

รายงานการวิจัย
การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
กลุ่มที่ 9 จากรูเมนของกระบือ
Cloning and Expression of Genes Encoding Cellulase Family 9 from
Buffalo Rumen

ชื่อผู้วิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ดร. มลฤดี ชวรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

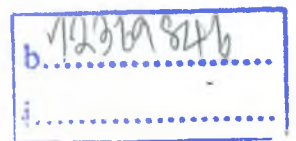
ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัย
การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
กลุ่มที่ 9 จากรูเมนของกระบือ
Cloning and Expression of Genes Encoding Cellulase Family 9 from
Buffalo Rumen

ชื่อผู้วิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QH
442.2
กชชก
ค.๒
ดร. มลฤดี ชวรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120254
วัน, เดือน, ปี 13 ก.พ. 2555

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการวิจัยนี้บางส่วนเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ของ นางสาวบุษยฉัตร รุ่งรัตนกสิน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และ นางสาวนวรรตน์ เขาวรรตน์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นางสาววิจิตา สาริตโกวิทชัย นางสาวพันธิพา แทนกุดเรือ และนักศึกษาศาขาทเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีส่วนสนับสนุน ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย มา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
กลุ่มที่ 9 ที่คัดเลือกมาจากรูเมนของกระบือ

(ภาษาอังกฤษ) Cloning and Expression of Genes Encoding Cellulase Family 9 from
Buffalo Rumen

รหัสโครงการ 31462

รหัสข้อเสนอโครงการ 2553A11802024

แหล่งเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน

300,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ. มลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์ 02-329-8519 โทรสาร 02-329-8519

มือถือ 089-751-4162

อีเมล kjkanya@kmitl.ac.th; kanyakmitl@yahoo.com

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร. มลฤดี ชวรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 40000

โทรศัพท์ 043 721728 โทรสาร 043 743135

อีเมล jackcwr@yahoo.com

คำสำคัญ

เซลลูเลส รูเมน กระบือ ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 9

Keywords

Cellulase, Rumen, Buffalo, Glycoside hydrolase family 9 (GH9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

กระป๋องเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถกินหญ้าที่มีคุณภาพต่ำได้ดีเนื่องจากระบบย่อยอาหารในส่วน กระเพาะหมักมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อช่วยในการย่อยเยื่อใยพืชให้เป็น สารอาหารที่มีคุณค่าต่อตัวสัตว์ โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อจำแนกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูโลสกลุ่มที่ 9 จากกระเพาะหมักของกระป๋องปลั๊กอาศัยวิธีการทางเมทาจีโนมิกส์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์กลุ่มที่ 9 ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก ทำการเพิ่ม ปริมาณยีนยีนขนาด 1,200 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ตัดต่อชิ้นยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T และ ถ่ายยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ *Escherichia coli* DH5 α เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจาก การแปลรหัสกับฐานข้อมูลยีน พบว่ามี 6 โคลนที่มีบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เซลลูโลสในกลุ่มไกลโคไซด์ ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 9 ได้แก่ cel9-1, cel9-2, cel9-3, cel9-4, cel9-A และ cel9-B เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค genome walking พบว่าโคลน cel9-B สามารถค้นพบยีนที่สมบูรณ์มีความยาว 2,100 คู่เบส และแปลรหัสเป็นโปรตีนยาว 699 กรดอะมิโน โปรตีน Cel9-B มีความเหมือนของลำดับ กรดอะมิโนมากที่สุด (53%) กับเอนไซม์เซลลูโลสกลุ่มที่ 9 จากแบคทีเรีย *Ruminococcus* sp. 18P13 (CBL17554.1) พบตำแหน่งของ signal peptide ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-43 มีโดเมนไกลโคไซด์ ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 9 อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 49-454 และพบโดเมน dockerin type I อยู่ที่กรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 617-682 ตามลำดับ ซึ่งจัดว่าเป็นเอนไซม์เซลลูโลสกลุ่มที่ 9 คลาสที่ 1 และมีโครงสร้างเป็น แบบเซลลูโลโซม หลังการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุส่วนของยีนGH9 เชื่อมต่อเข้าในจีโนมของยีสต์ เจ้าบ้านสายพันธุ์ *Kluyveromyces lactis* GG799 และคัดเลือกโคลนยีสต์ลูกผสมให้ชื่อว่า pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 เมื่อการเลี้ยงยีสต์ลูกผสมและเก็บโปรตีนที่หลังออกมาในอาหารเหลว พบว่าโปรตีน รวมในอาหารเหลวมีความเข้มข้น 803.87 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน และมีขนาดโมเลกุล ของโปรตีน 49.7 กิโลดาลตันเมื่อตรวจสอบด้วยเจล SDS-PAGE เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ที่ได้สามารถ ย่อยสลายสเตครดาร์บ็อกซีเมทิลเซลลูโลส อะไวเซล กระจาขกรอง และไซแลน โดยมีค่าจำเพาะต่อ กิจกรรมเท่ากับ 0.624 ± 0.036 , 0.083 ± 0.013 , 0.154 ± 0.032 และ 0.178 ± 0.029 หน่วยต่อมิลลิกรัม ของโปรตีนรวม ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์นี้มีกิจกรรมเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และไซแลนเนส เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 มีสถานะที่เหมาะสมของการย่อย 1% CMC ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 60°C ในระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยา 10 นาที นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถย่อย CMC ได้ในช่วง pH 3-11 และ อุณหภูมิ 30-80°C โดยยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์มากกว่า 40% ของค่าสูงสุด เอนไซม์ที่ได้จาก โครงการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง เช่น การย่อยเยื่อกระดาษ การผลิต เอทานอลจากเยื่อใยพืช รวมถึงการผลิตอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามต้องนำไปทดสอบความเหมาะสมใน การใช้งานต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Buffalo (*Bubalus bubalis*) is a ruminant that can utilize low quality roughage feed and agricultural crop-residues. Its rumen contains a high diversity of microbes producing enzymes for degradation of plant fibers to nutrients for the host animal. This project aimed to isolate genes encoding cellulase belonging to the glycoside hydrolase family 9 from swamp buffalo rumen using metagenomic approach. Degenerate primers were designed based on the conserved regions on cellulase family 9 of gram positive bacteria. DNA fragments of 1,200-bp length were amplified by polymerase chain reaction, cloned into pTZ57R/T vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 α host strain. Putative amino acid sequence alignment revealed that 6 clones contained the conserved regions of cellulase family 9, named cel9-1, cel9-2, cel9-3, cel9-4, cel9-A and cel9-B. A full-length gene of Cel9-B was successfully identified by genome walking technique, consisting of 2,100 bp encoding a putative protein of 699 amino acids. The protein Cel9-B sequence shared maximal similarity (53%) to the GH9 cellulase from *Ruminococcus* sp. 18P13 (CBL17554.1). The protein contained a putative signal peptide at amino acid position 1-43, glycosyl hydrolase family 9 domain at position 49-454 and dockerin type I domain at position 617-682 respectively. The Cel9-B was classified as a new member of GH9 class 1 with a cellulosomal structure. After construction of the GH9 domain into pKLAC2 vector, integration of the recombinant plasmid into the genome of *Kluyveromyces lactis* GG799 host strain, positive clone was selected and named pKLAC2-Cel9B/GH9-K3. The recombinant yeast was cultivated and the secreted crude protein was harvested from the culture media. The crude protein was 803.87 mg/L after 7 days of cultivation and a protein band of molecular weight 49.7 kDa was visible by SDS-PAGE gel. The enzyme Cel9B/GH9-K3 showed activities toward CMC, Avicel, filter paper and xylan, with specific activities at 0.624 ± 0.036 , 0.083 ± 0.013 , 0.154 ± 0.032 and 0.178 ± 0.029 U/mg of crude protein respectively, indicating endoglucanase exoglucanase and xylanase activities. The optimal condition of Cel9B/GH9-K3 for CMCase was pH 6.0 at temperature 60°C and incubation time 10 min. Moreover, the enzyme Cel9B/GH9-K3 exhibited activity of at least 40% of the maximum activity toward the CMC at pH 3-11 and temperature 30-80°C. The enzyme from this project could find applications in relevant industries i.e. pulp and paper degradation, ethanol production from plant fiber and animal feed production. However, further characterizations are needed to determine optimum conditions for use.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ix
1. บทนำ	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
วัตถุประสงค์	7
สมมติฐานของการวิจัย	7
ขอบเขตการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
2. วิธีดำเนินการวิจัย	9
การเก็บตัวอย่างจากรูเมนของกระบือ	9
การสกัดเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอ	9
ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน	9
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	10
การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	11
การสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส	11
การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i> DH5 α	12
การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T	12
การค้นหายีนที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค Genome walking	14
การโคลนยีนเซลลูเลสที่สมบูรณ์จากเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอ	17
การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน	18
การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน	18
การสร้างยีสต์ลูกผสม <i>Kluyveromyces lactis</i>	19
การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเอนไซม์	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
การวัดปริมาณโปรตีน	20
การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE	20
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	21
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	21
สถานที่ทำการวิจัย	22
3. ผลการวิจัย	23
การสกัดเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ	23
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อการโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9	24
การเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9	26
การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T	26
การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนเซลลูเลส	27
การจำแนกยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ที่สมบูรณ์	35
การวิเคราะห์ยีนเซลลูเลส Cel9-B	35
การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน Cel9-B	35
การสร้างยีสต์ลูกผสมผลิตเอนไซม์	39
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	40
การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส	41
4. วิจารณ์ผล	47
5. สรุปและเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก ยีน Cel9-B จากการวิเคราะห์ genome walking	55
ภาคผนวก ข การคาดคะเนคุณสมบัติของโปรตีน	61
ภาคผนวก ค แผนที่ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนยีน Cel9-B	63
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน	64
ภาคผนวก จ แผนที่พลาสมิด	66

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีนเซตลูเลตกลุ่มที่ 9 กับฐานข้อมูลโปรตีนด้วยโปรแกรม BlastX	29
ตารางที่ 2 ค่าความคล้ายคลึงของยีนเซตลูเลตกลุ่มที่ 9 จากฐานเปรียบเทียบข้อมูลโปรตีน	33
ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงยีสต์ในช่วงระยะเวลาการบ่ม 1-7 วัน	40
ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละระยะเวลาของการบ่ม	42
ตารางที่ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละค่าความเป็นกรดต่างของปฏิภพ	43
ตารางที่ 6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละอุณหภูมิของการบ่ม	45
ตารางที่ 7 ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 1	หลักการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ GenomeWalker™ universal kit	16
ภาพที่ 2	เมทาจีนโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในรูเมนของกระบือ	23
ภาพที่ 3	แถบ 16S rDNA จากเมทาจีนโนมที่สกัดจากของเหลวในรูเมนของกระบือ	24
ภาพที่ 4	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับจำแนกยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9	25
ภาพที่ 5	แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากเมทาจีนโนมของรูเมนกระบือ	26
ภาพที่ 6	แถบดีเอ็นเอจากการทดสอบด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์	27
ภาพที่ 7	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากรูเมนกระบือกับ เอนไซม์ในฐานข้อมูลโปรตีน	30
ภาพที่ 8	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนเซลลูเลสที่แยกได้จากรูเมนกระบือ	34
ภาพที่ 9	ตำแหน่ง signal peptide บนยีนเซลลูเลส Cel9-B	36
ภาพที่ 10	โครงสร้างของโปรตีน Cel9-B	37
ภาพที่ 11	โปรตีนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ Cel9-B	38
ภาพที่ 12	ตำแหน่งการโคลนยีนเซลลูเลส Cel9-B/GH9 เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2	39
ภาพที่ 13	ผลการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์	40
ภาพที่ 14	โปรตีนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ <i>K. lactis</i> ที่มียีน pKLAC2-Cel9B/GH9-K3	41
ภาพที่ 15	ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละระยะเวลาของการบ่ม	42
ภาพที่ 16	ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละค่าความเป็นกรดต่าง	44
ภาพที่ 17	ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละอุณหภูมิของการบ่ม	45

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CMC	Carboxymethylcellulose
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol, threo-2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutane
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FP	Filter paper
g	Gram
GH	Glycoside Hydrolase
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactoside
kDa	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per millilitre
mM	MilliMolar
M	Molar
PBS	Phosphate-buffered saline
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
w/v	Weight per volume
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside
YCB	Yeast Carbon Base
YPGal	Yeast Peptone medium containing Galactose
YPGlu	Yeast Peptone medium containing Glucose
μ g	Microgram
μ g/ μ l	Microgram per microlitre
μ g/ml	Microgram per millilitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

µl	Microlitre
µM	MicroMolar
µmole	Micromole
°C	Degree Celsius
%	Percentage



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. บทนำ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถกินอาหารหยาบและหญ้าที่มีคุณภาพต่ำได้ กระบือมีระบบทางเดินอาหารมีลักษณะคล้ายกับโค โดยมีกระเพาะแบ่งออกเป็น 4 ส่วน และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ประกอบด้วย กระเพาะเรติคูลัม (Reticulum) มีขนาดประมาณ 5% ของกระเพาะทั้งหมด อาหารในรูปของแข็งและเหลวสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้สะดวก กระเพาะหมัก หรือ รูเมน (Rumen) มีขนาดประมาณ 80% ของกระเพาะทั้งหมด กระเพาะโอม่าซั่ม (Omasum) มีขนาดประมาณ 7-8% ของกระเพาะทั้งหมด และกระเพาะอะโบมาซั่ม (Abomasum) มีขนาดประมาณ 7-8% ของกระเพาะทั้งหมด ทำหน้าที่คล้ายกับกระเพาะของสัตว์กระเพาะเดี่ยว กระเพาะรูเมนมีขนาดใหญ่กว่ากระเพาะอื่นๆ โดยส่วนหน้าเชื่อมติดกับหลอดอาหารและส่วนท้ายเชื่อมติดกับกระเพาะเรติคูลัม ภายในมีตุ่มขนอยู่ทั่วไปตามผนัง และผนังด้านในมีสันเป็นแถบ ๆ โดยมีความจุประมาณ 130 ถึง 202 ลิตร และมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากอาศัยอยู่ กระเพาะรูเมนนั้นมีสภาพเป็นถังหมักขนาดใหญ่ ด้านล่างบรรจุของเหลว มีอาหารละเอียดแขวนลอยอยู่ รวมทั้งโภชนะที่ละลายได้ มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในส่วนนี้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยอาศัยโภชนะที่ละลายได้เป็นอาหาร ส่วนด้านบนมีชี้นอาหารหยาบลอยอยู่ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ประมาณ 70% ของทั้งหมดจะติดกับชี้นอาหารเหล่านี้ เพื่อทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลาย อีก 5% ของจุลินทรีย์จะเกาะอยู่กับผนังกระเพาะรูเมนหรืออยู่กับโปรโตซัว (จิโรจน์ จันทร์น 2540; บุญล้อม ชีวะอิสระกุล 2541) จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมนจะต้องมีชีวิตอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 1 ล้านตัวต่อกรัมของปริมาณกระเพาะรูเมน โดยจุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมนนั้นมี 3 ประเภทหลัก คือ แบคทีเรีย โปรโตซัว และ เชื้อรา แต่ชนิดและสัดส่วนของจุลินทรีย์อาจแปรผันไปได้ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โภชนะประเภทที่เกิดการหมักย่อยได้ (Hungate, 1996) โดยแบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุด แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจำนวนประมาณ 10^9 - 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในโคมีประมาณ 10^9 - 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Prasad and Pradhan, 1990; Pradhan *et al.*, 1991) การศึกษาความหลากหลายของประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักของไทยโดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักไทยมีทั้งหมด 8 กลุ่ม คือ Low G+C gram-positive bacteria (57.8%), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (31.21%), *Proteobacteria* (6.36%), *Lentisphaerae* (1.16%) และ *Spirocheates* (0.58%) กลุ่มประชากรแบคทีเรีย Low G+C gram-positive bacteria ซึ่งได้แก่แบคทีเรียในคลาส *Clostridia* และ *Bacilli* เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในการรูเมนและเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์อื่นๆที่เกี่ยวข้องในการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อน โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (unculturable bacteria) มีสูงถึง 56.07 % (ศรีธญา สติชัยมันวิวัฒน์, 2551)

กระบือจัดเป็นสัตว์กินพืช (herbivore) ในเซลล์พืชนั้นมีผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน ลิกนิน และสารโปรตีนอื่นๆ ประสานกันเป็นโครงสร้างที่ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง และทนต่อแรงกดได้ เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ชั้นในสุดจะถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาของโพลีเมอร์ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลเพนโตส (pentose) และเฮกโซส (hexose) เพื่อเชื่อมไมโครไฟบริลของเซลลูโลสเข้าด้วยกัน เฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ชั้นที่สองจะก่อรูปโดยการเชื่อมกันด้วยลิกนินซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีโครงสร้างแข็งแรงและเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ และการเชื่อมกันด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็นสองส่วนหลักที่ปกป้องการย่อยเซลลูโลสเป็นโมเลกุลของกลูโคส

พืชมีอัตราการสังเคราะห์เซลลูโลสถึง 4×10^{10} ตันต่อปี (Lynd *et al.*, 2002) ซึ่งปริมาณและขนาดของเซลลูโลสขึ้นกับแหล่งที่พบ เช่น ในเนื้อไม้มีเซลลูโลส 60% ขณะที่ฝ้ายมีเซลลูโลสถึง 90% ในหนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 100 ถึง 40,000 หน่วยย่อย เซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงโดยพบว่าบริเวณที่รวมตัวกันแบบหลวมๆ จะเรียกว่า amorphous หรือ paracrystalline หน่วยย่อยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glucosidic linkage ในแต่ละโมเลกุลของเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน กับโมเลกุลของกลูโคสอีกสายหนึ่งตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ทำให้เซลลูโลสมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ในโมเลกุลของเซลลูโลสมีพันธะไฮโดรเจนอยู่ 2 ชนิด คือ พันธะไฮโดรเจนระหว่าง C_3OH group กับออกซิเจนในวงแหวนไพราโนสของกลูโคสในโมเลกุลเดียวกัน ส่วนอีกพันธะคือ พันธะระหว่าง C_6OH group ของโมเลกุลหนึ่งซึ่งเชื่อมกับออกซิเจนของพันธะไกลโคซิดิกของโมเลกุลอื่นด้วยพันธะไฮโดรเจนที่เกาะกันอย่างแน่นหนาทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า crystalline ซึ่งการจัดเรียงแบบนี้จะทำให้เซลล์พืชลดการสูญเสียน้ำ และทนต่อการย่อยของเอนไซม์บางชนิดได้ การเรียงตัวของเซลลูโลสจะมีโครงสร้างเป็นแบบ Flat-Ribbon และระหว่างชั้นของโมเลกุลจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณ amorphous จะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณ crystalline ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลส เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติไกลโคไซด์ไฮโดรเลส โดยจะตัดจำเพาะบริเวณพันธะเบต้าไกลโคซิดิก (beta-1,4-glycosidic bond) ระหว่างคาร์โบไฮเดรตสองโมเลกุล หรือมากกว่าสองโมเลกุล หรือระหว่างโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตและไมซ์โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต ในโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) ลิกนิน (lichenin) และ cereal β -D-glucans โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด การทำงานของเอนไซม์ในระบบเซลลูเลสสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเข้าจับจำเพาะกับสารตั้งต้นหรือสับสเตรตตามระบบของ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2004) ได้ 3 รูปแบบ คือ 1) Endoglucanase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(E.C.3.2.1.4) หรือ endo-1,4- β -D-glucanase จะทำการย่อยพันธะ Beta-1,4-Glucosidic linkage แบบสุ่มภายในสายของเซลลูโลสบริเวณ amorphous ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้ผลผลิตเป็นกลูโคส โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำได้ด้วยการทดสอบการย่อยกับสับสเตรต carboxymethylcellulose (CMC) เป็นต้น ซึ่งเรียกเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อย CMC ว่า CM-cellulase (Wike *et al.*, 1983) เอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยแบบเอนโดกลูคานเนสพบอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 19, 26, 44, 45, 48, 51, 61, 74, 124 และ NC (Henrissat and Davies, 1997); 2) Exoglucanase (E.C.3.2.1.91) หรือ exo-cellobiohydrolase จะทำการย่อยเซลลูโลสจากด้านปลายในบริเวณ crystalline ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ เช่น เซลโลไบโอส และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคส โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ด้วยให้ทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง (filter paper) และ อะไวเซล (Avicel) เป็นต้น (Wike *et al.*, 1983) เอนไซม์ที่ย่อย Avicel ได้จะเรียกว่า Avicelase เอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยแบบเอกโซกลูคานเนสสามารถพบได้ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5, 6, 7, 9 และ 48 (Henrissat and Davies, 1997) และ 3) β -glucosidases (E.C.3.2.1.21) หรือ cellobiase เป็นเอนไซม์ร่วมที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลไบโอแซคคาไรด์ให้เป็นกลูโคส (Beguin, 1990) โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ด้วยให้ทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG) เป็นต้น (Wike *et al.*, 1983) เอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยแบบเอกโซกลูคานเนสสามารถพบได้ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 1, 3, 5, 9, 30, 116 และ NC (Henrissat and Davies, 1997)

เอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 หรือ แฟมิลีที่ 9 (GH9) เดิมเรียกว่า cellulase family E จัดเป็นแฟมิลีที่มีสมาชิกที่เป็นเอนไซม์เซลลูเลสมากเป็นอันดับสองรองจากแฟมิลีที่ 5 เอนไซม์ทุกตัวในแฟมิลีที่ 9 มีโครงสร้างสามมิติของบริเวณ catalytic domain เป็นแผ่นพับซ้อนกันแบบ (α/α)₆ barrel fold ซึ่งมีร่องในการเข้าจับกับโพลิแซคคาไรด์ที่บริเวณที่มีน้ำตาลอย่างน้อย 6 โมเลกุลในลักษณะ -4 ถึง +2 (Sakon *et al.*, 1997; Guérin *et al.*, 2002) เอนไซม์ในแฟมิลีนี้ส่วนใหญ่จะมีส่วนของบริเวณที่ใช้ในการยึดกับเซลลูโลส เรียกว่า cellulose binding module (CBM) ซึ่งเป็นชนิด CBM3c โดยจะเชื่อมต่อจากทางด้าน C-terminal ของบริเวณที่ทำหน้าที่ในการย่อยสับสเตรต (catalytic domain) ของเอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 (Sakon *et al.*, 1997) โดยโดเมน CBM3c จะเข้าจับกับสายเซลลูโลสอย่างหลวมๆ (Tormo *et al.*, 1996) เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ E1 เป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย ขณะที่ E2 จำแนกได้จากสิ่งมีชีวิตอื่นและแบคทีเรียบางชนิด โดยเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมดที่เป็น processive endoglucanase จะเป็นสมาชิกของกลุ่ม E1 (Tomme *et al.*, 1995) เอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์เป็น [STV] - x - [LIVMFY] - [STV] - x(2) - G - x - [NKR] - x(4) - [PLIVM] - H - x - R (Henrissat and Davies, 1997) กิจกรรมการทำงานของเซลลูเลสในแฟมิลีที่ 9 พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งแบบ endoglucanase (EC 3.2.1.4) cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) และ beta-glucosidase (EC 3.2.1.21) และโดยส่วนมากในแบคทีเรียจะพบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในรูปแบบของหลายโดเมนทำงานร่วมกัน เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) (Henrissat and Davies, 1997) เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 มีกลไกการทำงานแบบ inverting มีรายงานว่าเอนไซม์ Cel9A จากแบคทีเรีย *Thermobifida fusca* สามารถย่อยเซลลูโลสบริเวณ crystalline ได้ดี (Chen *et al.*, 2007)

ในปัจจุบันฐานข้อมูล CAZy (<http://www.cazy.org/fam/GH9.html>) รายงานแหล่งที่มาของเอนไซม์แฟมิลีที่ 9 แยกได้จากสัตว์ เช่น หอย *Ampullaria crosseana* (ABD24274.1) จากพืช เช่น *Arabidopsis thaliana* (AAC16418.1) จากรา เช่น *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21 (AAW44965) จากโปรโตซัว เช่น *Epidintum ecaudatum* (CAL91976.1) จากอาร์เคียซึ่งมีรายงานไว้แล้ว 2 ชนิด และจากแบคทีเรียมีรายงานการจำแนกยีนเซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ไว้มากที่สุดจำนวน 375 ยีน เอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากพืชทั้งหมดจะเป็นสมาชิกของแฟมิลีที่ 9 (Cantarel *et al.*, 2009) แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ได้มากที่สุด โดยพบว่า *C. acetobutylicum*, *C. josui*, *C. cellulolyticum*, *C. lentocellum*, *C. cellulovorans* และ *C. thermocellum* มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 บนจีโนมอย่างน้อย 5 ยีน โดยที่ *C. thermocellum* พบยีนเซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 มากที่สุดถึง 16 ยีน ขณะที่ *Fibrobacter succinogenes* และ *Ruminococcus albus* แบคทีเรียที่อาศัยในรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องก็พบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ได้อย่างน้อย 8 ยีน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Bacillus pumilus*, *Cellulomonas fimi*, *Cellulomonas flavigena*, *Cellulosilyticum ruminicola*, *Cellvibrio japonicus*, *Cytophaga hutchinsonii*, *Dyadobacter fermentans* และ *Eubacterium cellulosolvens* ต่างก็สร้างเอนไซม์เซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ได้เช่นกัน (Cantarel *et al.*, 2009)

ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น ตัวอย่างดิน มูลสัตว์ สิ่งขับถ่ายจากสัตว์ รวมทั้งตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ การเพาะเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างดังกล่าวอาจมีข้อจำกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีลักษณะเฉพาะ บางชนิดไม่อาศัยออกซิเจนในการเจริญ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในในห้องปฏิบัติการอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบางชนิด จะเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า uncultured หรือ unidentified microorganism การจำแนกยีนจากสิ่งแวดล้อมดังกล่าวจึงอาศัยเทคนิคเมทาจีโนมิกส์ (metagenomics) ซึ่งทำการจำแนกยีนจากเมทาจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ โดยในลำไส้ตอนกลางของปลวกสามารถจำแนกยีนเซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 จาก uncultured microorganism ได้ถึง 11 ยีน (Warnecke *et al.*, 2007) ในดินที่มีการทับถมของใบไม้มีรายงานการจำแนกยีนเซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ได้ 3 ยีน (Pang *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการจำแนกยีนเซลลูเลสแฟมิลีที่ 9 ได้จากตะกอนดินจากทะเลสาบ (Grant *et al.*, 2004) จากลำไส้ของคน

(Tasse *et al.*, 2010) จากมูลช้าง (Wang *et al.*, 2009) และในสิ่งขับถ่ายจากไส้เดือน (Beloqui *et al.*, 2010) เป็นต้น

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การใช้พลังงานจากการเผาไหม้น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแหล่งผลิตในประเทศมีไม่เพียงพอกับความต้องการที่สูงขึ้นตามความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ จึงต้องพึ่งพาการนำเข้าเป็นหลัก ประเทศไทยสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงกว่าแสนล้านบาทต่อปีและราคาน้ำมันก็มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ การคิดค้นแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ๆ จึงเป็นสิ่งสำคัญ และที่มีความตื่นตัวกันมากในขณะนี้ คือ การใช้เอทานอลมาทดแทนเชื้อเพลิงที่ผลิตจากปิโตรเลียม การผลิตเอทานอลจะจำกัดอยู่ที่น้ำตาลจากอ้อย แป้งมันสำปะหลังและข้าวโพด ซึ่งโดยปกติวัตถุดิบเหล่านี้จะใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ การนำมาผลิตเอทานอลจะทำให้พืชเหล่านี้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นและทำให้เสียสมดุลในส่วนของนำไปผลิตอาหารและยังทำให้อาหารมีราคาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในปัจจุบันหลายๆ ประเทศจึงหันมาคิดค้นเทคโนโลยีใหม่ ๆ ในการผลิตเอทานอลซึ่งใช้วัตถุดิบจากชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) ซึ่งได้แก่ ไม้ ต้นไม้ เศษไม้ กระดาษ ฟางข้าว เศษหญ้า และเศษวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ ซึ่งใช้กรรมวิธีเปลี่ยนชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นหมักน้ำตาลที่ได้ให้กลายเป็นเอทานอลอีกที โดยส่วนประกอบหลักของชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ พวกลิกโนส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเซลลูโลสมีลักษณะเป็น โพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ beta-1,4-glucosidic linkage ส่วนเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบรองของพืชและลิกนินเป็นส่วนที่สร้างความแข็งแรงให้แก่ต้นไม้ การย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส (cellulase) จะสามารถใช้เป็นน้ำตาลตั้งต้นในขบวนการหมักให้เป็นเอทานอลเพื่อทดแทนการใช้วัตถุดิบประเภทแป้งได้

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีพื้นฐานทางเศรษฐกิจมาจากการเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ทำการเพาะปลูกข้าว อ้อย มันสำปะหลังและพืชไร่อื่นๆ หลังจากฤดูการเก็บเกี่ยวและการส่งผลผลิตออกสู่ตลาดแล้ว เศษวัสดุทางการเกษตรหรือชีวมวลที่เหลืออยู่ในปริมาณมาก โดยประมาณมากกว่า 50 ล้านตันต่อปี บางส่วนเกษตรกรนำไปใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทอาหารหยาบโดยเฉพาะโคและกระบือ ขณะที่ส่วนที่เหลือจะถูกไถกลบหรือเผาทิ้ง การเผาวัสดุเหล่านี้ยังก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลพิษทางอากาศและฝุ่นควันตามมา เศษวัสดุทางการเกษตรดังกล่าวส่วนใหญ่จะเป็นฟางข้าว ข้าวเปลือก ต้นและใบอ้อยและข้าวโพด และอื่นๆ เหล่านี้จะเป็นวัตถุดิบที่ดีในการผลิตเอทานอลด้วยเทคโนโลยีชีวโมเลกุลสมัยใหม่ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการนำเข้าพลังงานประเภทปิโตรเลียมจากต่างประเทศลงได้มาก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากชีวมวลยังอยู่ในระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิจัยและพัฒนาในหลายประเทศ เนื่องจากสิ่งสำคัญในการบรรลุเป้าประสงค์คือ การค้นพบและ
เข้าใจขบวนการการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยเฉพาะการค้นหา
เอนไซม์จากแหล่งใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพที่ดีในสภาวะการหมักของยีสต์ในขบวนการผลิตเอทานอล
กำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัยทั่วโลก

นอกจากการทำไร่นาของเกษตรกรแล้วเกษตรกรมักจะเลี้ยง โคและกระบือไปด้วย ซึ่งกระบือ
(*Bubalus bubalis*) นั้นเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ระบบการย่อยอาหารที่ซับซ้อน สามารถกินหญ้าแห้งและฟาง
ข้าวที่มีคุณภาพต่ำที่ขึ้นตามธรรมชาติหรือวัชพืชได้ กระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวน
มากทั้งแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ต่างๆที่ช่วยในการ
ย่อยอาหารที่สัตว์กินเข้าไปเพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารให้แก่ตัวสัตว์ ดังนั้นกระเพาะส่วนรูเมนของ
กระบือจึงนับว่าเป็นแหล่งเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่ดีอีกแหล่งหนึ่ง

การวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อมีเป้าหมายในการค้นหาชนิดที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
ชนิดใหม่ๆจากของเหลวที่นำมาจากกระเพาะรูเมนของกระบือ โดยเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่ 5, 9, 44,
45 และ 48 เป็นเอนไซม์ที่ค้นพบได้จากจุลินทรีย์ประเภทแกรมบวก และมีรายงานการจำแนกมาจาก
แบคทีเรียที่อาศัยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องยังไม่มากนักทั้งที่เป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์ที่
ผลิตเอนไซม์ในการย่อยเยื่อใยของพืชที่มีความหลากหลาย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรูเมนนั้น
ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ทำให้มีข้อจำกัดในการนำมาเพาะเลี้ยงใน
ห้องปฏิบัติการ การนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียใน
กระเพาะรูเมน ไปยังจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเพาะเลี้ยงได้ง่าย จะ
ช่วยให้สามารถผลิตเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพและในปริมาณที่มากขึ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยและคณะ
ได้ดำเนินการศึกษาและคัดแยกยีนเซลลูเลสในกลุ่มที่ 5 และ 44 จากกระเพาะโคและกระบือได้แล้วนั้น
โครงการวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อค้นหายีนเซลลูเลสเฉพาะในกลุ่มที่ 9 เพื่อนำยีนที่ได้มาสร้างดีเอ็นเอ
สายผสมในการผลิตเอนไซม์ในยีสต์เพื่อให้อีกทางเลือกหนึ่งของการผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพใน
การย่อยสลายชีวมวลจากพืชให้น้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในขบวนการผลิตเอทานอลและ
เพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรม
กระดาษ และอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อคัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากเมทาจีโนมที่แยกได้จากรูเมนของกระบือ
- 2) เพื่อค้นหายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ชนิดใหม่โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลยีน
- 3) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสที่คัดเลือกได้ในยีสต์เจ้าบ้าน
- 4) เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้

สมมติฐานของการวิจัย

กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถกินอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้เนื่องจากในกระเพาะส่วนรูเมนมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ช่วยในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเยื่อใยประเภทเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส การคัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ในการย่อยเยื่อใยพืชจากรูเมนของกระบือน่าจะมีโอกาสได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยเศษวัสดุจากพืชจำพวก ฟางข้าวและหญ้าแห้งได้ดี

ขอบเขตการวิจัย

สกัดเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอจากของเหลวที่แยกมาจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ นำมาจำแนกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์กลุ่มนี้ในฐานข้อมูลยีน นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปทำการตัดต่อยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และถ่ายยีนเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อด้านปลาย 3' และ 5' ของยีนส่วนยีนเพื่อทำการโคลนยีนส่วนที่เหลือทั้งสองด้านด้วยเทคนิค genome walking เมื่อได้ข้อมูลยีนที่สมบูรณ์แล้วทำการจำแนกยีนเซลลูเลสเส้นที่สมบูรณ์จากเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในรูเมนของกระบืออีกครั้งหนึ่ง ทำการตัดต่อยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความสมบูรณ์ของยีน ทำการตัดต่อยีนเซลลูเลสเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pKLAC2 และตัดต่อเข้าสู่จีโนมของยีสต์ *Kluyveromyces lactis* เลี้ยงยีสต์ลูกผสมในอาหารเหลวและทำการเก็บโปรตีนที่หลั่งออกมาจากอาหารเหลว ทำการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ให้ปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด และทำการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำไปพัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเชิงพาณิชย์โดยใช้ระบบการผลิตด้วยยีสต์ และนำไปพัฒนาเพื่อให้สามารถทำงานได้ในขบวนการหมักเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลในอนาคตเพื่อใช้เป็นพลังงานชีวภาพ ช่วยทดแทนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาล แป้ง ช่วยลดภาวะขาดแคลนวัตถุดิบอาหาร และช่วยลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงก่อให้เกิดความมั่นคงทางเศรษฐกิจของประเทศ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ การผลิตอาหารสัตว์ การย่อยชีวมวลเพื่อประโยชน์อื่นๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างจากรูเมนของกระบือ

เก็บของเหลวจากรูเมนของกระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัว กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้นใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำของเหลวที่ได้จากรูเมนแบ่งใส่หลอด 15 มิลลิลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85% แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่าง ที่ -80°C

การสกัดเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียอาศัยที่อยู่ในกระเพาะรูเมนตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Tajima *et al.* (1999) โดยนำของเหลว 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Sodium phosphate buffer pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% Cetyltrimethylammonium bromide: CTAB) และ proteinase K (20 mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 60 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 5 รอบ เก็บของเหลวส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) และ 5.3 M NaCl ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Ultraspec 1100pro (Amersham Biosciences, UK) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C

ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน

3.1 ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีนยีนเซลล์ลูเลสกุ่มที่ 9 จากดีเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือ ได้แก่

Cel9_F1 : 5' GAYGCNGGNGAYCAYGTIAARTT 3'

Cel9_R1 : 5' GCRTTRTARTCNRTIGCNACYTC 3'

โดย R = A หรือ G; Y = C หรือ T; N = A, C, G หรือ T; I = inosine

3.2 ไพรมเมอร์สำหรับการโคลนยีนที่สมบูรณ์ของเซลล์ของ Cel9-B โดยเทคนิค genome walking ได้แก่

Cel9_4 Up1 : 5' AAACGATCTCGTCGCCCTTGTTCGAGTCAG 3'

Cel9_4 Up2 : 5' TCAGTCCGTCCGGGTACTGGTACATACCC 3'

Cel9_B Dw1 : 5' CGAGTACAATCAGGCTGGCGCTACATTCGG 3'

Cel9_B Dw2 : 5' CTTCCAGGACGCAAACCTTCCAGTTCAAGGAC 3'

Cel9_B Dw3 : 5' GCGATGTTACTACCGCGGACGACAGTTGCT 3'

Cel9_B Dw4 : 5' CGAGGCAAAGGCTAATGCGGACGTTTACGG 3'

ตำแหน่งจับของไพรมเมอร์แต่ละเส้นบนยีนเซลล์ของ Cel9-B แสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.3 ไพรมเมอร์สำหรับการโคลนยีนเซลล์ของ GH9 จากโคลน Cel9-B เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 เพื่อการผลิตโปรตีนลูกผสมในยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces lactis* GG799 ได้แก่

NcoI

pKLAC_9_BF : 5' CATGCCATGGTAACAATGAAGAACCAGAACTTATCC 3'

EcoRI

pKLAC_9_BR : 5' CCGGAATTCTTAGGCAGCAGCGGCAACGAGAGTTGCGTTGTA 3'

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเซลล์จากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยใช้ไพรมเมอร์ Cel9_F และ Cel9_R ที่ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม สารละลาย 1X Taq Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.1% Triton™ X-100) สารละลาย dNTP 400 μM สารละลาย MgCl₂ 2 mM ไพรมเมอร์ Cel9_F และ Cel9_R อย่างละ 1 μM เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Vivantis, USA) 0.1 ยูนิต และปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ รุ่น MyCycler™ thermal cycler (Biometra, Germany) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส กำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คืออุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50°C เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรมเมอร์อย่างเหมาะสมกับไพรมเมอร์ ใช้เวลาเป็นเวลา 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนนี้ เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันกับตัวอย่างอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาถูกโซโพลีเมอเรส ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสทำได้ โดยเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TAE pH 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55°C แล้วเทเจลลงในถาดเจล (Gel tray) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X Loading dye ในอัตราส่วน 5:1 โดยใช้ lambda HindIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation รุ่น Syngene Genius (Bio Imaging System, Germany)

การสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1% แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตผ่านเครื่อง Gel documentation จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด แล้วเติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่เก็บได้) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใน Spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่เติม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB agar (1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast-extract, 1% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเชยโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SOB medium (2% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast-extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18°C เหย้าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเข็นตรีฟิวจ์แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย Transformation buffer หรือ TB (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl ปรับให้ได้ pH 6.7 แล้วเติม 55 mM MnCl₂) ที่แช่เย็น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่งเซลล์เจ้าบ้าน (competent host cell) ที่ได้ในหลอดไมโครเข็นตรีฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T

1. การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวก ค) ตามวิธีการในชุดน้ำยาสำเร็จรูป InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Canada) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิบัติการเชื่อมต่อ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP pH 7.8 ที่ 16°C) พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T 55 นาโนกรัม เอนไซม์ T4 DNA Ligase (Fermentas, Canada) ความเข้มข้น 5 ยูนิต, ผลผลิตพีซีอาร์-150 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α

การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) โดยนำเซลล์เจ้าบ้าน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที่ จากนั้นบีบไลต์สารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในเซลล์เจ้าบ้านผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB broth (1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast-extract, 1% (w/v) NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิเมตร และนำไปปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ย (Spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB agar ที่มี Ampicillin 100 µg/ml, IPTG 0.2 mg/ml และ X-gal 0.2 µg/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3. การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin, X-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T (Fermentas, Canada) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase โดยจะทำการย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วยผลผลิตพีซีอาร์ ที่บริเวณ *lacZ* gene จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เป็นผลให้โคโลนีสีขาวแทน

4. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เลือกโคโลนีที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin 100 µg/ml ปริมาตร 3 มิลลิเมตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) ดังนี้ เติมน้ำสารละลาย Resuspension ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติมน้ำสารละลาย Lysis ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Neutralization ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAprep® spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมน้ำสารละลาย Wash ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Wash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นทรัลพีวีจ์หลอดใหม่ เติมน้ำสารละลาย EB ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8% แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานตาม

5. การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการสกัดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยปฏิกิริยาของการตัดมีปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 นาโนกรัม 1X Buffer Tango™ with BSA (Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C) 3.3 mM, Magnesium acetate 10 mM, Potassium acetate 6.6 mM, BSA 0.01 mg/ml), เอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างละ 3 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ด้วยเจลอะกาโรส 1% จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคลนที่มีขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน มาทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วย ไพเรเมอร์ M13F และ ไพเรเมอร์ M13R-pUC (1ST Base, Malaysia)

การค้นหายีนที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค Genome walking

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยใช้ไพเรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับชิ้นส่วนของยีนและไพเรเมอร์ที่ให้มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการทำ genome walking โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ จากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากเจล ทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ แล้วจึงโคลนลงสู่คอมพิเทนส์เซลล์ของ *E. coli* แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ และเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเดิม ด้วยโปรแกรม Contig Express จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ที่สมบูรณ์

1. การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยให้มีชิ้นส่วนของยีนเป็นปลายตัด (blunt end) เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับ adaptor ของชุด GenomeWalker™ universal kit (Clontech, USA) ได้ ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ restriction enzyme: *DraI*, *PvuII* และ *StuI* ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะจะสุ่มตัดบนจีโนมิกดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กับชิ้นส่วนยีน จนสามารถทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 5 ไมโครกรัม สารละลาย 1X restriction enzyme buffer เอนไซม์ตัดจำเพาะ 100 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำ

การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยา 1 ไมโครลิตร ตรวจสอบลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ ในเจลอะกาโรส 1 %

2. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

สกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAquick[®] Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Germany) โดยนำจีโนมิกที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว มาเติมสารละลาย PN ปริมาตร 10 เท่าของปฏิกิริยาที่ได้ จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมสารละลาย PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน Spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่เติมสารละลาย EB ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% โดยใช้ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Canada) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ Genome Walker adaptor

