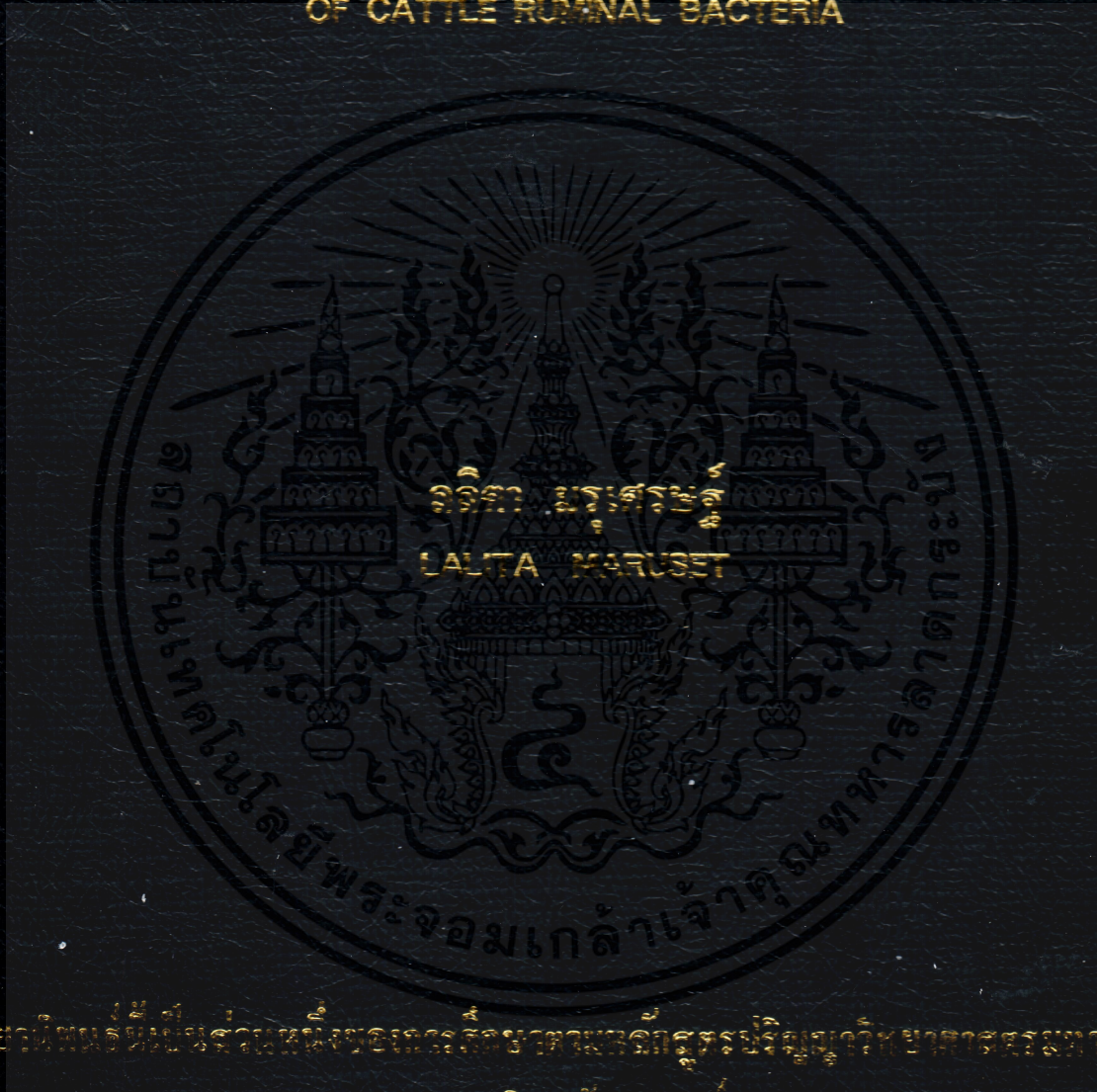


การคัดแยกยีนของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์
จากเมทาจีโนมิกไลบรารีของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคและกระบือ

IDENTIFICATION OF A GENE ENCODING POLYSACCHARIDE DEGRADING
ENZYME FROM METAGENOMIC LIBRARY
OF CATTLE RUMINAL BACTERIA



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของกรณีศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-14-031-039

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกยีนของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์
จากเมทาจีโนมิกไลบรารีของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคและกระบือ

IDENTIFICATION OF A GENE ENCODING POLYSACCHARIDE DEGRADING
ENZYME FROM METAGENOMIC LIBRARY
OF CATTLE RUMINAL BACTERIA



T107437

ลลิตา มรุเศรษฐ์

LALITA MARUSET

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 107437
วัน,เดือน,ปี..... 29 ส.ค. 2553



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ KMITL-2009-AG-M-031-039 กรุณาอย่าให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**IDENTIFICATION OF A GENE ENCODING POLYSACCHARIDE DEGRADING
ENZYME FROM METAGENOMIC LIBRARY
OF CATTLE RUMINAL BACTERIA**



LALITA MARUSET

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

2009

KMITL-2009-AG-M-031-039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดแยกยีนของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย โพลีแซคคาไรด์จากเมทาจีโนมิกไลบรารีของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โคและกระบือ

นักศึกษา

นางสาวลลิตา มรุเศรษฐ์

รหัสประจำตัว

48065403

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา

สัตวศาสตร์

พ. ศ.

2552

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.ปิยนันท์ หาญพิชาญชัย

บทคัดย่อ

เมทาจีโนมิกเป็นเทคนิคที่ใช้หาชิ้นที่กำหนดให้สร้างเอนไซม์หรือโปรตีนอื่นๆ โดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมในการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากจุลินทรีย์ต่างๆที่มีในธรรมชาติมาสร้างเป็นเมทาจีโนมิกไลบรารี ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีแนวทางในสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีจากจุลินทรีย์ในรูเมนของโคกระบือ 3 แนวทาง คือ จากเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนโคพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจากการเททัป 23 โคลน จากการสร้าง shotgun library จากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเททัปพบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 13 โคลน และกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจำนวน 1 โคลน และจากการคัดแยกยีนเซลลูเลสด้วยเทคนิค pyrosequencing เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำให้ได้ ลำดับเบสที่สมบูรณ์ 2 แบบ คือ full-length gene (CelF4) และ mature gene (CelM4) นำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pET28a(+) ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความใกล้เคียงกับยีนเซลลูเลสจาก uncultured microorganism ในรูเมนกระบือ (ACA61137) 80% และ 81% ตามลำดับ และจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycosyl hydrolase family 5 เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากโคลน CelM4 พบว่ามีคุณสมบัติทนกรด และทำงานได้ดีที่ pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเอนไซม์ทนต่อกรด pH 2.6-6 และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้สามารถย่อยสลาย CMC และ HE-Cellulose ได้ และเมื่อพิจารณาค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสของสับสเตรท CMC มีค่า V_{max}

2.94±0.21 $\mu\text{mole/mg}\cdot\text{min}$ และ K_m 1.89±0.25 mM และค่าจลศาสตร์ของสับสเตรท HE-Cellulose มีค่า V_{max} 0.52±0.06 $\mu\text{mole/mg}\cdot\text{mi}$ - และ K_m ได้ 1.45 ±0.46 mM และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและเชื้อเอนไซม์จากการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกโดยการผสมเอนไซม์ในอาหารสัตว์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับตัวควบคุมได้ 1.87 Unit/ml และค่าเชื้อเอนไซม์ที่ได้ 8.78% และตัวควบคุมให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.79 Unit/ml และมีค่าเชื้อเอนไซม์ 16.23%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ **II** ึ่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Identification of a Gene Encoding Polysaccharide Degrading Enzyme from Metagenomic Libraries of Cattle Ruminal Bacteria
Student	Miss Lalita Maruset
Student ID.	48065403
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanya Jirajaroenrat
Thesis Co-Advisor	Dr. Piyanant Harnpichanchai

ABSTRACT

Metagenomic library technique has been widely used to identify a gene of interest from uncultured microorganisms. This project aims to isolate a gene encoding for polysaccharide degradind enzyme from the metagenomic library of cow and swamp buffalo's ruminal bacteria. There are three approached for study. Previously, Twenty three clones were found to show xylanase activity from metagenomic library of cow's ruminal bacteria. Constuction of shotgun library of ruminal bacteria from swamp buffalo detected thirteen colonies that showed cellulase activity and one clone that showed xylanase activity. Identification of a cellulase gene from pyrosequencing data also allowed amplication of the full-length and mature cellulase gene from the fosmid DNA by PCR and cloned into pET28a (+) expression vector. Nucleotide analysis by BlastX analysis (NCBI) showed that the cloned cellulase 80% similarity to cellulase from uncultured microorganism (ACA61137). Amino acid analysis by protein Blast (NCBI) showed similarity glycoside hydrolase family 5. The recombinant cellulase, name CelM4, was subsequencely subjected to protein extraction and purification by nickel column. The recombinant protein exhibited optimal pH and temperature at 5.5 and 50°C, respectively. The enzyme was stable at acidic pH (2.6-6) and the protein showed the highest activity toward CMC with V_{max} and K_m values of $2.94 \pm 0.21 \mu\text{mole/mg.min}$ and $1.89 \pm 0.25 \text{mM}$, respectively. The enzyme also hydolyzed HE-Cellulose with V_{max} and K_m values of $0.52 \pm 0.06 \mu\text{mole/mg.min}$ and $1.45 \pm 0.46 \text{mM}$, respectively. The recombinant protein was stable up to 40°C for

30 min. However, the activity of cellulase enzyme was completely lost after incubated at 50°C-80°C for 30-120 min. In vitro digestion of pourty analysis by add enzyme in feed with reducing sugar and crude fiber values of 1.87 Unit/ml and 8.78%, respectively and the control with reducing sugar and crude fiber values of 0.79 Unit/ml and 16.23%, respectively.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิยนันท์ หาญพิชาญชัย จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร. ลีลี เอื้อวิไลจิตร ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ ดร.ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ คุณพีรดา พรหมคอนกอย คุณภรททพ กนกรัตน์ คุณกฤตพงศ์ แซ่ตั้ง คุณจรรยา แสนบุญเรือง และคุณชนพร อึ้งเวชวานิช สำหรับการทำให้ pyrosequencing รวมทั้งนักวิจัยและผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ห้องปฏิบัติการวิจัย เอนไซม์เทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณอาจารย์นายสัตวแพทย์ ชนาธิป ธรรมการ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากรูเมนของโค และนางสาว ศรัณยา สติดมน์วิวัฒน์ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากรูเมนของกระบือปลัก

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาสัตวศาสตร์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาสัตวศาสตร์และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและการประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีคุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ลลิตา มธุเศรษฐ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญภาพ.....	XII
รายการคำย่อ.....	XV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 เซลลูโลสและไซแทน.....	5
2.2 ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแทนเนส.....	8
2.2.1 ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส.....	8
2.2.2 ระบบการทำงานของเอนไซม์ไซแทนเนส.....	10
2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแทนเนสในอุตสาหกรรม.....	11
2.4 ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	11
2.5 จุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	12
2.6 หน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	16
2.7 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....	17
2.8 การย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 การสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารี.....	19
2.10 การค้นหาชิ้นที่กำหนดการสร้างเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกไลบรารี.....	21
2.10.1 function-driven analysis.....	22
2.10.2 sequence-driven analysis.....	23
2.10.3 SIGEX.....	24
2.10.4 pyrosequencing.....	25
2.11 จลนศาสตร์ของเอนไซม์และสมการของ Michaelis-Menten.....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	31
3.2 การสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนโค.....	31
3.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ.....	31
3.2.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	32
3.2.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i>	33
3.2.4 การแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย DNA troughing method.....	33
3.2.5 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> สำหรับการถ่ายยีนด้วย electroporation.....	34
3.2.6 การโคลนดีเอ็นเอ.....	34
3.2.7 การถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i>	35
3.2.8 การคัดเลือกโคลน.....	35
3.2.9 การเก็บโคโลนี.....	35
3.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	35
3.4 การตรวจสอบขนาดของชิ้นยีนที่โคลนในเวกเตอร์ pZErO-2.....	36
3.5 การสร้าง shotgun library จากเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ.....	36
3.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีการเทปโคโลนีด้วยสับสเตรท.....	37
3.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	38
3.8 การค้นหาชิ้นเซลล์จากข้อมูล pyrosequencing.....	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8.1 การวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pyrosequencing.....	39
3.8.2 การออกแบบไพรเมอร์.....	39
3.8.3 การสกัดพอสไมดจาก fosmid library.....	40
3.8.4 การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	41
3.9 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	42
3.10 การเตรียมเซลล์เข้าบ้าน <i>E.coli</i> สำหรับการถ่ายยีนด้วย heat shock transformation.....	42
3.11 การโคลนยีนสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	43
3.12 การสร้างโคลนเพื่อผลิตเอนไซม์เซลล์.....	44
3.12.1 การตัดยีนออกจาก pTZ57R/T.....	44
3.12.2 การแยกยีนให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล.....	44
3.12.3 การโคลนยีนเข้าพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของโปรตีน.....	45
3.12.4 การคัดเลือกโคโลนีและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	46
3.12.5 การเก็บรักษาโคโลนี.....	46
3.12.6 การย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ Rosetta.....	46
3.13 การทดสอบการแสดงออกของยีน.....	47
3.13.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลล์.....	47
3.13.2 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย western blot.....	47
3.14 การเลี้ยงเซลล์แบบ large scale.....	48
3.15 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	48
3.16 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์.....	49
3.16.1 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี.....	50
3.16.2 การวิเคราะห์อุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี.....	50
3.16.3 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนความเป็นกรด-ด่าง.....	50
3.16.4 การวิเคราะห์การทนความร้อนของเอนไซม์.....	50
3.16.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรท.....	51
3.17 การวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่นใดได้

