นเอผลผลิตที่ลักษณะจางมากกว่าครั้งก่อนๆ



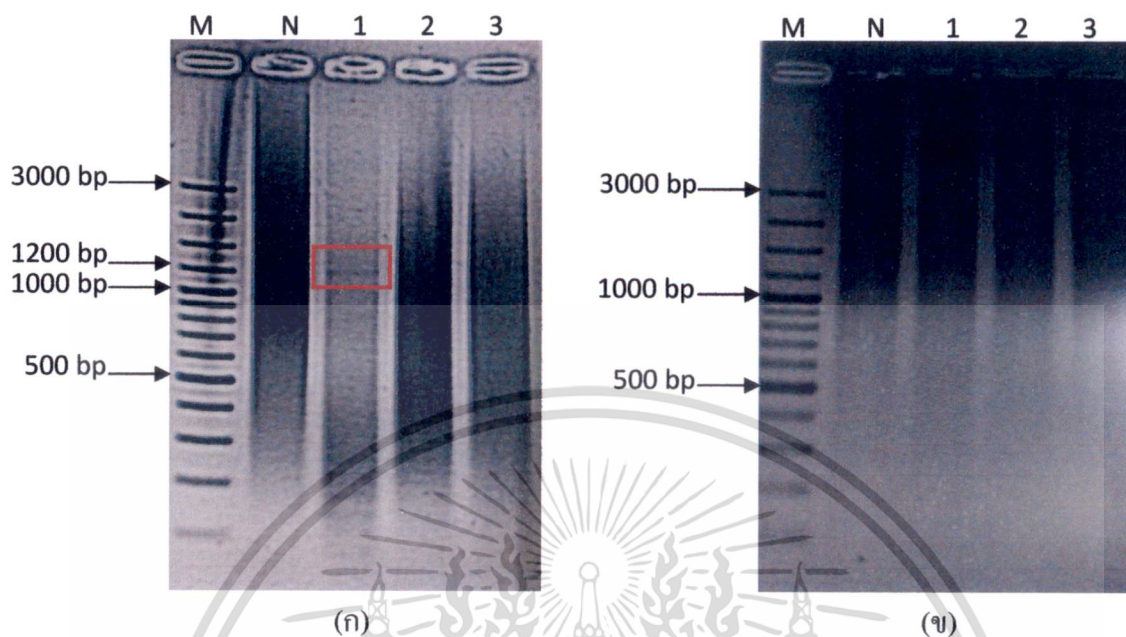
ภาพที่ 4.49 ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งกำหนดเวลาในขั้นตอน extension เป็น 2 นาที โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาการใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจางอัตรา 1:10

จึงได้ทำการทดลองอีกครั้ง โดยการปรับเปลี่ยนอัตราการเจือจางของดีเอ็นเอแม่แบบ จากเดิมที่ใช้คือ 1:10 เป็น 1:5, 1:10, 1:20 และแบบที่นำมาจากจีโนมที่ดีเอ็นเอเลยโดยไม่ต้องเจือจาง ได้ผลปรากฏดังภาพที่ 4.50 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 100 ng ปริมาตร 1 μ l (ไม่เจือจาง) ปรากฏลักษณะ smear ซึ่งอาจเกิดจากใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบมากเกินไป แต่ในขณะเดียวกัน ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง 1:5, 1:10 และ 1:20 ก็ไม่ปรากฏแลบดีเอ็นเอผลผลิตเช่นกัน



ภาพที่ 4.50 ผลการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งกำหนดเวลาในขั้นตอน extension เป็น 2 นาที โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control , Lane 1 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเข้มข้น 100 ng (แบบไม่เจือจาง) , Lane 2 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอเจือจาง 1:5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ , Lane 3 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอเจือจาง 1:10 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และ Lane 4 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอเจือจาง 1:20 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

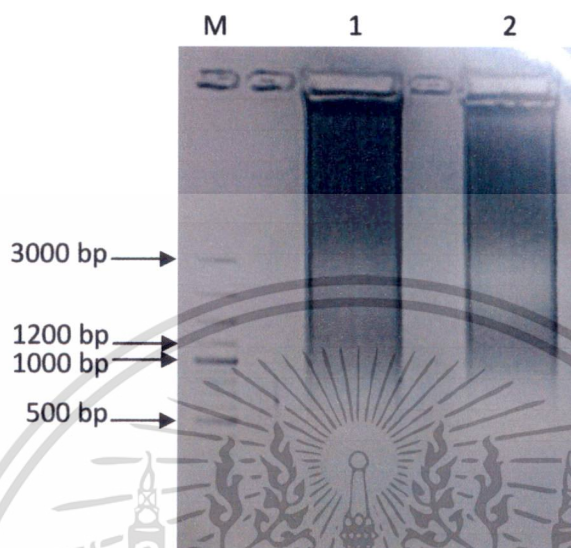
ดังนั้นจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนจำนวนรอบทั้งหมดในการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากเดิมจำนวน 35 รอบ เป็น 30 รอบ แต่ยังคงอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนเท่าเดิม เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.51 ก) พบว่ามีเพียงปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง 1:5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิต แต่มีลักษณะที่จางมาก จึงได้นำดีเอ็นเอผลผลิตดังกล่าวมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาอีกครั้งซึ่งคาดหวังว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาดชัดเจนขึ้น แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.51 ข) พบว่าไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอผลผลิตใดๆ



ภาพที่ 4.51 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดย Lane M คือ คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control , Lane 1 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้คีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง 1:5, Lane 2 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้คีเอ็นเอแม่แบบเจือจาง 1:10 และ Lane 3 คือ ปฏิกิริยาที่ใช้คีเอ็นเอแม่แบบเจือจางอัตราส่วน 1:20
 (ก) ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งทำการลดจำนวนรอบของปฏิกิริยาจาก 35 รอบ เป็น 30 รอบ
 (ข) ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก (ก) เป็นคีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลารวมถึงจำนวนรอบของปฏิกิริยาเท่ากับ (ก)

ดังนั้นจึงได้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอีกครั้ง โดยครั้งนี้ใช้คีเอ็นเอเจือจางอัตรา 1:5 มาเป็นคีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งกำหนดอุณหภูมิและเวลารวมถึงจำนวนรอบทั้งหมดของปฏิกิริยาเท่าเดิมคือ อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส กำหนดเวลาในขั้นตอน extention เป็นเวลา 2 นาที และกำหนดจำนวนรอบทั้งหมดของปฏิกิริยาเป็นจำนวน 30 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ยังไม่ได้้นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเป็นคีเอ็นเอแม่แบบเหมือนครั้งก่อน แต่นำมาทำการสกัดคีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลก่อน เพราะหากแถบคีเอ็นเอผลผลิตมีลักษณะไม่ชัดเจน จะนำคีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์ดังกล่าวมาใช้เป็นคีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซ้ำอีกครั้ง ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.52) พบว่าผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเตรียมจะใช้ในการสกัดคีเอ็นเอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอมผลผลิตออกจากเจล ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตใดๆ ดังนั้นจึงได้ยุติการทดลองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลผลิตด้วยไพรเมอร์แบบ mature gene ไว้เพียงเท่านี้



ภาพที่ 4.52 ผลการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเตรียมทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจล โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder, Lane 1 และ 2 คือผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอเจือจาง 1:5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอผลผลิต

4.5.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้ชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส

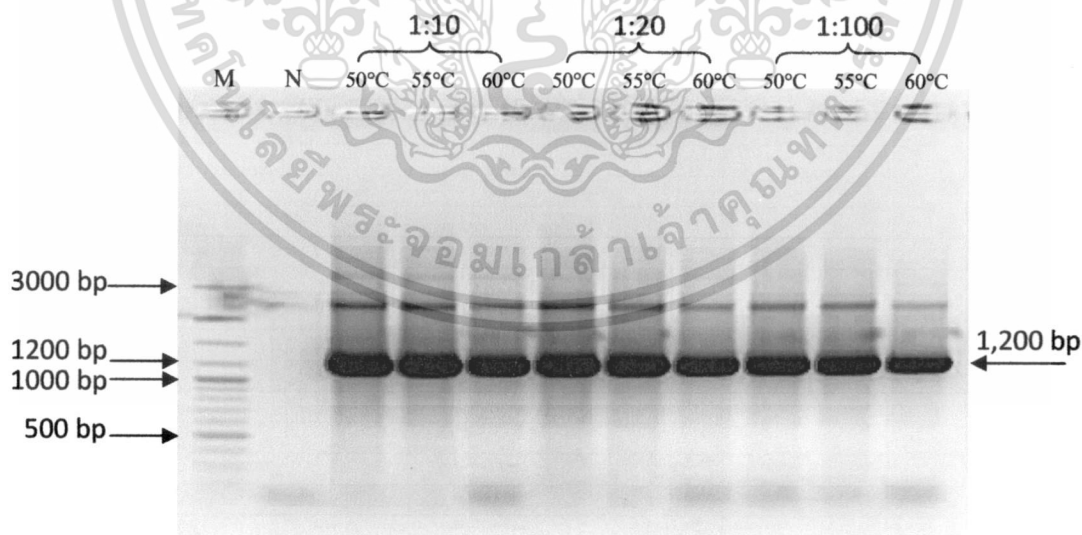
4.5.1.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากชิ้นส่วนยีน (partial gene) ที่ได้จากข้อ 4.3.1.3 ทั้ง 2 เส้น คือ Bglu1-1 และ Bglu1-3 โดยทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดในชิ้นส่วนยีน แต่ตัดที่เวกเตอร์ ณ ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a(+) (เช่นเดียวกับการออกแบบไพรเมอร์แบบ mature gene) และทำการติด His-Tag เพื่อช่วยในการเช็คการแสดงออกของยีน และยังมีประโยชน์ในกระบวนการทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ ซึ่งไพรเมอร์สำหรับเส้น partial gene ทั้ง 2 เส้นนี้ ได้ออกแบบไพรเมอร์แบบ degenerate primer 1 คู่ เนื่องจากทั้ง 2 เส้นมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง จึงได้ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1F สำหรับด้าน forward ได้เลือกเอนไซม์ *NdeI* และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R สำหรับด้าน reverse ได้เลือกเอนไซม์ *HindIII* โดยได้ทำการเลือกตำแหน่งของโปรตีน His*Tag ที่บริเวณปลาย N-terminal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

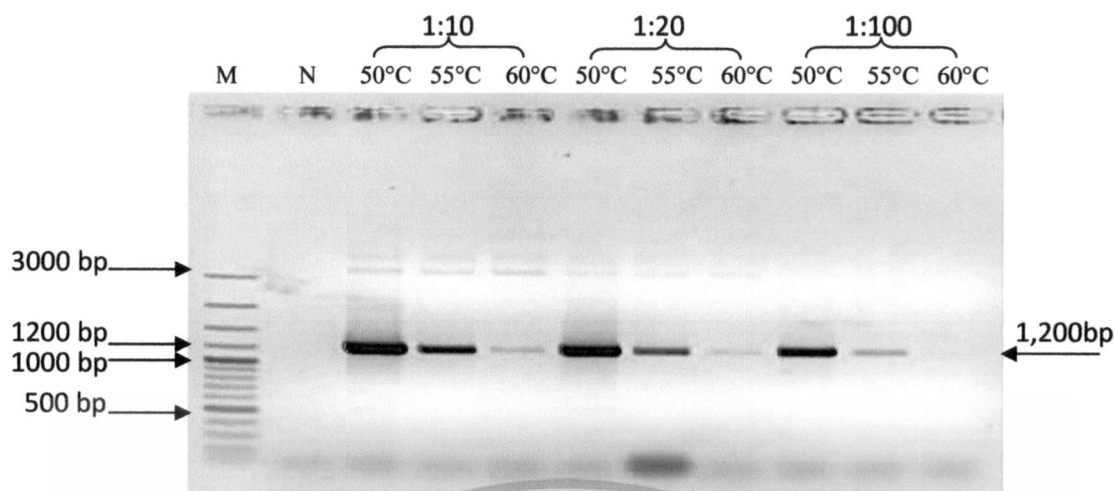
4.5.1.2.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนยีน (partial gene) เบต้ากลูโคซิเดส ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยจะใช้พลาสมิดลูกผสม Bglu1-1 และ Bglu1-3 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยทำการเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:10, 1:20 และ 1:100 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นในขั้นตอน annealing ลดอุณหภูมิลงมาที่ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สม จากนั้นในขั้นตอน extension เพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จึงเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยา แล้วนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1.0% พบว่าปฏิกิริยาของยีน Bglu1-1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตในทุกหลอดปฏิกิริยา (ภาพที่ 4.53) ในขณะที่ปฏิกิริยาของยีน Bglu1-3 นั้นพบว่า มีเพียงปฏิกิริยาที่ใช้พลาสมิดลูกผสมเจือจางอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 60 องศาเซลเซียสเท่านั้น ที่ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอผลผลิต (ภาพที่ 4.54)



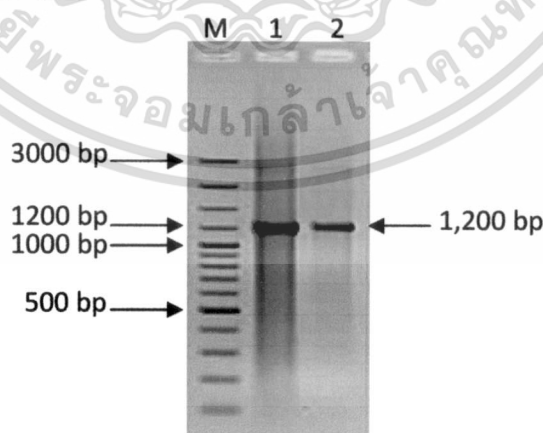
ภาพที่ 4.53 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu1-1 ซึ่งใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้อัตราการเจือจางดังนี้ 1:10, 1:20 และ 1:100 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตในทุกหลอดปฏิกิริยา โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder และ Lane N คือ negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