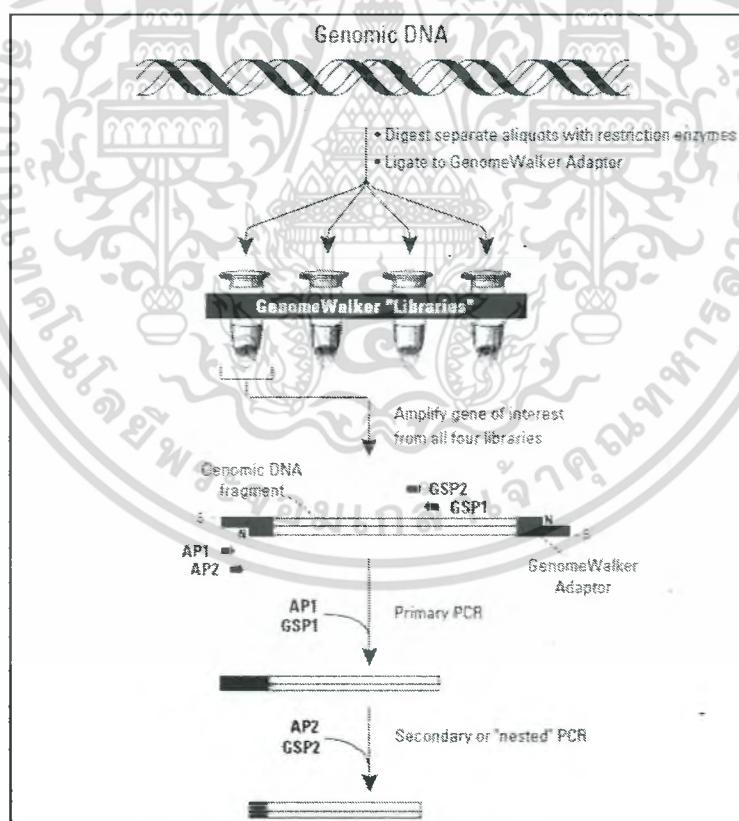
นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดและทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อกับ Genome Walker adaptor (Clontech, USA) โดยในปฏิกิริยา 8 ไมโครลิตร ประกอบด้วย digested DNA 400 นาโนกรัม, Genome Walker adaptor, 1x ligation buffer และ เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม TE buffer 72 ไมโครลิตร

4. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การหาส่วนของยีนโดยใช้ Genome Walker adaptor อาศัยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 รอบ (nested PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ซึ่งในปฏิกิริยารอบที่ 1 (primary PCR) อาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor เส้นที่ 1 (AP1) คู่กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิม เส้นที่ 1 (GSP1) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 มาเพิ่มความ specific ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการทำปฏิกิริยารอบที่ 2 (secondary PCR) โดยเปลี่ยนไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่

ออกแบบจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor เส้นที่ 2 (AP2) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนเดิม เส้นที่ 2 (GSP2) ดังภาพที่ 1

โดยในปฏิกิริยา primary PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร 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/μl *Tth* DNA polymerase , 0.01 μg/μl *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, 0.2 mM GSP1 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยวงรอบแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาทีจากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 7 รอบ ต่อจากนั้นเริ่มวงรอบที่ 2 โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 67°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 32 รอบ จากนั้นคงอุณหภูมิ 67°C ต่ออีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ในเจลอะกาโรส 1%



ภาพที่ 1 หลักการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ GenomeWalker™ universal kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก primary PCR แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเจือจางเป็น 1:100 เท่า ของความเข้มข้นเริ่มแรก เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใน secondary PCR ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x*Tth* PCR reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 9.3 ที่ 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, 0.2 mM GSP2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยวงจรแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 5 รอบ จากนั้นเริ่มวงจรที่ 2 โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 67°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 25 รอบ จากนั้นคงอุณหภูมิ 67°C ต่ออีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรส 1% และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการโคลนและคัดเลือกโคลนและทำการสุ่มเลือกพลาสมิดลูกผสมเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกมาด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R-pUC จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ทั้งทางด้านปลาย 5' (upstream) และปลาย 3' (downstream) มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเซลล์ูเลสตามด้วยโปรแกรม contig assembly ใน BioEdit จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเชื่อมต่อแล้ว มาตรวจสอบหาจุดเริ่มต้นของยีน (start codon) และจุดสิ้นสุดของยีน (stop codon)

การโคลนยีนเซลล์ูเลสที่สมบูรณ์จากเมทาจีโนมที่ดีเอ็นเอ

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน (specific primer) เพื่อทำการดึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลล์ูเลส ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์นั้นต้องมีความจำเพาะในบริเวณเริ่มต้นและท้ายสุดของยีน โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีนเข้าสู่ pKLAC2 ได้แก่ pKLAC_9_BF และ pKLAC_9_BR จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในปริมาตรรวม 25 ปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม 1X PCR Buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20), dNTP 200 μ M ไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 μ M และเอนไซม์ Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, USA) 1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 55°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ จากนั้นจึงคงอุณหภูมิที่ 72°C ต่ออีก 5 นาทีเป็นสิ้นสุดปฏิกิริยา

ทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แล้วตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจล นำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดถูกผสมสัปดาห์ละหนึ่งสัปดาห์ ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูเลสที่ได้ (1st BASE, Malaysia)

การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน

การรวมชิ้นส่วนยีนที่จำแนกได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CAP contig assembly (Huang, 1992) การแปลรหัสโปรตีนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Translate Tool ในเซิร์ฟเวอร์ ExPASy Proteomics Server เข้าถึงได้ที่ <http://expasy.org/tools/dna.html>. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูเลสกับฐานข้อมูลยีนและโปรตีนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST search) เข้าถึงได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul *et al.*, 1997) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูเลสกับยีนเซลล์ลูเลสกลุ่มที่ 9 โดยโปรแกรม ClustalW2 เข้าถึงได้ที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Larkin *et al.*, 2007) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-Joining method โดยใช้โปรแกรม MEGA4 (Saitou and Nei, 1987) และหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ (restriction site) ที่ตัดภายในยีนสามารถหาได้จาก NEBcutter V2.0 เข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน

การวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนใช้โปรแกรม ProtParam ใน ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server (Gasteiger *et al.*, 2003) การคาดคะเนตำแหน่งของ signal peptide ใช้โปรแกรม SignalP 3.0 server เข้าถึงได้ที่ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> การวิเคราะห์หา functional domain ใช้โปรแกรม InterProScan version 4.8 เข้าถึงได้ที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/> (Quevillon *et al.*, 2005) การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนใช้โปรแกรม CD-search เข้าถึงได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Marchler-Bauer and Bryant, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างยีสต์ลูกผสม *Kluyveromyces lactis*

1. การเชื่อมต่อยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อบริเวณปลายด้าน 5' และ ปลายด้าน 3' โดยให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* ที่บริเวณด้าน 5' ของยีน และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ที่บริเวณด้าน 3' จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ทำการตรวจสอบผลผลิตโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ทำการเปรียบเทียบผลผลิตกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วจึงนำเวกเตอร์ pKLAC2 (ภาคผนวก ค) และผลผลิตพีซีอาร์ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *EcoRI* แล้วจึงนำผลผลิตที่ได้มาทำเชื่อมต่อกันตามขั้นตอนที่แสดงในคู่มือของ *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolab, USA)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมของยีนเซลล์และเวกเตอร์ pKLAC2

นำดีเอ็นเอลูกผสมของยีนเซลล์และเวกเตอร์ pKLAC2 ที่ได้ไปทำการถ่ายยีนเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เพื่อใช้เป็นตัวคัดเลือก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบโคโลนีที่ได้ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ specific primer ของเวกเตอร์ pKLAC2 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ทำการเปรียบเทียบผลผลิตกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อหาขนาดของยีนเซลล์แล้วจึงทำการเลือกโคโลนีดังกล่าวไปสกัดพลาสมิดด้วยชุด Plasmid DNA Purification (Fermentas, USA) นำพลาสมิดที่ได้ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์

3. การโคลนยีนเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis*

นำพลาสมิด pKLAC2 ที่เชื่อมต่อกับยีนเซลล์ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเป็น linear DNA นำผลผลิต linear DNA ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ใส่ในยีสต์เจ้าบ้าน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยอาหารเหลว YPGlu (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที อีกครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วยอาหารเหลว YPGlu 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการย้ายเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็น

เวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายเชื้อลงในหลอดไมโครทิวป์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยสารละลาย IXPBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.4 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 ปรับให้ได้ค่า pH 7.4) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YCB (Sigma, France) ที่เติม 5 mM acetamide (Sigma, France) แล้วทำการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-4 วัน

4. การคัดเลือกโคลนที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสของยีสต์ *K. lactis* โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็ง yeast peptone ที่มี 1% CMC คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีการสร้างวงใส และเก็บเชื้อยีสต์ในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80°C (Tokunaga *et al.* 1997)

การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเอนไซม์

นำโคลนของยีสต์ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสมาตรวจสอบการสร้างโปรตีน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% galactose) เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-7 วัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใสที่มีโปรตีน เก็บตัวอย่างวัดปริมาณโปรตีนทุกวัน โดยเทียบกับยีสต์ที่ไม่มีพลาสติกและยีสต์ที่ใส่พลาสติกเปล่า

การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการเจือจางสารละลาย BioRad Protein Assay Reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 นำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย BioRad Protein Assay Reagent ที่เจือจาง 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE

ต้มตัวอย่างโปรตีน 10-20 ไมโครกรัม ใน 5X SDS loading buffer (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 15 mM Tris-HCl pH 6.8) นาน 1 นาที โดยใช้ 4% stacking gel และ 12% separating gel ตามลำดับ แยกขนาดโปรตีนบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7x10x0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้ไฟฟ้าขนาด 15 mA ต่อเจล เป็นเวลา 120 นาที ใช้ pre-stain protein marker (Fermentas, Canada) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน และใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า เมื่อครบกำหนดเวลา นำเจลไปย้อมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

coomassie blue staining buffer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย destaining buffer นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีน

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ในอาหารเหลว YPGal เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดไมโครทิวป้อนใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ตามขั้นตอนที่แสดงในคู่มือของ *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolab, USA)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ดัดแปลงจากวิธีของ Miller (1959) นำ crude enzyme ปริมาตร 100 μ l ที่ผลิตจากยีสต์บ่มกับ CMC ความเข้มข้น 1% ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรต 0.1 M (pH 6.0) ปริมาตร 300 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS (dinitrosalicylic acid) reagent ปริมาตร 600 μ l เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อหาค่า unit of enzyme โดย 1 ยูนิตของเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอะไมโลสให้น้ำตาลกลูโคส 1 μ mole ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

1. การทดสอบเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time)

บ่มเอนไซม์ 100 μ l กับสับสเตรต 1% CMC ที่ละลายในโซเดียมซิเตรต 0.1 M (pH 6.0) ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10, 20, 30, 40, 50, 60 นาที ตามลำดับ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้และนำไป โดยใช้ DNS reagent เลือกระยะเวลาของการบ่มที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดถือเป็นค่าที่เหมาะสม

2. การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimal pH)

บ่มเอนไซม์ 100 μ l กับสับสเตรต 1% CMC ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 M ที่มีค่า pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50°C ในระยะเวลาที่เหมาะสม วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยใช้ DNS reagent ค่า pH ของการบ่มที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดถือเป็นค่าที่เหมาะสม

3. การวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimal temperature)

บ่มเอนไซม์ 100 μ l กับสับสเตรต 1% CMC ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 1 M ที่มีค่า pH ที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 $^{\circ}$ C ตามลำดับ ในระยะเวลาที่เหมาะสม แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยใช้ DNS reagent อุณหภูมิของการบ่มที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดถือเป็นค่าที่เหมาะสม

สถานที่ทำการวิจัย

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- 2) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลงานวิจัย

การสกัดเมทาจีโนมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ

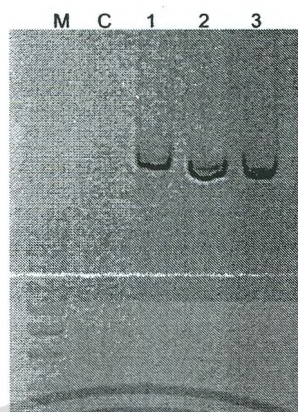
จากการสกัดเมทาจีโนมของแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในรูเมนของกระบือ เมื่อนำไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า เมทาจีโนมของแบคทีเรียที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ $0.915 \mu\text{g}/\text{มิลลิลิตร}$ และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A_{260}/A_{280}) เท่ากับ 1.53 ผลการประเมินเมทาจีโนมแบคทีเรียที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % พบแถบของเมทาจีโนมอยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งเป็นลักษณะตรงกับที่คาดหวัง และแถบดีเอ็นเอไม่เป็นปิ่นซึ่งแสดงว่าไม่มีการแตกหักของดีเอ็นเอในระดับที่มากเกินไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เมทาจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในรูเมนของกระบือ

วิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1% โดยเลน M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder และ เลน 1 คือ เมทาจีโนมดีเอ็นเอ

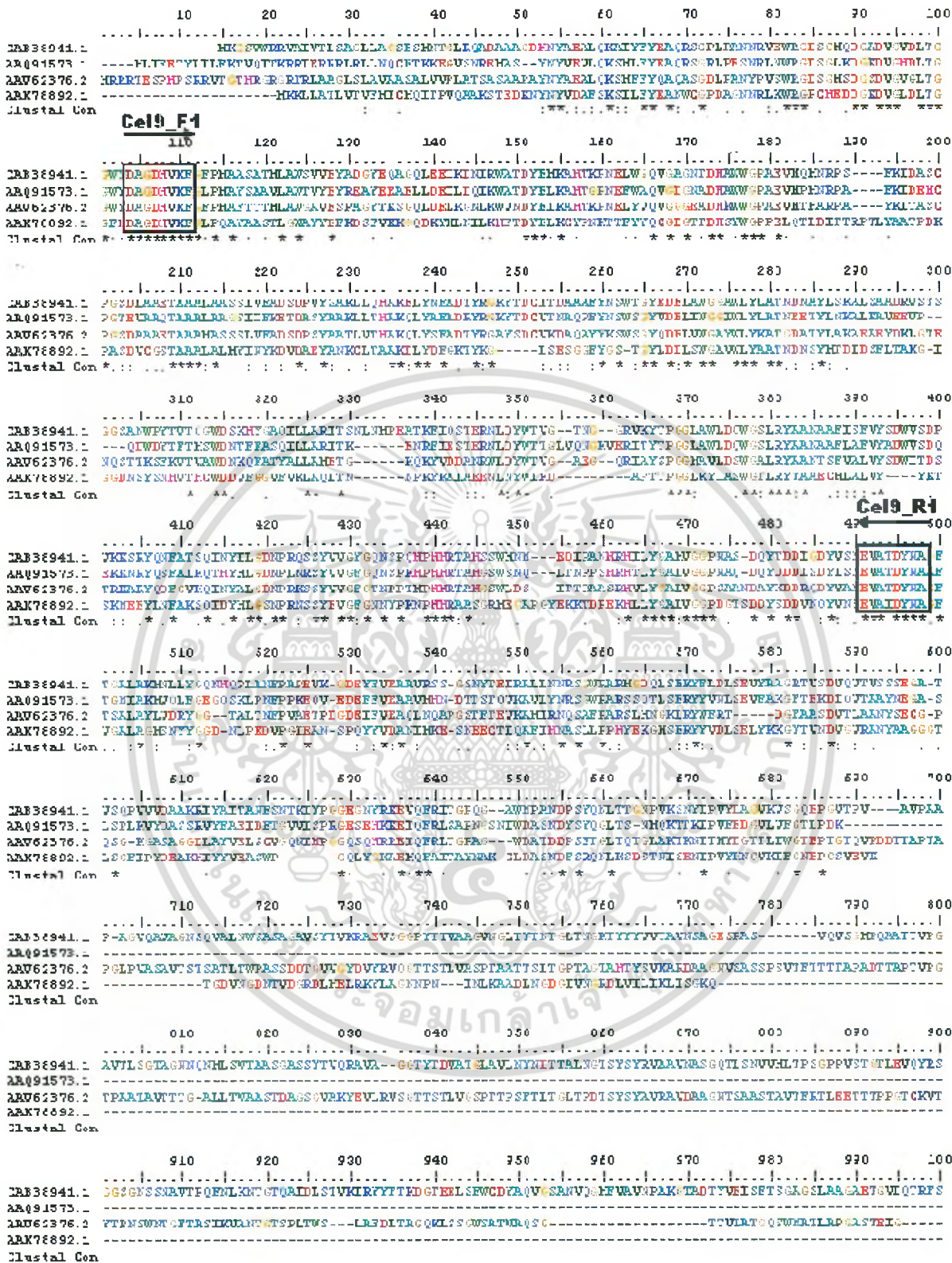
เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ BSF และ RIVB (Kanokratana *et al.* 2004) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นแสดงว่ามียีนนี้ในเมทาจีโนมที่สกัดได้เป็นเมทาจีโนมของแบคทีเรีย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แถบ 16S rDNA จากเมทาจีโนมที่สกัดจากของเหลวในรูเมนของกระบือ ผลการเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ BSF และ RIVB วิเคราะห์โดยเจลอะกาโรส 1% เลน M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder และ เลน 1-3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อการโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9

จากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 โดยเลือกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus* sp. BP-23 (CAB38941.1), *Bacillus pumilus* (AAQ91573.1), *Cellulomonas flavigena* (AAW62376.2) และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (AAK78892.1) ในฐานข้อมูล CAZy (<http://www.cazy.org/fam/GH9.html>) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) ซึ่งได้เลือกบริเวณลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) 2 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4) ทำให้ได้ degenerated primer 1 คู่ คือ Cel9_F1 (Forward) 5' GAY GCN GGN GAY CAY GTI AAR TT 3' และ Cel9_R1 (Reverse) 5' GC RTT RTA RTC NRT IGC NAC YTC 3' โดย R = A หรือ G, Y = C หรือ T, N = A, C, G หรือ T และ I = จับได้ทั้ง A, C, G และ T ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบครอบคลุมความยาวประมาณ 400 กรดอะมิโน และเมื่อทำพีซีอาร์จะทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส



ภาพที่ 4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับจำแนกยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9

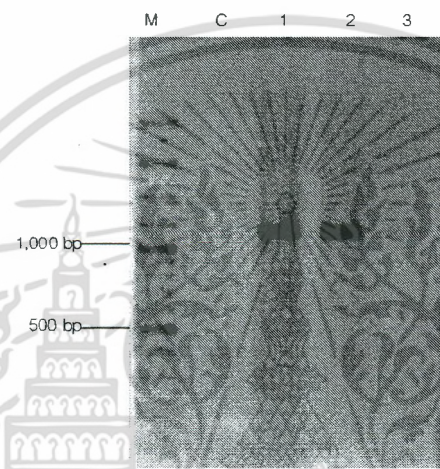
เอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จาก *Bacillus sp.* BP-23 (CAB38941.1), *Bacillus pumilus* (AAQ91573.1), *Cellulomonas flavigena* (AAW62376.2) และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (AAK78892.1) กรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง

ไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 ดอกจัน แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์กลุ่มที่ 9

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์กลุ่มที่ 9 จากดีเอ็นเอแบคทีเรียที่สกัดได้จากของเหลวในกระเพาะรูเมนด้วยปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 ที่ออกแบบและใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่แตกต่างกันสามอุณหภูมิ คือ 45°C, 50°C และ 55°C พบว่ามีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากอุณหภูมิในการ annealing ที่ 50°C มีความชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 5)

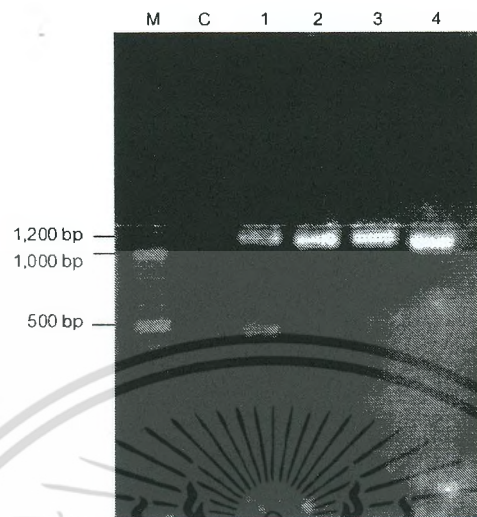


ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์กลุ่มที่ 9 จากเมทาจีโนมของรูเมนกระบือ ผลการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์โดยพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 วิเคราะห์โดยเจลอะกาโรส 1% เลน M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, เลน C คือ negative control และ เลน 1-3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากการใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 45°C, 50°C และ 55°C ตามลำดับ

การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T

หลังจากการโคลนชิ้นส่วนของยีนเซลล์กลุ่มที่ 9 ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์ลงในพลาสมิด pTZ57R/T แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α ด้วยวิธีเหนี่ยวนำด้วยความร้อน (Heat shock) และทำการคัดเลือกโคโลนีที่ถูกแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี Blue/white screening สามารถเลือกโคโลนีสีขาวได้ 6 โคโลนี กำหนดชื่อเป็น Cel9-1, Cel9-2, Cel9-3, Cel9-4, Cel9-A และ Cel9-B ตามลำดับ นำโคโลนีดังกล่าวไปตรวจสอบด้วยวิธีสกัดแยกพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์เพื่อยืนยันความสำเร็จของการโคลนยีน โดยใช้ไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นขนาดของยีนตามที่เราคาดหวัง แสดงว่าการโคลนชิ้นส่วนยีนเซลล์เข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T ประสบความสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอจากการทดสอบด้วยเทคนิคโคลนนิ่งพีซีอาร์ ผลการเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลส โดยพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 วิเคราะห์โดยเจลอะกวาโรส 1% เลน M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, เลน C คือ negative control และ เลน 1-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของโคลน Cel9-1 ถึง Cel9-4 ตามลำดับ

การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนเซลลูเลส

1. การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากโคลนทั้งหมดที่แยกได้ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากแปลรหัสกับฐานข้อมูลโปรตีนด้วยโปรแกรม Blastx ได้ผลแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

โคลน Cel9-1 มีความยาวของยีน 1,144 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีค่าความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Glycoside hydrolase family protein (ZP_06144448.1) ที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 ในกระเพาะรูเมนของโค โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 71% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 82%

โคลน Cel9-2 มีความยาวของยีน 1,121 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีค่าความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Cellulose binding domain/Glycosyl hydrolase family 9 (CBL18389.1) ที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus sp.* 18P13 ในลำไส้ของมนุษย์ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 69% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 77%

โคลน Cel9-3 มีความยาวของยีน 1,079 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีค่าความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Glycoside hydrolase family 9 (EFB39125.1) ที่แยกได้จากเชื้อ *Clostridium thermocellum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

JW20 บนเส้นใยฝ้าย โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 56% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 69%