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ VIII อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.18 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในการจำลองการย่อยอาหารสัตว์ในหลอดทดลอง.....	51
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	53
4.1 การจำแนกยีนเซลล์หรือ ไซแลนเนสจากเมทาจีโนมไลบรารีจุลินทรีย์ในรูเมนของโค.....	53
4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในรูเมนของโค.....	53
4.1.2 ผลของการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i>	54
4.1.3 ผลของการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี <i>troughing method</i>	55
4.1.4 ผลการตรวจสอบโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์.....	56
4.1.5 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสมเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	57
4.1.6 ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	58
4.2 การจำแนกยีนเซลล์หรือ ไซแลนเนสจาก shotgun library จุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ.....	58
4.2.1 ผลของการตัดฟอสมิดลูกผสมที่ได้จาก fosmid library.....	59
4.2.2 ผลการตรวจสอบโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์.....	59
4.2.3 ผลของการตรวจสอบการโคลนขึ้นยีนเข้าสู่ pZErO-2.....	60
4.2.4 ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	61
4.3 การจำแนกยีนเซลล์จากข้อมูล pyrosequencing ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ.....	62
4.3.1 การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	63
4.3.2 ผลของการโคลนยีนสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	64
4.3.3 ผลของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์.....	65
4.4 ผลของการสร้างโคลนเพื่อผลิตเอนไซม์เซลล์.....	69
4.4.1 การตัดยีนออกจาก pTZ57R/T และแยกยีนให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล.....	69
4.4.2 ผลของการตรวจสอบการโคลนขึ้นยีนเข้าสู่ pET28a (+).....	70
4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน.....	71
4.5 ผลของการทดสอบการแสดงออกของยีน.....	75
4.5.1 ผลของการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลล์.....	75
4.5.2 ผลของการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย western blotting.....	76

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลของการเลี้ยงเซลล์แบบ large scale.....	77
4.7 ค่าความเข้มข้นของ โปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์.....	79
4.8 ผลของการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์.....	80
4.8.1 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	80
4.8.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	81
4.8.3 ความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์.....	82
4.8.4 ความสามารถในการทนความร้อนเอนไซม์.....	84
4.8.5 ผลของการพิจารณาการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลส.....	86
4.9 ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลส.....	87
4.10 ผลการทำงานของเอนไซม์ในการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ในหลอดทดลอง.....	89
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	91
บรรณานุกรม.....	94
ภาคผนวก.....	102
ภาคผนวก ก อุปกรณ์ สารละลายและแผนที่เวกเตอร์.....	102
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน.....	113
ประวัติผู้เขียน.....	124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ X อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	หน้าที่ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....14
2.2	โปรโตซัวที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดต่างๆ.....14
2.3	กลุ่มเชื้อราที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดต่างๆ.....15
2.4	การนำเทคโนโลยีเมทาจีโนมิกมาใช้ในการค้า.....20
2.5	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างกระเพาะรูเมนของโค.....26
2.6	เปรียบเทียบวิธี activity-based analysis, sequence-driven analysis และ SIGEX.....28
4.1	ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลส โกลน CelM4.....88
ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ก 1	การเตรียม Polyacrylamide gel 12 เปอร์เซ็นต์.....110
ข1	ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการทำพีซีอาร์.....123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ XI อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	6
2.2 องค์ประกอบไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	7
2.3 องค์ประกอบไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	7
2.4 องค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืช.....	8
2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสต่อการย่อยสลายเซลลูโลส.....	9
2.6 ภาวะส่วนต่างๆ ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	10
2.7 การทำงานของเซลลูโลโซมเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส.....	19
2.8 ขั้นตอนการแยกชิ้นที่สนใจด้วยวิธีเมทาจีโนมิกไลบรารี.....	21
2.9 การหาเอนไซม์จากเมทาจีโนมไลบรารีโดยวิธี SIGEX.....	24
2.10 การทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดในขั้นตอนการทำ pyrosequencing.....	26
2.11 ปฏิกริยาของการทำ pyrosequencing.....	27
2.12 สมการของ Michaelis – Menten.....	29
2.13 อิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่ออัตราเร็วของปฏิกริยา.....	30
2.14 สมการเส้นตรงของ Lineweaver-Burk.....	30
3.1 แสดงการเก็บของเหลวในภาวะรูเมนของโค.....	31
3.2 ตำแหน่งของไพร์เมอร์เพื่อใช้ในการจับยีน.....	40
3.3 ขั้นตอนการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ในการสร้างยีน.....	41
4.1 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวของภาวะรูเมน โค.....	54
4.2 ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i>	55
4.3 ผลการแยกขนาดซีนดีเอ็นเอด้วยวิธี DNA troughing method.....	56
4.4 ผลของการเททับโคลีนีด้วยสับสเตรท AZCL-Xylan.....	57
4.5 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสมเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	58
4.6 การตัดพอสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i>	59
4.7 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจาก shortgu library.....	60
4.8 ผลการตรวจสอบการโคลนขึ้นยีนของ Cel5 และ Xyl15.....	61
4.9 ผลการเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสแบบ full-length gene และแบบ mature gene.....	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 ผลของการทำ size screening.....	65
4.11 การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing และจากการโคลนเข้า pTZ57R/T.....	66
4.12 ผลการตัดชิ้นยีนออกจากเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	70
4.13 ผลการตัดพลาสมิดคีเอ็นเอลูกผสม โคลน F4 และ M4.....	71
4.14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากการโคลนกับฐานข้อมูล GenBank.....	72
4.15 ผลการจัดกลุ่มเอนไซม์จากลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank.....	75
4.16 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของโคลน CelM4 และ โคลน CelF4.....	76
4.17 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน CelM4 ด้วย 12% SDS-PAGE และการทำ western blot.....	77
4.18 โปรตีนที่สกัดจากการเลี้ยง โคลนแบบ large scale.....	78
4.19 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทดสอบการย่อยของโปรตีนในรูป inclusion และ soluble.....	79
4.20 ผลของการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยผ่าน His-Trap affinity column.....	80
4.21 ผลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CelM4 ที่ pH 3-10.....	81
4.22 ผลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CelM4 ที่อุณหภูมิ 35-80°C.....	82
4.23 ผลของความสามารถในการทนต่อกรด-ด่างของเอนไซม์.....	83
4.24 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของการทำงานเอนไซม์ต่อกรด-ด่าง.....	84
4.25 ผลการทนความร้อนของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CelM4.....	85
4.26 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของการทำงานเอนไซม์ในการทนต่อความร้อน.....	86
4.27 ผลของความสามารถเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ.....	87
4.28 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีก.....	90
4.29 เเปอร์เซ็นต์เชื้อใยที่ได้จากการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีก.....	90

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pZErO™-2.....	105
ก2 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	105
ก3 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a (+).....	106
ก4 แผนที่ของพอสมิด pCC1FOS™.....	106

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข1 แสดง conserve domain ของกรดอะมิโนจากข้อมูล pyrosequencing.....	117
ข2 แสดง conserve domain ของกรดอะมิโนจากข้อมูล pyrosequencing หลังจากทำ reverse complementary.....	120
ข3 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็น signal peptide.....	120



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ **XIV** อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

μl	=	ไมโครลิตร
bp	=	คู่เบส
g	=	กรัม
kb	=	กิโลเบส
kDa	=	กิโลดาลตัน
Km	=	Michaelis – Menten constant
L	=	ลิตร
M	=	โมลาร์
mg	=	มิลลิกรัม
Min	=	นาที
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
MW	=	น้ำหนักโมเลกุล
%	=	เปอร์เซ็นต์
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
μM	=	ไมโครโมล
rpm	=	รอบต่อนาที
nm	=	นาโนเมตร
μg	=	ไมโครกรัม
ng	=	นาโนกรัม
cm	=	เซนติเมตร
mA	=	มิลลิแอมแปร์
Unit	=	ยูนิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ **xv** อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ ปีละเกือบพันล้านบาท โดยสำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ.2550 มีการนำเข้าเอนไซม์มูลค่ารวม 907,313,740 บาท (ข้อมูลเดือนมกราคม 2550–ธันวาคม 2550) และ ในปี 2551 ประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์ทั้งสิ้น 1,002,730,431 บาท (ข้อมูลเดือนมกราคม 2551–พฤศจิกายน 2551) (มติชนออนไลน์, 2552) ซึ่งตัวเลขมูลค่าจริงการใช้เอนไซม์จะมีมูลค่าสูงกว่านี้มาก เนื่องจากตัวเลขนี้เป็นตัวเลขที่ได้จากการระบุว่าเป็นเอนไซม์ แต่แท้จริงแล้วยังมีการนำเข้าเอนไซม์โดยถูกระบุเป็นรูปแบบอื่นอีกมาก เช่น ในรูปอาหารเสริม อาหารสัตว์ หรือ สารเคมี เป็นต้น แนวโน้มในการใช้เอนไซม์ทั่วโลกในอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะการใช้เอนไซม์แทนสารเคมี เนื่องจากเอนไซม์ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม กลุ่มเอนไซม์ที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรม คือ เอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ กระดาษ สารชะล้าง การแปรรูปแป้ง และ อาหารสัตว์ เป็นต้น ตัวอย่างของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โพลีแซคคาไรด์เป็นแหล่งสะสมพลังงานของสิ่งมีชีวิต โดยพืชเก็บสะสมพลังงานในรูปของแป้ง ส่วนสัตว์เก็บสะสมพลังงานในรูปของไกลโคเจน โดยมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของโครงสร้างของพืช และสัตว์ (Chaplin, 2008) หน้าที่ของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide degrading enzyme) ชนิดต่างๆ ได้แก่ อะไมเลส (amylase) ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้งตรงพันธะ α -1,4-glycosidic , เซลลูเลส (cellulase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสตรงพันธะ β -1,4-glycosidic และ ไซแลนเนส (xylanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสตรงพันธะ β -1,4-xylan เป็นต้น (Tomme *et al.* 1995)

แหล่งที่จะพบเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์เป็นกลุ่มที่สามารถพบเอนไซม์ได้มากที่สุด และสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติหลากหลาย รองลงมาคือในพืชและสัตว์ โดยเอนไซม์ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ถึงประมาณ 90% ซึ่งกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นแหล่งใหญ่แหล่งหนึ่งที่เป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยเยื่อใยที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และเพกติน (pectin) เพราะร่างกายของสัตว์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยเยื่อใยของพืชได้ จุลินทรีย์ที่พบได้ในกระเพาะรูเมน ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว เชื้อรา เป็นต้น (Wolfgang,

2004) โดยเชื้อราเป็นกลุ่มแรกที่เข้าย่อยสลายส่วนของเยื่อใยอาหาร ซึ่งเชื้อราจะช่วยลดการจับยึดแน่นของอนุภาคขึ้นอาหาร (เมธา วรรณพัฒน์. 2533) ทำให้ผิวของอาหารแตกเปราะ ส่งเสริมให้แบคทีเรียเข้ายึดเกาะและย่อยสลายเยื่อใยได้ดีขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนได้ดี แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นปริมาณมากที่สุดในการเพาะรูเมน โดยการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสามารถจำแนกได้หลายแบบ เช่น จำแนกตามส่วนต่าง ๆ ในกระเพาะรูเมนที่แบคทีเรียยึดเกาะอยู่ หรือจำแนกตามการใช้ประโยชน์อาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้

ภายในกระเพาะรูเมนมีสภาวะแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic) สภาพภายในของกระเพาะรูเมนที่มีความเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ คือ ต้องมีระดับความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.5 – 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 37-40 °C แต่อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่จะเป็นพวกไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobes) ดังนั้นการจะนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจึงเป็นไปได้ยาก (Shelswell, 2004) และสอดคล้องกับการพบว่าจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมมีถึงประมาณ 99% ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ยาก (Nobutada., 2006 : Rakesh *et al.* 2005) Schloss and Handelsman (2003) จึงได้เสนอเทคนิคการทำเมทาจีโนมิกไลบรารี (metagenomic library) เพื่อใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงยากเหล่านี้ โดยเทคนิคเมทาจีโนมิกไลบรารีเป็นการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องผ่านการเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือตัดด้วยวิธีกล จากนั้นเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเพื่อถ่ายทอด (transform) เข้า *Escherichia coli* (*E. coli*) หรือเจ้าบ้าน (host cell) อื่นๆ แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาเอนไซม์ที่สนใจ วิธีเมทาจีโนมิกไลบรารีมีการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วย 2 วิธีหลักๆ คือ การวิเคราะห์หาเอนไซม์แบบ function-driven analysis (activity-base screening) โดยการทำเมทาจีโนมิกไลบรารี แล้วจึงตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ที่เรานสนใจ และแบบ sequence-driven analysis โดยการทำเมทาจีโนมิกไลบรารี แล้วจึงตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์นั้นๆ (Schloss and Handelsman. 2003 : Cowan *et al.* 2004) แต่ในปัจจุบันก็มีการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีใหม่ๆ เช่น SIGEX (substrate-induced) gene expression หรือ pyrosequencing อีกด้วย

การศึกษาในวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ต้องการได้เอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ โคและกระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่กินหญ้าเป็นอาหารหลัก ในกระเพาะรูเมนจึงมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ จึงเลือกกระเพาะรูเมนของโคและกระบือเป็นแหล่งที่ใช้หาเอนไซม์เซลลูเลส แล้วใช้เทคนิควิธีเมทาจีโนมิกไลบรารีในการคัดแยกยีนของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแบบ function-driven analysis แล้วหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(full-length gene) จากข้อมูล pyrosequencing ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่มีกิจกรรมของ เอนไซม์จากไลบรารีแล้วจึงนำลำดับลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีนที่ได้มาทดสอบการแสดงออกของ โปรตีนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีจากแบคทีเรียในกระเพาะส่วนรูเมนของโคและกระบือ
- 2) เพื่อแยกยีนที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส
- 3) เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่แสดงออกในแบคทีเรีย