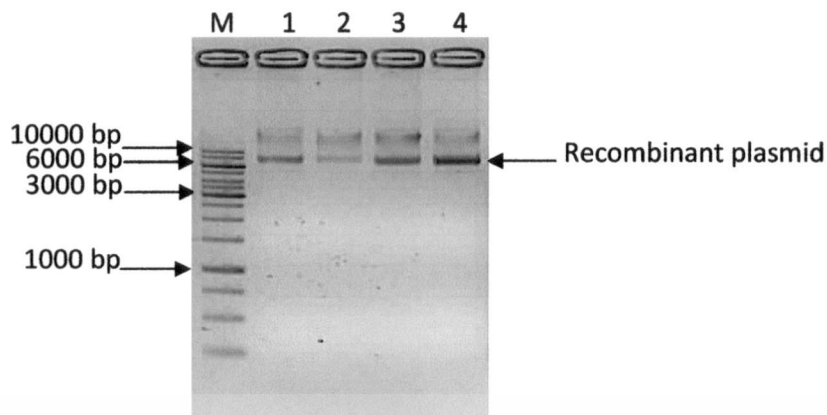
ภาพที่ 4.54 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu1-3 พบว่าปฏิกิริยาที่ใช้พลาสมิดลูกผสมเจือจางอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 60 องศาเซลเซียสเท่านั้น ที่ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอผลผลิต โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder และ Lane N คือ negative control

จากการทดลองทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของทั้ง 2 ยีน จึงได้เลือกใช้ พลาสมิดลูกผสมเจือจาง 1:10 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 50 องศาเซลเซียส สำหรับทั้ง 2 ยีน ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซ้ำอีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ของทั้ง 2 ยีน มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Purification Mini sample Kit (Favorgen®) แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8% (ภาพที่ 4.55) ในขณะเดียวกันก็ทำการสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ให้บริสุทธิ์(ภาพที่ 4.56)



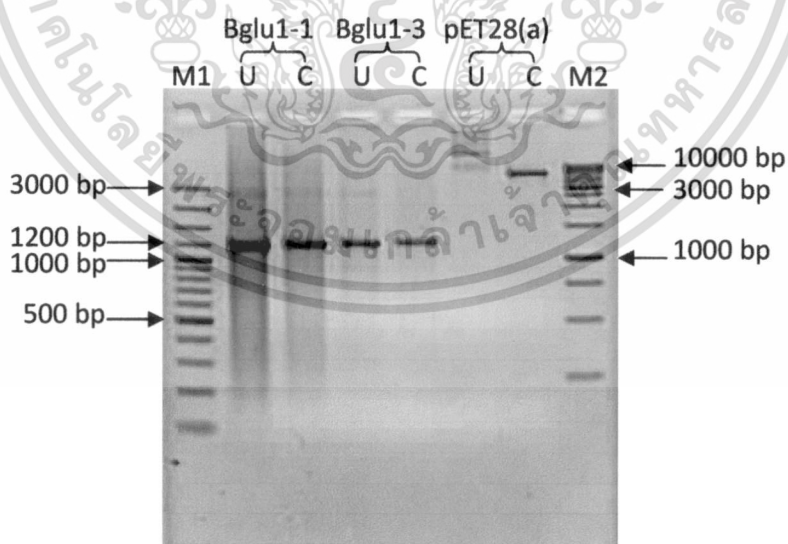
ภาพที่ 4.55 ผลการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์ โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1 คือ ผลผลิตของยีน Bglu1-1 และ Lane 2 คือ ผลผลิตของยีน Bglu1-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.56 การตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder , Lane 1-4 คือ ลำดับของหลอดผลผลิต ที่ได้จากการสกัด พลาสมิดเวกเตอร์

จากนั้นนำผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วทั้ง 2 ยีน พร้อมกับเวกเตอร์ pET28a(+) ที่ได้ทำการสกัดให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* โดยตัดแบบ double digest คือตัดพร้อมกันทั้ง 2 เอนไซม์ เนื่องจากใช้บัฟเฟอร์ตัวเดียวกัน แล้วนำไปปฏิกิริยาที่ได้มา ตรวจสอบในอะกาโรสเจล 1.0% (ภาพที่ 4.57) โดยเปรียบเทียบระหว่างหลอดที่ทำการตัดเอนไซม์ กับหลอดที่ไม่ได้ผ่านการตัดเอนไซม์



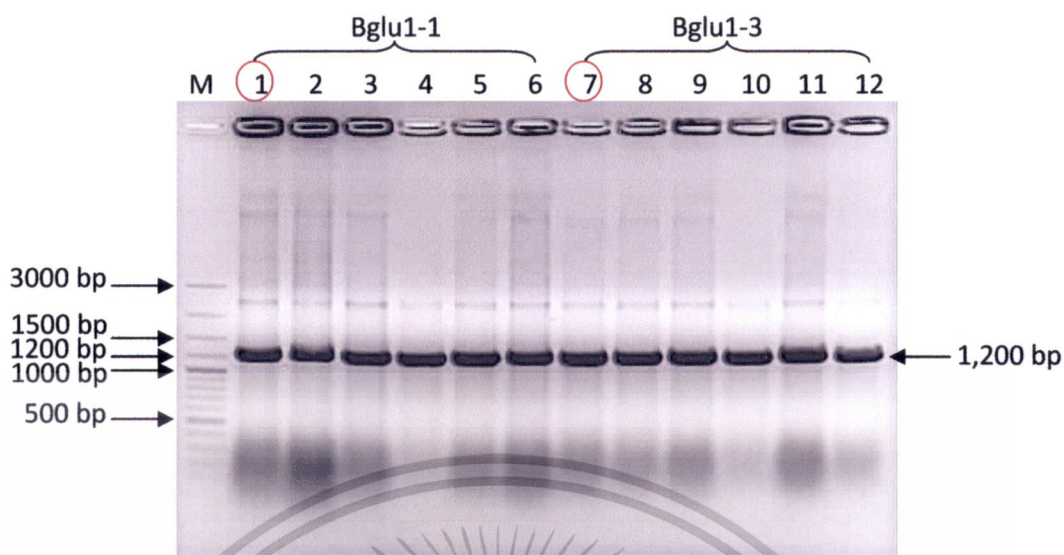
ภาพที่ 4.57 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* โดย Lane M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane U คือ ผลผลิตที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ , Lane C คือ ผลผลิตที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ และ Lane M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.1.2.3 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมลงสู่แบคทีเรียพาหะและการตรวจสอบ

ยีน

นำเวกเตอร์ pET28a(+) และยีน ที่ได้เตรียมจากข้อ 4.5.1.2.2 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 และโคลนลงสู่ competent cell สายพันธุ์ Rosetta(DE3) ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวมี T7 polymerase รองรับการแสดงออกของเวกเตอร์ที่มี T7 promoter และมี tRNA สำหรับ codon ที่มีน้อย (rare codon) โดยใช้วิธี Heat shock (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นนำเซลล์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย คือ อาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin 50 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายมาทำเป็น master plate โดยเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำ master plate ดังกล่าว มาตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากพลาสมิดลูกผสม) โดยใช้ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1F และ ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R เพื่อคัดเลือกโคลนของพลาสมิด Bgluc1-1 และ Bgluc1-3 ที่มีการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28a(+) นำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.58) ทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลปรากฏว่ายีน Bglu1-1 โคลน1 มีความเหมือนกับ conserved hypothetical protein จากแบคทีเรีย *Flavobacterium bacterium* BBFL7 เท่ากับ 30% ในขณะที่ยีน Bglu1-3 โคลน7 มีความเหมือนกับ lacZ alpha peptide (Expression vector pY3N-GFP) เท่ากับ 98% ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 โคลน ไม่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จึงได้ยุติการทดลองการศึกษาการแสดงออกโดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) ไว้เพียงเท่านี้



ภาพที่ 4.58 ผลการตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยาถูกลูโซ่โพลีเมอเรสจากพลาสมิดลูกผสม (colony PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ pET28a-Bglu1F และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R เพื่อคัดเลือกโคลนของพลาสมิด Bgluc1-1 และ Bgluc1-3 ที่มีการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28a(+) โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder, Lane 1-6 คือ ลำดับของโคลนที่เลือกมาทำปฏิกิริยาของยีน Bglu1-1 และ Lane 7-12 คือ ลำดับของโคลนที่เลือกมาทำปฏิกิริยาของยีน Bglu1-3 เลือกโคลนที่วงกลมไว้เพื่อทำการสกัดพลาสมิดแล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ pBAD TOPO[®] TA Expression Kit

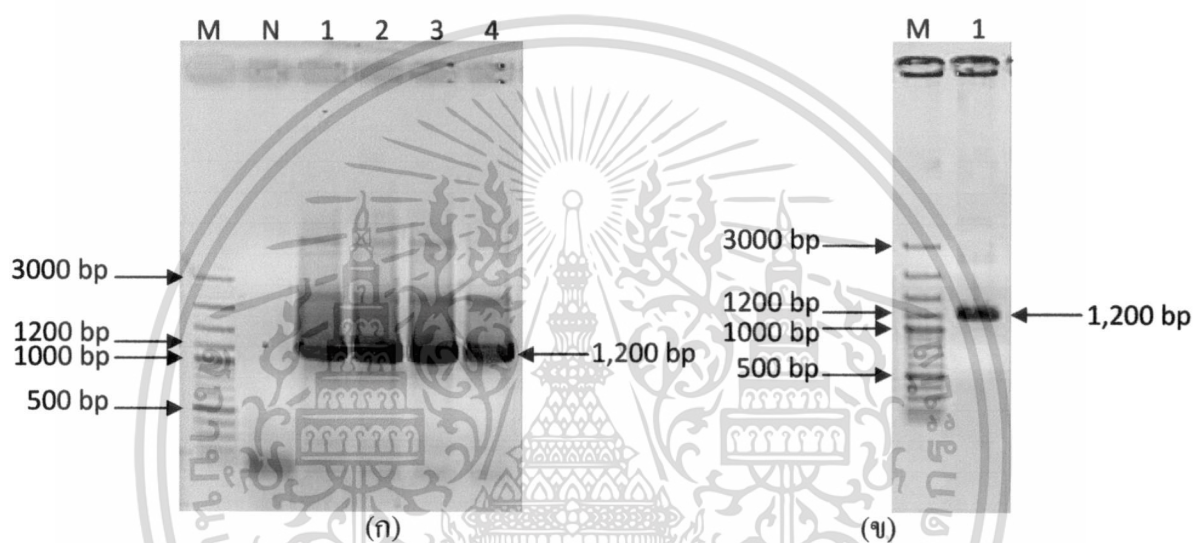
4.5.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ TOP10

4.5.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์

จะใช้ไพรเมอร์เส้น Bgluc1_F1 สำหรับด้าน Forward จากข้อ 4.3.1.1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R จากข้อ 4.5.1.2.1 สำหรับด้าน Reverse ที่ได้เคยออกแบบไว้มาใช้คู่กัน เนื่องจากทั้ง 2 เส้น ได้ออกแบบเพื่อครอบคลุมเส้น partial gene และจะใช้ start codon ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO

4.5.2.1.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณยีนเบต้ากลูโคซิเดสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในขั้นตอนนี้จะใช้พลาสมิดลูกผสม Bglu1-3 ที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 4.3.1.2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยานำมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1.0% (ภาพที่ 4.59 ก) แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ออกจากเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Gel Purification Mini sample Kit (Favorgen®) (ภาพที่ 4.59 ข)



ภาพที่ 4.59 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากพลาสมิดลูกผสมของยีน Bglu 1-3 และทำการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจล

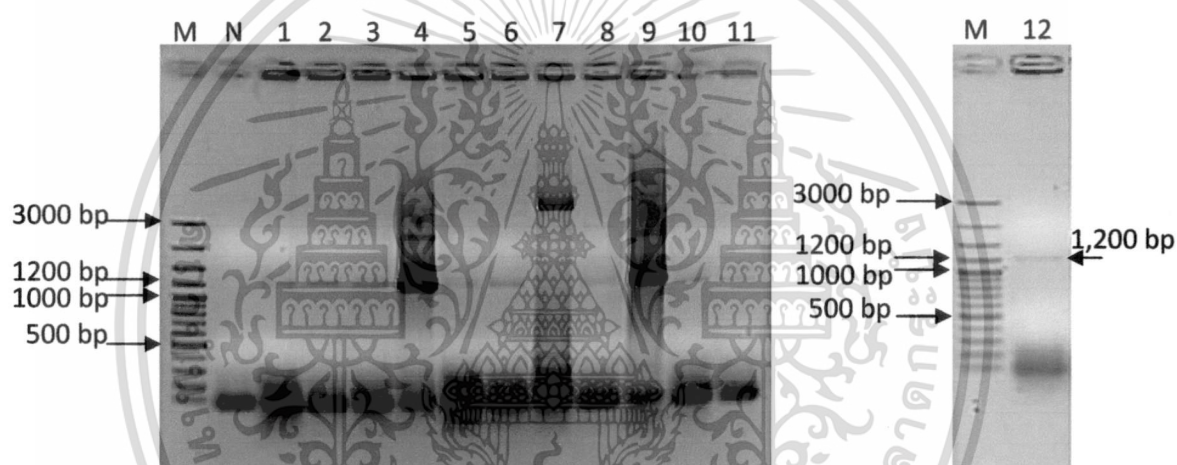
(ก) ผลการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย อะกาโรสเจล 1.0% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control และ Lane 1-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์

(ข) ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder และ Lane 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอที่สกัดได้