โคลน Cel9-4 มีความยาวของยีน 1,085 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Glycoside hydrolase family protein (ZP_06144448.1) ที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 ในกระเพาะรูเมนของโค โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 74% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 83%

โคลน Cel9-A มีความยาวของยีน 1,060 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Putative carbohydrate-active enzyme (ADD61854.1) ที่แยกได้จากเชื้อ uncultured organism ในตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 55% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 71%

โคลน Cel9-B มีความยาวของยีน 1,062 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนมากที่สุดกับโปรตีน Glycoside hydrolase family 9 (CBL17554.1) ที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus* sp. 18P13 ในลำไส้ของมนุษย์ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 50% และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 64%

2. การเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเซลล์กลุ่มที่ 9

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของโคลน Cel9-1, Cel9-2, Cel9-3, Cel9-4, Cel9-A และ Cel9-B ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลล์กลุ่มที่ 9 ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ข้างต้นด้วยโปรแกรม MEGA4 ทำให้เห็นว่ายีนทั้งหมดล้วนมีตำแหน่งส่วนอนุรักษ์เช่นเดียวกับเอนไซม์เซลล์กลุ่มที่ 9 ซึ่งยืนยันได้ว่าโคลนที่ได้จากการทดลองนี้เป็นยีนใหม่ในกลุ่มเซลล์กลุ่มที่ 9 (ภาพที่ 7) โดยพบว่า ทั้งหมดโคลน มีความคล้ายกับเซลล์จาก *Ruminococcus* sp. และ *Clostridium* sp. ประมาณ 30-70% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 กับฐานข้อมูลโปรตีนด้วยโปรแกรม BlastX

โคลน	ขนาดยีน (คู่เบส)	ขนาดเปปไทด์ (กรดอะมิโน)	หมายเลขโปรตีน ที่มีความคล้าย มากที่สุด	รายละเอียดโปรตีนที่มีความคล้ายคลึง	แหล่งที่มาของโปรตีนที่มี ความคล้ายคลึง	ค่าเปอร์เซ็นต์ ความเหมือน	ค่าเปอร์เซ็นต์ ความคล้ายคลึง
Cel9-1	1,144	377	ZP_06144448.1	Glycoside hydrolase family protein [<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1]	กระเพาะรูเมนของโค	71%	82%
Cel9-2	1,121	378	CBL18389.1	Glycosyl hydrolase family 9 [<i>Ruminococcus</i> sp. 18P13]	ลำไส้ของคน	69%	77%
Cel9-3	1,079	373	EFB39125.1	Glycoside hydrolase family 9 [<i>Clostridium thermocellum</i> JW20]	ดอกฝ้าย	56%	69%
Cel9-4	1,085	382	ZP_06144448.1	Glycoside hydrolase family protein [<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1]	กระเพาะรูเมนของโค	74%	83%
Cel9-A	1,060	356	ADD61854.1	Putative carbohydrate-active enzyme [uncultured organism]	อุจจาระของคน	55%	71%
Cel9-B	1,062	357	CBL17554.1	Glycosyl hydrolase family 9 [<i>Ruminococcus</i> sp. 18P13]	ลำไส้ของคน	50%	64%

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
AAA20892 : MRLVNSLGRRKILLILAVIVAFSTVLLFAKLWGRKTSSTLDEVGSKTHGDLTAENKNGGYLP-----EEIIPDQPPATGAFNYGEALQKAIFFYECQQRSGKLD : 98
CAK22316 : -----MKKFSLILVVSFLIM-----LLTPSTKISAATTFNYGEALQKAIMFYEFQQRSGKLP : 52
YP_0010371 : -----MKKFSLILVVSFLIM-----LLTPSTKISAATTFNYGEALQKAIMFYEFQQRSGKLP : 52
YP_0010369 : -----MKKILAFLLTVALVAV-----VAIPQAVVSVFADFNYGEALQKAIMFYEFQQRSGKLP : 52
CAP78918 : -----MREK-----KIFSKRTRKALIVSFVILALMVFPVGTVNI SAANVEYNYAKALQYSIFYDANMCGTGV : 62
ZP_0542803 : -----MMRK-----NLPAKRAVAPLLGIVITAAAGIVSFNTVSTSAAG-EYNYAKALQYSIMFFYDANMCGTGV : 61
Cel9-A : ----- : -
CBL17554 : -----MHAKSKLQRKLTALSAMAVSAIAAPLAS--MPANTASAGDTONYAKLLQYSIMFFYDANMCGSQV : 65
ZP_0614286 : -----MHKS-----NRLKSILISGAMAISLAAPFTAVVSPSLTANAADSDNYAKLLQYSIFYDANMCGKNV : 63
Cel9-B : ----- : -
CBL17683 : -----MNLKAKWLAALLTTGAICGTIAAPKSAALLQIQVASAANTYNYVEAMQKSLFFYQVQSGPLA : 63
CBL18389 : -----MNKRIISLACTGAIL--AGAAGSLPVQNAAGLHGAADINYATALQMSLYFYECQQAGHLP : 58
Cel9-2 : ----- : -
Cel9-1 : ----- : -
Cel9-4 : ----- : -
ZP_0614444 : -----MLKKITSGLLSIVMLA--ASTAFSMEVS---SVTAASEQNYADALDKSLFFYEAQQAGPLP : 56
ZP_0542892 : -----MKKTLCFVLTAMLT-----AFILPQGIVSAAGSYNYAEALQKAIFFYECQQAGPLP : 52
Cel9-3 : ----- : -

```

```

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200
AAA20892 : PSTLRLNWRGDSGLDDGK-----DAGIDLTTGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 176
CAK22316 : -STIRNNWRADSCLDGK-----DVGLDLTTGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 129
YP_0010371 : -STIRNNWRADSCLDGK-----DVGLDLTTGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 129
YP_0010369 : -ENKRNWRGDSALNDGA-----DNGLDLTTGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 129
CAP78918 : DENGQYNWRGDCHVYDAELPLDSVNTNMSDAFIRENISVLDPDGDGKVDVSGGF-----DAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 168
ZP_0542803 : DENSLLSWRGDCHVYDARLPLDSQNTNMSDGFISNRSVLDPDGDGKVDVSGGF-----DAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 167
Cel9-A : -----DAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 51
CBL17554 : AEKSGMTWRGNCHTSDS-----VDGGFYDAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 139
ZP_0614286 : ESTTRLSWRGNCHTSDE-----VDGGFYDAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 137
Cel9-B : -----DAGDHVREGEAEAYSGSTIGYEFREYQYKQTCQDQHIETIRFNMYFM : 51
CBL17683 : -DWNVSWRADCMMD-----YVTGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 134
CBL18389 : -AWNREWRADATDD-----FIDGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 129
Cel9-2 : -----DAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 49
Cel9-1 : -----TPGNVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 48
Cel9-4 : -----DAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 49
ZP_0614444 : -SWNRVEWRDSTMTD-----EVLGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 127
ZP_0542892 : -EWNREWRGDATMND-----EVLGGWYDAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 123
Cel9-3 : -----DAGDHVRENEMAYASAMIAAVYEFYAFKQSCYNHILNNAKACDY-- : 49

```

dagdh kF p Y 6 w y d G d5

ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูเลตกลุ่มที่ 9 จากกรมกระบี่กับเอนไซม์ในฐานข้อมูลโปรตีน
 ครอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของไฟรเมอร์

```

220          *          240          *          260          *          280          *          300          *          3
AAA20892 : ---FIKCHPEKDVYYICVGCQCHADH-MWGPCA-VMPMER-----PSYKVDRSSPG--STVVAITSAALAIASIIFFKVKVDG-EYSKECLKHAELDELLEADTTKSD : 268
CAK22316 : ---FIKCHPEPDVYYYICVGCQDIDH-MWGPCA-VVHLRTRK-----PSYKVDITSPG--STVSAITSAALAAASIVFKDTPD-QYSNLCIKHAELLENBFDKTRSD : 223
YP_0010371 : ---FIKCHPEPDVYYYICVGCQDIDH-MWGPCA-VVHLRTRK-----PSYKVDITSPG--STVSAITSAALAAASIVFKDTPD-QYSNLCIKHAELLENBFDKTRSD : 223
YP_0010369 : ---FIKCHPSFNVYYYICVGCQADH-SWGPCA-VMQMPR-----PSFKVDLTNPG--STVVAITSAAMPAASSIVFKPTDP-EYAATILRHAELDELLEADTTTRSD : 221
CAP78918 : RCTFRDKDGNVVAFCVGCQDIDH-AVGNPF-IDDMFRR-----G-WFATKHLPSIDCVSAAASLAVNYVFNFKDTPD-EYAEEKLDYAKALLENBFDKQKNDK- : 262
ZP_0542803 : RCTFRDASGNVVAFCVGCQDIDH-AFWGAP-NDTMFRR-----G-WFITKEKPGDILISATAASLAINYMNFKDTPD-QYAAKSLDYAKALLENBFDKKNPKG : 262
Cel9-A : KCMVLDASGKVEAFVVCNCGEINDHNTYVWSP-KQTQSGGR-----KIYFATANNDQSIDVVALSAAALALHYMNFQDKSS-----LDSAKKLEFEBKNNK- : 143
CBL17554 : NSTKLSGD-SVSSFCVGCQDENVH-SYWNTFAEQEQQGV-----Q-KEYWTSSTAEDAAAYAAALAINYINFGNEE-----DLKYAKALLNYLTVRVS- : 227
ZP_0614286 : DATVLNGD-TVSKVCIKGCQDNDH-AVWCFP-NQGNRG-----GCKWTTDGAANVVAAYAAALAINYVNFQGNPD-----DLKYAKALLENBFDKQHQG- : 222
Cel9-B : DSTTSLGD-TVTELWQIGGENDHNOYVWFP-KQDSSS-----R-KVFKTSNGAADAAAYAAALAVNYLNFHNEE-----DLKYAKALLENBFDKQKSN- : 138
CBL17683 : ---LVGCDLG-DEVVNCIGEIFGDH-KWWSA-VVHLRQELMQG--ETERPYYTKD--SNVTGMAAALAGYLVEKDSDP-ALAKTYLEHAENCKIADTTR-- : 228
CBL18389 : ---LAACDLG-DEIVFCVGNQEDH-TWVFPVLYSYGMGESSP--YTRPYKASEGCAVFGMAAALAGYCALDGKIGEGQRSAYLEHAENCKIADTSPSD : 227
Cel9-2 : ---LAACDLG-DEAVICVGNQEDH-TWVFPVLYEYALKEGSY--YKRPYYTGTC--SAVCGMAAALAGAAALKGKSS--KTDDYIKHAELLENBFDKADTAKSD : 143
Cel9-1 : ---LAACDQG-DEIVFCVGNQKIDH-TWVFPVSLLEYGMEDNGHTVADARASLKSSKGCASVFGMAAALAGYALDGHGTDARANYLKHANHYEVAKTDPSPD : 149
Cel9-4 : ---LADCDKG-DEIVFCVGNQKIDH-TWVFPVGLLEYGMEDNGHSVEBARAILKSSKGCASVFGMAAALAGYAAALDGGKVDSDSKREGYIKHANHYEVAKTDPSPD : 150
ZP_0614444 : ---LADCDKG-TEAVFCVGNQETMDH-TWVFPVIGLIQYGMEDSGASAAAARETLKSSKGCASVFGMAAALAGAAALDGGKIDASKKASYLEHAENCKIADASKSD : 228
ZP_0542892 : ---LVACDRG-DSVVCVGCQCHADH-KWWSA-VIEKEM-----TRPYFVGKG--SAVCGMAAALAVGSIVLKN-----DTPYRYAKYETADATRSD : 206
Cel9-3 : ---FIKCHPSADVYYICVGCQASDH-SFWGAA-VVETQMSR-----PSYKVDLKNGG--STVAAGTASALATCALVEFKDTPD-AYSEKCLKHAELLENBFDKLVKQSD : 143

```

2 G g DH 5Wg s aAa6A 6 Ak A

```

20          *          340          *          360          *          380          *          400          *          420
AAA20892 : DGYTAANG-FYNSWGHYDELTWAAANLYLATN-SSYLDKAES--SDKWGYEPQT-NIPKYKMAQWDEVTYCTYNTAR-KNDNGKYKEAIERHLDWWTGYNGE : 371
CAK22316 : AGYTAATN-FYTSHGHYDELTWAAANLYLATG-TSYLDKAES--VEFWSTEPQT-DIMSYPKMGHWDEVRYCAQNTAR-T-NKPIYKESMERHLDYWTVGVDNS : 325
YP_0010371 : AGYTAATN-FYTSHGHYDELTWAAANLYLATG-TSYLDKAES--VEFWSTEPQT-DIMSYPKMGHWDEVRYCAQNTAR-T-NKPIYKESMERHLDYWTVGVDNS : 325
YP_0010369 : AGYRAAEG-FYSSHGHYDELTWASINLYLATG-QSYLDKAES--EPHWERERGT-TLISYSWAHWDEKLYCSLNTAKT-T-GKSYKQCIENHLDYWTVGFNFS : 323
CAP78918 : -EYNADGPKGYTS-KVQIDYCAANLYLATQ-DNYENELFKY-D-YYAPSC-----WVHCWNVVAATACITAC-DDLYDKDSEEFENRYRQAANKSPYE : 357
ZP_0542803 : VVQGEDGPKGYTS-KVQIDYCAANLYLATQ-EHYLDEAFKY-D-YYAPPG-----WVHCWNVVWSTACITACIENHLDYDKDQNFEDRYKRASNKNQWE : 358
Cel9-A : --ALNNTAGEFYRS-GEEDDYCLAAAILYKATG-SSYNTENKYNCTTKGN-----IYWALSVDITAPAIGYFRNDTNALKASADYAKNYVSN- : 230
CBL17554 : --VATDGPNGYGSDDKLDVAAGNLYLATK-TTYQNIMNQNI--PQYIG-----WVHCWNVVSLCAHVKRHTGDSMVNSYIDGKVNST----- : 312
ZP_0614286 : --SYSC--FYGNKDTSD-GEAACLNYLATK-SAYKGDVDN--IGKAY-----WVHCWNVVSLCAAHVKGHTGDSWAAGYLG-D-LS----- : 298
Cel9-B : --CATEGVSPYESAGCILDKAAAGNLYLATKKEEKYNTILKNEFAGNSSNPN-----WDYCWKVSICASVNGEINGDFGIASNYAKQKRYTN----- : 225
CBL17683 : DHKNTPASDDMYPSEHYDELTWAAANLYKATGKAYENKAES--IPNLGKEDQS-TEMKYTGMQWDEVQQG-GMLIYANTGDATWKEQFRKHLEYWTGYG-G : 331
CBL18389 : TVYNDSDASGYRS-HYDELTWAAANLYKATG-KAYENKAES--IPNLGKELGT-SELKYSMSQWDEVQQG-GMLIYANTKDYTSYISRVQKHLDYWCs---- : 325
Cel9-2 : ADYNDSDASGYRS-HYDELTWAAANLYLATG-KDYLDKAAAS--IKKLDKELGQ-DVLKYTECHQWDEVMQG-GMLIYANTGNEEYINHVQKHVDYLAND--- : 242
Cel9-1 : DYYNDSDAQGYQS-HYDELTWAAANLYLATG-DAYLADAKS--LPKLGKMLGEGDITAYGWAHQWDEITQG-GMLIYANTNDTSSAIAHVKKHCDRWVNGD--- : 250
Cel9-4 : DVYNDSDAQGYQS-HYDELTWAAANLYLATG-DAYLADAKD--MPKLGKMLGEGDITAYGWAHQWDEITQG-GMLIYANTNDSSAIAHVKKHCDRWVNGD--- : 251
ZP_0614444 : SVYNDSDASGYRS-HYDELTWAAANLYLATK-SSYLDKAKG--IPNLGKMLGEGDRLAYGQGHQWDEITMQG-GMLIYANTG--EYKDHVKKHLDRWVNGD--- : 327
ZP_0542892 : STYTAANG-FYSSHGHYDELTWASTLYLATG-RNYLDKAES--IPKLNQNQT-TDIEYCAHQWDECHYG-AVITLARAATGKEEYKHFQAQMLDWWTFQGYNG : 308
Cel9-3 : SGYTAANG-FYNSHGRLVYLAAVRLYKATGKDYKTAED-FDQG-----DNNWTLQWDRKSEFTAVIYAKET-DAMQYKLVAMENLDYVWSQQNK- : 235

```

s D Aa 6Y AT Y1 W cw g 1

ภาพที่ 7 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูกกลุ่มที่ 9 จากกรมกระบือกับเอ็นไซม์ในฐานข้อมูลโปรตีน

กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์

```

*      440      *      460      *      480      *      500      *      520      *
AAA20892 : -----RITYTPKCLAWIDQWGSRLRATTATLALCYSDWENGDK--EKAKYLEPERSCADYAGST--G---RSVVGCGENPPKREHHR : 450
CAK22316 : -----RIKYTPKCLAWINNWGSLRATTATLALAYAGWEGCSP--QKAKIINDPKACVDYAGST--G---RSVVGCGENWPQHEHHR : 404
YP_0010371 : -----RIKYTPKCLAWINNWGSLRATTATLALAYADWEGCSP--QKAKIINDPKACVDYAGST--G---RSVVGCGENWPQHEHHR : 404
YP_0010369 : -----RVQYTPKCLAWIDRWGSLRATTQALASVYADWSGCDP--AKAAVKEPEKKQVDYAGST--G---RSVVGCGKGNPPRNEHHR : 402
CAP78918 : PIDFWAEVAKLVENWMYGKTVTITPGGYALINKWSARNTATQVALVYDKHHGDAP----SAYSQVRSQCEILMGNPLN---RCYIVCYSDISVKFEHHR : 454
ZP_0542803 : QIDFWKPIQDLLDKWSGGG-ITVTPGCVYELNWSARNTAAQLRLVYDKHHGDTP----SKANVRSQMDYLKGNPLN---RCYVVGYSNSVVKYEHHR : 454
Cel9-A : -----EYVCLDNGSARNTALQSGLYDRKVTG-----TNTYRSSEACVKILTCNNSQK---QCIVVGYNNYSPKYEHHE : 300
CBL17554 : -----SNSYVQNAWGSCKRNTALQQCLAAATKNSS-----ADLSAFCYKQCTILGQNPAN---KCFVVGADNSAKYEHHR : 382
ZP_0614286 : -----GDIYKIDAWGSARHNTAQMCLLAAKYN-----KGNAAVWKGQCLLTGDKPFANGQSYCLVVGCEKPNASSMEHHR : 371
Cel9-B : -----PKQWYLNWGAARNTAAQTGLDLTRYKQ-----GDISEVAQSQMMITGDNPKG---VCVVGGENAQSAKYEHHE : 295
CBL17683 : K-----QINHTPDLAWITNWGSLRHATTTALVYAADELFSG--TADADKTOPADTCMNYCFGDNSK---FSYVIGMGDTYPKAWHHR : 413
CBL18389 : -----GKQLDGLCVDITWCCLRVANNIGLAVACDTLFSSDA-ALCTKVKTLYENQINYSIGDNDPH---QCIVVGHCANSPKNEHHR : 406
Cel9-2 : -----AKKLDGLVIDITWCCLRVATGGIPAVASDTILK-DS-PNKDKYKKYETQINYLIGDNPNS---MCIYVGLDETSPKNEHHR : 322
Cel9-1 : -----EAKEIEGLRWISNWGCLRYANTSAPITVAGDTVLK---SEAAKADPFAQVINYAGDNPLK---QSYVVGCGDKYEQNEHHR : 329
Cel9-4 : -----EATLIKGLRWISNWGCLRYANTAAQITVASDTILK---SEASKTEPFAQVINYAGDNPLD---QSYVVGCGDKYEQNEHHR : 330
ZP_0614444 : -----EAKITKGLRWITWCCLRVANTAGLEPVASDTIFK---GEDTSKETEPEEQVINYSGDNPEN---SSYVVGCGENYFKNEHHR : 407
ZP_0542892 : K-----RVAYTPGLAHIDTWGPIRATTEALVYVYADSINDP--ALKQKYNVYKSCIDYALGSNPDN---RSYVVGCGENPPQREHHR : 389
Cel9-3 : -----TPKCLAWCDEWGPIRNTAAALVLSYVDSGVCKE--SKKEEKKFAKSCIDYAGSS--G---RSYVVGCGENYFQNEHHR : 310
          g      W G R      a      y      a      Q      G      66G      pHHR