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- 2) ห้องปฏิบัติการวิจัยเอนไซม์เทคโนโลยี หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนรูเมนของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนนำมาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูเมนด้วยวิธีทางเคมี และวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยนำจีโนมิคดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ pZER0-2 vector และ CopyControl™ Fosmid vector และถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปใน *E.coli* จากนั้นนำโคลนที่ได้มาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยการใช้ AZCL-HE-Cellulose หรือ AZCL-Beech wood xylan และ enzhanse buffer จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีกิจกรรมของเซลลูเลส หรือ ไซแลนเนส โดยดูจากการเกิดสีฟ้า (blue zone) รอบๆ โคลนี มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อหา full length gene ด้วยการวิเคราะห์ผลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ shotgun cloning หรือ pyrosequencing เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จะนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อหา ยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET 28a(+) vector แล้วถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli*

สายพันธุ์ Rosetta™ คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลผลิตพีซีอาร์ ไม่ว่าจะพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาร์มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ให้ผลิตเอนไซม์ และสกัดเอนไซม์เซลลูเลสจึงนำไปพิจารณาคุณสมบัติทางชีวเคมี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้เมทาจีโนมิกไลบรารีจากแบคทีเรียในรูเมนโคและกระบือ
- 2) ได้ยีนของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นลำดับเบสที่สมบูรณ์จากเมทาจีโนมิกไลบรารี
- 3) ได้คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อเป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ที่ได้ไปพัฒนา และผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

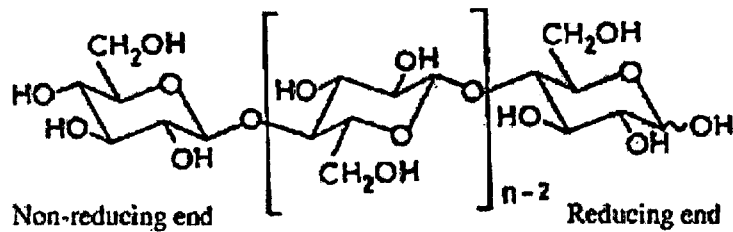
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลลูโลส (cellulose) และไซแลน (xylan)

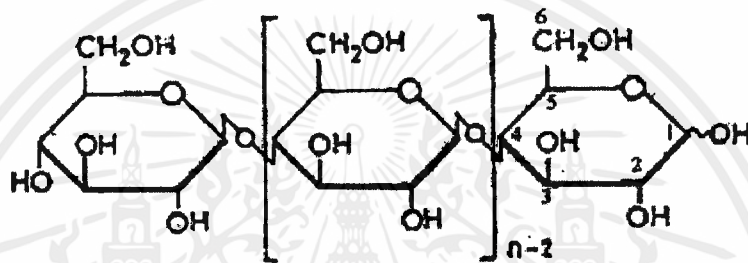
เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่ง โดยโพลีแซคคาไรด์ คือ คาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) ตั้งแต่ 12 โมเลกุลขึ้นไปจับกันด้วย glycosidic linkage เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของพืชและสัตว์ โดยในพืชมีปริมาณสูง 60–80 % (Higuchi, 1997 ; วิเชียรลีสุข, 2532) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์หลักของพืช ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสสายยาว (Chaplin, 2008) เกิดจากหน่วยของ D-glucose มาจับต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic (ภาพที่ 2.1) หนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสจะประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสระหว่าง 100 ถึง 14,000 หน่วยย่อย (Beguin and Aubert, 2000) หน่วยย่อยของกลูโคสบางส่วนจะยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกลูโคสในแต่ละสาย เรียกว่า microfibril ซึ่งจะพบมากในผนังเซลล์ชั้นที่สอง (Reese, 1976) การจัดเรียงตัวของ microfibril มี 2 แบบ คือ เรียงตัวแบบมีระเบียบ (parallel) ทำให้โครงสร้างที่เกิดขึ้นอัดตัวกันแน่น (crystalloid หรือ crystalline cellulose) ย่อยสลายได้ยาก และแบบเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (antiparallel) เกิดโครงสร้างแบบหลวมๆ (amorphous) การจัดเรียงตัวทั้ง 2 แบบ ของเซลลูโลสทำให้มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในกรด และด่างเล็กน้อย ในธรรมชาติเซลลูโลสมักอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส โดยเชื่อมต่อกับโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ เช่น ลิกนิน เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และโมเลกุลฟีนอลิก

เซลลูโลสแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

- 1) α -cellulose เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในด่างเข้มข้น (NaOH 17.5-18%) ประกอบด้วย poly-D-glucose
- 2) β -cellulose เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้เล็กน้อยในด่างเข้มข้น เป็นเซลลูโลสสายสั้นๆ
- 3) γ -cellulose เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ดีในด่างเข้มข้น ไม่ละลายในกรด



Sometimes shown as



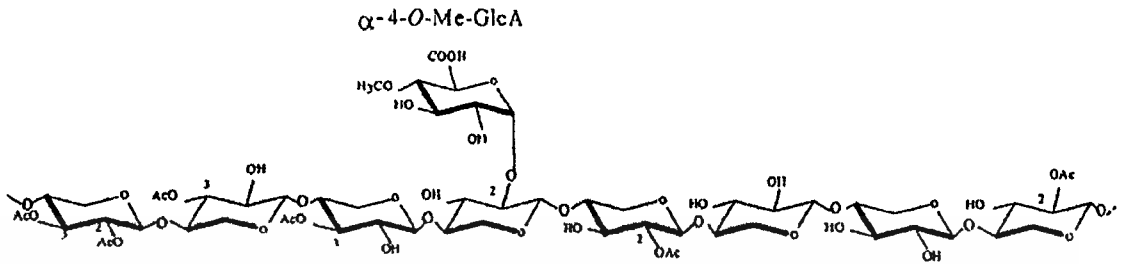
Cellulose

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส (American Fiber Manufacturers Association, 1997)

รัตติยา แวนนกุล (2546) กล่าวว่า ไชเลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์พืช การย่อยสลายไชเลนให้สมบูรณ์เป็นไปได้ยากเนื่องจากเป็นสารประกอบประเภท heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อยหลายชนิด มีโครงสร้างหลักเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 linkage และมีโครงสร้างรองเป็นน้ำตาลเพนโตส เฮกโซส และกรดดยูเรนิค ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับที่มาของไชเลนนั้นๆ ได้แก่

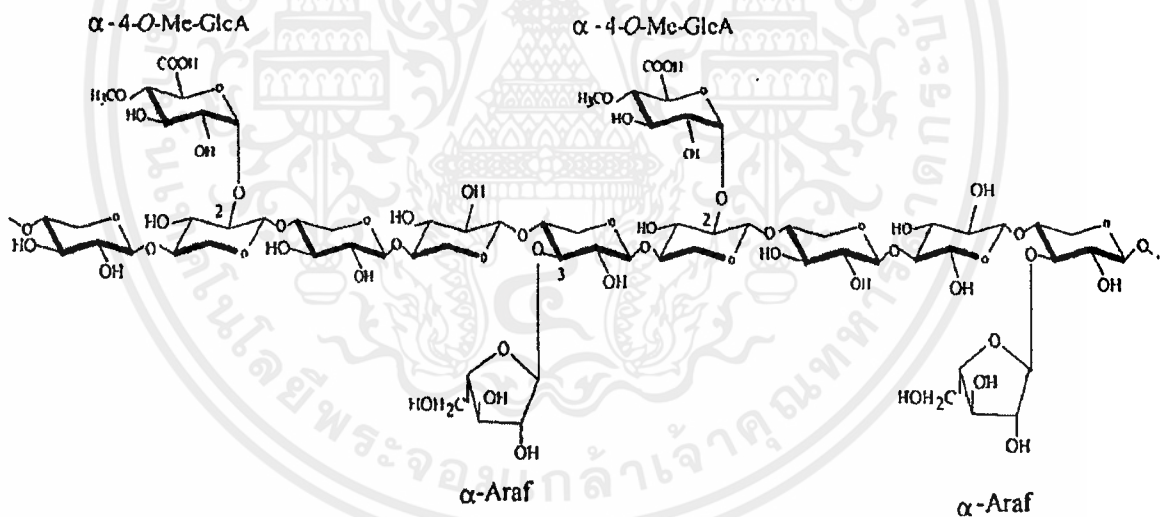
1) ไชเลนในเนื้อไม้แข็ง ประกอบด้วย O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan และมีหมู่ acetyl (OAc) ปริมาณมาก (ภาพที่ 2.2) โดยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วย β -xylopyranose residue อย่างน้อยที่สุดประมาณ 70 หน่วยทุกๆ 10 หน่วยของไซโลสมีหมู่ 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid จับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 องค์ประกอบไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Sunna and Antranikian. 1997)

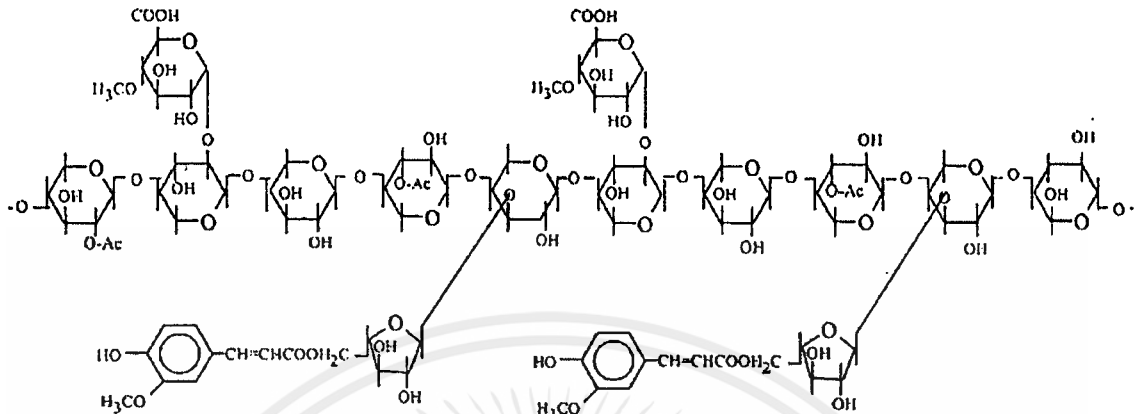
2) ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน มีโครงสร้างหลักเป็น arabino-4-O-methylglucuronoxylan เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic (ภาพที่ 2.3) มี 4-O-methylglucuronic acid (α -4-O-Me-GlcA) เป็นองค์ประกอบมากกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็ง มีหมู่ α -L-arabinofuranose (α -Araf) แทนหมู่ acetyl



ภาพที่ 2.3 องค์ประกอบไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Sunna and Antranikian. 1997)

3) ไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืช มีโครงสร้างเป็น O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan (ภาพที่ 2.4) มี 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid น้อยกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็ง แต่มีปริมาณ L-arabinofuranose จำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืช (Coughlan and Hazlewood. 1993)

2.2 ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

2.2.1 ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อได้เป็นกลูโคสโดยการตัดพันธะ β-glycosidic แบบจำเพาะ ซึ่งระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแบบ multicomponent enzyme โดยมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด คือ endo-β-glucanase (EC. 3.2.1.4), exo-β-glucanase (EC.3.2.1.91) และ β-glucosidase (EC.3.2.2.21) (Reese *et al.* 1950; Sternberg *et al.* 1977; Beguin and Aubert. 2000) ซึ่งมีลักษณะการทำงานแตกต่างกันดังนี้

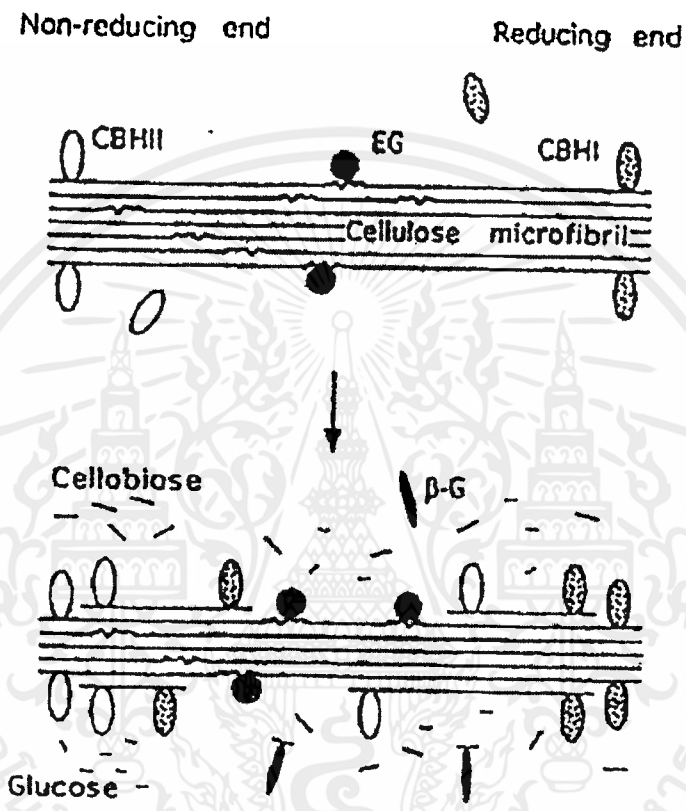
1) endo-β-glucanase หรือ 1, 4-β-D-glucan glucanohydrolase หรือ CMCase มีหน้าที่ย่อยโมเลกุลเซลลูโลสทั้งในรูปแบบที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ โดยตัดพันธะ β-1, 4-glycosidic ภายในสายเซลลูโลสแบบสุ่ม ผลผลิตทันทีที่ได้จึงมีหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่างๆ กัน