4.5.2.1.3 การโคลนชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสลงสู่แบคทีเรียพาหะและคัดเลือกโคลนด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์จากข้อ 4.5.2.1.2 มาเชื่อมต่อเข้ากับ pBAD-TOPO® vector ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์นี้ จะทำที่อุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียส เมื่อเปิดสารครบทุกตัวผสมกันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว เป็นเวลา 5-10 นาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ขึ้นอยู่กับขนาดของยีน) จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ One Shot[®] TOP10 *E.coli* ต่อมาเติม S.O.C. medium แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubate shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 µg/ml เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนี เป้าหมายปรากฏจำนวน 12 โคโลนี จึงได้เก็บเชื้อทั้ง 12 โคลนเป็น master plate จากนั้นทำโคโลนี พีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R เพื่อเช็คนั้นแรกว่ามีชิ้นส่วน ยีนเบต้ากลูโคซิเดส ในดีเอ็นเอสายผสม แล้วนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจล 1.0%(ภาพที่ 4.60) พบว่าจากจำนวนทั้งหมด 12 โคลน มีเพียง 1 โคลน(โคลนที่ 7) เท่านั้นที่ไม่มีการแทรก อยู่ของชิ้นยีนเป้าหมาย



ภาพที่ 4.60 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน Bgluc1-3 ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R พบว่ามีเพียงโคลนที่ 7 เท่านั้นที่ไม่มี การสอดแทรกของชิ้นยีน โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane N คือ negative control และ Lane 1-12 คือ ลำดับของโคลนที่เลือกมาทำปฏิกิริยา

4.5.2.1.4 การตรวจสอบพลาสมิดถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์

นำโคลนทั้ง 11 โคลนของยีน Bgluc1-3 จากข้อ 4.5.2.1.3 มาทำการสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำทั้ง 11 โคลนมาทำการตรวจสอบว่าชิ้นยีนเราที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pBAD-TOPO อย่างถูกต้องทิศทางหรือไม่ (5'→3') โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bgluc1-3 ที่แทรกอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pBAD-TOPO มาหาเอนไซม์ 1 ตัวที่สามารถตัดภายใน ยีนของเรา 1 ตำแหน่ง และสามารถตัดในเวกเตอร์ได้ 1 ตำแหน่ง (ใช้โปรแกรม web cutter2.0) ซึ่ง ได้ทำการเลือกเอนไซม์ *NcoI* จากนั้นทำการคำนวณหาขนาดของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชิ้นที่จะถูกตัดด้วย

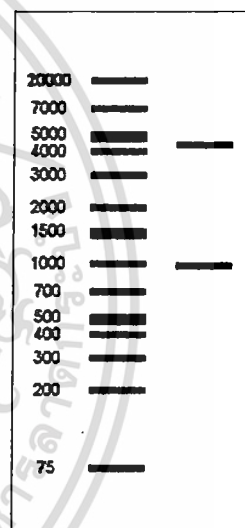
เอนไซม์ดังกล่าว (ใช้โปรแกรม Serial Cloner V2.1) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวจะตัดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 344 และ 1,310 ซึ่งจะได้ชิ้นยีนที่มีขนาด 4,349 bp และ 966 bp (ภาพที่ 4.61) ทำการตัดเอนไซม์ จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในอะกาโรสเจล 1.0% (ภาพที่ 4.62) ซึ่งจากผลการตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* ทำให้ทราบว่ามีเพียง โคลนที่ 4 และ โคลนที่ 9 เท่านั้นที่สามารถแทรกอยู่ในเวกเตอร์อย่างถูกต้องทาง จึงได้นำโคลนที่ 4 และ 9 มาทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8%(ภาพที่ 4.63) จากนั้นทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์(First Base , Malaysia) โดยตั้งชื่อโคลนที่ 4 ว่า Bglu1-3/4 และ โคลนที่ 9 คือ Bglu1-3/9

<Serial Cloner V2.1> -- <18 ก.พ. 2555 18:49>

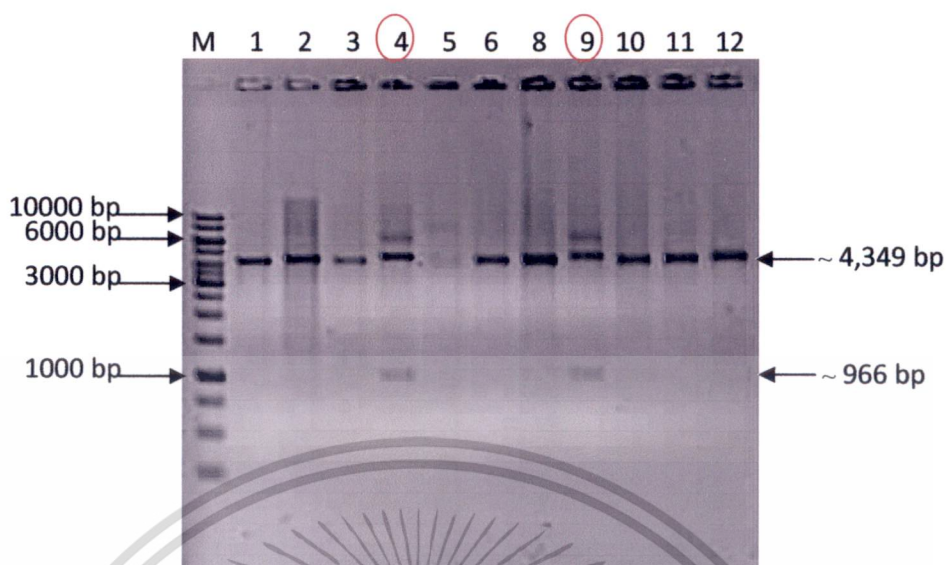
Restriction analysis of pBADtopo+Bglu1_3.txt [Circular]
Incubated with *NcoI*

2 fragments generated.

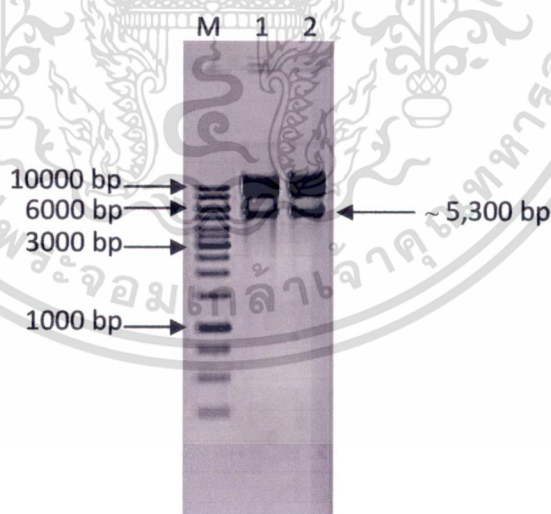
- 1: 4,349 bp - From *NcoI*[1310] To *NcoI*[344]
- 2: 966 bp - From *NcoI*[344] To *NcoI*[1310]



ภาพที่ 4.61 การคำนวณหาขนาดของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชิ้นที่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* โดยใช้โปรแกรม Serial Cloner V2.1



ภาพที่ 4.62 ผลการนำโคลนจำนวน 11 โคลน ซึ่งแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pBAD-TOPO มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในอะกาโรสเจล 1.0% พบว่ามีเพียงโคลนที่ 4 และ โคลนที่ 9 เท่านั้นที่สามารถแทรกอยู่ในเวกเตอร์อย่างถูกต้องทาง โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb ladder และ Lane 1-12 คือ ลำดับของโคลนทั้ง 11 โคลนที่นำมาทำการตรวจสอบ



ภาพที่ 4.63 ผลการสกัดพลาสมิดของโคลนที่ 4 และ 9 เพื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 0.8% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder , Lane 1 คือ พลาสมิดของยีน *Bglu1-3/4* และ Lane 2 คือพลาสมิดของยีน *Bglu1-3/9*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2.1.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสเข้ากับเวกเตอร์ pBAD TOPO

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 โดยได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองยีนมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เดิมของเส้นยีน Bglu1-3 (ด้วยโปรแกรม BioEdit) ทำให้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเส้นยีน Bglu1-3 แต่จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่ตำแหน่งที่แตกต่างออกไป จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทั้งสองยีนเป็นยีนในกลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolase family1 ซึ่งยีน Bglu1-3/4 มีขนาดเท่ากับ 1,257 bp และพบว่ามีค่าความเหมือน (Identities) กับ *Sorangium cellulosum* 'So ce56', *Eubacterium eligens* ATCC 27750, *Cellulosilyticum ruminicola*, *Phycisphaera mikurensis* NBRC 102666 และ *Lentisphaera araneosa* HTCC2155 เท่ากับ 47%, 45%, 45%, 44% และ 44% ตามลำดับ ในขณะที่ยีน Bglu1-3/9 มีขนาดเท่ากับ 1,260 bp มีความเหมือนกับ *Sorangium cellulosum* 'So ce56', *Eubacterium eligens* ATCC 27750, *Cellulosilyticum ruminicola*, *Phycisphaera mikurensis* NBRC 102666 และ *Lentisphaera araneosa* HTCC2155 โดยมีค่าความเหมือน (Identities) เท่ากับ 46%, 45%, 44%, 43% และ 43% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

Accession	Description	Identities	Identities
		Bglu1-3/4	Bglu1-3/9
YP_001618312.1	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	191/406 (47%)	189/407 (46%)
YP_002935811.1	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750	187/415 (45%)	186/416 (45%)
ACZ98664.1	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	183/404 (45%)	180/405 (44%)
YP_005446400.1	<i>Phycisphaera mikurensis</i> NBRC 102666	179/406 (44%)	176/407 (43%)
ZP_01877597.1	<i>Lentisphaera araneosa</i> HTCC2155	177/405 (44%)	174/407 (43%)

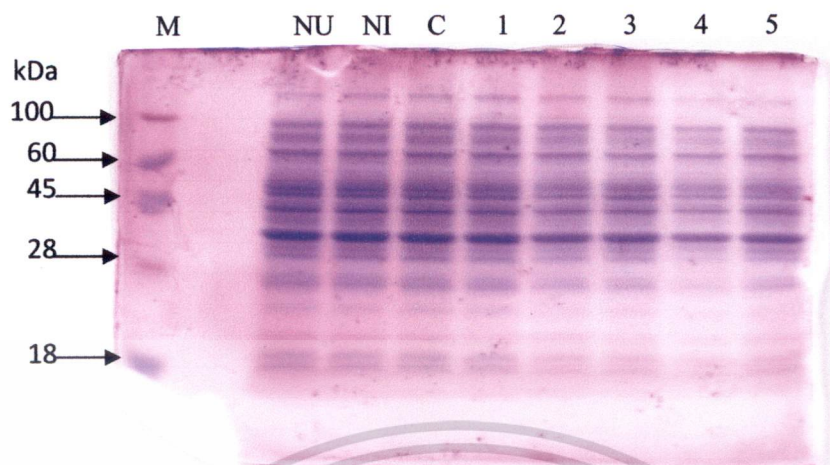
4.5.2.1.6 ผลการตรวจสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

พลาสมิดลูกผสมที่ได้สังเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของยีน Bglu1-3 ไม่พบความแตกต่าง จึงได้นำพลาสมิดลูกผสม Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 มาทำการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีน เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยการเติม L-arabinose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย L-arabinose (0% L-arabinose) ทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งขนาดของโปรตีนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพลาสมิดลูกผสม Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 จะมีขนาดประมาณ 47 kDa โดยส่วนแรกที่ทำมาตรวจสอบเป็นส่วนของ total cell ของพลาสมิดลูกผสม Bglu1-3/4 (ภาพที่ 4.64) และพลาสมิดลูกผสม Bglu1-3/9 (ภาพที่ 4.65) ผลการตรวจสอบการเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดการสร้างโปรตีน แล้วตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเจล SDS-PAGE พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนจากโคลนทั้งสอง



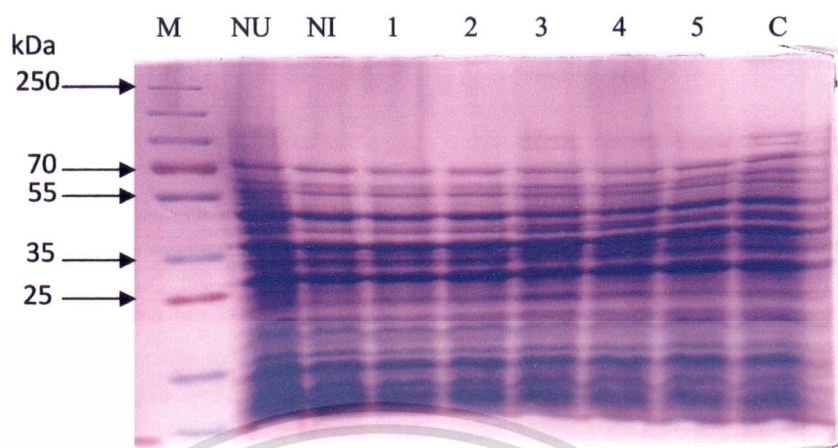
ภาพที่ 4.64 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ total cell ด้วย 12% SDS-PAGE เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.65 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ total cell ด้วย 12% SDS-PAGE เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มี การเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยพบว่าโปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 (ภาพที่ 4.66) และโปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 (ภาพที่ 4.67) ที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top10 ไม่ปรากฏแถบแบนของโปรตีนที่สนใจ ทำการสกัดแยกโปรตีนส่วน soluble และ inclusion protein โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย Lysis buffer และย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI แล้วปั่นแยกส่วนของเหลวซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) และตะกอนซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลาย (inclusion protein) ทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.68 และ 4.69) จากผลการตรวจสอบไม่พบการแสดงออกของโปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 จึงได้ยุติการศึกษาการแสดงออกด้วย pBAD-TOPO[®] vector โดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน One Shot[®] TOP10 *E. coli* เพราะคาดว่าจะเกิดจาก toxic cell จึงจะ得以ทำการย้ายพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 โคลนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host express) *E. coli* LMG194 ต่อไป