          540      *      560      *      580      *      600      *      620      *
AAA20892 : THSWADSQMEPPEHR-----HVLVYALVGG--DSTDNITLIDISNYTCNEVACDYNACFVGLLAKMYRKYLDGDPKPFNGIEEVP----- : 530
CAK22316 : THSWYDSMNVPDYHR-----HVLVYALVGG--GESDNRIDDISVQCNEVACDYNACFVGALAKMYRNYDGRVPVEFKAIEVP----- : 483
YP_0010371 : THSWYDSMNVPDYHR-----HVLVYALVGG--GESDNRIDDISVQCNEVACDYNACFVGALAKMYRNYDGRVPVEFKAIEVP----- : 483
YP_0010369 : THSSWSALMTEPAEER-----HVLVYALVGG--BGSDSVIRLDVQCNEVANDYNACFVGALAKMYEKYGGEPINPFAFETP----- : 481
CAP78918 : ASLSKCEDPD-----PHKYVLYALVGG--DENDQHILMTEVYNEVITIDYNAFVGCACAGLYRYFGDPSMEITPNFPPEVE----- : 533
ZP_0542803 : ASLKDANDSS-----PHKYVLYALVGG--DASDQHVRTNRYNEVITIDYNAFVGCACAGLYRYFGDSSMQIDPSPM----- : 529
Cel9-A : ASYGFSELNQGTHAMA-----HVLVYALVGG--KTDGSAALTADYIYNEVAMDYNA----- : 353
CBL17554 : ASLTNWDEFNNS--GGVCPNGHVLVYALVGG--TDQGGSVDSVKRQANEVACDYNALSGAAAGLYSIYKTGS--TVTSIEGVKP----- : 466
ZP_0614286 : ASLTDTAESDG-----VPSKYSLIGALCGG--TDANGVADKRSYQANEVITIDYNAFVGCACAGLYRYHKTGTPDSTSSLPVGVKGGSSDGPVVTQTPTGTANP : 470
Cel9-B : ASLSGWDEYNQAGATFGPKGGHVLVYALVGG--QDANFCKIELNITSSEVATDYNA----- : 354
CBL17683 : TSSVWDDQWTMLGEEKE---YAHVLYALVGG--GQSGTINKVNSYENEVITIDYNAFYTAALCAMIQYGGEQLTNFPPEETPK----- : 496
CBL18389 : THCSWKNALETPEENR-----HVLVYALVGG--DNCGNEDDRGMINNEVATDYNAFTALLCMKVSAYGGETDAAFPPEVVRT----- : 486
Cel9-2 : THCSWKNALETPEENR-----HVLVYALVGG--NQDGSVIDDRGMINNEVATDYN----- : 373
Cel9-1 : SHNSWKNDMKVPSNTR-----HVLVYALVGG--AQDGSVLDGREDFICNEVATDYN----- : 380
Cel9-4 : THSSWKNDLKVPSNTR-----HVLVYALVGG--AQDGSVLDGREDFICNEVATDYN----- : 381
ZP_0614444 : THCSWKNDLAVPSTNR-----HVLVYALVGG--NEDGSVIDDRGMINNEVATDYNAFTALLCMKVDRYGGKTDPNFPPEKEHD----- : 487
ZP_0542892 : THCTWLDKRDIPKHR-----HVLVYALVGG--GRDSSVEDNIEVYKNEVACDYNACFVGALCRLTAEYGGTPLANFPPPE-QR----- : 468
Cel9-3 : THSYANNIGEPSQTR-----HVLVYALVGG--DRNDNLSDRSAQNEVATDYN----- : 361
          a g      h L GALVGGp      D      nEVA DYNa

```

ภาพที่ 7 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูเลสกลุ่มที่ 9 จากรูเมนกระบือกับอนิเมชันฐานข้อมูลโปรตีน
 กรอบสี่เหลี่ยมสีแดงตำแหน่งของไพรเมอร์

ตารางที่ 2 ค่าความคล้ายคลึงของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากรูเมนกระบือเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน

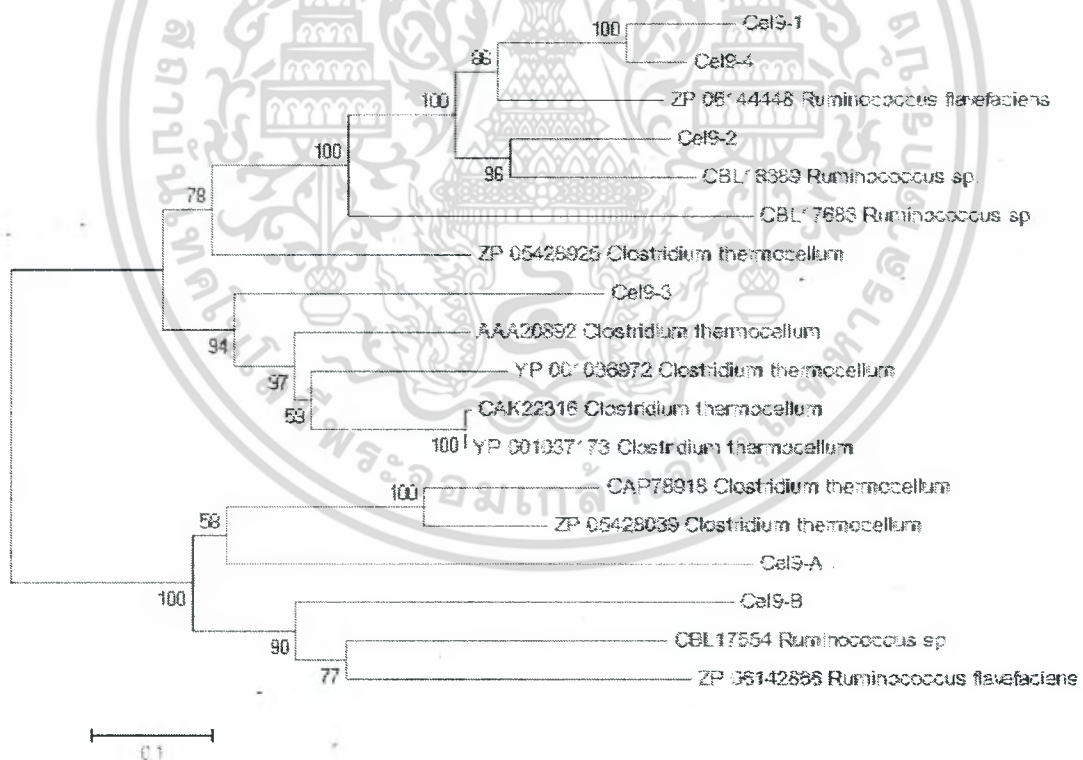
	Cel9-1	Cel9-2	Cel9-3	Cel9-4	Cel9-A	Cel9-B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Cel9-1	100																		
Cel9-2	69	100																	
Cel9-3	36	38	100																
Cel9-4	86	60	39	100															
Cel9-A	29	32	30	30	100														
Cel9-B	29	30	29	31	38	100													
1	39	45	57	44	32	34	100												
2	40	43	58	40	31	32	56	100											
3	30	31	37	31	41	40	29	33	100										
4	28	31	30	29	37	50	27	27	37	100									
5	42	49	37	46	29	30	36	39	28	28	100								
6	60	69	38	62	30	30	34	36	27	28	44	100							
7	39	42	58	40	31	30	51	58	33	29	39	36	100						
8	40	43	58	40	31	32	56	99	33	27	39	36	58	100					
9	31	32	38	32	43	39	30	35	69	37	27	27	34	35	100				
10	44	50	48	44	31	32	45	50	34	29	46	42	52	50	35	100			
11	26	29	26	28	36	42	18	24	27	47	23	21	22	24	35	26	100		
12	70	68	39	74	31	30	32	37	27	28	41	58	36	37	28	44	24	100	

1=*Clostridium thermocellum* (AAA20892), 2=*Clostridium thermocellum* (CAK22316), 3=*Clostridium thermocellum* (CAP78918), 4=*Ruminococcus* sp. (CBL17554), 5=*Ruminococcus* sp. (CBL17683), 6=*Ruminococcus* sp. (CBL18389), 7=*Clostridium thermocellum* (YP_001036972), 8=*Clostridium thermocellum* (YP_001037173), 9=*Clostridium thermocellum* (ZP_05428039), 10=*Clostridium thermocellum* (ZP_05428925), 11=*Ruminococcus flavefaciens* (ZP_06142866), 12=*Ruminococcus flavefaciens* (ZP_06144448)

3. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม Cel9 ทั้งที่ยีนที่โคลนได้จากการทดลองกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA4 (ภาพที่ 8) พบว่า ยีนเซลลูเลสโคลน Cel9-1, Cel9-2, และ Cel9-4 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเซลลูเลสที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus sp.* ZP_06144448, CBL18389 และ CBL17683 ขณะที่ Cel9-B ก็มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเซลลูเลสที่แยกได้จากเชื้อ *Ruminococcus sp.* CBL17554 และ ZP_06142866 แต่แยกกิ่งออกไปเป็นอีกหนึ่งกลุ่ม

โคลน Cel9-3 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกับเอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อ *Clostridium thermocellum* ZP_05428925, AAA20892, YP_0010036972, CAK22316 และ YP_001037173 ขณะที่ Cel9-A แยกกลุ่มออกไปโดยมีความใกล้ชิดกับ *Clostridium thermocellum* CAP78918 และ ZP_05428039



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนเซลลูเลสที่แยกได้จากกรูเมนกระบือเปรียบเทียบกับยีนเซลลูเลสที่แยกได้จากกรูเมนกระบือกับเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่ 9 วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4 หมายเลขบนแขนงแสดงค่า bootstrap test แสดงระยะห่างทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกยีนเซลล์กลุ่มที่ 9 ที่สมบูรณ์

ทำการค้นหายีนที่สมบูรณ์ของยีนเซลล์กลุ่มที่ 9 ทั้งหมดโคลนโดยการสร้างห้องสมุดยีน (library) จากการตัดเมทาจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* และ *StuI* นำไลบรารีที่สังเคราะห์มาเชื่อมต่อกับ Adapter และทำการเพิ่มปริมาณยีนโดยจับคู่กับไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนปลายทั้งสองด้านของยีนตาม เมื่อนำชิ้นส่วนยีนที่ได้จากการทำ Genome walking มารวมด้วยโปรแกรม CAP contig assembly ผลการทดลองพบว่า โคลนที่ Cel9-B สามารถนำชิ้นส่วนต่างๆมาเชื่อมต่อกันได้จนพบตำแหน่งของจุดเริ่มต้น start codon (ATG) และสิ้นสุดของยีน stop codon (TAA) โดยได้ชิ้นส่วนยีนทั้งหมดยาว 3,037 คู่เบส (ภาคผนวก ก)

การวิเคราะห์ยีนเซลล์ Cel9-B

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแปลรหัสด้วยโปรแกรม Translate พบว่ายีน Cel9-B มีความยาว 2,100 คู่เบส และกรดอะมิโนจากการแปลรหัสมีความยาว 699 กรดอะมิโน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel9-B กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่ามีความเหมือนมากที่สุดกับเอนไซม์ *Ruminococcus* sp. 18P13 (CBL17554.1) โดยมีค่าเท่ากับ 53% และมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 66%

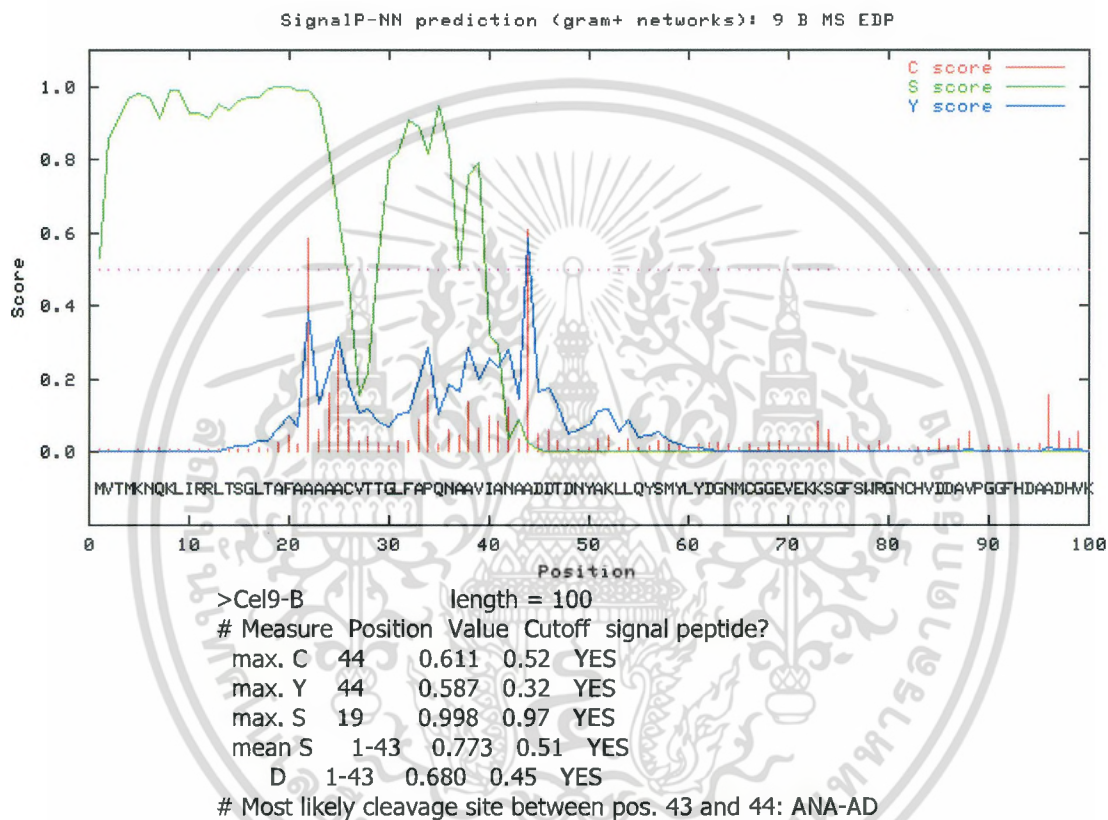
เมื่อตรวจสอบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NEBcutter V2.0 พบว่าเอนไซม์ *XhoI* และ *EcoRV* สามารถตัดภายในยีนได้ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์ในบริเวณ multiple cloning site ของเอนไซม์ในเวกเตอร์ pKLAC2

การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนเซลล์ Cel9-B

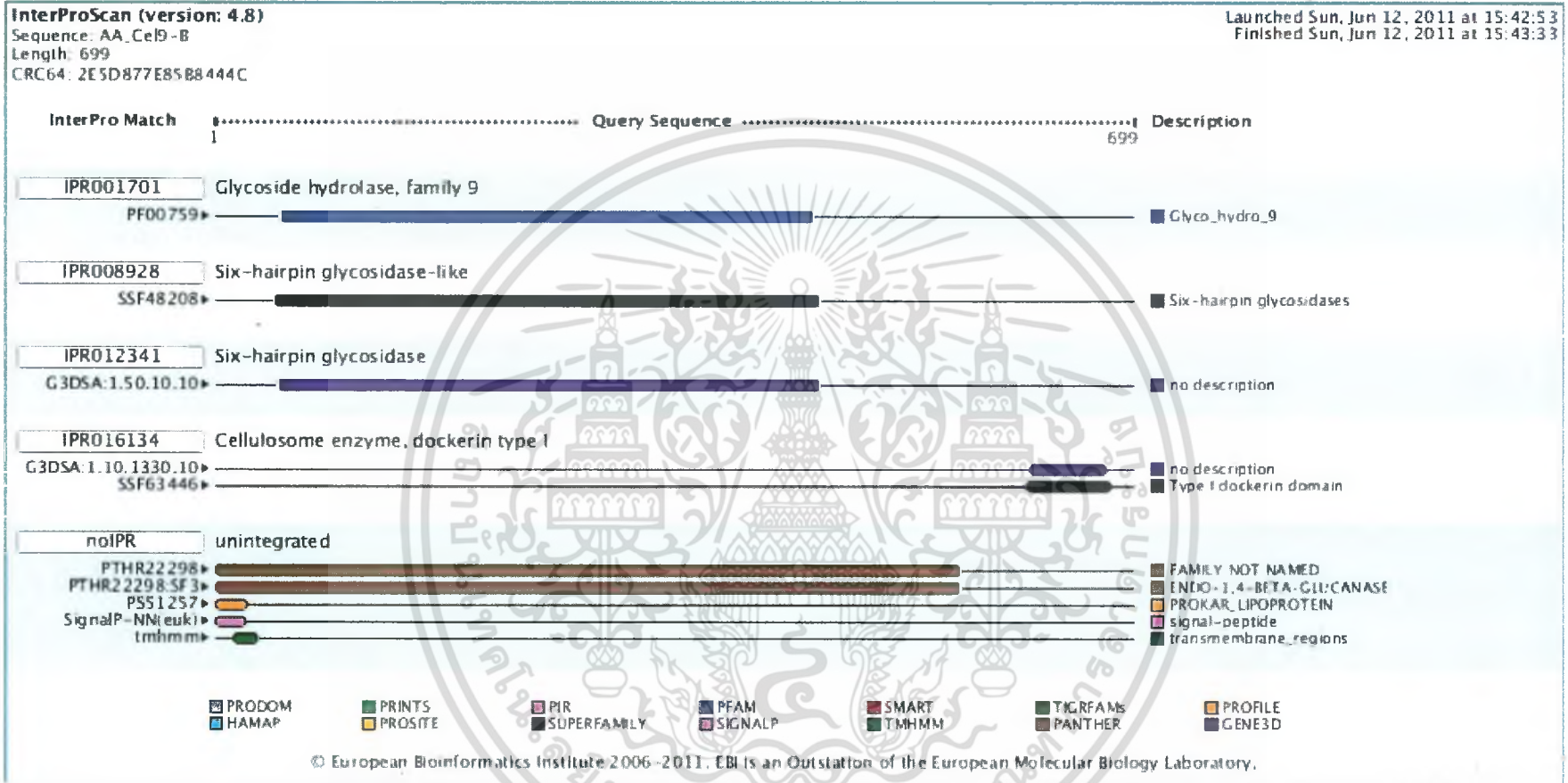
เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีน Cel9-B ด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่า น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 75.7 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 4.92 เมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งการตัดของ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP พบว่าโปรตีน Cel9-B มีตำแหน่งของ Signal peptide ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1-43 โดยมีการตัดของเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน Arg43 และ Arg44 (ภาพที่ 9)

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนด้วยโปรแกรม InterProScan พบว่า โปรตีน Cel9-B มีโดเมนของ Glycoside hydrolase family 9 อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 49-454 (InterPro: IPR001701; Pfam: PF00759) โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46-460 มีความเหมือนกับโปรตีนใน Superfamily Six-hairpin glycosidase (InterPro: IPR008928) มีตำแหน่งของ Signal peptide ตั้งแต่กรดอะมิโน 1-25 นอกจากนี้ยังพบโดเมน Type I Dockerin อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 617-682 (InterPro: IPR016134) (ภาพที่ 10)

เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของโดเมนโดยใช้โปรแกรม CD-search พบว่า โดเมน Glycoside hydrolase family 9 ของ Cel9-B มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเอนไซม์ในกลุ่มที่ 9 และมีลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของ active site เป็น CVVVGFNAQSAKYPHHE (ภาพที่ 11) ซึ่งอยู่ในบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เซลล์ลูเลสกลุ่มที่ 9 คือ [STV] - x - [LIVMFY] - [STV] - x(2) - G - x - [NKR] - x(4) - [PLIVM] - H - x - R (PROSITE: PDOC00511)



ภาพที่ 9 ตำแหน่ง signal peptide บนยีนเซลล์ลูเลส Cel9-B
วิเคราะห์โดยโปรแกรม SignalP



ภาพที่ 10 โครงสร้างของโปรตีน Cel9-B

วิเคราะห์โดยโปรแกรม InterProScan version 4.8

1RQ5_A	100	[1].YTQMKYDALAFFYHKRS	IP.	[1].EMPYA.	[2].EQWTRP.	[1].GHIGIE.	[28].VTGGWYDAGDHG	181	
query	49	[1].YAKLLQYSMYLYDGNMCG.	[1].EV	EKKSG	PSWRGN	CHVDDA	VPGGFHDAADHV	99	
gi_75427674	114	[1].YEDIVKASIKWFYQORAS	MA.	[1].ESQYA	GKWARA.	[1].GHTNPT.	[14].SSKGWYDAGDYG	179	
gi_121828	31	[1].YGEALQKAIMFYEQRS	KL	PENKR	NNWRGD.	[1].ALNDGA.	[5].LTGGWYDAGDHV	86	
gi_145559480	77	[1].YGEALQKAIFFYEQRS	KL.	[1].PSTLR	LNWRGD.	[1].GLDDGK.	[5].LTGGWYDAGDHV	133	
1RQ5_A	182	KYVVNGGIAVWTL	MNMYERAKIR.	[16].EQ	[1].NGYPD.	[4].ARWEIEFFKMQV	T.	[2].E 249	
query	100	KFGITAGYSGTTL.	[1].WAYYBYKDV	DE.	[1].GQTGH	LKLLTDHFCKYFK.	[8].T.	[9].D 163	
gi_75427674	180	RYIVNSGITTYTL	LSLYEHFPQV.	[9].AE	GSLPD.	[4].IKYNLDWMLTMOA	S	D 237	
gi_121828	87	KFNLPMAVAVTML.	[1].WSVYESRDAY	VQ.	[1].GQLPY.	[4].IKWATDYPIKCHP	S.	[9].D 146	
gi_145559480	134	KFNLPMSYSAAML.	[1].WAVYEDAF	KQ.	[1].GOYNE.	[4].IKWADYPIKCHP	E.	[9].D 193	
1RQ5_A	250	[5].GMVHHK	I.	[4].WTA.	[1].GMLP	HEDPQPR.	[2].RPV	STAATLNFAATLAQSARLWKD	306
query	164	GNMDHN.	[1].Y	WGP.	[1].EKQD.	[1].SSRKVFK	TSN.	[1].AADVAEYAAALAVNYLNFHN	212
gi_75427674	238	GGVYHK	L.	[4].FPG	DVMP	AADNSKL.	[2].IGK	STAGTFDFAAVMAMASRIYKH	288
gi_121828	147	GALDHS	W	WGE.	[1].EVMQ	MPRPSFK	[2].LTN.	[1].GSTVVAETAAMAASSIVFKP	195
gi_145559480	194	GHADHA	W	WGP.	[1].EVMF	MERPSYK.	[2].RSS.	[1].GSTVVAETSAAALIASIIFKK	242
1RQ5_A	307	[6].ADCLEKAEIAWQAALK.	[8].TPGS.	[1].GP	GGGPFYND	DYVGDEFYWAACELYVTTGKDEY	373		
query	213	EEDLKYAKALFDFAQK	SNSC.	[1].TE.	[1].VSPFYES	AGCDDDKAFAAGFLYLATKEEKY	266		
gi_75427674	289	[6].SKCLEAAKKAYAWGQQ.	[5].LANP.	[1].DV	STGAYEN	DNPNDKVLGATLFFITTDASY	353		
gi_121828	196	[6].ATLLRHAKELFTFADT.	[2].SDAG.	[1].RA	AEGYSS.	[1].SGFYDELWASTWLYLATGDQSY	257		
gi_145559480	243	[6].KECLKHAKELFEFADT.	[2].SDDG.	[1].TA	ANGFYNS.	[1].SGFYDELSWAAVWLYLATNDSSY	304		
1RQ5_A	374	[1].NYLMNSPH.	[26].WGTTQGLGTIT.	[22].AADRWLENIIE.	[1].GYRL	PIKQ	AE.	[5].YPW 471	
query	267	NTILKNFA.	[12].WDKVTGASIL	NGEINGDFGIA.	[1].NYAK	QKYT.	[1].PK.	[5].NSW 328	
gi_75427674	354	[1].QSGSSEYV.	[2].WGDVWGLATYE.	[21].TADNFANRAEK	GFGV	VMPK	DD	FVW 420	
gi_121828	258	[1].DKAESYEP.	[18].WDNKLYGSLLL.	[12].CIENHLDYWTV.	[1].FNGS.	[1].VQYT	PK.	[5].DRW 338	
gi_145559480	305	[1].DKAESYSD.	[18].WDDVYGTLL.	[13].AIERHLDWWT.	[1].YNGE.	[1].ITYT	PK.	[5].DQW 386	
1RQ5_A	472	GS.	[3].ILN.	[5].GYAYD	FTGDSKYLDCMFDGISYLLGRNAM.	[2].	[1].VQVYGG	[3].P 536	
query	329	GA.	[1].RYN.	[14].AAQYT.	[5].KYKQGDYSEWAQSQMMILGDNPK.	[2].	[1].VQVYGG	[3].G 392	
gi_75427674	421	GS.	[2].VAS.	[6].LYAYY	LTGEQKYKAAVVKVLDYLLGKNPL.	[2].	[1].VQVYGG	[3].P 482	
gi_121828	339	GS.	[1].RYA.	[6].ASVYA.	[6].PAKAAYKEFAKKQVDYALGSTGR		[1].VQVYGG	[3].S 406	
gi_145559480	387	GS.	[1].RYA.	[6].ACVYS.	[6].KEKAKTYLEFARSQADYALGSTGR		[1].VQVYGG	[3].G 454	
1RQ5_A	537	QTSKRFPAP	PP	GIISGG	PNS.	[17].QKCFIDHTDSWGTNQITVWNAPFAWVTA	602		
query	393	[1].SGWDEYNQA.	[5].PK.	[6].GALEGG.	[1].QDA	NFQFKDELNDITSSEVATDYNATLVAAAA	454		
gi_75427674	483	STSDNIEEP	IP	GMLVGG	PQP.	[21].ATAYTDQRCSYATNEVAIWNAPLAYLAG	552		
gi_121828	407	SWSALMTEP	AE.	[6].GALVGG	PDG	SDSYVDRLLDYQCNEVANDYNAGFVGLA	461		
gi_145559480	455	SWADSQMEP	PE.	[6].GALVGG	PDS	TDNYTDDISNYTCNEVACDYNAGFVGLLA	509		

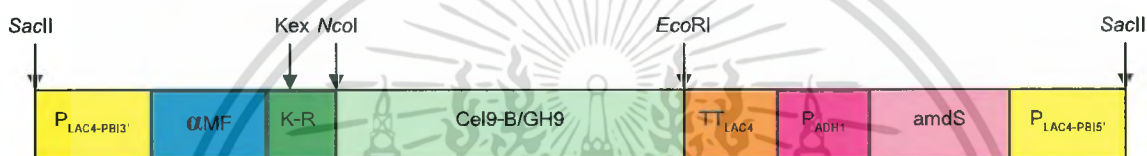
ภาพที่ 11 โปรตีนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ Cel9-B

วิเคราะห์โดยโปรแกรม CD-search โดย 1RQ5_A = *C. thermocellum* CbhA Exocellulase, gi_75427674 = *F. succinogenes* Endoglucanase D, gi_121828 = *C. thermocellum* Endoglucanase F, gi_145559480 = *C. thermocellum* Endoglucanase 1; แถบสีฟ้าแสดงบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ GH9 โดยตำแหน่ง H = active site

การสร้างยีสต์ลูกผสมผลิตเอนไซม์

1. การโคลนยีนเซลลูเลส Cel9-B/GH9 เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2

ทำการเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลส GH9 จากโคลน Cel9-B โดยใช้ไพรเมอร์ pKLAC_9_BF ที่มีตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *NcoI* และ pKLAC_9_BR ที่มีตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *EcoRI* โคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2. ในตำแหน่ง *NcoI* และ *EcoRI* (ภาพที่ 12) และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม แล้วจึงถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. lactis* GG799 และทำการเหนี่ยวนำยีนให้แทรกตัวเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์โดยใช้ acetamide เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็ง YCB

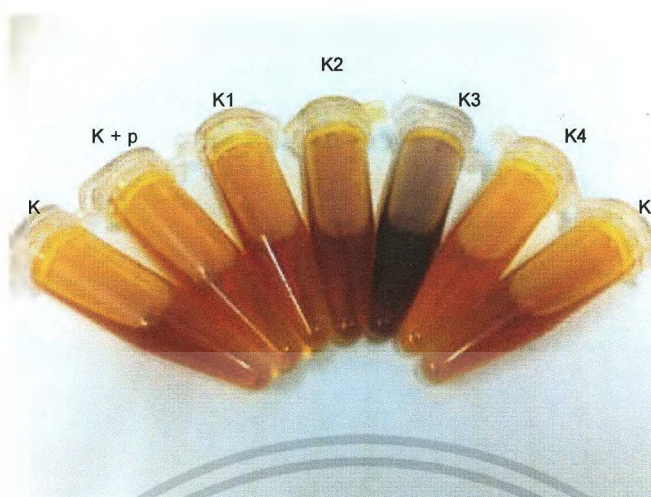


ภาพที่ 12 ตำแหน่งการโคลนยีนเซลลูเลส GH9 เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2

ตำแหน่ง $P_{LAC4-PBI}$ = LAC4 promoter, αMF = α -mating factor signal peptide, K-R = Kex endoprotease site, Cel9-B/GH9 = ยีนไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 9 จากโคลน Cel9_B, TT_{LAC4} = LAC4 transcription terminator, P_{ADH1} = yeast ADH1 promoter และ amdS = acetamidase selectable marker gene ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ชี้โดยลูกศร

2. การคัดเลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

สุ่มเลือกโคโลนีของยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง YCB+ 5 mM acetamide มา 5 โคโลนี (K1-K5) นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด YGal นาน 7 วัน เก็บ crude protein ที่หลังออกมาในอาหารเหลวมาทำการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ crude protein 100 ไมโครลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate pH 5.0 ที่มี 1% CMC ปริมาณ 300 μ l ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย DNS และตรวจดูสีของส่วนผสมของปฏิกิริยา ผลการทดสอบพบว่า สีของสารละลายในหลอดโคโลนี K3 มีสีน้ำตาลเข้ม บ่งบอกได้ว่า โคโลนี K3 สามารถผลิตเอนไซม์ได้เมื่อเทียบกับหลอดที่ใส่เฉพาะยีสต์ที่ไม่มีพลาสมิด (K) และหลอดที่ใส่ยีสต์ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pKLAC2 (K+p) และ โคโลนีอื่นๆซึ่งสีของสารละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

หลอดทดสอบ K = ยีสต์ที่ไม่มีพลาสมิด, K+p = ยีสต์ที่มีพลาสมิดเปล่า pKLAC2 และ K1-K5 = โคโลนีที่ 1 ถึง 5

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

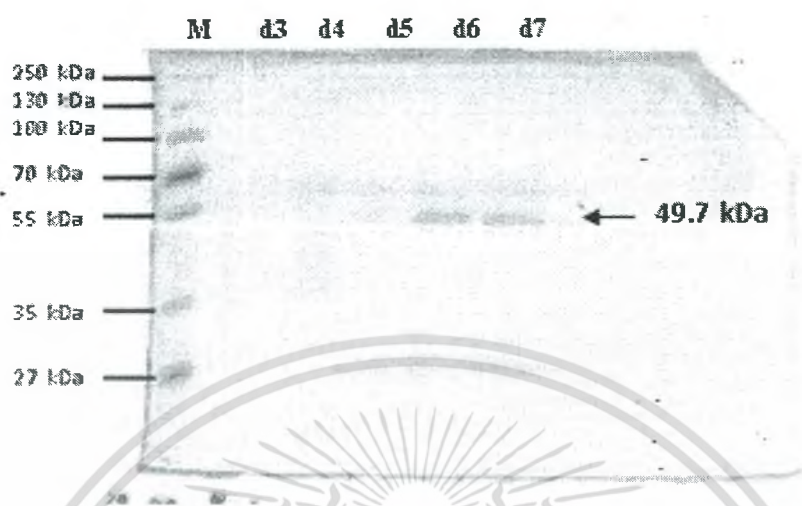
1. เวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ลูกผสมเพื่อการผลิตเอนไซม์

นำยีสต์ลูกผสม โคโลนี pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 มาเลี้ยงในอาหาร YGal ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเซลล์ทิ้งและวัดปริมาณโปรตีนทุกวัน พบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารเหลว มีค่าสูงที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ 803.87 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 3) เมื่อนำอาหารเลี้ยงยีสต์ลูกผสมมาทำการรันเจล SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มีขนาด 49.7 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเอนไซม์ Cel9B/GH9 ที่ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม ProtParam คือ 44.3 kDa และมีขนาดของแถบโปรตีนเข้มที่สุดในวันที่ 6 ถึง 7 (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงยีสต์ในช่วงระยะเวลาการบ่ม 1-7 วัน

ยีสต์ลูกผสม <i>K.lactis</i>	ระยะเวลาการเลี้ยง	ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mg/L)
ไม่มีพลาสมิด	7 วัน	690.62
มี pKLAC2	7 วัน	309.69
มี pKLAC2_Cel9-B/GH9-K3	3 วัน	42.01
	4 วัน	92.05
	5 วัน	186.14
	6 วัน	309.69
	7 วัน	803.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 โปรตีนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ *K. lactis* ที่มียีน pKLAC2-Cel9B/GH9-K3

วิเคราะห์โดยเทคนิค SDS-PAGE โดยโหลดโปรตีนหลุมละ 20 μg เลน M = pre-stained protein marker, เลน d3-d7 = ระยะเวลาการเลี้ยงยีสต์ลูกผสม 3-7 วันตามลำดับ

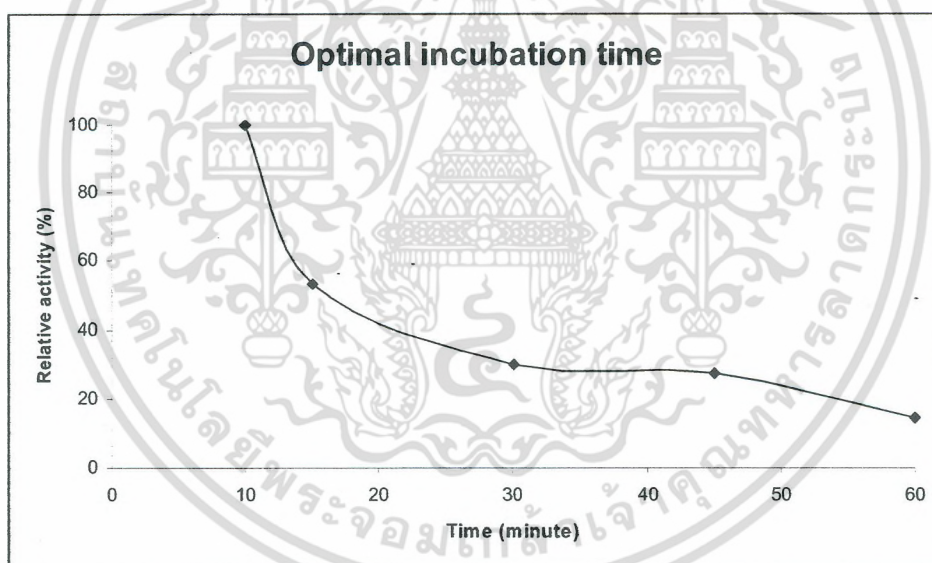
การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

1. เวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์

นำ crude protein ที่ได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคลน pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 ที่เลี้ยงในอาหาร YGal มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรต 1% CMC ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตรดบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50°C หยุดปฏิกิริยาคด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับกลูโคสมาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าระยะเวลาการบ่มของปฏิกิริยานาน 10 นาที ให้ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด เท่ากับ 0.458 ± 0.043 ยูนิต (ตารางที่ 4) ขณะที่เมื่อบ่มเอนไซม์นานขึ้นเป็น 15 นาที ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์ลดลงอย่างประมาณ 50% และเมื่อบ่มเอนไซม์นานขึ้นพบว่าค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือน้อยกว่า 30% (ภาพที่ 15) ดังนั้นระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 10 นาที จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส Cel9B/GH9-K3

ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละระยะเวลาของการบ่ม

ระยะเวลาการบ่ม (นาที)	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
10	0.458 ± 0.043	100
15	0.276 ± 0.017	53
30	0.150 ± 0.029	30
45	0.098 ± 0.018	27
60	0.095 ± 0.002	14



ภาพที่ 15 ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละระยะเวลาของการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

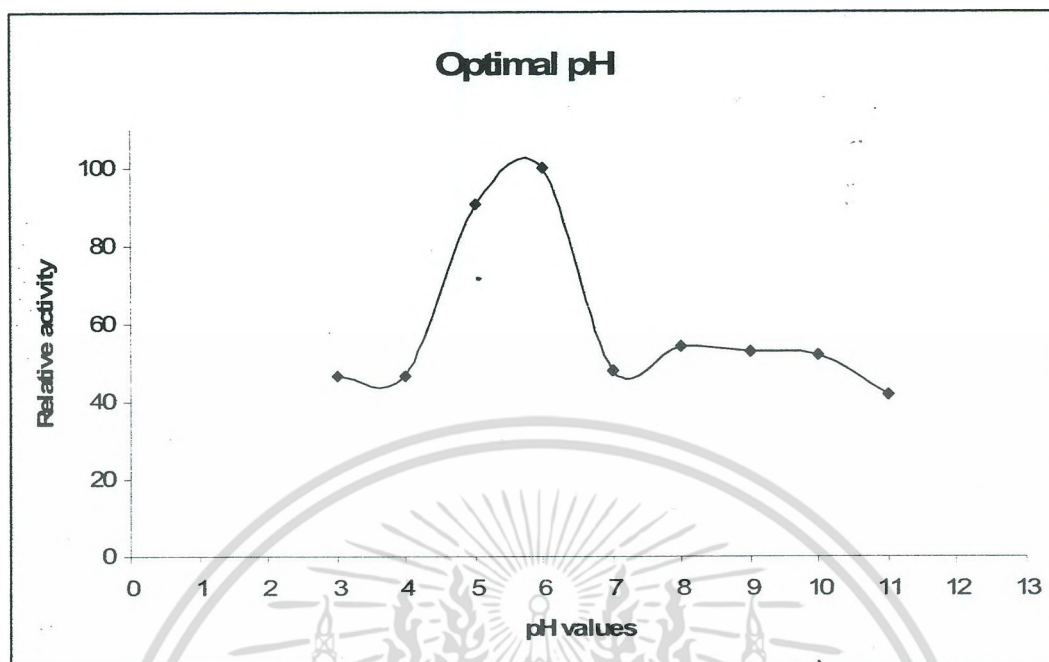
2. ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์

นำ crude protein ที่ได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคลน pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 ที่เลี้ยงในอาหาร YGal มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรต 1% CMC ใน 0.05M โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่ pH 3-6 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7-11 บ่มที่อุณหภูมิ 50°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิคซ์ที่ได้เทียบกับกลูโคสมาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าการบ่มปฏิกิริยาที่ค่า pH 6 ให้ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 0.591 ± 0.011 U/mg รองลงมาคือที่ pH 5 ให้ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 0.536 ± 0.004 U/mg หรือ 91% (ตารางที่ 5) ขณะที่การบ่มเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ pH 3-4 และ pH 7-11 ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ยังคงอยู่ในช่วงประมาณ 40-50% ของค่าสูงสุด (ภาพที่ 16) จากการทดสอบข้างต้นสรุปได้ว่าการบ่มปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 6 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลล์ Cel9B/GH9-K3

ตารางที่ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละค่าความเป็นกรดด่างของปฏิกิริยา

ค่าความเป็นกรดด่าง	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
3	0.275 ± 0.014	47
4	0.276 ± 0.008	47
5	0.536 ± 0.004	91
6	0.591 ± 0.011	100
7	0.282 ± 0.005	48
8	0.320 ± 0.011	54
9	0.311 ± 0.006	53
10	0.307 ± 0.005	52
11	0.247 ± 0.003	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



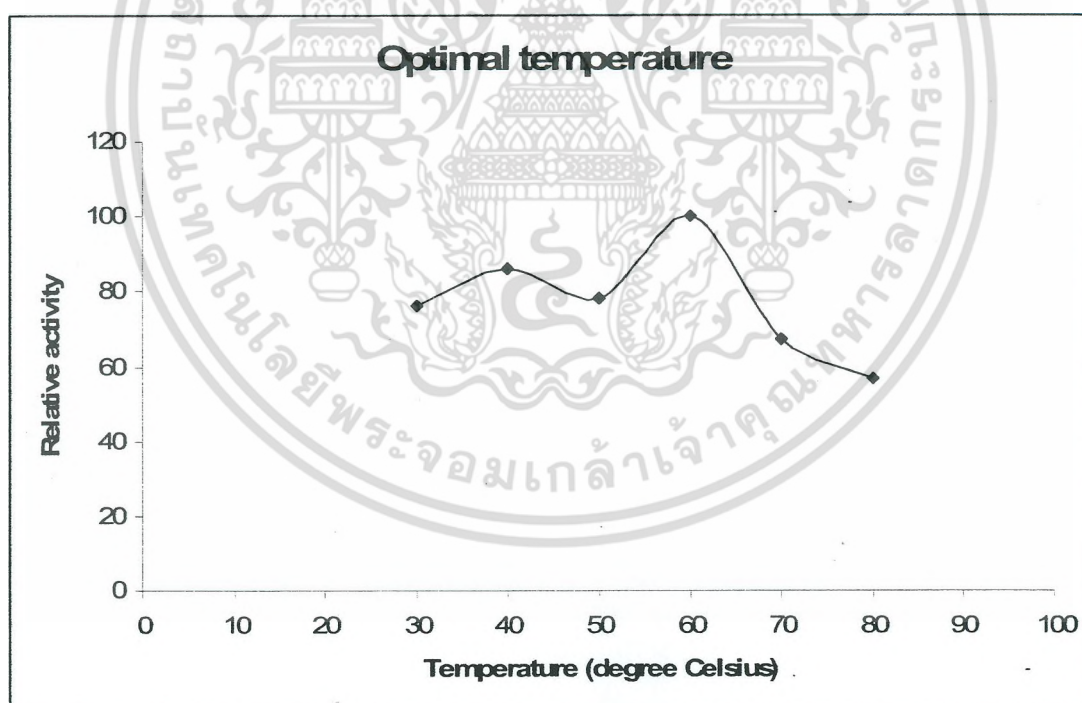
ภาพที่ 16 ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ Ce19B/GH9-K3 ในแต่ละค่าความเป็นกรดต่างของปฏิกิริยา

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์

นำ crude protein ที่ได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคลน pKLAC2-Ce19B/GH9-K3 ที่เลี้ยงในอาหาร YGal มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรต 1% CMC ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตรดความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30-80°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับกลูโคสมาตรฐาน พบว่า เมื่อ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที ได้ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด เท่ากับ 0.624 ± 0.036 U/mg (ตารางที่ 6) ขณะที่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-50°C ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสยังคงมีค่าสูง 70-80% และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70-80°C พบว่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ยังคงมีค่าสูงมากกว่า 55% (ภาพที่ 17) ผลการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ข้างต้นจึงบ่งได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Ce19B/GH9-K3 อยู่ที่ 60°C