2) exo-β-glucanase หรือ 1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase หรือ avicelase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสโดยตัดพันธะของ β-1, 4-glycosidic จากด้านปลายของ non reducing end ไปอย่างมีระเบียบ ทำให้ได้เซลโลไบโอส และกลูโคสบ้าง

3) β-glucosidase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นกลูโคส

การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจะทำงานได้ดีกับเซลลูโลสที่มีการจัดเรียงตัวแบบ amorphous แต่ที่เป็นแบบ crystalline จะย่อยสลายได้ไม่ดีเนื่องจาก

อัตราการย่อยสลายจะเกิดได้ช้ามาก (ภาพที่ 2.5) ดังนั้นการนำน้ำตาลที่ผลิตได้ไปใช้นั้นเกิดจากการย่อยสลายของเซลลูโลสแบบ amorphous เป็นส่วนใหญ่ (Fan et al. 1987)



ภาพที่ 2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสต่อการย่อยสลายเซลลูโลส (CBHI, II = exocellobiohydrolases I, II EG = endoglucanase และ β-glucosidase) (Beguin and Aubert. 1994)

ลักษณะการทำงานของเอนไซม์ และลักษณะของเซลลูโลสมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดย crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายจากการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ในงานวิจัยชนิดของเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท (substrate) เพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส มีหลายชนิด (Han et al. 1995) เช่น

- 1) filter paper และ avicel ใช้ตรวจสอบการทำงานของ endo-β-glucanase และ exo-β-glucanase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าให้คำแนะนำเชิงธุรกิจหรือการดำเนินงานใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) acid-swollen cellulose, carboxymethyl-cellulose (CMC), carboxymethyl-cellulose azure, trinitrophenyl-cellulose ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ endo- β -glucanase

3) methylumbellifery- β -D-cellobiose (MMC) และ p-nitrophenyl- β -D-cellobioside (pNPC) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ exo- β -glucanase

4) MUG (methylumbellifery- β -D-glycopyranoside) และ pNPG (p-nitrophenyl- β -D-glycopyranoside) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -glucosidase

2.2.2 ระบบการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

Reilly (1980) แบ่งการทำงานของเอนไซม์ตามตำแหน่งของสับสเตรทที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ดังนี้

1) β -xylosidase (xylosidase; exo-1,4- β -xylosidase, EC 3.2.1.37) ย่อยสลาย xylo-oligosaccharides ไปเป็นน้ำตาลไซโลส

2) Exoxylanase ((1,4)- β -D-xylan xylohydrolase EC 3.2.1.37) ย่อยสลายไซแลนและ xylo-oligosaccharides ที่มีสายสั้นๆ ได้เล็กน้อย

3) Endoxylanase (1,4- β -D-xylan xylohydrolase EC 3.2.1.8) ย่อยสลายไซแลนและ xylo-oligosaccharides ที่มีสายยาวๆ ได้

และจากข้อมูลในระบบเอนไซม์ของ Carbohydrate-Active Enzymes Database (CaZy) ซึ่งแบ่งเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family (GHF) ออกเป็น family โดยอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนและพบว่าทั้งหมด 115 families ซึ่งเอนไซม์เซลล์ูเลสที่ย่อยสับสเตรทแบบ endo- β -glucanase (3.2.1.4) พบใน family 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61 และ 74 เอนไซม์เซลล์ูเลสที่ย่อยสับสเตรทแบบ exo- β -glucanase (3.2.1.91) พบใน family 5, 6, 9 และ 48 ขณะที่เอนไซม์เซลล์ูเลสที่ย่อยสับสเตรทแบบ β -glucosidase (3.2.2.21) พบใน family 1, 3, 9 และ 30 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลล์ูเลสใน family 5 เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด แยกได้จากกลุ่มมีชีวิตทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา โปรโตซัว หนอนตัวกลม *Schistoma mansoni* และในพืช เช่น *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (ข้าว), *Zea mays* (ข้าวโพด) และ *Solanum lycopersicum* (มะเขือเทศ) และเอนไซม์ไซแลนเนสที่ย่อยสับสเตรทแบบ endoxylanase จะพบได้ใน family 5, 8, 10, 11 & 43 และเอนไซม์ไซแลนเนสที่ย่อยสับสเตรทแบบ β -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xylosidase และ exoxylanase จะพบได้ใน family 3, 30, 39, 43, 51, 52 และ 54 (Henrissat and Davies, 1997)

2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสในอุตสาหกรรม

ในปัจจุบันได้มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่ใช้ผลิตภัณฑ์ หรือของเหลือใช้จากพืชเป็นวัตถุดิบ ยกตัวอย่างเช่น

1) อุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เอนไซม์เซลลูเลสหรือเอนไซม์ไซแลนเนสที่ทนกรดเสริมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยในการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) ประเภทเส้นใยเซลลูโลสช่วยให้สัตว์ได้รับสารอาหารมากขึ้นซึ่งจะทำให้สัตว์โตเร็วขึ้น และมีผลไปช่วยลดความหนืด (viscosity) ในกระเพาะของสัตว์ (อุทัย คันโร. 2533) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ทนร้อนในการทำน้ำผลไม้เพื่อให้ผลไม้ใส และทำให้คั้นน้ำผลไม้ออกมาจากผลได้มากขึ้น

2) อุตสาหกรรมผ้า ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ทนกรดมาดกแต่งใยผ้าแทนการขัดล้างด้วยก้อนหิน ทำให้ผ้ามีความเรียบและเป็นมันเงา สีสดใสมากขึ้นและทำให้สีเป็นลวดลายได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการสัมผัสและการทิ้งตัวของผ้าให้ดีขึ้น

3) อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ทนร้อน สำหรับย่อยวัตถุดิบที่ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลจำพวก ฟางข้าว กากชื้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น เพื่อให้ได้น้ำตาลเอาไปเปลี่ยนเป็นเอทานอล

2.4 ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

โคและกระบือเป็นสัตว์เคี้ยวลูกด้วยนมจำพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีกีบคู่ มีการจัดกลุ่มของโคแบ่งเป็นการให้ประโยชน์มี 3 กลุ่ม คือ โคเนื้อ, โคนม และโคเนื้อและนม โคจัดอยู่ในสปีชีส์ (species) *Bos taurus* และกระบือจัดอยู่ในตระกูล *Bovidae* สามารถแยกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กระบือป่า และกระบือบ้าน สำหรับกระบือบ้านนั้นแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ กระบือปลัก (swamp buffalo) และกระบือแม่น้ำ (river buffalo) กระบือทั้งสองชนิดจะอยู่ใน family และ genus เดียวกันคือ *bubalus bubalis* แต่ก็มี ความแตกต่างกันทางสรีระวิทยา รูปร่าง และผลผลิตต่าง ๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

สัตว์เคี้ยวเอื้องมีระบบทางเดินอาหารคล้ายกับสัตว์ชนิดอื่น คือ ช่องปาก (oral cavity), หลอด

อาหาร (esophagus), กระเพาะอาหาร (stomach), ลำไส้เล็ก (small intestine), ลำไส้ใหญ่ (large intestine) และทวารหนัก (rectum) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีลักษณะพิเศษคือ มีกระเพาะอาหารที่ประกอบด้วย 4 ช่อง คือ กระเพาะอาหารส่วนหน้า (rumen) กระเพาะอาหารส่วนกลาง (reticulum) กระเพาะอาหารส่วนหลัง (omasum) และกระเพาะอาหารส่วนปลาย (abomasum) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความซับซ้อนและมีความสามารถในการย่อยสลายอาหารได้ดีกว่าสัตว์ชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการย่อยสลายเส้นใยพืช (cellulose) และแป้ง (starch) ซึ่งสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถย่อยสลายได้มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น

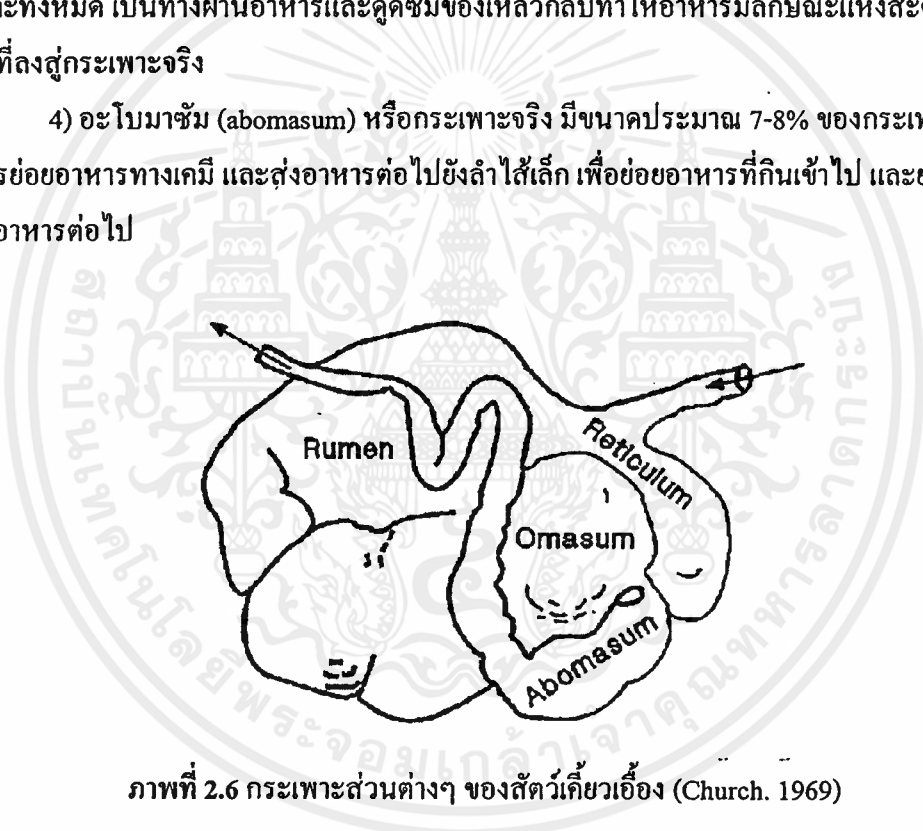
intestine), ไส้ตรง (rectum) และทวารหนัก (anus) แต่จะแตกต่างกับสัตว์ชนิดอื่นที่กระเพาะอาหารจะแบ่งเป็น 4 ส่วน (ภาพที่ 2.6) คือ

1) รูเมน (rumen) เรียกว่า ผ้าชีวีว มีขนาดประมาณ 80% ของกระเพาะทั้งหมด ทำหน้าที่หมักอาหารโดยจุลินทรีย์ซึ่งอาหารจะถูกส่งออกมาเคี้ยวเอื้องอีกครั้งหนึ่งเพื่อบดเส้นใยให้ละเอียด

2) เรติคิวลัม (reticulum) เรียกว่า กระเพาะรังผึ้ง มีขนาดประมาณ 5% ของกระเพาะทั้งหมด อาหารในรูปของแข็งและเหลวสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้สะดวก

3) โอมาซั่ม (omasum) เรียกว่า กระเพาะสามสิบกลีบ มีขนาดประมาณ 7 ถึง 8% ของกระเพาะทั้งหมด เป็นทางผ่านอาหารและดูดซึมของเหลวกลับทำให้อาหารมีลักษณะแห้งสะดวกในการเคลื่อนที่ลงสู่กระเพาะจริง

4) อะโบมาซั่ม (abomasum) หรือกระเพาะจริง มีขนาดประมาณ 7-8% ของกระเพาะทั้งหมด จะมีการย่อยอาหารทางเคมี และส่งอาหารต่อไปยังลำไส้เล็ก เพื่อย่อยอาหารที่กินเข้าไป และย่อยจุลินทรีย์เป็นอาหารต่อไป



ภาพที่ 2.6 กระเพาะส่วนต่างๆ ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Church, 1969)

2.5 จุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

อาหารส่วนใหญ่ที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไปเป็นพวกพืชที่มีเซลลูโลสสูง ซึ่งต้องใช้เวลาหลายวันในการย่อย ดังนั้นสัตว์เคี้ยวเอื้องจึงต้องกินอาหารเหล่านี้ในปริมาณมากเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย แต่สัตว์เคี้ยวเอื้องไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสที่เพียงพอได้ด้วยตัวเอง ดังนั้นเมื่อ

อาหารอยู่ในกระเพาะรูเมน อาหารจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะช่วยย่อยสลายเซลลูโลสให้
 เอกสารที่
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) เช่น acetic acid, propionic acid, butyric acid และ pyruvic acid เป็นต้น เพื่อใช้เป็นพลังงานต่อไป กลุ่มจุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมน ได้แก่ แบคทีเรีย (bacteria), โปรโตซัว (protozoa) และ เชื้อรา (fungi) เป็นต้น (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541; Kamra .2005; Wolfgang. 2004; Woolcock. 1991)

1) แบคทีเรีย มีอยู่หลายชนิด จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ และไม่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโต แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ไม่มีหน้าที่ในการย่อยอาหาร เพียงแต่ปนเปื้อนจากอาหารเข้าไปในกระเพาะเท่านั้น แต่ก็มีแบคทีเรียบางพวกเหมือนกันที่ช่วยในการย่อยอาหาร เช่น *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus spp.* เป็นต้น ซึ่งช่วยในการย่อยอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาล ส่วนอาหารที่เป็นพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ถูกแบคทีเรียย่อยได้เหมือนกัน แต่ช้ามาก Wanapat *et al.* (1999) รายงานว่า จำนวนแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นที่พบในกระบือและโคที่ได้รับฟางข้าวและฟางหมักยูเรียเป็นอาหาร มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งรวมทั้งแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส แบคทีเรียที่สร้างกรดโพรพิโอนิก และแบคทีเรียที่ย่อยอะไมโลสในกระบือสูงกว่าในโคที่กินหญ้า