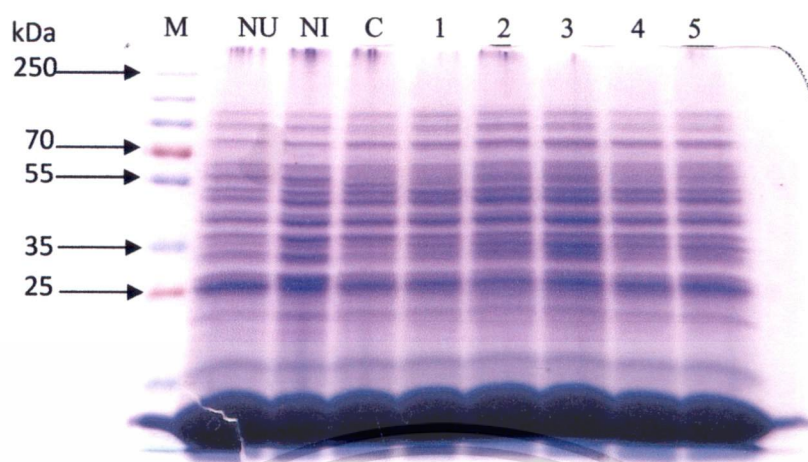


ภาพที่ 4.66 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของตะกอนเซลล์เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 20%, 2% , 0.2% , 0.02% และ 0.002% L-arabinose ตามลำดับ



ภาพที่ 4.67 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของตะกอนเซลล์ เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 20%, 2% , 0.2% , 0.02% และ 0.002% L-arabinose ตามลำดับ และ Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.68 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ soluble โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มี การเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ



ภาพที่ 4.69 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ soluble โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ Top10 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ Top10 ที่มี การเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

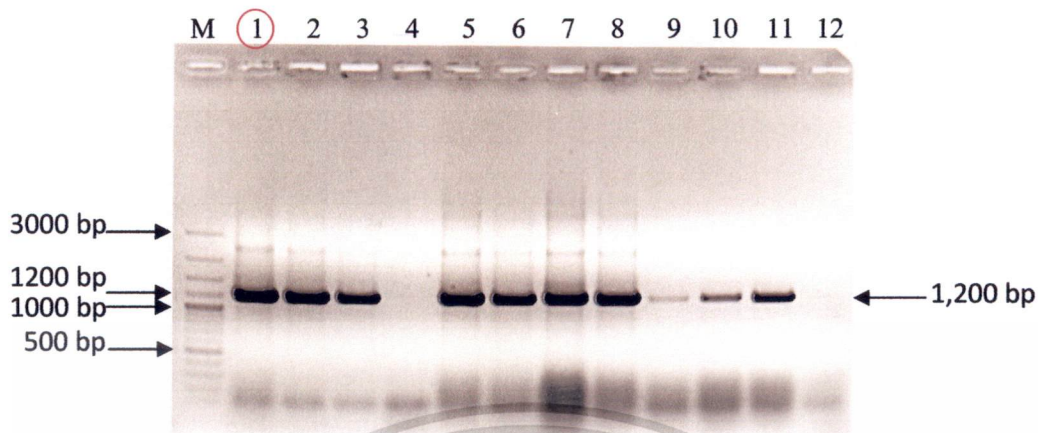
4.5.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสโดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ LMG194 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (competent cell)

4.5.2.2.1 การทรานส์ฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

นำพลาสมิดจากข้อ 4.5.2.1.4 ทั้ง 2 โคลนคือ Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ที่อยู่ในเวกเตอร์ pBAD-TOPO มาทำการทรานส์ฟอร์มอีกครั้ง(Re-transform) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน(host express) LMG194 จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏมาทำเป็น master plate โดยเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ ampicilin 100 $\mu\text{g/ml}$ และ streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R แล้วนำมาเชื้อในเจลอะกาโรส 1.0% พบว่าโคลน Bglu1-3/4 ทุกปฏิกิริยามีการสอดแทรกของยีนเป้าหมายจึงได้สุ่มเลือกโคลนที่ 7 (ภาพที่ 4.70) เพื่อมาทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน ในขณะที่โคลน Bglu1-3/9 (ภาพที่ 4.71) ได้ทำการคัดเลือกโคลนที่ 1 เพื่อมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนต่อไป



ภาพที่ 4.70 ผลการตรวจสอบการทำโคโลนีพีซีอาร์ของ Bglu1-3/4 ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1-12 คือลำดับของโคลนที่เลือกมาทำปฏิกิริยา สัญลักษณ์ที่วงกลมไว้คือโคลนที่ได้สุ่มเลือกเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน

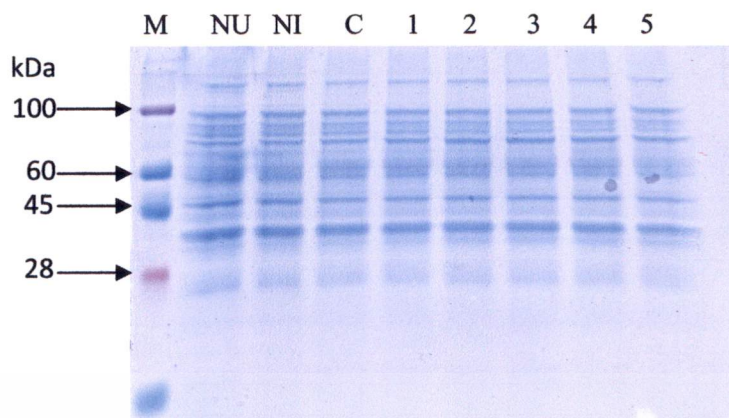


ภาพที่ 4.71 ผลการตรวจสอบการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ Bglu1-3/9 ด้วยไพรเมอร์ Bgluc1_F1 และไพรเมอร์ pET28a-Bglu1R โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder , Lane 1-12 คือลำดับของโคลนที่เลือกมาทำปฏิกิริยา สัญลักษณ์ที่วงกลมไว้คือโคลนที่ได้คัดเลือกเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน

4.5.2.2.2 ผลการตรวจสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี

SDS-PAGE

นำโคลนแต่ละโคลนที่เลือกไว้ดังกล่าวมาเลี้ยง ในอาหาร RM medium +0.2% glucose สำหรับเป็น starter และเลี้ยงในอาหาร RM medium + 0.2%glycerol สำหรับขั้นตอนการเหนี่ยวนำ(Induce) โดยได้ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ L-arabinose สำหรับการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ตั้งแต่ 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% โดยเปรียบเทียบกับ Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำ (0% L-arabinose) และ LMG194 ที่ทำการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose กับ LMG194 ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำ (0% L-arabinose) ซึ่งหลังจากเหนี่ยวนำครบ 4 ชั่วโมงได้แบ่งนำส่วนที่เป็น total cell มาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีน พบว่าในยีนBglu1-3/4 (ภาพที่ 4.72) และ Bglu1-3/9 (ภาพที่ 4.73) ไม่ปรากฏแถบของโปรตีน จากนั้นนำปฏิกิริยามาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอนของ Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 มาทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.74 และ 4.75 ตามลำดับ) จากการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวยังไม่ปรากฏการแสดงออกของโปรตีน

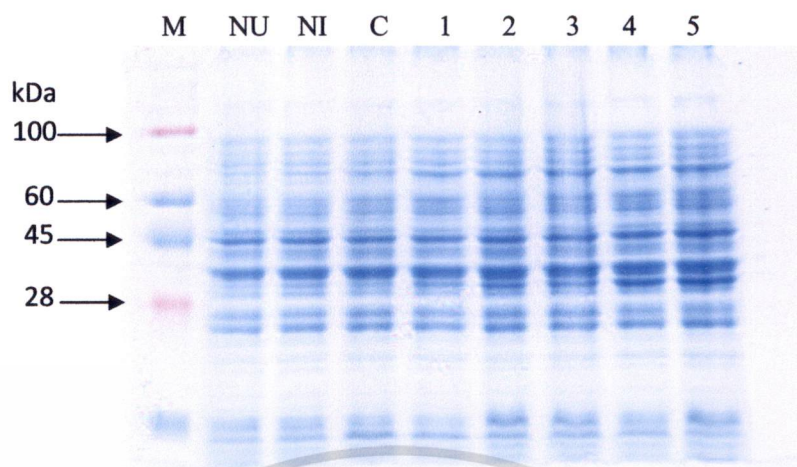


ภาพที่ 4.72 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของ total cell โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ



ภาพที่ 4.73 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของ total cell โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



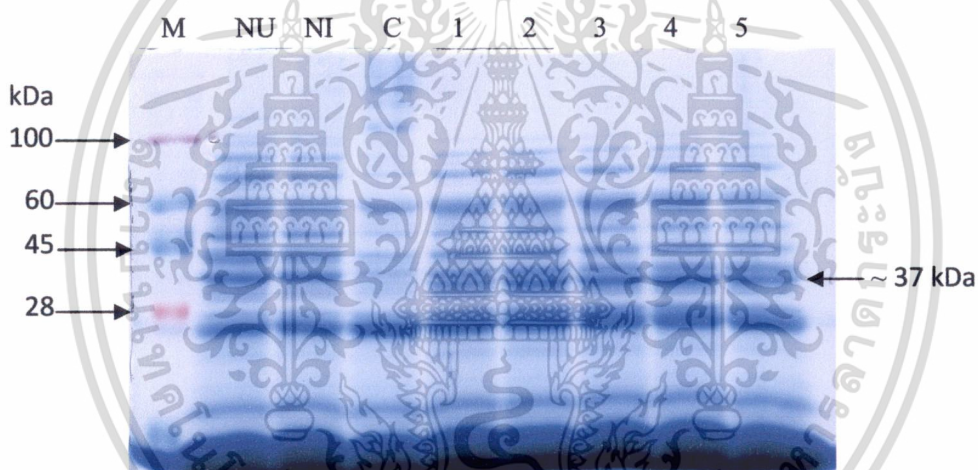
ภาพที่ 4.74 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/4 ในส่วนของตะกอนเซลล์ โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ



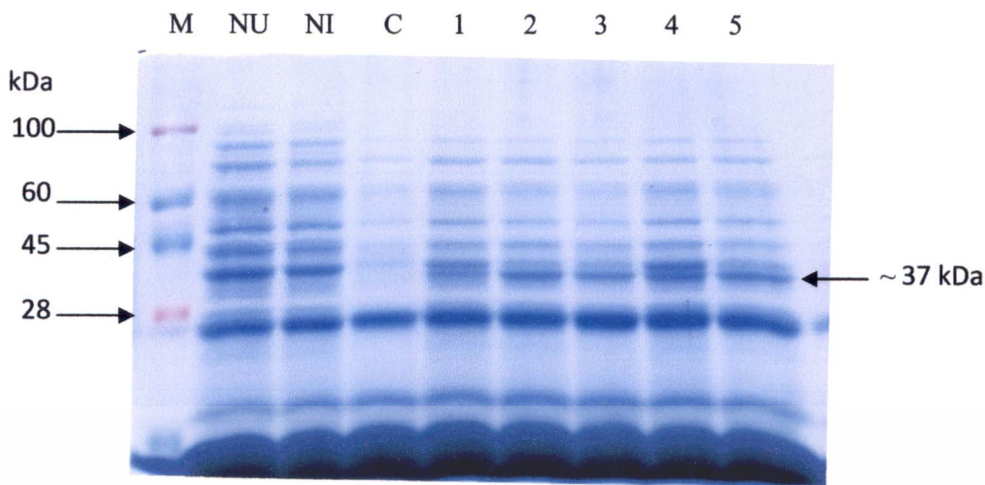
ภาพที่ 4.75 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน Bglu1-3/9 ในส่วนของตะกอนเซลล์ โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงได้นำโคลน Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ที่อยู่ใน LMG194 มาทำการสกัดแยกโปรตีนส่วน soluble และ inclusion protein โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย Lysis buffer และย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI แล้วปั่นแยกส่วนของเหลวซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) และตะกอนซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลาย (inclusion protein) นำมาทำการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) ที่ได้จาก Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.76 และ 4.77 ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลาย (inclusion protein) ที่ได้จาก Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.78 และ 4.79 ตามลำดับ) พบว่าโปรตีนที่ได้จาก Bglu1-3/4 และ Bglu1-3/9 เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) และยังพบว่าโปรตีนถูกผสมที่พบมีขนาดเล็กกว่าขนาดที่ประมาณการไว้คือ 47 kDa ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีเอนไซม์ไปย่อยโปรตีนทำให้มันมีขนาดสั้นลง



ภาพที่ 4.76 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/4 ในส่วนที่เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

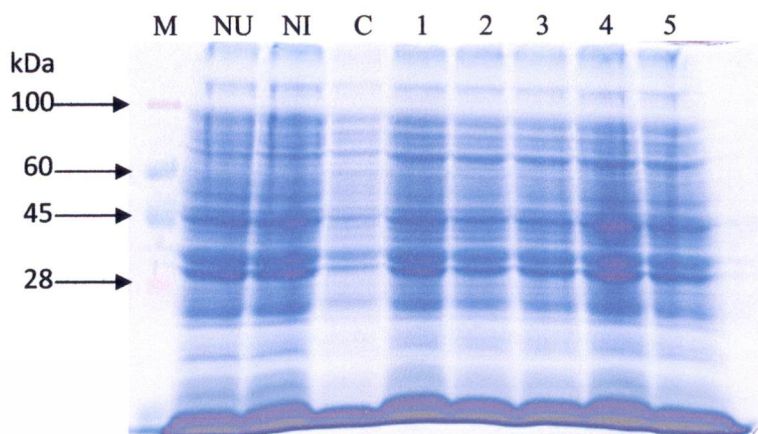


ภาพที่ 4.77 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/9 ในส่วนที่เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ



ภาพที่ 4.78 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/4 ในส่วนของโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion protein) โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/4 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.79 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจาก Bglu1-3/9 ในส่วนของโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion protein) โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pre-stained Protein Marker (Dual Colour), Lane NU คือ LMG194 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane NI คือ LMG194 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose , Lane C คือ Bglu1-3/9 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย L-arabinose , Lane 1-5 คือ Bglu1-3/9 ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.002% , 0.02% , 0.2% , 2% และ 20% L-arabinose ตามลำดับ

4.6 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

4.6.1 การทดสอบการย่อย 4 or *p*-Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (*p*NPG)

ในการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ คัดแปลงวิธีจาก Jiong *et al.* (2007) โดยจะใช้ 4 or *p*-Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (*p*NPG) เป็นซับสเตรตจำเพาะของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในการทดสอบ เปรียบเทียบกับ *p*-Nitrophenol ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm (ภาคผนวก ค) พบว่าจากการนำเอนไซม์จากทั้ง 10 โคลนของ Bglu1-3/4 และ 10 โคลนของ Bglu1-3/9 มาทดสอบหาคุณสมบัติของเอนไซม์ในการย่อยซับสเตรต คือ 4 or *p*-Nitrophenol β -D-Glucopyranoside (*p*NPG) เอนไซม์ในแต่ละโคลนมีความสามารถในการย่อยซับสเตรตได้แตกต่างกัน ซึ่งค่าที่วัดได้ดีที่สุดได้จาก Bglu1-3/4 clone4 ที่เหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose สามารถวัดค่า OD405 nm โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.152 ในขณะที่ Bglu1-3/9 clone2 ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย 2% L-arabinose สามารถวัดค่า OD405 nm โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.304 จึงได้เลือกเอนไซม์จาก Bglu1-3/9 โคลน 2 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดมาทำการศึกษาเพื่อหาค่ากรด-ด่าง , อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

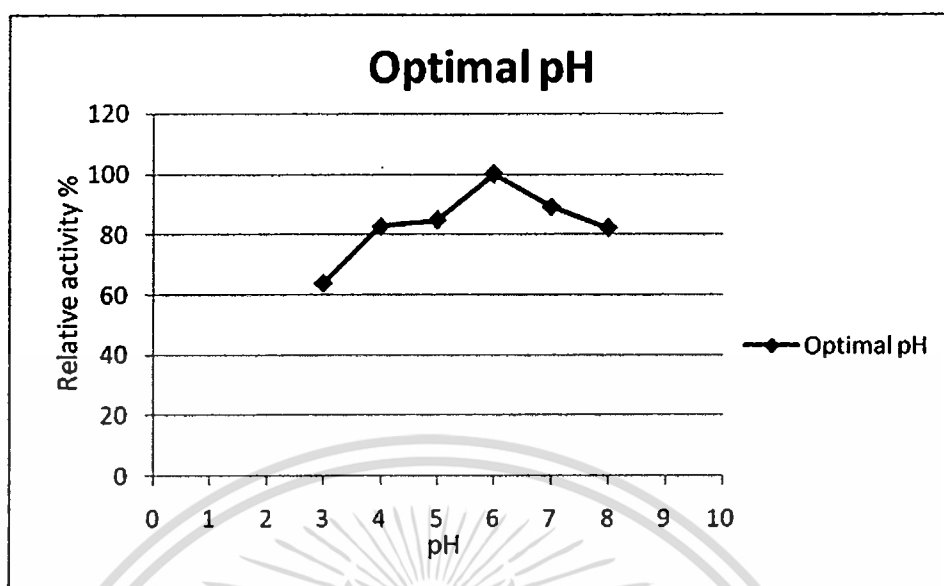
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH)

นำเอนไซม์จาก Bglu1-3/9 clone 2 ซึ่งพบว่ามีค่ากิจกรรมสูงสุดจากข้อ 4.6.1 มาทำการวิเคราะห์หาค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเริ่มพิจารณาตั้งค่า pH 3-8 โดยละลายซับสเตรต 5mM *p*NPG ในสารละลาย pH 3-6 จะใช้ sodium acetate buffer ที่ความเข้มข้น 0.2 M และ pH 7 และ 8 จะใช้ sodium phosphate buffer ที่ความเข้มข้น 0.2 M จากนั้นจึงทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดตามปฏิกิริยาดังข้อ 4.9.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาตรีควิซที่ได้เปรียบเทียบกับ *p*-Nitrophenol มาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ตารางที่ 4.4) พบว่าการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ค่า pH 6.0 นาน 20 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุด เท่ากับ 47.51 U/mg protein รองลงมา คือ ค่า pH ที่ 7.0 เท่ากับ 42.40 U/mg protein หรือ 89%

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ค่าความเป็นกรดด่าง	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/mg protein)	Relative activity (%)
3	30.43 ±0.068	64
4	39.30 ±0.034	83
5	40.26 ±0.028	85
6	47.51 ±0.135	100
7	42.40 ±0.012	89
8	39.02 ±0.088	82



ภาพที่ 4.80 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

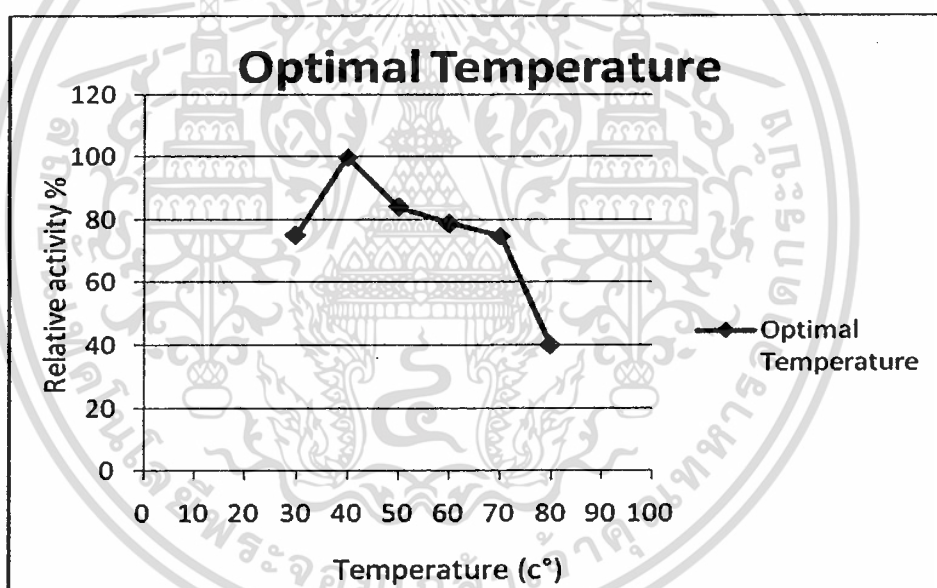
4.6.3 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature)

หลังจากวิเคราะห์ค่ากรด-ด่าง ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้ดีที่สุดแล้ว จึงทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรตจะแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบตามวิธีการในข้อ 4.9.1 เพื่อวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (ตารางที่ 4.5) ผลการวิเคราะห์การบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ เพราะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุด เท่ากับ 47.77 U/mg protein รองลงมา คืออุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 40.13 U/mg protein หรือ 84%

ขณะที่บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ยังคงมีค่าสูงถึง 75% เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ยังคงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่า 70% ในขณะที่ทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสลดลงเหลือเพียง 40%

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ค่าอุณหภูมิในการป่ม(°C)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/mg protein)	Relative activity (%)
30	35.83 ±0.039	75
40	47.77 ±0.164	100
50	40.13 ±0.066	84
60	37.64 ±0.092	79
70	35.70 ±0.062	75
80	19.11 ±0.073	40



ภาพที่ 4.81 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

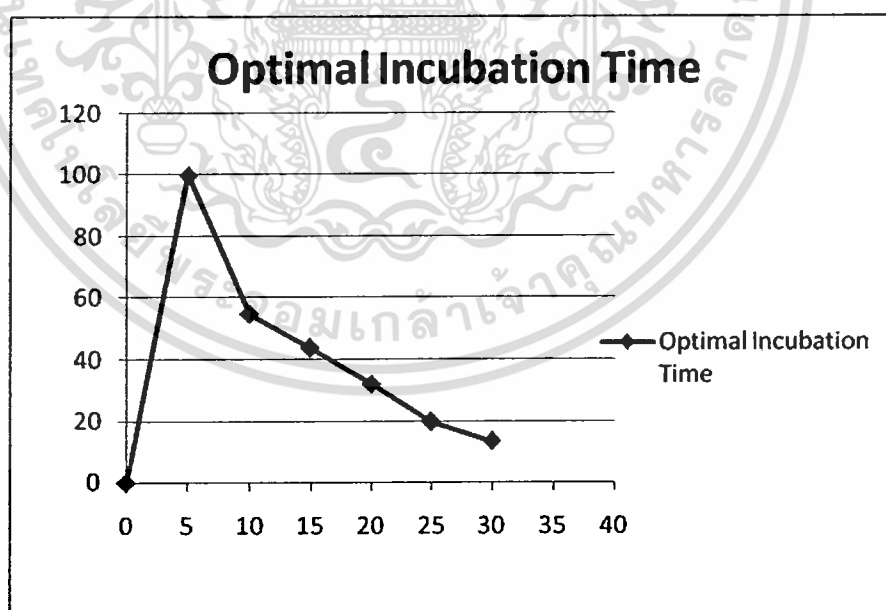
4.6.4 การวิเคราะห์ค่าเวลาที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (optimal time)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ เพื่อหาเวลาที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทดสอบด้วยซับสเตรต 5mM *p*NPG ในสารละลาย 0.2M NaOAc pH 6.0 โดยทดสอบที่เวลาแตกต่างกันที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ โดยใช้ pH 6 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่า pH และอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับ *p*-Nitrophenol มาตรฐาน เมื่อกำหนดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ตารางที่ 4.6) พบว่าเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 5 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุด เท่ากับ 47.31 U/mg protein จากนั้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดน้อยลงตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

เวลาในการบ่ม (minutes)	Reducing sugar (μ mole)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (U/mg protein)	Relative activity (%)
0	1.504	0 \pm 0.019	0
5	1.729	47.31 \pm 0.022	100
10	1.888	25.83 \pm 0.009	55
15	2.265	20.66 \pm 0.050	44
20	2.220	15.18 \pm 0.019	32
25	1.707	9.34 \pm 0.043	20
30	1.371	6.25 \pm 0.012	13



ภาพที่ 4.82 กราฟแสดงค่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ศึกษาการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จาก กระเพาะหมักของกระบือ พบว่าผลการดึงชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส โดยใช้ degenerate primer ที่ ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 1 (GH1) สามารถคัดแยก ได้ 2 โคลนคือ โคลน Bglu1-1 มีขนาด 1,179 คู่เบส และโคลน Bglu1-3 มีขนาด 1,189 คู่เบส ซึ่ง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 ไปทำการแปลรหัสและเปรียบเทียบกับ ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastx พบว่า โคลน Bglu1-1 มีค่าความเหมือน (identity) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่คัดแยกมาจากเชื้อ แบคทีเรีย *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 (ACI19973) เท่ากับ 45% ขณะที่โคลน Bglu1-3 มี ค่าความเหมือน (identity) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่คัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Sorangium cellulosum* 'So ce 56' (CAN97832) เท่ากับ 45% และจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของทั้ง สองโคลน กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วย โปรแกรม ClustalW2 พบว่าทั้งสองโคลนมีตำแหน่งอนุรักษ์ (consensus region) ของกรดอะมิโนใน กลุ่มของยีนเบต้ากลูโคซิเดส GH 1 จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) คือ [LIVMFSTC] - [LIVFYS] - [LIV] - [LIVMST] - E - N - G - [LIVMFAR] - [CSAGN] จึงสามารถยืนยันได้ว่าโคลน Bglu1-1 และ Bglu1-3 เป็นยีนในกลุ่มเบต้ากลูโคซิเดส GH1

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสโดยใช้ GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA) พบว่าการหาส่วนต่อของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 ทางด้าน 5'upstream ปรากฏมีเฉพาะ โคลน Bglu1_3up36 เท่านั้นที่สามารถรวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน Bglu1-3 (partial gene) แล้วเกิด overlap กันขึ้น และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเปรียบเทียบ ความเหมือนกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม blastx จะพบว่ามีค่าความเหมือน (identities) กับ *Sorangium cellulosum* So ce 56 (CAN97832) 197/414 เท่ากับ 48% ในขณะที่การหาส่วนต่อของ ยีน Bglu1-3 ทางด้าน 3'downstream พบว่าโคลน Bglu1-3_Dw1 สามารถนำมาเชื่อมต่อกับลำดับนิว คลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้ในขั้นตอนแรก รวมเป็นยีน Bglu1-3_FL1 และเมื่อ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล พบว่ายีนมีขนาดเท่ากับ 1,605 bp และมีความเหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family1 โดยพบว่ามีค่าความ เหมือน (identities) กับ *Cellulosilyticum ruminicola* เท่ากับ 82% และเมื่อนำยีนมาทำการแปลรหัส เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีนมีขนาด 534 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน Bglu1-3_FL1 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolase family 1 และพบตำแหน่งจุดเริ่มต้นของยีน (start codon) และจุดสิ้นสุดของยีน (stop codon) นอกจากนี้ยังพบบริเวณ consensus region ของ glycoside hydrolase family1 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Pfam ทำให้พบบริเวณที่เป็นตำแหน่ง catalytic domain อยู่ที่ตำแหน่ง 86-532 จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม signalP 3.0 พบตำแหน่งอะมิโนที่เป็น signal peptide ตั้งแต่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 38 และส่วนที่เป็น cleavage site มีตำแหน่งอยู่ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 38 and 39: ASA-SS

และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนส่วนยีนเบต้ากลูโคซิเดส Bglu1-3/9 โดยใช้ pBAD TOPO® TA Expression Kit ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ LMG194 เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 40°C แต่เมื่อทำการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์พบว่าใช้เวลา 5 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุด เท่ากับ 47.31 U/mg protein จากนั้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดน้อยลง และแม้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือจะมีค่ากิจกรรมที่ค่อนข้างน้อยเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักมีหลายชนิด และเอนไซม์ดังกล่าวต้องอาศัยการทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบของเอนไซม์ชนิดอื่น ดังนั้นจึงมีการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดในปริมาณที่ไม่มาก แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่เกิดขึ้นในการวิจัย มีค่ามากกว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Piptoporus betulinus* และ *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 19 U/mg protein และ 33 U/mg protein ตามลำดับ (Valaskova และ Baldrian, 2006) และ (Lyman, 1995) แต่มีค่าน้อยกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Penicillium pinophilum* ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส อยู่ที่ 83 U/mg protein (Ah-Reum Joo et al. 2010)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถทำการคัดแยกยีนเบต้ากลูโคซิเดส จากแบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ในกระเพาะหมักของกระบือได้ และจากการค้นคว้าวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่พบการรายงานการคัดแยกยีนดังกล่าวจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือมาก่อน จึงเชื่อว่างานวิจัยในครั้งนี้ น่าจะมีประโยชน์เป็นอย่างยิ่ง ในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอล รวมถึงนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น และควรมีการศึกษาวิจัยนี้ต่อไป เนื่องจากในธรรมชาติ การย่อยสลายเซลลูโลส ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของหลายเอนไซม์ (cellulase complex) การค้นหาเอนไซม์ใหม่ๆ จึงเป็นการสร้างระบบเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมในแต่ละอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- มานิสานุกา. 2555. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสและไซแลนเนสจากกระเพาะหมักของกระบือ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 95 น.
- ศรันยา สติตมันวิวัฒน์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 81 น.
- Ah-Reum, Joo., Marimuthu, Jeya., Kyoung-Mi, Lee., Kyoung-Min, Lee., Hee-Jung, Moon., Yeong-Suk, Kim. And Jung-Kul, Lee. 2010. "Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*". **Process Biochem.** 45: 851-858
- Ajisaka, K., Nishida, H. and Fujimoto, H. 1987. "The synthesis of oligosaccharides by the reversed hydrolysis reaction of β -glucosidase at high substrate concentration and at high temperature". **Biotechnol. Lett.** 9: 243-248.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215 (3): 403-410.
- Anonymous. 2010. "Cellulase". [Online] Available: <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm>. [cited 18/3/2010; 11:35 EST].
- Anonymous. 2012a. "Cellulose". [Online] Available: www.learners.in.th/media/file/83293. [cited 10/2/2012; 15:35 EST].
- Atalla, R.H. and VanderHart, D.L. 1984. "Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms". **Science.** 223:283-285.
- Barrett, T., Suresh, G.C., Tolly, S., Dodson, E. and Hughes, M. 1995. "The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase". **Structure** 3: 951-960.
- Bhat, M.K. 2000. "Cellulases and related enzymes in biotechnology". **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.
- Boons, G. 1996. Synthetic oligosaccharides: recent advances. **Res. Foc.** 1: 331-342.

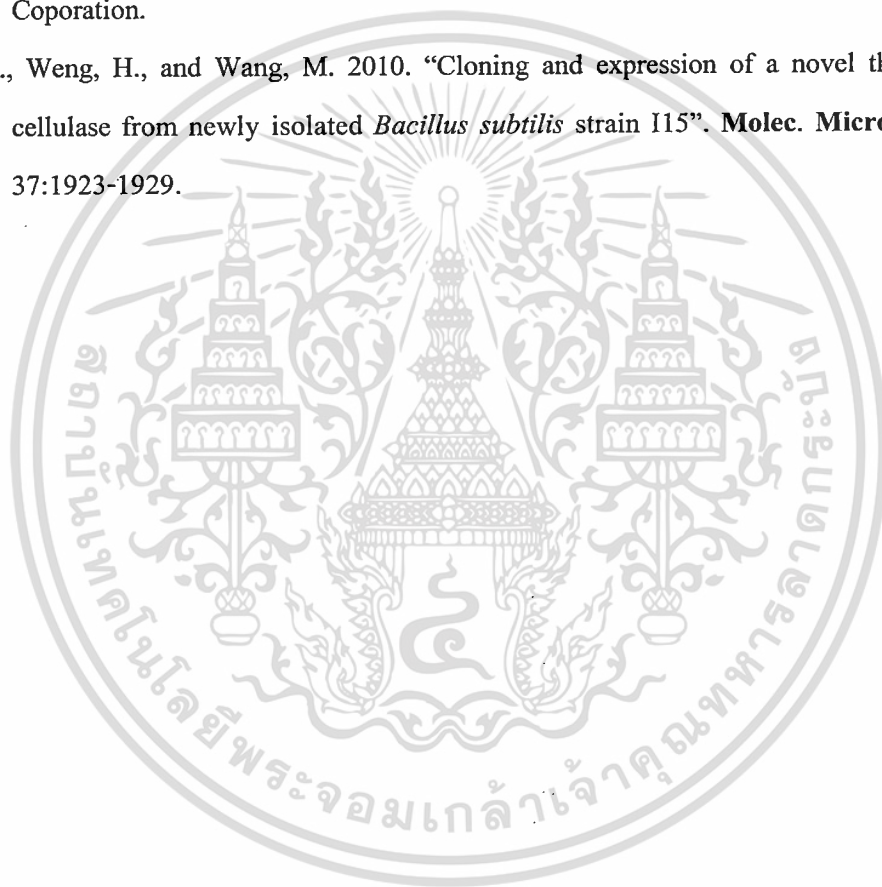
- Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Liebold, B.W., Thiede, B. and Svasti, J. 2000. "Sequence and expression of thai rosewood β -glucosidase/ β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein". **J. Biochem.** 128: 999-1003.
- Cicek, M., Blanchard, D., Bevan, D.R. and Esen, A. 2000. "The aglycone specificity-determining site are different in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize β -glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -glucosidase)". **J. Biol. Chem.** 275: 20002-20011.
- Clontech Laboratories. 2007. "GenomeWalker™ Universal Kit User Manual." [Online]. Available : <http://www.clontech.com>. [cited 12/3/2013; 13:20 EST].
- Daniel, C., Grange, I., Haan, R., Willem, H. and Zyl, V. 2010. "Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 87: 1195-1208.
- David, L., Zechel, and Stephen, W.G. 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18.
- Eksittikul, T. and Chulavatnatol, M. 1988. "Characterization of cyanogenic b-glucoside (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)". **Arch. Biochem. Biophys.** 266: 263-269.
- Esen, A. 1993. β -glucosidase: overview. "In β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology". **ACS Symp. Ser.** 1-14.
- Franks, N.E., Bazewicz, S.E. and Holm, H.C. 1996. "Used of monocomponent cellulose for removing inks, coating and toners from printed paper". **Us Pat 5525193**.
- Guo, H., Feng, Y., Mo, X., Duan, C., Tang, J. and Feng, J. 2008. "Cloning and expression of a beta-glucosidase gene umcel3G from metagenome of buffalo rumen and characterization of the translated product." **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.** 24(2): 232-238.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.** 41: 95-98.
- Hewitt, M.C. and Seeberger, P.H. 2001. Solution and solid-support synthesis of a potential leishmaniasis carbohydrate vaccine **J. Org. Chem.** 66: 4233-4243.
- Hommalai, G., Chaiyen, P. and Svasti, J. 2005. "Studies on the transglucosylation reactions of Cassava and Thai reosewood β -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates". **Arch. Biochem. Biophys.** 442: 11-20.

- Howard, G.T. and White, B.A. 1998. "Molecular cloning and expression of cellulose gene from *Ruminococcus albus*8 in *Escherichia coli* bacteriophage λ ." **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1752-1755.
- Cloning, Heterologous Expression, and Biochemical Characterization". **J. Microbiol.** 48(3): 318-324.
- Hughes, M.A. 1993 Molecular genetic of plant cyanogenic β -glucosidases, In A Esen,ed. β -glucosidases Biochemistry and Molecular Biology. **Am. Chem. Soc.**153-169.
- Huo, Y., Wang, T., Long, H. and Zhu, H. 2007. "Cloning, Sequencing and expression analysis of the first cellulose gene encoding cellobiohydrolase 1 from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010". **Acta. Biochem. Biophys. Sin.** 39: 101-107.
- Henrissat, B. and Davies, G.J. 1997. "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases". **Curr. Op. Struct. Biol.** 7: 637-644.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., 1990. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". **Gene.** 96:23-28.
- IUBMB. 2004. "Enzyme Nomenclature. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Online available: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>. Citation on 20 March 2012.
- Jana, S. and Deb, J.K. 2005. "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Mini-review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 289-298.
- Jiong, H., Hisanori, T. and Hidehiko, K. 2007. "Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 73: 1331-1339.
- Kanokratana, P.S. Chanapan, K., Pootanakip and L, Eurwilaichitr. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archea in the Bor Khueng hot spring in Thailand. **J. Basic. Microbiol.** 44: 430-444.
- Keresztesy, Z., Brown, K., Dunn, M.A. and Hughes, M.A. 2001. "Identification of essential active site residues in cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis". **Biochem. J.** 353: 199-205.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0, **Bioinformatics.** 23(21): 2947-2948.

- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M. and Chen Y.L. 2008. "Cloning of a Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated *Bacillus subtilis* and its Expression in *Escherichia coli*. **Mol. Biotechnol.** 40: 195-201.
- Li, W., Huan, X., Zhou, Y., Ma, Q. and Chen, Y. 2009. "Simultaneous cloning and expression of two cellulose genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*)". **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 383: 397-400.
- Lirdprapamongkol, K. and Svasti, J. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 22: 1889-1994.
- Liu, W., Wang, F., Li, F. and Chen, G. 2008. "Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches". **Microbiol Res.** 164:650-657.
- Liu, L., Feng, Y., Duan, C.J., Pang, H., Tang, J.L. and Feng, J.X. 2009. "Isolation of a gene encoding endoglucanase activity from uncultured microorganisms in buffalo rumen". **Microbiol Biotechnol.** 25:1035-1042.
- Liu, J.M., Xin, X.J., Li, C.X., Xu, J.H. and Bao, J. 2011. "Cloning of Thermostable Cellulase Genes of *Clostridium thermocellum* and Their Secretive Expression in *Bacillus subtilis*". **Appl. Biochem. Biotechnol.** 166: 652-662.
- Lymar, E.S. and Li, B. 1995. "Renganathan V. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2976-2980.
- Naumoff, D.G. 2011. "Hierarchical classification of glycoside hydrolases". Review. **Biochemistry (Moscow).** 76(6): 622-635.
- Opassiri, R., Ketudat-Cairns, J.R., Akiyama, T., Wara-Aswapati, O., Svasti, J. and Esen, A. 2003. "Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot". **Plant Sci.** 165: 627-638.
- Palczic, M.M. 1999. Biocatalytic synthesis of oligosaccharide. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 616-624.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.**
- Slater, B.E.C. 2005. "IUB and IUBMB". **IUBMB Life.** 57:379-380.
- Srisomsap, C., Svasti, J., Surarit, R., Champattanachai, V., Boonpuan, K., Sawangaretrakul, P., Subhasitanont, P. and Chockchaichamnankit, D. 1996. "Isolation and characterization

- of and enzyme with β -D-glucosidase/ β -D-fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre". **J. Biochem.** 119: 585-590
- Srisomsap, C., Subhasitanont, P., Techasakul, S., Surarit, R. and Svasti, J. 1999. Synthesis of homo-and hetero-oligosaccharides by thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 21: 947-951.
- Surarit, R., Svasti, J., Srisomsap, C., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P. and Benjavongkulchai, E. 1995. "Screening of glycohydrolase enzyme in Thai plant seeds for potential use in oligosaccharide synthesis". **J. Sci. Soc. Thailand.** 21: 293-303.
- Svasti, J., Srisomsap, C., Techasakul, S. and Surarit, R. 1999. "Dalcochinin-8'-0- β -D-glucoside and its β -Glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*". **Phytochemistry** 50:739-743.
- Svasti, J., Phongsak, T. and Santhima, R. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassava β -glucosidase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 305: 470-475.
- 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.
- Tajima, K., Nakajima, K., Yamashita, H., Shiba, T., Munekata, M. and Takai, M. 2001. "Cloning and Sequencing of the Beta-glucosidase Gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769". **DNA Research.** 8:263-269.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol.** 24: 1596-1599.
- Tomomatsu, H. 1994. Health Effects of Oligosaccharides. **Food Tech.** 48: 61-65.
- Valaskova, V. and Baldrian, P. 2006. "Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases". **Microbiol.** 152: 3613-3622.
- Waegeman, H. and Soetaert, W. 2011. "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering". **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 38: 1891-1910.