ตารางที่ 6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละอุณหภูมิของการบ่ม

อุณหภูมิ (°C)	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
30	0.474 ± 0.005	76
40	0.538 ± 0.004	86
50	0.490 ± 0.005	78
60	0.624 ± 0.036	100
70	0.415 ± 0.015	67
80	0.353 ± 0.013	57



ภาพที่ 17 ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ในแต่ละอุณหภูมิของการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ความจำเพาะต่อสับสเตรต

นำ crude protein ที่ได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคลน pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 ที่เลี้ยงในอาหาร YGal มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้สับสเตรตชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรตความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 มีค่าจำเพาะของกิจกรรมของ CMCCase, Avicelase, FPase และ Xylanase เท่ากับ 0.624 ± 0.036 , 0.083 ± 0.013 , 0.154 ± 0.032 และ 0.178 ± 0.029 U/mg ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ค่าจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3

สับสเตรต	Activity	Specific activity (U/mg)
1% CMC	Endoglucanase	0.624 ± 0.036
1% Avicel	Exoglucanase	0.083 ± 0.013
1% Filter paper	Endo- and Exo-glucanases	0.154 ± 0.032
1% Xylan	Xylanase	0.178 ± 0.029

4. วิจารณ์ผล

การโคลนยีนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย เช่น ดิน ในลำไส้สัตว์ มูลสัตว์ แหล่งทับถมของซากพืชซากสัตว์ รวมถึงน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางเมทาจีโนมิกส์ ซึ่งเป็นการจำแนกยีนที่สนใจโดยตรงจากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง โดยไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้มีโอกาสค้นพบยีนชนิดใหม่ได้มากขึ้น ในปัจจุบันวิธีการเมทาจีโนมิกส์ได้มีการนำมาใช้ในการจำแนกยีนชนิดใหม่แล้วมากมาย โดยเฉพาะยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่สนใจในระดับอุตสาหกรรม ดังเช่น การสร้างห้องสมุดยีนหรือไลบรารีจากเมทาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดจากในลำไส้ปลวกแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ หลังทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค random short gun sequencing พบว่าสามารถค้นพบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มGH5 ได้ 56 ยีน กลุ่มGH9 ได้ 11 ยีน กลุ่มGH8 ได้ 5 ยีน และ กลุ่มGH45 ได้ 6 ยีน เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากไลบรารีที่โคลนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* พบว่าโคลนที่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีเพียง 11 โคลน (Wamecke *et al.*, 2007) วิธีการดังกล่าวซึ่งเรียกว่า Activity หรือ Expression-based strategy ยังได้มีการนำมาใช้ในการค้นหายีนที่กำหนดการสร้างเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากในดินที่มีการทับถมของใบไม้ได้ 3 ยีน (Pang *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบยีนจากตะกอนดินจากทะเลสาบ (Grant *et al.*, 2004) ลำไส้ของคน (Tasse *et al.*, 2010) จากมูลช้าง (Wang *et al.*, 2009) และในสิ่งขับถ่ายจากไส้เดือน (Beloqui *et al.*, 2010) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีการตรวจสอบจำนวนโคลนเป็นจำนวนมากแต่ได้โคลนที่มีการแสดงออกของยีนเพียงไม่กี่โคลน เนื่องจากต้องอาศัยโปรโมเตอร์ที่อยู่ในด้าน 5' ของยีนที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ ทำให้มีข้อจำกัดในการแสดงออกของยีนในเชื้อ *E. coli* การค้นหายีนเซลลูเลสจากรูเมนของกระบือโดยใช้เทคนิคดังกล่าวสามารถพบโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างน้อย 12 โคลน จากการตรวจสอบทั้งหมด 10,000 โคลน อย่างไรก็ตาม ไม่พบยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 แต่อย่างใด (Nhung *et al.*, 2010)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการค้นหายีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อกลุ่มยีนที่สนใจแล้วทำการเพิ่มปริมาณยีนจากเมทาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ซึ่งเรียกว่า Sequence-based strategy แล้วทำการค้นหายีนส่วนที่เหลือทั้งสองด้านด้วยเทคนิค Genome walking จากนั้นจึงโคลนยีนเข้าสู่เชื้อยีสต์ *K. lactis* โดยอาศัยโปรโมเตอร์ LAC4 ที่มีอยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pKLAC2 ซึ่งวิธีการนี้ไม่ต้องตรวจสอบจำนวนโคโลนีเป็นจำนวนมาก สามารถกำหนดการค้นหายีนกลุ่มที่สนใจได้ และสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ด้วยโปรโมเตอร์ที่ต้องการ ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากเมทาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่อยู่ในของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือได้ไพรเมอร์ Cel9_F1 และ Cel9_R1 ซึ่งจะทำได้ชิ้นส่วนของยีนขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เมื่อโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วถ่ายเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนนี้สี่ขาว 4 โคลนนี้ ให้ชื่อว่า Cel9-1, Cel9-2, Cel9-3, Cel9-4, Cel-A และ Cel-B ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทั้งหมดและเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ยืนยันได้ว่าเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 และทั้งหมดเป็นยีนใหม่ในกลุ่มนี้

เมื่อทำการค้นหายีนส่วนที่เหลือด้วยเทคนิค genome walking พบว่ามีเพียงโคลน Cel9-B ที่ประสบความสำเร็จในการค้นหายีนในด้านปลาย 3' และ 5' โดยได้ยีนที่มีความยาวทั้งสิ้น 3,037 คู่เบส ซึ่งมียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ตั้งแต่จุดเริ่มต้น (start codon) ถึง จุดสิ้นสุดยีน (stop codon) มีความยาวทั้งสิ้น 2,100 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็น โปรตีนขนาด 699 กรดอะมิโน พบตำแหน่งของ signal peptide ในตำแหน่งกรดอะมิโน 1-43 โปรตีน Cel9-B มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุด 53% กับเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ของ *Ruminococcus* sp. 18P13 (CBL17554.1) ที่แยกเชื้อได้จากลำไส้ของคน (Pajon *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน Cel9-B มีโดเมน glycoside hydrolase family 9 อยู่ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 49-454 และพบโดเมน dockerin type I อยู่ที่ตำแหน่งที่ 617-682 ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณอนุกรมของโปรตีน Cel9-B มีลักษณะเช่นเดียวกับเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 คลาสที่ 1 คือ [STV] - x - [LIVMFY] - [STV] - x(2) - G - x - [NKR] - x(4) - [PLIVM] - H - x - R โดยมีตำแหน่ง His เป็น active site residue (Tomme *et al.*, 1991; Sigrist *et al.*, 2010) บ่งบอกได้ว่ายีน Cel9-B ถือเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 คลาสที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นเซลลูโลโซม เช่นเดียวกับเซลลูเลสส่วนใหญ่ในกลุ่มที่ 9 โดยพบว่าเซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแกรมบวกที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน เช่น *Clostridium thermocellum* หรือ *Clostridium cellulolyticum* สามารถทนต่อความร้อนได้ดีและมีลักษณะเป็นเซลลูโลโซมซึ่งสามารถย่อยเส้นใยเซลลูโลสแบบ crystalline ได้ (Beguin, 1990; Beguin *et al.*, 1992) และยังพบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่มีส่วนของโดเมน dockerin type I ซึ่งมีความยาวประมาณ 65 ถึง 70 กรดอะมิโน และโดยทั่วไปจะอยู่ในส่วนปลายด้านคาร์บอกซิลของโปรตีน ในโดเมน dockerin จะมีบริเวณที่เป็นเบสซ้ำแบบ tandem repeat ของ calcium-binding loop-helix motif 2 ชุด (Shoham *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีน Cel9-B อาจจะถูกแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่มีวิวัฒนาการมาจากเชื้อ *Clostridium* sp. ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้กับฐานข้อมูล GenBank

เมื่อทำการโคลนยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากยีนต้นแบบแล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิด pKLAC2 เพื่อสร้างยีสต์ลูกผสม *K. lactis* แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายสเตรด CMC ให้โคลนที่มีการแสดงออกดีที่สุดชื่อว่า pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 ทำการเลี้ยงยีสต์ลูกผสมในอาหารเหลว YGal เป็นเวลา 1-7 วัน และทำการทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์พบว่า กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมีการแสดงเพิ่มขึ้นตามเวลาการบ่มเชื้อยีสต์ โดยมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ 803.87 mg/L และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ลูกผสมมาทำการรันเจล SDS-PAGE พบแถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนที่มีขนาด 49.7 kDA ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการคำนวณ และมีขนาดของแถบโปรตีนเข้มที่สุดในวันที่ 6 ถึง 7

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ในการย่อยสลายพบว่า เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 สามารถย่อยต่อสับสเตรต CMC และไซแลน ซึ่งบ่งได้ว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase และ xylannase ตามลำดับ และยังสามารถย่อยสับสเตรต avicel ซึ่งเป็นบริเวณ crystalline cellulose ซึ่งบ่งถึงกิจกรรมเอนไซม์ exoglucanase (Cheng *et al.* 2011) นอกจากนี้การที่เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 สามารถย่อย filter paper ได้ก็เป็นการยืนยันได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีกิจกรรมทั้งแบบ endoglucanase และ exoglucanase (Han *et al.* 1995)

เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย 1%CMC ที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH 6.0 เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที โดยเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-6.0 และสามารถทำงานได้มากกว่า 40% ในช่วง pH 3-4 และ 7-11 นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความสามารถในการทำงานได้ค่อนข้างดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30-80°C โดยพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ $0.140 \pm 0.008 \mu\text{mole}/\text{min}$ และค่าความจำเพาะต่อกิจกรรม CMCase สูงสุด เท่ากับ $0.624 \pm 0.036 \text{ U}/\text{mg}$ of crude protein เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีโครงสร้างของโปรตีนคล้ายคลึงกันมากที่สุด เช่น เอนไซม์ CelD ของ *Fibrobacter succinogenes* S85 (gi75427674; P77864.1) ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 35°C โดยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีค่าความจำเพาะต่อกิจกรรม CMCase เท่ากับ 11.5 U/mg (Malburg *et al.*, 1996) เอนไซม์ CelF จาก *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 (gi145559480; Q02934.2) ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 60°C โดยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีค่าความจำเพาะต่อกิจกรรม CMCase เท่ากับ 0.800 U/mg (Hazlewood *et al.*, 1993) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 มีสภาวะเหมาะสมของการทำกิจกรรม CMCase ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน

การที่เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่กว้าง แสดงว่าสามารถนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย อาทิ เช่น อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ การหมักวัสดุเยื่อพืชเพื่อการผลิตน้ำตาลสำหรับนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ หรือ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยเยื่อพืชสำหรับอาหารสัตว์ กระเพาะเดี่ยว เป็นต้น (Rajeev *et al.*, 2005.)

5. สรุปและเสนอแนะ

โครงการวิจัยครั้งนี้ทำการค้นหายีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 โดยวิธี Sequence-based strategy สามารถจำแนกยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากเมทาจีโนมของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของกระบือได้ทั้งหมด 6 ยีน ได้แก่ cel9-1, cel9-2, cel9-3, cel9-4, cel9-A และ cel9-B ซึ่งมีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส และเป็นยีนเซลลูเลสชนิดใหม่ทั้งหมด เมื่อค้นหาส่วนยีนที่สมบูรณ์พบว่าสามารถค้นพบยีนที่สมบูรณ์ของ cel9-B มีความยาวทั้งสิ้น 2,100 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 699 กรดอะมิโน โปรตีน Cel9-B มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุด 53% กับเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 จากแบคทีเรีย *Ruminococcus* sp. 18P13 (CBL17554.1) ที่แยกเชื้อได้จากลำไส้ของคน พบตำแหน่งการตัดของ signal peptide ที่กรดอะมิโน 43-44 มีโดเมน glycoside hydrolase family 9 อยู่ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 49-454 และพบโดเมน dockerin type I อยู่ที่ตำแหน่งที่ 617-682 ตามลำดับ จัดเป็นเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 คลาสที่ 1 และมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบเซลลูโลโซม เมื่อทำการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุส่วนของยีน GH9 ให้ชื่อว่า pKLAC2-Cel9B/GH9-K3 และทำการแสดงออกในยีสต์ *K. lactis* โดยสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ เอนไซม์ Cel9B/GH9-K3 ที่ได้สามารถแสดงกิจกรรมเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนสและไซแลนเนส โดยมีสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสับสเตรด CMC ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยา 10 นาที โดยเอนไซม์ยังสามารถย่อยสับสเตรดได้ค่อนข้างดี ในช่วง pH 3-11 และ อุณหภูมิ 30-80°C

จากโครงการวิจัยครั้งนี้จะเห็นว่าได้ยีนเซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ชนิดใหม่ทั้งสิ้น 6 ยีน แต่สามารถดำเนินงานจนเสร็จสิ้นได้ 1 ยีน ดังนั้นการดำเนินงานวิจัยในการสร้างและผลิตโปรตีนจากยีนเซลลูเลสที่เหลือน่าจะเป็นอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้จะค้นพบเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีเด่นเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อไป

บรรณานุกรม

- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 6. เชียงใหม่ : ธนบรรณการพิมพ์.
- วิโรจน์ จันทรัตน์. 2540. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ศรัณยา สติชัยมันวิวัฒน์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*). วิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Beguin P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.
- Beguin P, Millet J; Aubert JP. 1992. Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: from manure to molecular biology. *FEMS Microbiol. Lett.* 79: 523-528.
- Beloqui,A., Nechitaylo,T.Y., Lopez-Cortes,N., Ghazi,A., Guazzaroni,M.E., Polaina,J., Strittmatter,A.W., Reva,O., Waliczek,A., Yakimov,M.M., Golyshina,O.V., Ferrer,M. and Golyshin,P.N. 2010. Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(17): 5934-5946.
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37: D233-238.
- Chen, Y., Stipanovic A.J., Winter W.T., Wilson D.B. and Kim Y.-J. 2007. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. *Cellulose.* 14: 283-293.
- Cheng, G., Varanasi, P., Li, C., Liu, H., Melnichenko, Y.B., Simmons, B.A., Kent, M.S. and Singh, S. 2011. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules.* 12(4): 933-941.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.

- Grant, S., Sorokin, D.Y., Grant, W.D., Jones, B.E. and Heaphy, S. 2004. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. *Extremophiles*. 8(5): 421-429.
- Guérin D.M., Lascombe M.B., Costabel M., Souchon H., Lamzin V., Béguin P., and Alzari P.M. 2002. Atomic (0.94 Å) resolution structure of an inverting glycosidase in complex with substrate. *J. Mol. Biol.* 316(5): 1061-1069.
- Han, S.J., Yoo, Y.J. and Kang, H.S. 1995. Characterization of bifunction cellulase and its structural gene: the cel gene of *Bacillus sp.* DO4 has exo- and endoglucanase activity. *Biochem. J.* 270: 26012-26019.
- Hazlewood, G.P., Davidson, K., Latrie, J.I., Huskisson, N.S. and Gilbert, H.J. 1993. Gene sequence and properties of Cell1, a family E endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* 139(2): 307-316.
- Henrissat B., Davies G.J. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 637-644.
- Huang, X. 1992. A Contig Assembly Program Based on Sensitive Detection of Fragment Overlaps. *Genomics*. 14(1): 18-25.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. New York: Academic Press.
- IUBMB. 2004. *Enzyme Nomenclature*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Online available: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>. Citation on 31 May 2011.
- Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwilailaichitr. 2004. Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *J. Basic. Microbiol.* 44: 430-444.
- 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. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl, and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 506-577.
- Malburg, L.M. Jr., Iyo, A.H. and Forsberg, C.W. 1996. A novel family 9 endoglucanase gene (celD), whose product cleaves substrates mainly to glucose, and its adjacent upstream homolog (celE) from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 898-906.

- Marchler-Bauer A., Bryant S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32(W): 327-331.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Nhung N.H., Maruset L., Uengwetwanit T., Harnpicharnchai P., Pongpattanakitsote S., Tanapongpipat S., Jirajaroenrat K., Rakshit S.K and Eurwilaichitr L. 2011. Identification of novel genes encoding lignocellulosic-degrading enzymes from buffalo rumen by metagenomic approach. (Submission to *BMC Biotechnology*).
- Pang, H., Zhang, P., Duan, C.J., Mo, X.C., Tang, J.L. and Feng, J.X. 2009. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. *Curr. Microbiol.* 58(4): 404-408.
- Pajon A., Turner K., Parkhill J. and Bernalier A. 2010. The genome sequence of *Ruminococcus* sp. 18P13. MetaHIT consortium. Unpublished.
- Pradhan K. 1991. Rumen ecosystem in relation to cattle and buffalo nutrition. pp 221-243. In Wanapat, M. and Sommart, K (eds). In Proc 1st Asian Buffalo Association Congress. Khon Kaen.
- Prasad, D. and Pradhan, K. 1990. Relative concentration of protozoa, bacteria and some enzyme in the rumen of cattle, buffalo and sheep fed various straw-concentrate diets. *J. Anima. Sci.* 60(5): 576-581.
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R. and Lopez R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*: 33(W): 116-120.
- Rajeev, K. S., Reeta R.S. and Ashok P. 2005. Microbial cellulase - production, application and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 64: 832-844.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Evol. Biol.* 4(4): 406-425.
- Sakon J, Irwin D, Wilson DB, and Karplus PA. 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* 4(10): 810-818.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh and Maniants, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Shoham Y, Lamed R, Bayer EA. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* 7: 275-281.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sigrist C.J.A., Cerutti L., de Castro E., Langendijk-Genevaux P.S., Bulliard V., Bairoch A., Hulo N. 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): 161-166.
- 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.
- Tasse, L., Bercovici, J., Pizzut-Serin, S., Robe, P., Tap, J., Klopp, C., Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Leclerc, M., Dore, J., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. and Potocki-Veronese, G. 2010. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res.* 20(11): 1605-1612.
- Tomme P., Chauvaux S., Beguin P., Millet J., Aubert J.-P., Claeyssens M. 1991. Identification of a histidyl residue in the active center of endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *J. Biol. Chem.* 266: 10313-10318.
- Tomme P., Warren R.A., and Gilkes N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 1-81.
- Tormo J., Lamed R., Chirino A.J., Morag E., Bayer E.A., Shoham Y., and Steitz T.A. 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J.* 15(21): 5739-5751.
- Wang, F., Li, F., Chen, G. and Liu, W. 2009. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiol. Res.* 164(6): 650-657.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernandez, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P. and Leadbetter, J.R. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. 2007. *Nature.* 450 (7169):560-565.
- Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangu, K., Wiley, D. and Wong, H. 1983. *Enzymatic hydrolysis of cellulose.* Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.

ภาคผนวก ก

ยีน Cel9-B จากการวิเคราะห์ genome walking