Lee (2007) รายงานว่า แบคทีเรียในรูเมนมีประโยชน์ต่อสัตว์ เช่น *Ruminococcus albus* และ *R. flavefaciens* ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยพวกเซลลูโลสและไซแลนในอาหารสัตว์ ได้ผลผลิตเป็นกรด เช่น format, acetate และ hydrogen เป็นต้น นอกจากนี้ *Fibrobacter succinogens* ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยพวกเซลลูโลสและอะไมโลส ได้ผลผลิตเป็น format, acetate และ succinate เป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

2) โปรโตซัว ที่พบในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีขน (cilia) และบางพวกมีหนวด (flagella) ขนาดเล็ก พวกที่มีขน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 พวก คือ holotrichs และ oligotrichs โปรโตซัวส่วนใหญ่ที่อยู่ในกระเพาะรูเมน มีหน้าที่ในการย่อยเส้นใยและน้ำตาลจากพืช Kamra (2005) รายงานว่า โปรโตซัวที่พบในรูเมนของโคกระบือ เช่น *Isotricha prostoma*, *I.intestinalis* และ *Oligoisotricha bubali* เป็นต้น โปรโตซัวที่พบในรูเมนของกวาง เช่น *I. prostoma* และ *I.intestinalis* และโปรโตซัวที่พบในรูเมนของแกะ เช่น *I. prostoma* (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 หน้าที่ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

Species	Function	Products
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Cellulolytic, Amylolytic	Formate, Acetate, Succinate
<i>Ruminococcus albus</i>	Cellulolytic, Xylanolytic	Formate, Acetate, Ethanol, Hydrogen, Carbon dioxide
<i>R. flavefaciens</i>	Cellulolytic, Xylanolytic	Formate, Acetate, Succinate, Hydrogen
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Cellulolytic, Xylanolytic, Proteolytic	Formate, Acetate, Lactate, Butyrate, Ethanol, Hydrogen, Carbon dioxide
<i>Clostridium lochheadii</i>	Cellulolytic, Proteolytic	Formate, Acetate, Butyrate, Ethanol, Hydrogen, Carbon dioxide

ที่มา: คัดแปลงจาก Lee (2007)

ตารางที่ 2.2 โปรโตซัวที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดต่างๆ

Protozoa	Host
<i>Isotricha prostoma</i>	Sheep
	Zebu cattle
	Blackbuck
	Water buffalo
	Red deer
	Goat
	<i>I. intestinalis bubali</i>
	Bison
	Mouse deer
	Red deer
<i>Dasytricha ruminantium</i>	Sheep
	Blackbuck
	Water buffalo
<i>Oligosotriccha</i>	Water buffalo
	Cattle

เอกสารนี้
ที่มา: คัดแปลงจาก Kamra (2005) ซึ่งงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เชื้อรา เป็นจุลินทรีย์กลุ่มแรกที่เข้าไปย่อยโครงสร้างของเยื่อใย ช่วยให้แบคทีเรียเข้าไปย่อยได้ง่ายขึ้น (Akin *et al.*, 1983) ในกระเพาะรูเมนหากมีเชื้อรามากจะช่วยลดระยะเวลาการเข้าย่อยอาหารเยื่อใย เชื้อราอยู่ได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนในกระเพาะรูเมน แกะ แพะ โคน และบางสายพันธุ์ของกวางหรือในไส้ติ่งของม้า ช้าง และจิงโจ้ เชื้อรามีวงจรชีวิตแบ่งเป็น 2 ระยะ motile flagellated zoospore เป็นระยะเคลื่อนไหวได้ มีหางทำหน้าที่ในการพัดโบกและระยะ non-motile vegetative เป็นระยะที่หยุดการเคลื่อนไหว มีไรซอยด์ (rhizoid) ทำหน้าที่คล้ายรากของต้นไม้ เจริญเติบโตเข้าไปในเยื่อของพืช นำเอาคาร์บอนจากพืชมาใช้เป็นประโยชน์ Kamra (2005) กล่าวว่า เชื้อราที่พบในรูเมนของโคกระบือ เช่น *Neocallimastix frontalis*, *N. hurleyensis* และ *Ruminomyces elegans* เป็นต้น (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 กลุ่มเชื้อราที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดต่างๆ

Fungus	Source of isolation
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Cow
<i>N. patriciarum</i>	Sheep
<i>N. hurleyensis</i>	Cattle
<i>Caecomycetes communis</i>	Cattle
<i>C. equi</i>	Horse
<i>Orpinomyces bovis</i>	Cattle
<i>Ruminomyces mucronatus</i>	Cattle
<i>R. elegans</i>	Cattle
<i>Piromyces communis</i> , <i>P. mae</i> , <i>P. dumbonica</i>	Horse, Elephant

ที่มา: Kamra (2005)

ฉลอง วชิราภากร (2541) มีรายงานถึงปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ กล่าวคือ

1) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย ไม่ว่าจะอยู่บนชิ้นอาหาร หรืออาศัยอยู่บนผนังกระเพาะรูเมน มักจะมีปฏิสัมพันธ์กันในแง่บวก (symbiosis) คือ แบคทีเรียกลุ่มหนึ่งจะเจริญได้ต้องอาศัยผลผลิตสุดท้ายจากแบคทีเรีย อีกกลุ่มหนึ่ง กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนของการเปลี่ยนจากเซลลูโลสเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน และกลุ่มที่ใช้ไฮโดรเจน ซึ่งในกระเพาะรูเมนนั้นมีแบคทีเรียหลายกลุ่ม ที่มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดในด้านส่งเสริมกัน (syntropic association)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย เชื้อรา และ โปรโตซัว แบคทีเรียมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อราในด้านบวก แต่จะมีปฏิสัมพันธ์กับโปรโตซัวในด้านลบ คือ โปรโตซัวเป็นพวกที่กิน และย่อยแบคทีเรียทำให้ชีวมวลของแบคทีเรียที่อยู่ในของเหลวในกระเพาะรูเมนลดลง ซึ่งจะมีผลกระทบต่ออัตราการย่อยเยื่อใย นอกจากนี้โปรโตซัวยังเป็นคู่แข่งของแบคทีเรียในการใช้แป้ง และน้ำตาล

2.6 หน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

Lee (2007) ได้อธิบายดังนี้ คือ

1) การย่อยคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน การย่อยคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน สุดท้ายจะได้กรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งได้แก่ กรดน้ำส้ม กรดโพรไพโอนิก และกรดบิวทีริก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้อาจได้กรดแลกติก ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น กรดน้ำส้ม และ กรดโพรไพโอนิก

2) การย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน เป็นการย่อยสลายโซ่เปปไทด์ เป็นเปปไทด์สั้น และ สุดท้ายจะได้เป็นกรดอะมิโน แอมโมเนีย และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะมิโนบางส่วนที่เกิดขึ้น สัตว์เคี้ยวเอื้องจะดูดซึมไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย และอีกบางส่วนจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญขยายจำนวนของจุลินทรีย์ หรือเรียกว่าสร้างโปรตีนของจุลินทรีย์ขึ้นมาใหม่ เมื่อจุลินทรีย์ผ่านมาถึงลำไส้เล็กพร้อมกับอาหารที่ถูกย่อยแล้ว จุลินทรีย์ก็จะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนและถูกดูดซึมเข้าร่างกายสัตว์ เกิดประโยชน์อีกต่อหนึ่ง นอกจากนี้สารพวกยูเรียหรือ ไนโตรเจนที่เกิดจากการย่อยหรือที่ปนมากับอาหาร จุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์ยูรีเอส (urease) ย่อยจนเกิดเป็นแอมโมเนีย จากนั้นจุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียเหล่านี้ในการเจริญและเพิ่มจำนวน ดังนั้น สัตว์เคี้ยวเอื้องจึงเป็นสัตว์ที่สามารถเปลี่ยนโปรตีนคุณภาพต่ำ เช่น ยูเรีย ไนโตรเจน หรือแอมโมเนีย ให้เป็นโปรตีนคุณภาพสูง เช่น เนื้อ นม ได้โดยกลไกของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหาร

3) การย่อยไขมันของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ถ้าเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวจะถูกทำให้อิ่มตัวโดยการรวมกับไฮโดรเจนในกระเพาะรูเมนหรือที่เรียกว่า กระบวนการไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) จากนั้นไขมันจะถูกย่อยสลายได้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดโพรไพโอนิกในที่สุด

4) การสังเคราะห์สารอื่น ๆ ในกระเพาะรูเมน จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน สามารถสร้างวิตามินได้เองหลายชนิด เช่น วิตามินบี และวิตามินเค ถ้าโคขาดธาตุโคบอลต์ มักทำให้ขาดวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากโคบอลท์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสร้างไวตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ จุลินทรีย์ในกระเพาะอาหาร โค ยังสามารถสร้างไวตามินได้อีกหลายชนิด

2.7 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

ประมาณครึ่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกระเพาะรูเมนเป็นแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมีมากกว่า 200 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ (Hungate. 1996) การกระจายตัวของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน อยู่ในรูปลอยตัวอิสระในของเหลวในกระเพาะรูเมนประมาณ 30%ของแบคทีเรียทั้งหมด และอีก 70% จะยึดติดกับอาหารและผนังของกระเพาะรูเมนหรือยึดติดกับโปรโตซัว (Qrskov and Ryle. 1990) แบคทีเรียสามารถจำแนกได้ตามประเภทอาหารที่ใช้และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สร้างขึ้น ดังนี้ (ฉลอง วชิรภกร. 2541; เมธา วรณพัฒน์. 2533; Kamra. 2005)

1) แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น โดยมีการผลิตเซลลูเลสเข้าย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้อาจย่อยเซลโลไบโอสซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีมากที่สุดในการเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก แบคทีเรียชนิดที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bacteroides succinogenes* ในบางขณะ *Cillobacterium cellulosolvens* และ *Clostridium* spp. ต่างๆ ก็มีช่วยในการย่อยเซลลูโลส โดย *Clostridium lochhaedii* เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างสปอร์ แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น คือ มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายเท่า (Hungate. 1996)

2) แบคทีเรียที่ย่อยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulolytic bacteria) โดยปกติแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ก็จะสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย ได้แก่ *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospيريا multiparens* และ *B. ruminicola* เป็นต้น

3) แบคทีเรียที่ย่อยอะไมโลส (amylolytic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้จะมี เป็นจำนวนมากในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารชั้นที่มีอะไมโลสอยู่สูง ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ *B. amylophilus*, *Succinimonas amylophilus*, *B. fibrisolvens*, *Selenomonas ruminatum*, *Streptococcus bovis* และ *B. ruminicola* เป็นต้น โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสหลายสปีชีส์สามารถที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) แบคทีเรียย่อยกรด (acid-utilizing bacteria) มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้กรดต่าง ๆ ได้ เช่น formic, acetic, malic, fumaric, lactic และ succinic แบคทีเรียจำพวกนี้ได้แก่ *Veillonella gazogenes*, *V. alcalescens*, *Propionic bacterian* sp., *Seimonas ruminantium*, *Reptostreptococcus elsdenii* และ *S. lactilytica* เป็นต้น

5) แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน (proteolytic bacteria) แบคทีเรียหลาย ๆ สปีชีส์จะย่อยโปรตีนเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ *B. amylophilus*, *C.m sporogens* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

6) แบคทีเรียผลิตแอมโมเนีย (Ammonia-producing bacteria) ได้แก่ *B. ruminicola*, *S.ruminantium*, *R. elsdenii* และ *Butyrivibrio* spp.

7) แบคทีเรียที่สังเคราะห์มีเทน (methanogenic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างแก๊สมีเทนจากการแตกตัวของ formate เป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ *Methanobacterium ruminantium* และ *Methanobacterium formicicum*

8) แบคทีเรียที่ย่อยไขมัน (lipolytic bacteria) แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการใช้กลีเซอรอล แต่ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าสปีชีส์ใดที่มีความสามารถในการย่อยไขมันได้กลีเซอรอล

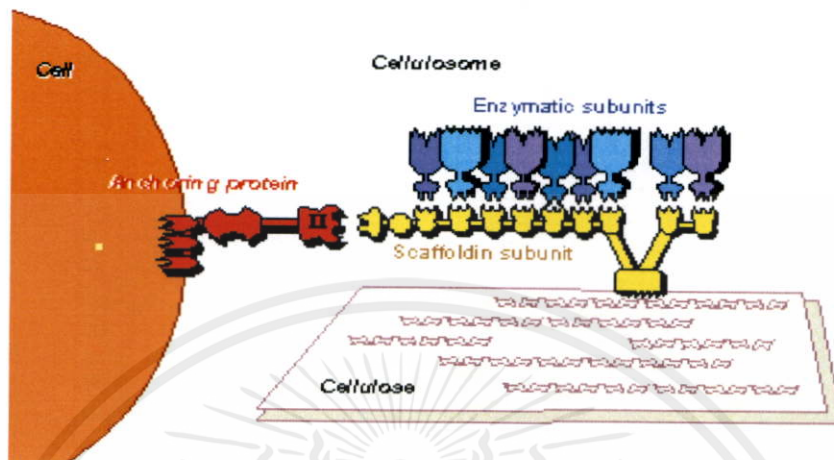
9) แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (vitamin-synthesising bacteria) ถึงแม้จะทราบว่าไม่มีแบคทีเรียหลายสปีชีส์มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบีคอมเพลกซ์ได้ แต่การศึกษายังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าเป็นสปีชีส์ใด

ฉลอง วชิราภกร (2541) กล่าวว่า แบคทีเรียในบางกลุ่มสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งความต้องการทางโภชนะของแบคทีเรียในการเจริญเติบโตแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป ส่วนแหล่งพลังงานของแบคทีเรียจะได้จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตต่างๆ ที่ย่อยได้