- Wang, L., Xiajuan, H., Ying, Z., Qingyi, M. and Yulin, C. 2009. "Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*)". **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 383: 397-400.
- Westers, L., Westers, H. and Quax, W.J. 2004. "*Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism". **Acta Biochim Biophys Sin.** 1694: 299-310.
- Wike, C.R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D. and Wong, H. 1983. "Enzymatic hydrolysis of cellulose". Park Ride, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.
- Yang, D., Weng, H., and Wang, M. 2010. "Cloning and expression of a novel thermastable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15". **Molec. Microbiol. Rep.** 37:1923-1929.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย อากาศเลี้ยงเชื้อและแผ่นที่เวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมสารละลาย

1) 50X TAE buffer (Tris-acetate)

242 g	Tris-borate
57.1 ml	Acetic acid
100 ml	EDTA (pH8.0)

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1 ลิตร

2) 6X loading buffer

0.25%	Bromopheno blue
30%	Glycerol

3) Ethidium bromide 0.5ug/ml

ละลาย 0.5 mg Ethidium bromide ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ml เก็บใบขวดสีน้ำตาล (เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียมสารละลาย)

4) TB buffer ที่ใช้สำหรับการเตรียม competent cell

10 mM	PIPES
55 mM	MnCl ₂
15 mM	CaCl ₂
250 mM	KCl

5) Alkaline lysis I ใช้สำหรับสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl (pH8.0)
10 mM	EDTA (pH8.0)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) Alkaline lysis II ใช้สำหรับสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

0.2 N	NaOH
1%	SDS

7) 1M Isopropyl-B-D- thiogalactoside (IPTG)

เตรียม Stock IPTG โดยละลาย 2 g IPTG ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 8 ml เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย filter ขนาด 0.22 μ M เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

8) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

ละลาย 20 mg X-gal ใน Dimethylformamide 400 μ l แล้วเก็บในหลอดที่กันแสง เก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9) Lysis buffer

140 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

1.8 mM KH_2PO_4

pH 7.3 เติม 1 mM PMSF ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Luria-Bertani broth (LB Broth)

10 g Tryptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) Luria-Bertani broth (LB Broth)

10 g Tryptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

15 g Agar

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3) SOB media

2%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร หนึ่งฝา
เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1) Ampicilin 100 mg/ml

2) Kanamycin 50 mg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กรองด้วย filter ขนาด 0.22 μ m เก็บที่
-20 องศาเซลเซียส

3) Chloramphenicol 34 mg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยเอทานอล เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4) Tetracycline 5mg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วย 70%เอทานอล เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสง)

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1) 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 Mercaptoneethanol
0.2 ml	1% Bromophenol blue

2) 10x protein running buffer (1 ลิตร)

30 g	Tris-base
144 g	Glycine
10 g	SDS

3) Destaining buffer (1 ลิตร)

100 ml	Methanol
100 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

4) Coomassie Brilliant Blue stain (2 ลิตร)

2 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
1L	Methanol
200 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

5) 10% Ammonium persulfate

ละลาย 100 mg Ammonium persulfate ในน้ำกลั่น 1 ml

6) การเตรียมเจลเพื่อทำ SDS-PAGE

เจลมี 2 แบบ คือ 12% separating และ 4% stacking ในการเตรียมเจลทั้ง 2 แบบ

ตารางภาคผนวก ก1 การเตรียม polyacrylamide gel

ส่วนประกอบ	12% Separating gel	4% Stacking gel
น้ำกลั่น	2 ml	1.5 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	625 μ l
10% SDS	60 μ l	25 μ l
30% Acrylamide	2.4 ml	334 μ l
10% Ammonium persulfate	30 μ l	15 μ l
TeMED	5 μ l	5 μ l

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3-6

- 0.2M acetic acid
- 0.2M sodium acetate (tri-hydrate) (27.2 g / l)
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางภาคผนวก ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate

pH	0.2M acetic acid	0.2M sodium acetate
3	982.3 ml	17.7 ml
4	847.0 ml	153.0 ml
5	357.0 ml	643.0 ml
6	52.2 ml	947.8 ml

2) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 7-8

- 0.2M disodium hydrogen phosphate (28.4 g / l)
- 0.2M HCl
- 0.2M NaOH
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

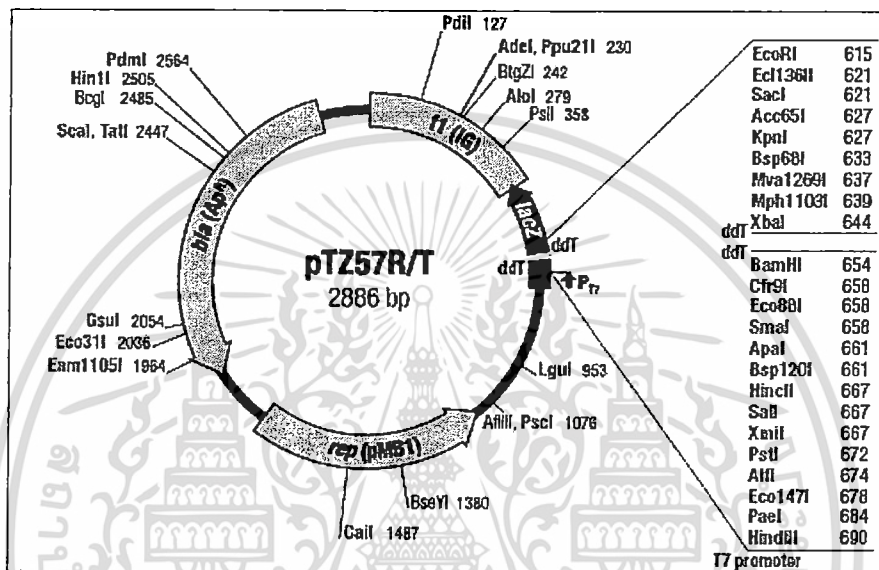
ตารางภาคผนวก ก3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate

pH	0.2M disodium phosphate	0.2M HCl	0.2M NaOH
7	756.0 ml	244 ml	
8	955.1 ml	44.9 ml	
9	955.0 ml	45.0 ml	
10	966.4 ml		33.6 ml
11	965.3 ml		34.7 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. แผนที่เวกเตอร์

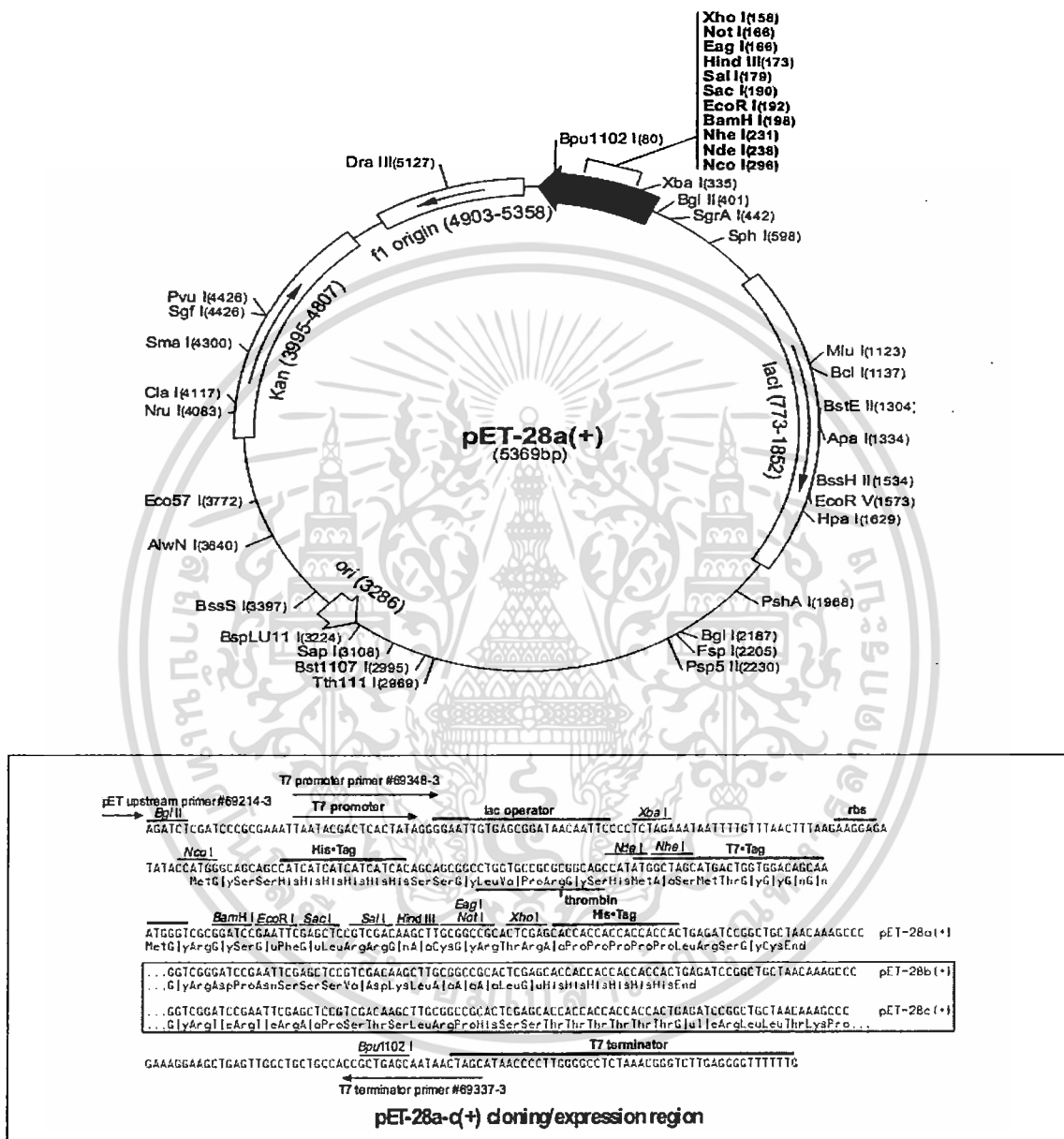
1) pTZ57R/T vector



ภาพผนวกที่ ก1 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pTZ57R/T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

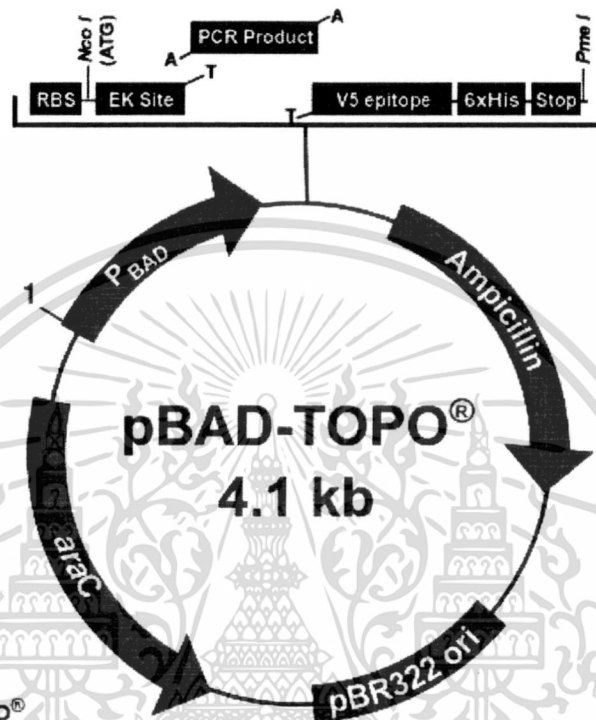
2) pET28a(+) vector



ภาพผนวกที่ ก2 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pET28a(+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) pBAD-TOPO vector



Comments for pBAD-TOPO[®]
4126 nucleotides

Note: The vector is supplied linearized between bp 387 and bp 388. This is the TOPO[®] Cloning site.

Arabinose promoter and regulatory elements: bases 4-276

pBAD Forward priming site: bases 208-227

Ribosome binding site: bases 328-331

Initiation ATG codon: bases 345-347

Enterokinase recognition site: bases 363-377

TOPO[®] Cloning site: bases 387-388

V5 epitope: bases 402-443

Polyhistidine region: bases 453-470

pBAD Reverse priming site: bases 526-543

rmb T1 and T2 transcription terminators: bases 576-733

Ampicillin resistance gene: bases 1013-1873

pBR322 origin: bases 2018-2691

AraC ORF: bases 4100-3222 (ORF on the opposite strand)

ภาพผนวกที่ 3 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pBAD TOPO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ก3 (ต่อ) แผนที่ขึ้นและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pBAD TOPO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CAB08072.1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAA33665.1	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AAC05445.1	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AAU93797.1	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CAB56688.1	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Clustal Consensus	* * * * *									
CAB08072.1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAA33665.1	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AAC05445.1	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AAU93797.1	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CAB56688.1	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Clustal Consensus	* * * * *									