```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
cap_cel9_B_EcoRV4 + TGCGGCAGCTGCTGCCTGCGTGACAACAGGGCTCTTTGCGCCTCAGAATGCCGCTGTATCGCTAACGCTGCCGATGACACCGACAACACGCAAAGCTG 600
cap_Cel9_B      1062 ba+ .....
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        TGCGGCAGCTGCTGCCTGCGTGACAACAGGGCTCTTTGCGCCTCAGAATGCCGCTGTATCGCTAACGCTGCCGATGACACCGACAACACGCAAAGCTG 600

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
cap_cel9_B_EcoRV4 + CTCCAGTATTCAATGTATCTTTACGACGGCAATATGTGCGGCGGCGAGGTCGAAAAGAAGAGCGGCTTCTCGTGGCGCGGCAACTGCCACGTTGACGACG 700
cap_Cel9_B      1062 ba+ .....
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        CTCCAGTATTCAATGTATCTTTACGACGGCAATATGTGCGGCGGCGAGGTCGAAAAGAAGAGCGGCTTCTCGTGGCGCGGCAACTGCCACGTTGACGACG 700

      710      720      730      740      750      760      770      780 Un 2 790      800
cap_cel9_B_EcoRV4 + CTGTTCCCGGAGGCTTCCACGACGGGGC GACCACGTAAAAATTCGGCATTACGCCCGGATATTAGGCACACTCTCGGCTGGG 783
cap_Cel9_B      1062 ba+ ..... GACCGGGTGATCAGTGAATTCGGCATTACGCCCGGATATTAGGCACACTCTCGGCTGGGCATATTACGAATACAA 80
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        CTGTTCCCGGAGGCTTCCACGACGGGGC GACCACGTAAAAATTCGGCATTACGCCCGGATATTAGGCACACTCTCGGCTGGGCATATTACGAATACAA 800

      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
cap_cel9_B_EcoRV4 + ..... 783
cap_Cel9_B      1062 ba+ GGACGTTTTTCGATGAACTCGGTCAGACAGGACATCTCAAGCTCCTGACAGACCATTCTGCAAATACTTCAAGGACAGCACGACCCCTCAGCGGTGATACA 180
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        GGACGTTTTTCGATGAACTCGGTCAGACAGGACATCTCAAGCTCCTGACAGACCATTCTGCAAATACTTCAAGGACAGCACGACCCCTCAGCGGTGATACA 900

      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
cap_cel9_B_EcoRV4 + ..... 783
cap_Cel9_B      1062 ba+ GTGACCGAGCTCGTTTACCAGATAGGCGACGGCAACATGGACCACAACCAGTACTGGGGGCTCCCGAGAAGCAGGATTCCTCGTCGCGTAAGGTTTTCA 280
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        GTGACCGAGCTCGTTTACCAGATAGGCGACGGCAACATGGACCACAACCAGTACTGGGGGCTCCCGAGAAGCAGGATTCCTCGTCGCGTAAGGTTTTCA 1000

      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
cap_cel9_B_EcoRV4 + ..... 783
cap_Cel9_B      1062 ba+ AGACCTCCAACGGCGCTGCTGACGTTGCTGCCGAGTATGCAGCCGCTCTCGCGGTGAACTACCTCAACTTCCACAACGAGGAGGACCTCAAATACGCGAA 380
cap_cel9_B_DraI11 + .....
cap_9_B_D121    638 b- .....
Contig-0        AGACCTCCAACGGCGCTGCTGACGTTGCTGCCGAGTATGCAGCCGCTCTCGCGGTGAACTACCTCAACTTCCACAACGAGGAGGACCTCAAATACGCGAA 1100

```

```

      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      GGGCTGTTCGATTTTCGCTCAGAAGTCAAATTCCTGCGCTACCGAAGGCGTTTCGCCTTTCTACGAGTCGGCAGGCTGCGACGACGACAAGGCTTTTGCA 480
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      GGGCTGTTCGATTTTCGCTCAGAAGTCAAATTCCTGCGCTACCGAAGGCGTTTCGCCTTTCTACGAGTCGGCAGGCTGCGACGACGACAAGGCTTTTGCA 1200

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      GCGGGATTCTCTACCTTGCAACCAAAGAGGAAAAGTACAACACCATTCTCAAAAACCTTCGCGGCAACTCGAGCAATAACCCCAACTGGGACTACTGCT 580
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      GCGGGATTCTCTACCTTGCAACCAAAGAGGAAAAGTACAACACCATTCTCAAAAACCTTCGCGGCAACTCGAGCAATAACCCCAACTGGGACTACTGCT 1300

      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      GGGATAAGGTATCAATCGGAGCTTCTATCCTCAACGGCGAGATAAACGGCGATTTTCGGCATCGCTTCCAACACTACGCAAGCAGAAATACACCAATCCGAA 680
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      GGGATAAGGTATCAATCGGAGCTTCTATCCTCAACGGCGAGATAAACGGCGATTTTCGGCATCGCTTCCAACACTACGCAAGCAGAAATACACCAATCCGAA 1400

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      GCAGTGGTACCTGCTCAACAGCTGGGGCGGTGCAAGATACAACACTGCCGCTCAGTATACAGGTCTGCTTCTTACAAAGTATAAGCAGGGTGATTACTCC 780
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      GCAGTGGTACCTGCTCAACAGCTGGGGCGGTGCAAGATACAACACTGCCGCTCAGTATACAGGTCTGCTTCTTACAAAGTATAAGCAGGGTGATTACTCC 1500

      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      GAATGGGCTCAGTCACAGATGAACATGATTTCTCGGGCACAACCCCAAGGGCGTTTTCGGTAGTTGTAGGATTCAACGCTCAGTCGGCTAAGTATCCTCACC 880
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      GAATGGGCTCAGTCACAGATGAACATGATTTCTCGGGCACAACCCCAAGGGCGTTTTCGGTAGTTGTAGGATTCAACGCTCAGTCGGCTAAGTATCCTCACC 1600