2.8 การย่อยสลายเซลล์ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

แบคทีเรียไม่สามารถนำเซลล์เข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของเซลล์เป็นสายยาว แบคทีเรียจึงต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลล์นอกเซลล์ เพื่อให้ได้น้ำตาลที่สามารถผ่านเซลล์นำไปใช้ได้ พรรณทิพา ธงทอง (2547) กล่าวว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์จากกระเพาะรูเมนมี 3 ชนิดหลัก คือ *B. (Fibrobater) succinogenes*, *R. flavefaciens* และ *R. albus*, โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างอวัยวะยึดเกาะกับผนังเซลล์ของพืช (consortia) โดยมีลักษณะโครงสร้างเป็น glycocalyx เมื่อแบคทีเรียเกาะยึดกับพืชจะสร้างโคโลนีบนผนังเซลล์ของพืช และปล่อย

extracellular enzyme ออกมาย่อยเยื่อใยของพืช (Patterson. 1992) นอกจากนี้ Weimer (1996) รายงานว่า การค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 การทำงานของเซลลูโลโซมเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส (Raphael. 2004)

จากภาพที่ 2.7 ในการย่อยสลายเชื้อโยเซลลูโลโซมที่ผลิตออกจะรวมตัวกันอยู่นอกเซลล์ ซึ่งอยู่ระหว่างเซลล์กับสับสเตรท เมื่อได้ผลิตภัณฑ์เป็น เซลโลไบโอส กลูโคส และไซโตส ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เมื่อมีปริมาณมากพอจะไปยับยั้งการทำงานของเซลลูโลโซม จนทำให้เซลลูโลโซมหลุดออกจากสับสเตรท

2.9 การสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารี (Metagenomic library)

เทคนิคเมทาจีโนมิก (metagenomic technique) เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และดีเอ็นเอเทคโนโลยีที่ใช้ในการแยกชิ้นที่สนใจจากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยง (Schloss and Handelsman. 2003) เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมเราพบจุลินทรีย์มากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ หรือสารออกฤทธิ์อื่นๆ ที่มีคุณสมบัติหลากหลาย แต่จุลินทรีย์ที่เรานำมาเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการนั้นมีแค่ประมาณ 1% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมอีก 99% นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ยาก และส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจและมีความสำคัญในแง่สามารถผลิตเอนไซม์มาใช้ในการอุตสาหกรรมต่างๆ (Nobutada., 2006 : Rakesh et al., 2005) วิธีเมทาจีโนมิกจึงถูกนำมาใช้ในการคัดแยกชิ้นที่เราสนใจ หรือค้นหายีนใหม่ๆ มาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงจากสิ่งแวดล้อมซึ่งไม่จำเป็นที่จะต้องนำจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีจากเมทาจีโนมิกไลบรารีมาใช้ในการค้าต่างๆ (ตารางที่ 2.4)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น่าสนใจและมีความสำคัญในแง่สามารถผลิตเอนไซม์มาใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ (Nobutada., 2006 : Rakesh *et al.*, 2005) วิธีเมทาจีโนมิกจึงถูกนำมาใช้ในการคัดแยกยีนที่เราสนใจ หรือค้นหายีนใหม่ๆ มาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงจากสิ่งแวดล้อมซึ่งไม่จำเป็นที่จะต้องนำจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีจากเมทาจีโนมิกไลบรารีมาใช้ในการค้าต่างๆ (ตารางที่ 2.4)

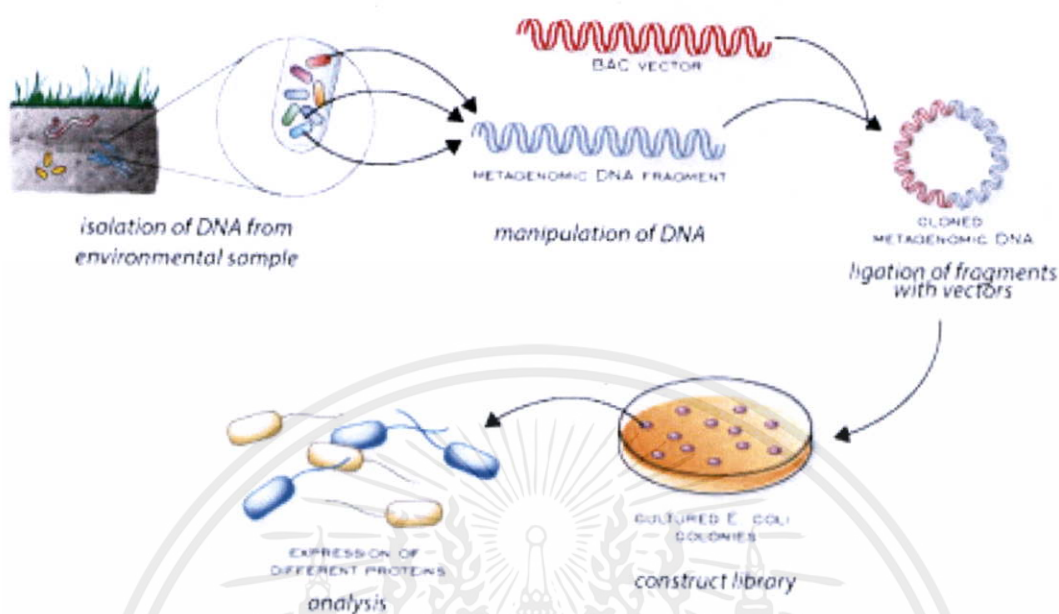
ตารางที่ 2.4 การนำเทคโนโลยีเมทาจีโนมิกมาใช้ในการค้า

Company	Target products	Classes	Products and market	Commercial interest
BASF www.corporate.basf.com	Enzymes	Amylase Hydratase	Acidophilic glucoamylase	Food industry, aiding with the digestion of starch
Bioresearch Italia, SpA (Italy)	Anti-infectives	N.D.	Dalbavancin	Development of human gene targeted therapeutics and novel anti-infective
B.R.A.I.N www.brain-biotech.de	Bioactive peptides and enzymes for pharmaceuticals and agrochemicals	N.D.	Nitrile hydratases Cellulases	Degussa AG Partnership for the industrial processes
Cubist pharmaceuticals http://www.cubist.com/	Anti-infectives	N.D.	N.D.	Various commercial relationships.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Cowan *et al.* (2005)

เมทาจีโนมิกไลบรารีสามารถถูกสร้างขึ้นมาได้ ด้วยเทคนิคที่หลากหลายแตกต่างกันไปขึ้นกับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่จะนำมาศึกษา (ภาพที่ 2.8) เริ่มแรกสกัดดีเอ็นเอโดยรวมจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอสั้นลงโดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ 4 ตัว และตัดแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete) หรือทำให้ดีเอ็นเอสั้นลงโดยวิธีกล (mechanical shearing) แล้วนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ (vector) เพื่อถ่ายทอด (transform) เข้า *Escherichia coli* หรือเจ้าบ้านชนิดอื่น แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 ขั้นตอนการแยกยีนที่สนใจด้วยวิธีเมทาจีโนมิกไลบรารี (Shelswell, 2004)

2.10 การค้นหายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกไลบรารี

วิธีเมทาจีโนมิกไลบรารีมีการวิเคราะห์หลัก 2 วิธี ดังนี้ 1) วิเคราะห์หาเอนไซม์แบบ function-driven analysis (activity base screening) เป็นการสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีแล้วตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ที่เราสนใจด้วยการพิจารณาจากกิจกรรมของโคลนที่ได้ และ 2) แบบ sequence-driven analysis เป็นการสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีแล้วนำโคลนที่ได้จากไลบรารีไปตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับยีนที่สนใจจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank (Schloss and Handelsman, 2003 ; Cowan *et al.*, 2004) การคัดเลือกเวกเตอร์สำหรับการโคลนขึ้นอยู่กับขนาดของยีนที่ต้องการศึกษา เวกเตอร์ต่างๆที่ใช้ในเมทาจีโนมิกไลบรารี ได้แก่ plasmid สำหรับยีนขนาดประมาณ 0.1 ถึง 1.0 กิโลเบส bacteriophages สำหรับยีนขนาดประมาณ 8 ถึง 20 กิโลเบส cosmid สำหรับยีนขนาดประมาณ 35 ถึง 50 กิโลเบส fosmid สามารถบรรจุขนาดของยีนได้ประมาณ 40 กิโลเบส bacterial artificial chromosomes (BAC) มีขนาดของยีนที่บรรจุได้ประมาณ 75 ถึง 300 กิโลเบส และ yeasts artificial chromosomes (YAC) สำหรับยีนขนาดประมาณ 100 ถึง 1000 กิโลเบส (McClellan, 1997 ; Kim *et al.*, 1992) เป็นต้น นอกจากนี้ function-driven analysis และ sequence-driven analysis แล้ว

ในปัจจุบันยังมีวิธีการใหม่ๆ อย่าง SIGEX มาใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกไลบรารี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า โดยผู้ดูแลเนื้อหาไม่รับผิดชอบต่อเนื้อหาการค้นคว้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.1 function-driven analysis ในปี 2004 นักวิจัย Yun *et al.* ได้คัดแยกยีนของเอนไซม์ตัวใหม่ที่อยู่ในกลุ่ม amylase จากเมทาจีโนมมิโคลาบราจีของจุลินทรีย์ในตะกอนดินบริเวณแหล่งน้ำ พบว่าเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 42°C ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และเมื่อนำเอนไซม์มาทดสอบการย่อยสลาย พบว่าสามารถย่อยสลายแป้งและ cyclodextrin ได้เป็นผลผลิตเป็นน้ำตาล maltose และน้ำตาล pullulan ต่อมา Walter *et al.* (2005) ได้สร้างเมทาจีโนมมิโคลาบราจีและวิเคราะห์หายีนของ β -glucanase ของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ของหนู เมื่อทำการสุ่มโคลนจากเมทาจีโนมมิโคลาบราจีจำนวน 61 โคลน พบว่ามี 3 โคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์ β -glucanase และในปีเดียวกัน Ferrer *et al.* (2005) ได้สร้างเมทาจีโนมมิโคลาบราจีของจุลินทรีย์ (microflora) จากกระเพาะรูเมนของโค เพื่อหา diversity ของกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลสใหม่ๆ (hydrolase) พบว่ามี 22 โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลส โดย 12 โคลน มีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) 9 โคลน มีกิจกรรมของเอนไซม์ endo- β -1,4-glucanases และ 1 โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ cyclodextrinase

ในปี 2006 นักวิจัย Lee *et al.* ทำการโคลนและหาคูสมบัติของยีนไซแลนเนสจากไลบราจีของจุลินทรีย์ที่มาจากบ่อน้ำเสียของฟาร์มโคนม แล้วหากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยวิธีทับ (overlay) โดยใช้สับสเตรท 0.2% RBB-xylan (Remazol Brilliant Blue-xylan) เมื่อได้โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าอยู่ในกลุ่มของ glycosyl hydrolase family 8 หลังจากนั้น Feng *et al.* (2007) นำยีนที่ได้จากจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ของกระต่ายมาสร้างเมทาจีโนมมิโคลาบราจีและทำการคัดแยกยีนของเอนไซม์เซลลูเลสผลการทดลองพบ 9 โคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นนำโคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความใกล้เคียงกับเซลลูเลส 50-70% ในปีเดียวกัน Lammle *et al.* (2007) ทำการศึกษาเอนไซม์ตัวใหม่ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ hydrolytic แตกต่างกันโดยการสร้างโคลนจากวิธเมทาจีโนมมิโคลาบราจีของจุลินทรีย์ในดิน ผลการคัดกรองพบว่า จาก 21,000 โคลน พบโคลนที่มียีนของเอนไซม์ lipase/esterase จำนวน 14 โคลน พบโคลนที่มียีนของเอนไซม์ phosphatase จำนวน 13 โคลน และพบโคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์ amylase จำนวน 38 โคลน

ต่อมานักวิจัย Soo *et al.* (2008) ศึกษาคุณสมบัติของยีนเซลลูเลสจากไลบราจีของแบคทีเรียที่มาจากบริเวณที่ดินที่มีความชื้น โดยโคลนเข้าเวกเตอร์ pCM2 แล้วหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้สับสเตรท คือ carboxymethyl cellulose (CMC) เมื่อหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ได้พบว่ามี 36% ที่มีความเหมือนกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จาก *Synechococcus sp.* โดยคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้สามารถย่อย CMC ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 45°C นอกจากนี้ยังได้โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

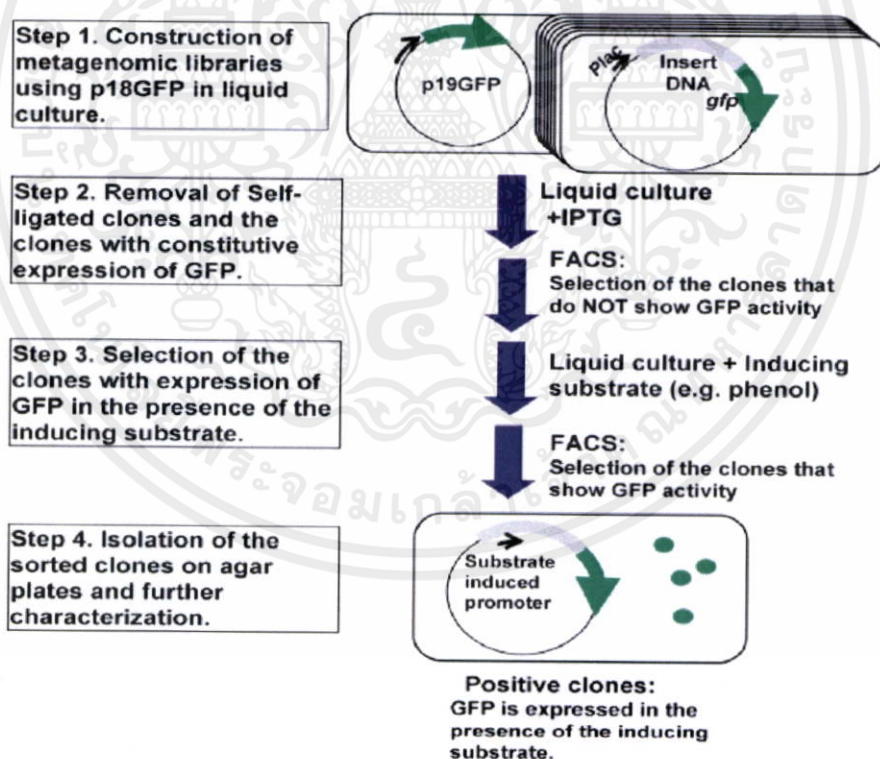
เนส และพบว่า 59% ที่มีความ เหมือนกับ endo-1,4-b-xylanase จาก *Cellulomonas pachnodae* และในปี 2009 นักวิจัย Duan *et al.* ได้แยกสกัดยีนที่ผลิต acidic cellulases จากเมทาจีโนมไลบรารีของกระเพาะรูเมนกระบือ เมื่อค้นหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบ 61 โคลนที่มีกิจกรรมของเซลลูเลส (นอกจากนี้ยังใช้วิธี sequence-driven analysis พบ 13 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และ 14 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ MUCase)