ภาพผนวกที่ ๓2 การออกแบบไพรเมอร์อินที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 3 โดยเทียบจากลำดับกรดอะมิโน จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) ตั้งชื่อว่า Bgluc3


```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MNFRRMLCAAIVLTIIVLSIMLPSTVFALEDKSKLPDY-KNDLLYERTFDEGLCFPHWTCEDSGKCFADVDPGEPGNKAPRLTVIDKG--QNKWSVQ
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
MLRKLKLSMIVAASLVVGVFSNICVAKPAPDPNSNVGHDLIKRNSTFDGVLPTWVETPAHGFDPDIS-----GGTYNIITVTKPG--SNIWDVQ
--MRRFASGLLASVVTLSAAS-----IAPLSAFAGQQLGQN-DPDAGVGLPWHHCETNPAKQKQFDPDIS-----GGTYNVEIVNNDGPFESRWDLQ
Clustal Consensus
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MRHRGITLEQGHYTYVRFITWSDKSCRVAIKGMEPEYEWNN-NWNEFN---LFPQKLTVEQNFMMYPTDDTCEFFHLGG---ELAAG-T
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
FRHRNLQKAGHKYHYVEFTVADKDCDIYPLAMSKDPYIQYWHYGNWENVH---HTAGQAKVTDDFTMTT-NDDSAEFAFHISN-----TNDNSKL
LHRHRGHIEAGHTYKVRHEVNAKSGEMYTRIGNTGGTVEWHNNCSDFNSKWSVCRKIQQGDNSFDAEFTAKETVEVAEWAFAHYFGKGGQYQDVIDCFEN
Clustal Consensus
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PYVYVDDVSYDDP-----RFVKEVEYVLPQP---DVRVNOYGYLPPAKKATVVSSTSLKQWLLNSANQVVLGNTIPKGLD-----
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
PITYKFDNIHLTDP-----QYTPQ---ATPDDNIYDVRVNOYGYLPPAKKATVVSSTSLKQWLLNSANQVVLGNTIPKGLD-----
GTVLKFQDNLSLDVTSDKMNWNTENEMGVVRPES---VYRLNQLGYYPNLKSKASVYVTDASSETLTFEIRNTSQYVYTKVFGADPDPDSGTGKTTVT
* : : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
Clustal Consensus
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KDSQDYVHWLDFSDFAFEGYGFELP-TVNSP-----
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
VGNETIIRLKDGSANVHIDFSDFKITG-EYIFVKDVTGVSQTQVLLAKNVNDFKLSGDKLMTNPQKQFVMMNQSNSNFVLSDEYVNTQLLKDSSMYY
: * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : : * * * : : : :
Clustal Consensus
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
YHKRSGLPIEMPYAG-GEOWTRPAGHIGIEPNKGDINVPWFQDDEYAGRPQKYTKDVTGGYDAGDGRKMYVYVNGGIAVWTLMMNYERAKIRG-IANOG
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
YQNRSGVPIESQYLTSGDKTALAHKYGHNPDYAYQSKWVKSNSDASDVEKSKTIDGTGGYDAGDGRKMYVYVNGGIAVWTLMMNYERAKIRG-LDNWG
YQNRSGVPIESQYLTSGDKTALAHKYGHNPDYAYQSKWVKSNSDASDVEKSKTIDGTGGYDAGDGRKMYVYVNGGIAVWTLMMNYERAKIRG-LDNWG
Clustal Consensus* : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AYKDGGMNIPERNNGYDILLDEARWEIEFFKMKQVTEKEDPSIAGVHHKIHDFRWALGMLPHEDPQP-----RYLRPVSTAATLNFAATLA
AAR06139.1
AAR87745.1
AAK78540.1
AAR01216.1
KWNGTISIPENKDNDFDILLDEARVELEWFMFKMID-----ENGVYHKHIDHKKWTKGLATKPMYDYEKVMENGEKKGWGTVRIYKVPATYAAATFNMIACAA
Clustal Consensus: : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : :

```

ภาพผนวกที่ ๓3 การออกแบบโปรแกรมอื่นที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เป็ดจากโคซิเดส ในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 9 โดยเทียบจากลำดับ

กรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) (EC 3.2.1.21) ตั้งชื่อว่า Bgluc9


```

BglIu1-1 : 114 GATTCAGGGGCGGCTCAGACGACGGCGGACGACGACAGATTCGGGAGCTTTGGCCGCAATGGGGCA* 200 *
BglIu1-3 : 120 PATCGAGCGCGGGAGGAGGAGGAGCCAGGATTCGGGAGCAATTCGCAATGACGGGACGCGCGCGCA*
ACR70277 : 88 CTTTATAGGMPGGAAGGAGAAATGATGCGGACGATTTAGCATAACCGGGGAA*
ACR43071 : 158 GATGAGGCGCTTCGTAAGGATGGTAAGGAAAGCTTGGGAGATTTCCATACCTCTGGAG*
BAR36160 : 152 CTTGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ACV58907 : 155 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ACR237931 : 170 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ABC33525 : 155 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ACV52977 : 161 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
CAJ90043 : 179 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
AA519749 : 164 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
BAC69512 : 200 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ABE39076 : 164 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
CAN97832 : 170 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ZP_0611601 : 164 CTGTGACGATAATCCCATACAGCCCAAACGGTCTTA*
ACR298664 : 149 ATGAGGAGCGCTGTTAAGGATCATHAGGATTAATTAAGGATTTTGGCGTGAAGAGTA*
EDM99208 : 164 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ACR200292 : 149 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
ACR73677 : 146 GATGAGGCGCCGACGAGAGGAGGCGGAAATGCGATTCGGGAGCTTTCCGACGCGCGGCA*
gat ga gg gc at Tgggaca tt

```

ภาพผนวกที่ ๒๔ การออกแบบ reverse 5' upstream จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน BglIu1-1 และโคลน BglIu1-3 สำหรับการทำ genome walking ในกรอบสี่เหลี่ยมคือบริเวณที่เลือกมาออกแบบไพรเมอร์ Up1 และไพรเมอร์ Up2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

atgagggctacagctattacgatcagtcacacctggaccacctacgacggcgaacccttca
 M R A T A I T I S P P G P P T T A N P S
 acgccgaactgctctccaccgaagaagtgcctatgaatacacctgcgtcagcatcaagc
 T P N C S P P K K C P M N T P A S A S S
 ccgccgacctgggctttgccaccttcttcgattggctggccgcgcagcacaagtaatacc
 P P T W A L P P S S I G W P R S T S N T
 tctgaccgggttaccacggcccgccgtgggttttcacggcgagcccttttccacatttttt
 S D R F T Q A R R G F H G E P F S T F F
 gtgaagggagcaactggaatggcccaatttccaaaggattttttgtggggcgctcgccacg
 V K G A T G M A Q F P K D F L W G V A T
 gccgcgtaccaaactcgagggcgcggtggaacgaggatggaaaaggccccagcatttgggac
 A A Y Q I E G A W N E D G K G P S I W D
 gatttctgccaatgacgcaagcgccgcgcacatcaagcacggcgacaccggcgacattgcc
 D F C H D A S A A H I K H G D T G D I A
 tgcgacagctatcacccgcccggggaggatgtggcgctcatgaaggagcaccatattcag
 C D S Y H R R R E D V A L M K E H H I Q
 gcgtaccgtttttccatcagttggccccgtgtgattccggagggcggtgggagcgggtcaac
 A Y R F S I S W P R V I P E G V G A V N
 gaaaagggcctgcggttctacgacgacttgggtgaatgaactgctgaaaaacggcattgag
 E K G L R F Y D D L V N E L L K N G I E
 cttttaatcactctctatcactgggacctgcccagcgcttttgaggccaagggcgggatgg
 P L I T L Y H W D L P S A L Q A K G G W
 cagaaccgggaaatcgaaagctgggttgaaagcctacgcccgggtcatcgccgcccgccttc
 Q N P E I E S W F E A Y A R V I A A R F
 Aagggccgggtaaagaaatacatgaccatcaacgaaccccagtgcgtcacctgcctgggt
 K G R V K K Y M T I N E P Q C V T C L G
 tatggcatgggacctccacgccccggcgtaaaaacggacgaggaaggcatggcccgcatt
 Y G M G L H A P G V K T D E E G M A R I
 ttccatcatatctgcctgtgccacagcggcgtcagcgggcatcaaggaaatcgccggg
 F H H I C L C H S A A Q R A I K E I A G
 ccggacgcccaggtggggatcgtgccctgcggcaagctctgctttccggataaggatacc
 P D A Q V G I V P C G K L C F P D K D T
 tcagaaaaccgggaagccgcctatcaggccacgttctccctcaaagaaagatggatgttc
 S E N R E A A Y Q A T F S L K E R W M F

ภาคผนวกที่ ข6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Bglu1-3_FL1 เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโน แล้วนำลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล พบว่ายีนมีขนาดเท่ากับ
 1,605 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gccacaatatcgtgctggacagcctgattttacgccggtatgaggacagcgcaccggag
 A H N I V L D S L I L R R Y E D S A P E
 gcggtgaaacgcttcgcaaaacgattcccgcagcgaatgggaacggatggagaagccg
 A V K R F A K T I P A S E W E R M E K P
 gattttatcggcgtcaacgtgtatcggggacagaaggtggatgaaaacggccagccggtg
 D F I G V N V Y R G Q K V D E N G Q P V
 aagctgcccgtgggctaccccatggccgctttcaaagtggaaatcaccccggaggtgatg
 K L P V G Y P M A A F K W E I T P E V M
 cgctacgggcccgtgaatctgtataagcgggtatcatatccccctctatatttcggaaaac
 R Y G P L N L Y K R Y H I P L Y I S E N
 ggctgtcctgcagcgcagcgtgggtatccctggacgggcaggtgcacgatccaaccgcatc
 G L S C S D V V S L D G Q V H D P N R I
 gatttcctgcaccgggtatttgagggagccttgccaaggctattcaggagggagcggacgtg
 D F L H R Y L R E L A K A I Q E G A D V
 cggggctatatgcagtgaggccttcatggataacttcgagtgggcatccggctatgaagag
 R G Y M Q W S F M D N F E W A S G Y E E
 cggttcggcctcatccatgtggattatgaatcgctgggtccgcacccccaaggattcggcc
 R F G L I H V D Y E S L V R T P K D S A
 cggtggtacgcccaggtgatcgacagcaacggggaaatcctttga
 R W Y A Q V I D S N G E I L -

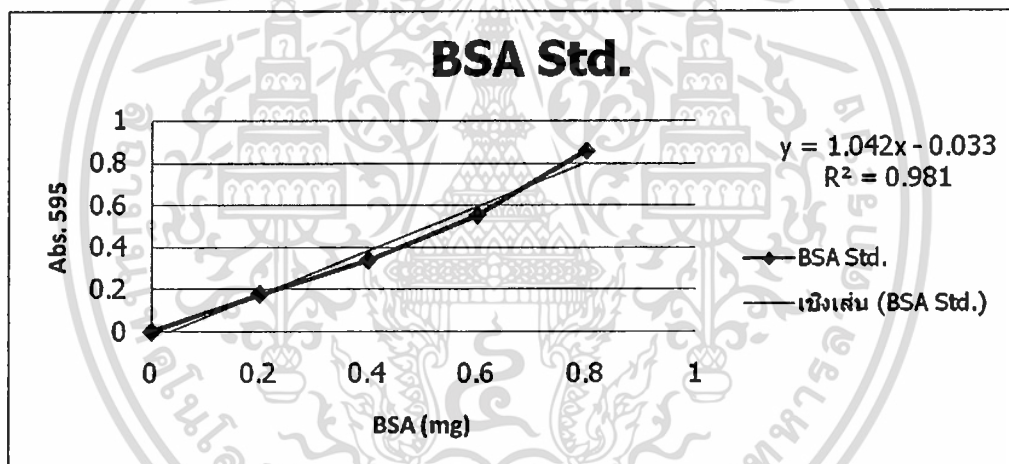
ภาคผนวกที่ ข6 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Bglu1-3_FL1 เมื่อแปลงเป็นลำดับอะมิโน แล้วนำ
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล พบว่ายีนมี
 ขนาดเท่ากับ 1,605 bp



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

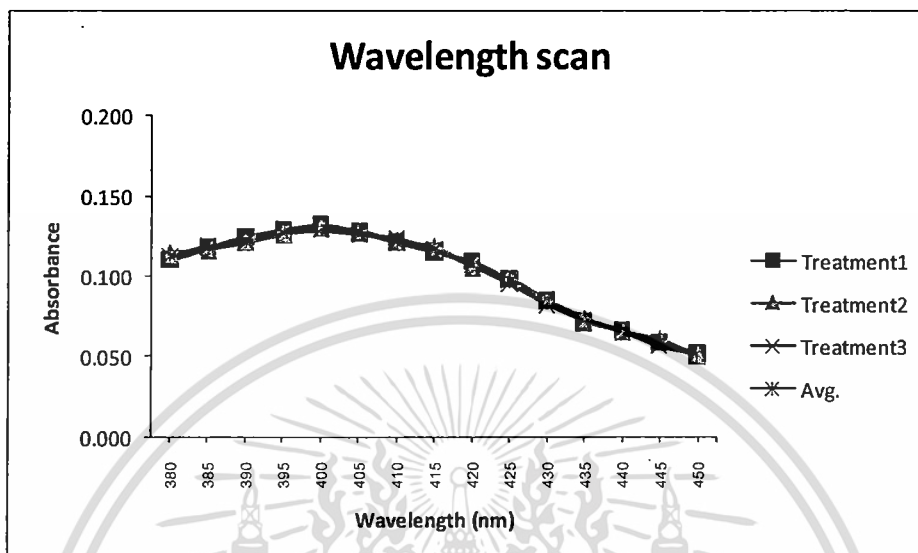
กราฟมาตรฐานโปรตีน

%BSA (mg/ml)	OD
0	0
0.2	0.177
0.4	0.336
0.6	0.549
0.8	0.856



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า Wavelength scan



OD	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Avg.
380	0.11	0.114	0.112	0.112
385	0.118	0.116	0.119	0.117667
390	0.124	0.121	0.121	0.122
395	0.129	0.126	0.127	0.127333
400	0.132	0.13	0.129	0.130333
405	0.127	0.129	0.126	0.127333
410	0.121	0.121	0.123	0.121667
415	0.115	0.119	0.116	0.116667
420	0.109	0.105	0.107	0.107
425	0.098	0.099	0.095	0.097333
430	0.085	0.085	0.082	0.084
435	0.071	0.074	0.072	0.072333
440	0.066	0.065	0.066	0.065667
445	0.058	0.06	0.056	0.058
450	0.051	0.05	0.051	0.050667

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวดารารัตน์ ปิ่นมงคลกุล
วัน/เดือน/ ปีเกิด	7 ธันวาคม 2528
ที่อยู่	89/400 ม.10 ต.บางเมืองใหม่ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
ประวัติการศึกษา	2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ D. Pinmongkolgul, S. Netrphan and K. Jirajaroenrat. 2010. "Molecular Cloning of Bacterial Beta-glucosidase Genes from Buffalo Ruminant Fluid Using Metagenomic Approach" In Proceedings of 16 th AAS and 1 st ISAT: Sufficiency Agriculture. August 25-27. Bangkok, Thailand.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	สนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) ทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาบุคลากรวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระหว่างสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติกับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้