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
cap_cel9_B_EcoRV4      +      783
cap_Cel9_B      1062 ba+      ATGAGGCTGCTTCGGTCTCAGCGGCTGGGACGAGTACAATCAGGCTGGCGCTACATTCGGTCCGAAGGGTGGTCACGTCCTCAGGGCGCTCTCGAGGG 980
cap_cel9_B_DraI11      +      1
cap_9_B_D121      638 b-      1
Contig-0      ATGAGGCTGCTTCGGTCTCAGCGGCTGGGACGAGTACAATCAGGCTGGCGCTACATTCGGTCCGAAGGGTGGTCACGTCCTCAGGGCGCTCTCGAGGG 1700

```

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 Dw 2
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ CCGCTTCCAGGACGCAAACTTCCAGTTCAAGGACGAGCTCAACGATATCACCTTCATCTGAGGTAGCCACCGATTACAATGCA 1062
 cap_cel9_B_DraI11 +TTCCAGGACGCAAACTTCCAGTTCAAGGACGAGCTCAGCGGTATCACCTTCCTCTGAGGTAGGTATCGACTACAACGCAACTCTCGTTGCCGCTGCT 96
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 CCGCTTCCAGGACGCAAACTTCCAGTTCAAGGACGAGCTCAACGATATCACCTTCATCTGAGGTAGCCACCGACTACAACGCAACTCTCGTTGCCGCTGCT 1800

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ GCCGGACTTTACAGCATTTACAAGACCGGCAAGGTCGATGCTACTCCCAACGGCGTTGACAGAGTTATCCAGTACGGTAATATTCAGCCAACCTTCATCTA 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + GCCGGACTTTACAGCATTTACAAGACCGGCAAGGTCGATGCTACTCCCAACGGCGTTGACAGAGTTATCCAGTACGGTAATATTCAGCCAACCTTCATCTA 196
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 GCCGGACTTTACAGCATTTACAAGACCGGCAAGGTCGATGCTACTCCCAACGGCGTTGACAGAGTTATCCAGTACGGTAATATTCAGCCAACCTTCATCTA 1900

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ CAACAACAACAGCTACAACCTACTTCAACTACTTCCGAGTCTACCACAACCTACCACCGTTACGACCTCCGCAGACCGCGCAAAGGCTATCGTGAACGTGGA 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + CAACAACAACAGCTACAACCTACTTCAACTACTTCCGAGTCTACCACAACCTACCACCGTTACGACCTCCGCAGACCGCGCAAAGGCTATCGTGAACGTGGA 296
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 CAACAACAACAGCTACAACCTACTTCAACTACTTCCGAGTCTACCACAACCTACCACCGTTACGACCTCCGCAGACCGCGCAAAGGCTATCGTGAACGTGGA 2000

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ TATCGTTGACAAGAATACCGGCAAGAATATCTCCGGCGTTAAGTATCAGATAACAGGCTACGGCGAATGGGGTGCTCACTTCGGAACCGAGAATTCGTT 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + TATCGTTGACAAGAATACCGGCAAGAATATCTCCGGCGTTAAGTATCAGATAACAGGCTACGGCGAATGGGGTGCTCACTTCGGAACCGAGAATTCGTT 396
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 TATCGTTGACAAGAATACCGGCAAGAATATCTCCGGCGTTAAGTATCAGATAACAGGCTACGGCGAATGGGGTGCTCACTTCGGAACCGAGAATTCGTT 2100

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ TCAAGCGACAAGACTGACGTCCTCGATGTAAACTGGCACGACTTATCTACCAGAAACTTCAAGAACGCTAAGTACTGGGAGCTCAGTATCAGGGATATCC 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + TCAAGCGACAAGACTGACGTCCTCGATGTAAACTGGCACGACTTATCTACCAGAAACTTCAAGAACGCTAAGTACTGGGAGCTCAGTATCAGGGATATCC 496
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 TCAAGCGACAAGACTGACGTCCTCGATGTAAACTGGCACGACTTATCTACCAGAAACTTCAAGAACGCTAAGTACTGGGAGCTCAGTATCAGGGATATCC 2200

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ CCGCAGGATACAAGTTCCCGCATCTTCAAACACAAAAATTCAGCCTTGTAACCGGTACTGCCGATGTCAAGGTAGAGCTTGAATCCGACGGCAAGAAGGT 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + CCGCAGGATACAAGTTCCCGCATCTTCAAACACAAAAATTCAGCCTTGTAACCGGTACTGCCGATGTCAAGGTAGAGCTTGAATCCGACGGCAAGAAGGT 596
 cap_9_B_D121 638 b- 1
 Contig-0 CCGCAGGATACAAGTTCCCGCATCTTCAAACACAAAAATTCAGCCTTGTAACCGGTACTGCCGATGTCAAGGTAGAGCTTGAATCCGACGGCAAGAAGGT 2300

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ Dw 3 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + CGTTACGGCGATGCTAACCTCGACGGCGATGTTACTACCGCGGACGCAGTTGCTATCCTCCAGTTTATCGGCAACAAGGATAAGTACCCCTTCACTGAC 696
 cap_9_B_D121 638 b-C 1
 Contig-0 CGTTACGGCGATGCTAACCTCGACGGCGATGTTACTACCGCGGACGCAGTTGCTATCCTCCAGTTTATCGGCAACAAGGATAAGTACCCCTTCACTGAC 2400

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ Dw 4 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + GAGGCAAAGGCTAATGCGGACGTTTACGGCGCTGACGGCATCACAGGCACAGACGCTCTCACGATTTCAGAAGATAGACGCAGGTCTCTTCGCTGT 791
 cap_9_B_D121 638 b- GAGGCAAAGGCTAATGCGGACGTTTACGGCGCTGACGGCATCACAGGCACAGACGCTCTCACGATTTCAGAAGATAGACGCAGGTCTCTTCGCTGTGAGG 101
 Contig-0 GAGGCAAAGGCTAATGCGGACGTTTACGGCGCTGACGGCATCACAGGCACAGACGCTCTCACGATTTCAGAAGATAGACGCAGGTCTCTTCGCTGTGAGG 2500

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ STOP 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + ACCTCCCTATCATTCGGAAGTTTGAGACTGACGAAGTAGAAGAAATATCCACACTTCGTACAAAAATCAAACAATGTTTTGTTACCGGTGTACAAGA 791
 cap_9_B_D121 638 b- ACCTCCCTATCATTCGGAAGTTTGAGACTGACGAAGTAGAAGAAATATCCACACTTCGTACAAAAATCAAACAATGTTTTGTTACCGGTGTACAAGA 201
 Contig-0 ACCTCCCTATCATTCGGAAGTTTGAGACTGACGAAGTAGAAGAAATATCCACACTTCGTACAAAAATCAAACAATGTTTTGTTACCGGTGTACAAGA 2600

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + 791
 cap_9_B_D121 638 b- TTTAAGCTTGTACACCGGTAATTTATGCTTTTAAATTGCAATTTTATTCAGAAATGTTTTGTTTCAGAAATAATTTATTCATAGAATCCAGTATATTT 301
 Contig-0 TTTAAGCTTGTACACCGGTAATTTATGCTTTTAAATTGCAATTTTATTCAGAAATGTTTTGTTTCAGAAATAATTTATTCATAGAATCCAGTATATTT 2700

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + 791
 cap_9_B_D121 638 b- ATCGTGATAATATACAAGCCGGAATCATTTTTTATGTTCAATACGTAGAAACTCTGAAAAATCGCAGGTATTGTAACCTTATTGTAACCTAATTTAATTAACCA 401
 Contig-0 ATCGTGATAATATACAAGCCGGAATCATTTTTTATGTTCAATACGTAGAAACTCTGAAAAATCGCAGGTATTGTAACCTTATTGTAACCTAATTTAATTAACCA 2800

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 cap_cel9_B_EcoRV4 + 783
 cap_Cel9_B 1062 ba+ 1062
 cap_cel9_B_DraI11 + 791
 cap_9_B_D121 638 b- GTGTGTAACCTACTTCTCCGAAAAATATGTATAATAGGTTATGGCATAACATATTATAGGCTATGTAACGAATATTCAGAAAGAAGTGTGAATAGTATGCA 501
 Contig-0 GTGTGTAACCTACTTCTCCGAAAAATATGTATAATAGGTTATGGCATAACATATTATAGGCTATGTAACGAATATTCAGAAAGAAGTGTGAATAGTATGCA 2900

ภาคผนวก ข
การคาดคะเนคุณสมบัติของโปรตีน

1. โปรตีน Cel9-B

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ExPASy ProtParam

Number of amino acids: 699

Molecular weight: 75714.7

Theoretical pI: 4.92

Amino acid composition:

Ala (A)	79	11.3%
Arg (R)	9	1.3%
Asn (N)	46	6.6%
Asp (D)	55	7.9%
Cys (C)	9	1.3%
Gln (Q)	23	3.3%
Glu (E)	29	4.1%
Gly (G)	63	9.0%
His (H)	12	1.7%
Ile (I)	27	3.9%
Leu (L)	45	6.4%
Lys (K)	50	7.2%
Met (M)	7	1.0%
Phe (F)	30	4.3%
Pro (P)	17	2.4%
Ser (S)	44	6.3%
Thr (T)	61	8.7%
Trp (W)	12	1.7%
Tyr (Y)	38	5.4%
Val (V)	43	6.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 84

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 59

Atomic composition:

Carbon	C	3367
Hydrogen	H	5101
Nitrogen	N	881
Oxygen	O	1080
Sulfur	S	16

Formula: C₃₃₆₇H₅₁₀₁N₈₈₁O₁₀₈₀S₁₆

Total number of atoms: 10445

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 123120

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.626, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 122620

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.620, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, *in vitro*).

>20 hours (yeast, *in vivo*).

>10 hours (*Escherichia coli*, *in vivo*).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 17.02

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 69.31

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.379

ภาคผนวก ค

แผนที่ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนยีน Cel9-B

NEBcutter V2.0

แผนที่ของเอนไซม์ที่ตัด 1 ตำแหน่ง



เอนไซม์ที่ไม่ตัดในยีน:

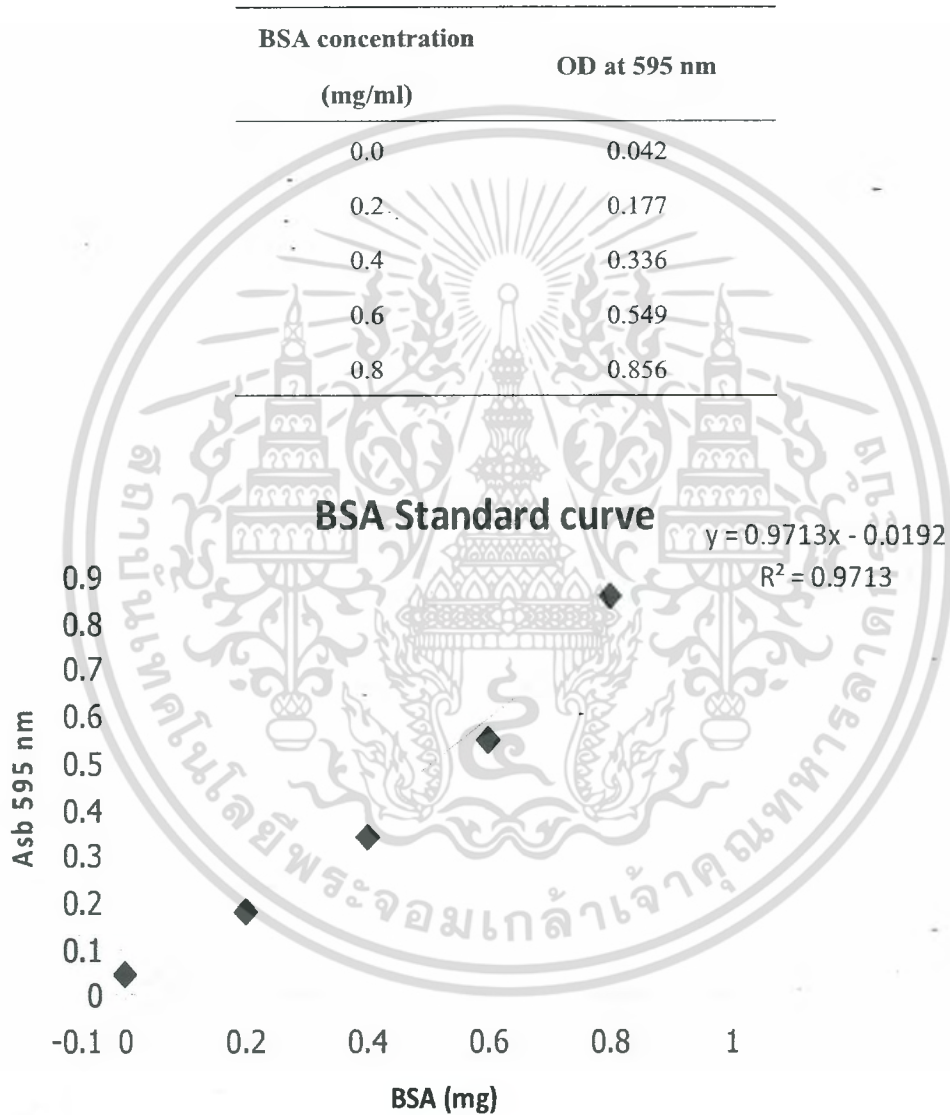
AatI, Acc16I, AccB7I, AccIII, AclNI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, Alw44I, AocI, Aor51HI, ApaI, ApaII, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, AspEI, AspI, AtsI, AviII, AvrII, BalI, BamHI, BanIII, BbeI, BbrPI, BbsI, BbuI, Bbv16II, BclI, BfrI, BglI, BglII, BlnI, BlpI, BpiI, Bpu102I, Bpu14I, BpuAI, Bsa29I, BsaBI, BsaOI, BscI, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, BsgI, Bsh1285I, Bsh1365I, BsiEI, BsiMI, BsiWI, BsmBI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp1720I, Bsp68I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspTI, BspXI, BsrBRI, BsrDI, BsrGI, BssHII, Bst98I, BstBI, BstEII, BstI, BstMCI, BstPI, BstSFI, BstSNI, BstX2I, BstXI, BstYI, BstZI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII, Cfr9I, CfrI, ClaI, Csp45I, CvnI, DraI, DraIII, DrdI, EaeI, EagI, Eam1105I, EclHKL, EclXI, Eco105I, Eco147I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco72I, Eco81I, Eco91I, EcoNI, EcoO65I, EcoRI, EcoT22I, EheI, Esp1396I, Esp3I, FauNDI, FbaI, FseI, FspI, HindIII, HpaI, KasI, Kpn2I, Ksp22I, LspI, MamI, MfeI, MflI, MluI, MluNI, Mph1103I, MroI, MscI, MslI, MspCI, MunI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NruI, NsiI, NspI, NspV, PacI, PaeI, Pfl123II, PflMI, PinAI, Ple19I, PmaCI, Pme55I, PmeI, PmlI, Ppu10I, PshBI, Psp1406I, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PspOMI, PstI, PstNHI, PvuI, RcaI, SalI, SbfI, SexAI, SfcI, SfiI, SfuI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SplI, SrfI, Sse8387I, SseBI, SspBI, StuI, SunI, SwaI, Tth111I, Van91I, Vha464I, VneI, VspI, XbaI, XcmI, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI, Zsp2I

* อักษรสีแดงคือเอนไซม์ที่อยู่ใน multiple cloning site ของเวกเตอร์ pKLAC2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน

กราฟโปรตีนมาตรฐาน

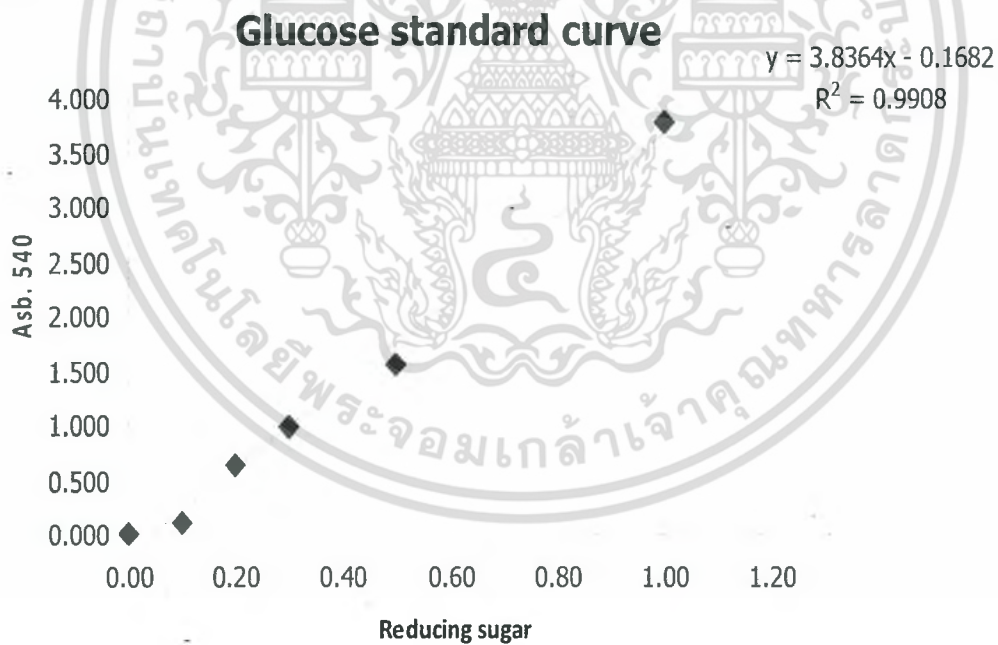


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

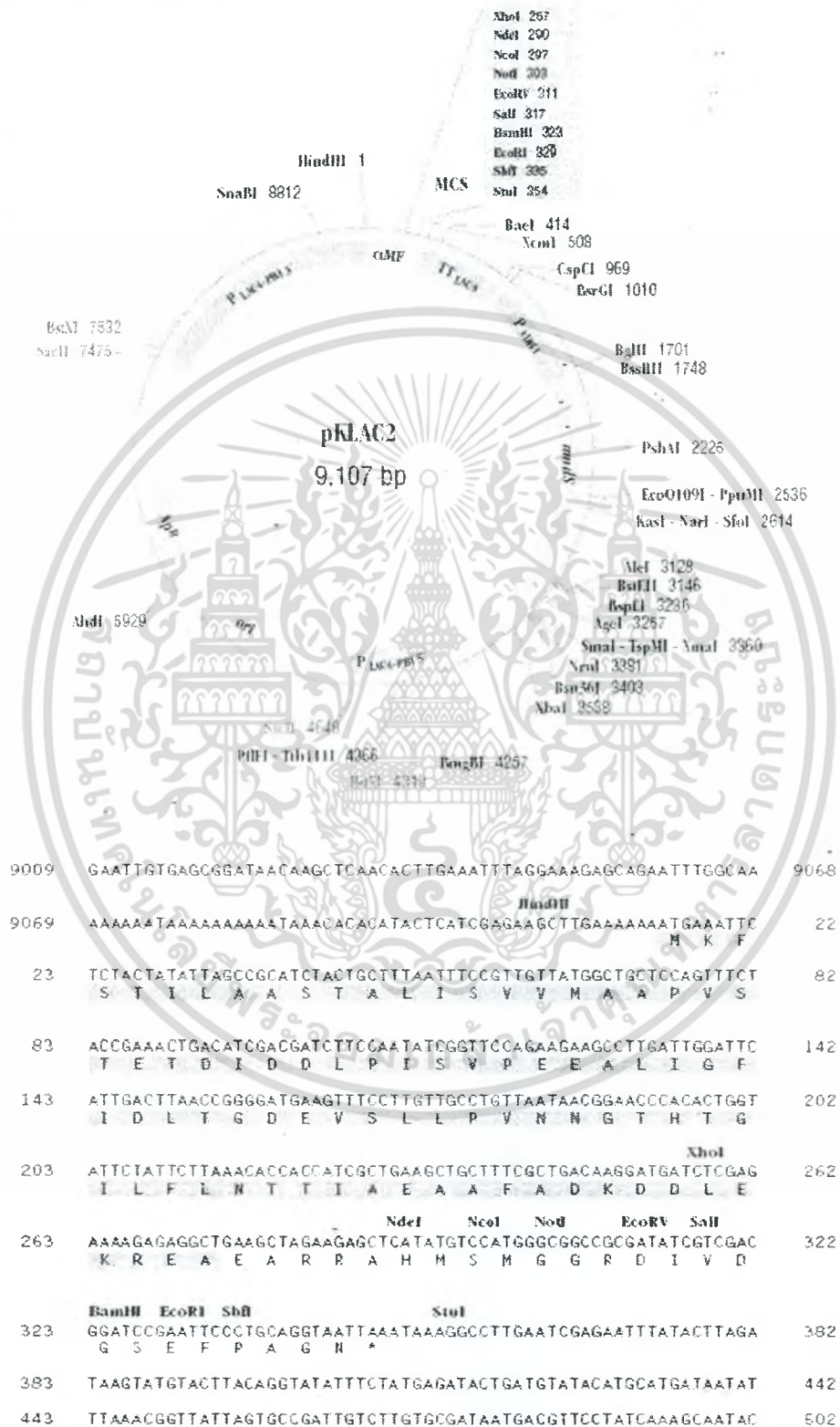
Glucose concentration* (mM)	Reducing sugar (μ mole)	OD at 540 nm
0	0.00	0.000
5	0.10	0.107
10	0.20	0.634
15	0.30	0.981
25	0.50	1.555
50	1.00	3.770

* Add glucose 20 μ l in 1000 μ l-reaction



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The pKLAC2 expression vector



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หนังสือเป็นสมบัติของท่าน

โปรดช่วยกันรักษา

www.lib.kmitl.ac.th

สำนักหอสมุดกลาง โทร. 0 2739 2221

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้