2.10.2 sequence-driven analysis เป็นการนำโคลนที่ได้จากเมทาจีโนมไลบรารีมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง เพื่อหาเอ็นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีอยู่ใน data base เช่น GenBank โดยอาจจะใช้เทคนิค hybridization หรือ PCR amplification (Vergin *et al.*, 1998) ซึ่ง Rondon *et al.* (2000) วิเคราะห์ biological function ของประชากรจุลินทรีย์ในดินจาก West Madison Agricultural Research Station in Madison, WI, USA. โดยใช้ 16S rDNA phylogenetic เป็น marker และสร้างไลบรารีจาก BAC พบโคลนที่ผลิตเอนไซม์ DNase 1 โคลน antibacterial 1 โคลน lipase 2 โคลน และ amylase 8 โคลน จากนั้น Courtois *et al.* (2003) สร้างไลบรารีจากดินที่มีการเพาะปลูกทางการเกษตร โดยใช้เวกเตอร์ cosmid ได้โคลนจากไลบรารีที่สร้างทั้งหมด 5,000 โคลน จึงใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการวิเคราะห์โคลนที่ได้เพื่อหาเอ็นที่คล้ายกับยีน polyketide synthase พบอย่างน้อย 8 ยีนที่คล้ายกับ polyketide synthase และในปีเดียวกัน Voget *et al.* (2003) ได้ทำการแยกสกัดยีน agarase, cellulase, amylase และ lipase จากเมทาจีโนมไลบรารีของแบคทีเรียในดินจาก consortia ผลที่ได้ คือ พบลำดับเบสจำเพาะของเอนไซม์ในกลุ่มที่แปลรหัสได้เป็น β -agarase กลุ่มที่ผลิต lipases และกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญกลุ่มอื่น ๆ และในปี 2004 นักวิจัย Hyung *et al.* (2004) ใช้ sequence-driven analysis ในการหาเอนไซม์ไลเปส จาก microbial genome databases โดยการทำให้ PCR cloning ได้ 9 ยีนที่มีเอนไซม์ไลเปส เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลมี sequence similarity น้อยกว่า 26.7% อยู่ 5 ยีน และนักวิจัย Lee *et al.* (2004) ค้นหาเอนไซม์ใหม่ในกลุ่ม lipase จากเมทาจีโนมไลบรารีของจุลินทรีย์ในดินที่มีการหมักของใบไม้ อยู่ เมื่อนำโคลนไปหาลำดับ นิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ lipase อยู่ 34–48%

2.10.3 SIGEX (substrate-induced gene expression system) เป็นการนำดีเอ็นเอโดยรวมจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมมาทำให้สายสั้นลงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่ได้กับพาหะ คือ operon-trap vector ที่มีการเชื่อมกับ co-expressed marker เช่น green

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นๆ ที่ได้กับพาหะ คือ operon-trap vector ที่มีการเชื่อมกับ co-expressed marker เช่น green fluorescent protein (GFP), Yellow fluorescent protein (YFP) และ red fluorescent protein (DsRed) เป็นต้น เพื่อสามารถตรวจสอบการแสดงออกของโคลนด้วย fluorescence activated cell sorting (FACS) (ภาพที่ 2.9) โดยทำการเชื่อมดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมไว้ข้างหน้ายีน co-expressed marker แล้วจึงนำพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อแล้วมาถ่ายทอดเข้าสู่ host จากนั้นนำ host ไปเลี้ยงและ induce ด้วยสับสเตรท เช่น การ induce ด้วยเซลลูโลส จะเหนี่ยวนำให้ promoter ของยีนเซลลูเลสถูกกระตุ้นและทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่กำหนดให้เกิดการผลิตเซลลูเลส ดังนั้นโคลนที่ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็น promoter ของยีนเซลลูเลสจะถูกกระตุ้นด้วยเซลลูโลส ทำให้เกิดการแสดงออกของ GFP เกิดโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ต่อจากนั้นจึงนำโคลนที่มีการแสดงออกมามาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่อไป (Uchiyama and Watanabe, 2008) วิธีนี้ได้มีการนำมาใช้ในงานวิจัย ดังนี้ Yun *et al.* (2005) สามารถคัดแยก aromatic hydrocarbon-induced genes จากเมทาจีโนมมิโคโลบรารี



ภาพที่ 2.9 การหาเอนไซม์จากเมทาจีโนมมิโคโลบรารี โดยวิธี SIGEX (Yun and Ryu, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4 pyrosequencing เป็นการนำเมทาจีโนมิกไลบรารีไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์สายละ 100-400 นิวคลีโอไทด์อย่างรวดเร็ว แล้วนำสายที่ได้มาเชื่อมต่อกันเป็น contig ต่อจากนั้นจึงหา ยีนที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่สนใจจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวมากได้อย่างรวดเร็ว และอาศัยพื้นฐานของ chemiluminescent enzymatic reaction โดยใช้การอ่านของจังหวะของแสงที่อ่านลำดับเบสหลายๆพันเบสในครั้งเดียว พร้อมกับใช้คอมพิวเตอร์ที่มีฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลและเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดยพัฒนาจาก The Royal Institute of Technology (Stockholm, Sweden) ข้อดี คือ ระยะเวลาในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pyrosequencing ประมาณ 2 ชั่วโมง ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอที่ก่อให้เกิดโรค การวิเคราะห์หา genomic diversity และนอกจากนี้ได้มีการนำมาใช้ในการหาตัวยั้งเอนไซม์โปรตีเอส ที่ก่อให้เกิดโรค HIV-1 (Ahmadian *et al.*, 2000)

Kataeva *et al.* (2009) นำเทคนิค pyrosequencing หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากไลบรารีของ *Anaerocellum thermophilum* ซึ่งมีประมาณ 2.97 Mb และเมื่อเทียบกับ Genebank นิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cellulolytic และ Yamada *et al.* (2008) ได้เพิ่มขี้นยีนของ glycoside hydrolase ให้เป็น full-length gene โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อมูล pyrosequencing ของแบคทีเรียในกระเพาะปลวก *Nasutitermes takasagoensis* และกระเพาะมดด้วยเทคนิค inverse polymerase chain reaction (IPCR) Brulc *et al.* (2007) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ pyrosequencing จากตัวอย่างรูเมนของโคที่ได้รับสูตรอาหารที่มีเชื้อยีสต์ต่างกัน 3 ชนิด คือ สูตร 8, 64 และ 71 โดยเรียงลำดับจากสูตรอาหารที่มีเชื้อยีสต์ผสมจากน้อยไปมาก พบว่าโคที่ได้รับอาหารสูตร 71 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียมากกว่าอีกสองสูตร ดังตารางที่ 2.5

ในการทำ pyrosequencing จะใช้เอนไซม์ในปฏิกิริยา 4 ชนิด คือ DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase และ apyrase (ภาพที่ 2.10) ทำโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย single stranded DNA เป็นแม่แบบ (template), sequencing primer ซึ่งจะออกแบบไพรเมอร์เองเพื่อให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์, dNTP, เอนไซม์ sulfurylase และ luciferase และสับสเตรท 2 ชนิด คือ adenosine 5'phosphosulfate (APS) และ luciferin ในปฏิกิริยาเมื่อได้ผลผลิตจาก PCR จะใช้โปรแกรม pyrosequencing โดยใช้แสงในการวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา PCR (McKnight, 2004) ซึ่งแสงที่ได้นั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ sulfurylase และ luciferase เมื่อจับกับสับสเตรท คือ APS และ luciferin (ภาพที่ 2.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างกระเพาะรูเมนของโค

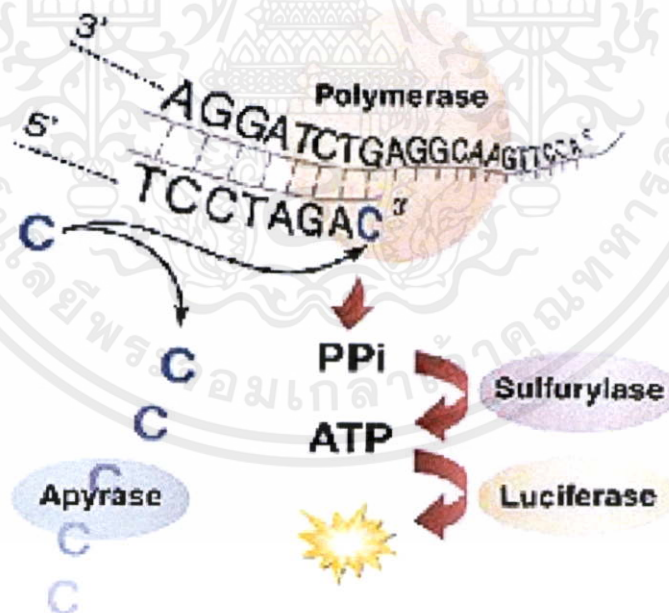
Parameters	Fiber-adherent fractions			Liquid fraction
	8	64	71	PL
No. of sequences	178,713	264,849	345,317	236,830
Total length of sequences	18,153,371	26,644,817	35,115,534	24,016,021
Avg. length of sequences, bp	101.7	101.6	100.6	101.4
Avg. quality score*	26.4	26.8	26.1	26.4
Total coding sequences (EGTs) [†] (% of total sequences)	47,885 (26.8)	62,531 (23.6)	160,698 (46.5)	60,955 (25.7)
Archaea EGTs (% of total EGTs)	1,067 (2.2)	1,464 (2.3)	1,098 (0.68)	2,586 (4.2)
Bacteria EGTs (% of total EGTs)	45,142 (94.3)	59,162 (94.6)	152,910 (95.2)	55,634 (91.3)
Eukarya EGTs (% of total EGTs)	726 (1.5)	1,058 (1.7)	980 (0.61)	899 (1.5)
Virus EGTs (% of total EGTs)	60 (0.12)	89 (0.14)	204 (0.13)	87 (0.14)
Hypothetical sequences (% of total EGTs)	4,500 (9.4)	5,415 (8.7)	14,751 (9.2)	5,450 (8.9)
Nonhypothetical sequences (% of total EGTs)	40,310 (84.2)	52,470 (83.9)	123,740 (77.0)	51,369 (84.3)
Noncoding sequences (% of total sequences)	130,595 (73.1)	201,950 (76.3)	183,894 (53.3)	175,569 (74.1)
Number of SSU rDNA hits [‡] (% of total sequences)				
Bacteria (Ribosomal Database Project)	228 (0.13)	362 (0.14)	722 (0.21)	291 (0.13)
Archaea (European Ribosomal Database)	0	2 (8 ⁻³)	2 (6 ⁻⁴)	14 (6 ⁻³)
Eukarya (European Ribosomal Database)	5 (3 ⁻⁷)	4 (2 ⁻⁷)	1 (3 ⁻⁴)	1 (4 ⁻⁷)

*The quality score of each base was provided by 454 Life Sciences and is analogous to the Phred score of Sanger Sequencing methods (53). The value cited here is the mean quality score per sequence. Avg., average.

[†]The BLASTX cutoff for environmental gene tags is 1×10^{-5} .

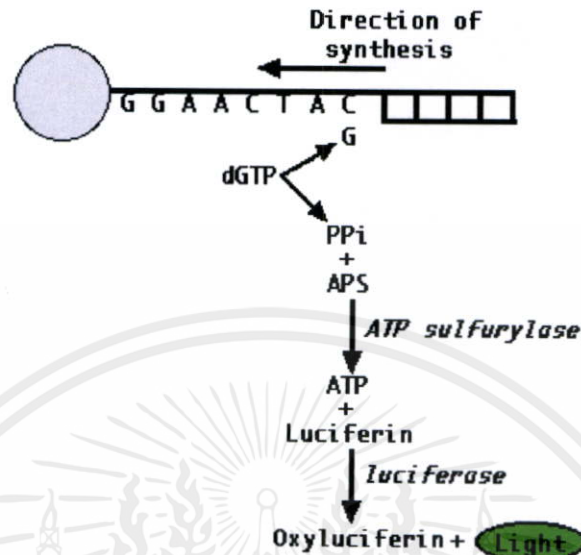
[‡]The E value cutoff for SSU rDNA hits for all databases used is 1×10^{-5} with a minimum length of 50 bp.

ที่มา : Brule *et al.* (2007)



ภาพที่ 2.10 การทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดในขั้นตอนการทำ pyrosequencing (Invitrogen. 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.11 ปฏิกริยาของการทำ pyrosequencing (Kimball. 2006)

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของการค้นหาอินที่กำหนดการสร้างเอนไซม์จากเมทาจีโนมิกไลบรารีด้วยเทคนิคต่างๆ กัน พบว่า ในการค้นหาอินที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โดยวิธี activity-based analysis มีข้อดีในการค้นพบอินใหม่ๆ แต่อาจจะใช้เวลานานในการค้นหาอินที่สร้างของเอนไซม์สำหรับวิธี sequence-driven analysis ข้อดี คือ ทราบข้อมูลของอินโดยไม่ต้องหากิจกรรมของเอนไซม์จากโคลน แต่จะได้อินที่เหมือนกันจากการทำปฏิกริยาพีซีอาร์และวิธี SIGEX นั้นสามารถทราบการแสดงออกของอินโดยใช้สับสเตรท แต่ข้อเสีย คือ regulator ของอินอาจจะไม่ทำงานหากอินที่โคลนเขาไปเป็นเพียงสายสั้นๆ ซึ่งมีผลให้อิน catabolic ที่มีหน้าที่ไปกระตุ้นให้ operon ทำงานเพื่อสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหารไม่ทำงานทำให้โคลนที่ได้ไม่มีการแสดงออกของอิน (ตารางที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบวิธี activity-based analysis, sequence-driven analysis และ SIGEX

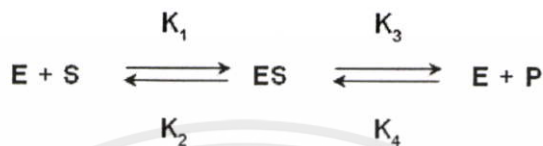
หลักการดำเนินงาน	ข้อดี	ข้อเสีย
Activity-based analysis	<ol style="list-style-type: none"> 1. อาจได้ยีนใหม่ๆ โดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน database 2. ได้ยีนที่ทำหน้าที่ได้ตรงกับความต้องการ 3. ได้ยีนที่สามารถแสดงออกเป็นเอนไซม์ได้ใน host ที่เลือก 	<ol style="list-style-type: none"> 1. อาจจะใช้เวลาในการหากิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากไม่ทราบว่ายีนทำหน้าที่อะไร 2. เซลล์เจ้าบ้านที่เลือกต้องมีความเหมาะสมต่อการแสดงออกยีน 3. อาจพบ positive clones ที่มีการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์น้อย
Sequence-driven analysis	<ol style="list-style-type: none"> 1. ทราบข้อมูลของยีนที่มีอยู่ สามารถนำไปหาคุณสมบัติของยีนหรือเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนโปรตีนตัวอื่น 2. ไม่จำเป็นต้องพิจารณา activity clone 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ต้องอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน data base 2. ยีนที่ค้นพบอาจไม่สามารถแสดงออกใน host ที่เลือกในการทำ cloning 3. ได้ยีนที่เหมือนกัน
SIGEX	<ol style="list-style-type: none"> 1. ทราบได้ว่าโคลนไหนที่มีการแสดงออกของยีนโดยใช้สับสเตรทที่จำเพาะกับการทำงานของยีน 2. ประหยัดเวลา 	<ol style="list-style-type: none"> 1. regulator ของยีนอาจจะไม่ทำงานหากยีนที่ได้เป็นสายสั้น

ดัดแปลงจาก: Yun and Ryu (2005)

2.11 จลศาสตร์ของเอนไซม์และสมการของ Michaelis-Menten

เอนไซม์มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เพราะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์สามารถช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้โดยไม่ทำให้สมดุลของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง แต่มีความจำเพาะอย่างมากต่อชนิดของปฏิกิริยา (reaction specificity) และยังมี ความจำเพาะต่อตัวทำปฏิกิริยา (substrate specificity) ซึ่งส่งผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นั้นมีความเร็วสูงกว่าปฏิกิริยาที่เร่งโดยตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทอนินทรีย์ (inorganic catalyst) จลศาสตร์ของเอนไซม์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

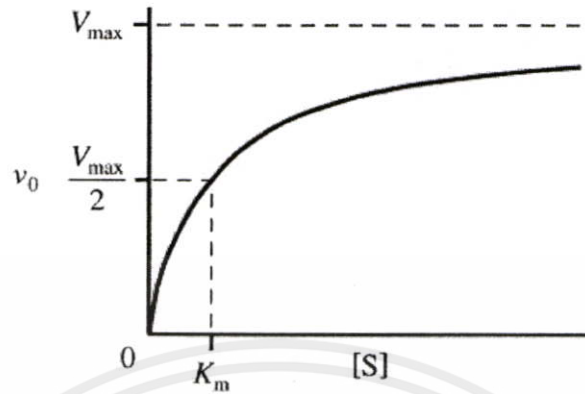
หมายถึง การศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ในสถานะต่างๆ กัน เพื่อนำผลที่ได้มาใช้อธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ในปี 1913 นักวิทยาศาสตร์ Leonor Michaelis และ Maud Menten ได้เสนอกลไกการทำงานของเอนไซม์ ดังสมการในภาพที่ 12



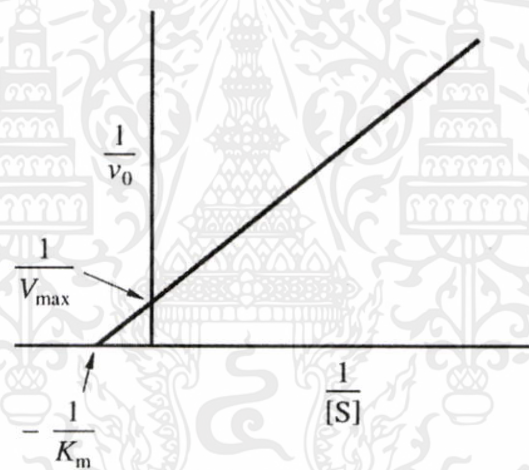
ภาพที่ 2.12 สมการของ Michaelis – Menten

อัตราเร็วของปฏิกิริยาภายใต้สมการของ Michaelis – Menten คือ $V = (V_{\max}[S])/(K_m + [S])$ ซึ่งค่า K_m และ V_{\max} เป็นค่าบ่งชี้ที่สำคัญในการบอกถึงสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยที่ค่า V_{\max} คือ ค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (maximum velocity) เป็นค่าจำกัดของอัตราเร็วเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยา (initial velocity) เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรท $[S]$ เพิ่มขึ้นแบบ Infinity ส่วน ค่า K_m จะมีค่าเท่ากับความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรท ที่ $V_{\max}/2$ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า ค่า K_m จะบอกถึง affinity ของสับสเตรทต่อเอนไซม์ ส่วนค่า V_{\max} นั้นจะแสดงให้เห็นถึงอัตราความเร็วในการสลายตัวของ ES เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ค่า K_m และ V_{\max} หาได้จากกราฟในภาพที่ 12 ตามสมการของ Michaelis – Menten และเนื่องจากกราฟ Hyperbola (ภาพที่ 13) อาจมีความคลาดเคลื่อนในการหาค่า K_m และ V_{\max} เพราะความเข้มข้นของสับสเตรทยังไม่สิ้นสุด ดังนั้น จึงมีการดัดแปลงสมการของ Michaelis – Menten ให้เป็นสมการเส้นตรงของ Lineweaver-Burk (ภาพที่ 14) และในการทำงานของเอนไซม์มีปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ สภาพที่ความเป็นกรด-ด่าง และสารยับยั้ง เป็นต้น (จกกลณี เขวภาคย์โสภณ. มปป.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.13 อิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

ภาพที่ 2.14 สมการเส้นตรงของ Lineweaver-Burk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

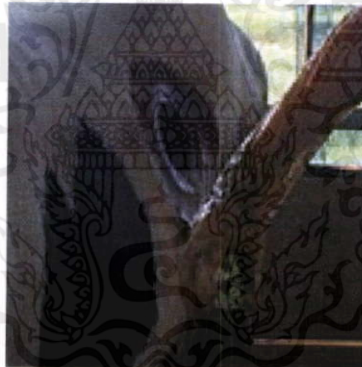
บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รายละเอียดของอุปกรณ์ และการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองสำหรับทำการโคลนยีนที่ไม่ได้กล่าวไว้ใน ๓ ที่นี้ จะแสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้ ได้แก่ ของเหลวจากกระเพาะส่วนรูเมนของโค โดยทำการเก็บของเหลวจากรูเมนของโคจากช่องที่เจาะบริเวณท้องฝั่งเดียวกับรูเมนจากโคที่เลี้ยงในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร จำนวน 1 ตัว เก็บตัวอย่าง 3 ครั้งๆ ละ 3,000 ml แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วจึงเก็บตัวอย่างที่ -80°C (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แสดงการเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมนของโค

3.2 การสร้างเมทาจีโนมิกส์ไลบรารีของแบคทีเรียในรูเมนโค

3.2.1 การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

ในการสร้างเมทาจีโนมิกส์ไลบรารีจากจุลินทรีย์ในรูเมนโคจะสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยตรงจากจุลินทรีย์ในรูเมน ซึ่งจะคัดแปลงวิธีจาก Zhou *et al.* (1996) โดยนำของเหลวจากกระเพาะรูเมนปริมาตร 300 μl ผสมกับสารละลาย extraction buffer ปริมาตร 300 μl เติม lysozyme 100 mg/ml และเติม proteinase K (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.6 mg/ml) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ต่อมาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติม 20% sodium dodecyl sulphate (SDS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2%) นำไปเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °C เขย่าที่ความเร็วประมาณ 50 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดทุกๆ 15-20 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บเฉพาะส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 โดยปริมาตร) ผสมกับส่วนใสที่ได้ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1 โดยปริมาตร) และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสอีกครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอในส่วนใสด้วย isopropanol (1 เท่าของปริมาณชั้นส่วนใสที่เก็บได้) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 μ l และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และ 280 nm (A_{280}) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ (Ray *et al.*, 2006) คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-1.9 และ A_{260}/A_{320} มากกว่า 1.2 (Sambrook *et al.* 1989) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C

3.2.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

หลังจากสกัดจีโนมดีเอ็นเอแล้วจะต้องนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยการเตรียมอะโรสเจลความเข้มข้น 0.8% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TBE pH 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 °C แล้วเทเจลลงในถาดเจล (Gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยใช้ lambda DNA/*Hind*III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 μ g/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง gel documentation (Syngene genious; Bio Imaging System)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI*

เมื่อวิเคราะห์จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วจึงทำการตัดจีโนมดีเอ็นเออย่างไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ โดยปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 60 μ l ประกอบด้วยจีโนมดีเอ็นเอ 46.2 μ g, เอนไซม์ *Sau3AI* (Bsp143I) (Fermentas, USA) ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ยูนิต, 1x tango buffer (33 mM Tris-acetate pH 7.9 ที่ 37°C, 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/ml BSA) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที และทำให้เอนไซม์ *Sau3AI* เสียสภาพด้วยความร้อนที่ 65°C เป็นเวลา 20 นาที และวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามข้อ 3.2.2 โดยเทียบดีเอ็นเอที่ได้กับ lambda DNA/*HindIII*

3.2.4 การแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย DNA troughing method

หลังจากตัดจีโนมดีเอ็นเออย่างไม่สมบูรณ์ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีหลายขนาดโดยทำการเลือกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่จะโคลนเข้าเวกเตอร์ด้วยวิธี DNA troughing method (Harpichanchai *et al.*, 2007) โดยนำปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* 2 ครั้ง มารวมกันได้ปริมาตร 120 μ l แล้วมาทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 40 นาที (gel electrophoresis) ซึ่งมี 1x ethidium bromide ผสมอยู่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% ละลายในบัฟเฟอร์ TAE จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอจากการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วตัดช่องสี่เหลี่ยมกว้างประมาณ 1 cm ได้แถบดีเอ็นเอ แล้วเติมสาร 30% PEG8000 ในบัฟเฟอร์ TAE จากนั้นนำไปอิเล็กโทรโฟรีซิสที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกระทั่งดีเอ็นเอตกลงมาในช่องที่ตัดทำการเก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในช่อง จากนั้นเก็บดีเอ็นเออีกครั้งโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ อีกครั้งเป็นเวลา 20 นาที 40 นาที และ 60 นาที จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดในช่วงต่าง ๆ กัน แล้วนำดีเอ็นเอแต่ละครั้งที่เก็บมาสกัดดีเอ็นเอด้วย chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าของปริมาตรดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วเติม 0.02 mg glycogen เติม 3 M sodium acetate 1 ต่อ 10 เท่าของปริมาตร และ absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตร จากนั้นแช่เย็นที่ -80°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เวลา 30 นาที ที่ 4°C เก็บตะกอนดีเอ็นเอ เติม 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 rpm เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บตะกอนดีเอ็นเอ และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 μ l และวิเคราะห์ผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นวิเคราะห์ผลเจลด้วยเครื่อง gel documentation และเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ โดยไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ผ่านการกำกับว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ lambda DNA/*Hind*III marker (Fermentas, USA) ขนาดดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ต่อควรมีขนาด ~ 0.75-2.0 kb เนื่องจากว่าเป็นขนาดความยาวของยีนเซลล์ลูเลสในฐานข้อมูล NCBI

3.2.5 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สำหรับการถ่ายยีนด้วย electroporation

สำหรับการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านเพื่อถ่ายยีนด้วยวิธี electroporation จะเลือก *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 โดยนำมาเลี้ยงใน LB medium 5 ml ที่ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น subculture มาเลี้ยงใน LB medium 200 ml ที่ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ได้ 0.5-0.8 (ประมาณ 3-4 ชั่วโมง) วางเซลล์บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย dH₂O ที่แช่เย็น 50 ml วางบนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย dH₂O ที่แช่เย็น 20 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย 10% glycerol 20 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ เก็บตะกอนเซลล์แล้วละลายด้วย 10% glycerol 50 µl แล้วเก็บรักษาที่ -80 °C

3.2.6 การโคลนดีเอ็นเอ

นำพลาสมิด pZErO-2 (Invitrogen, USA) ปริมาณ 10 ng มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI 1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37°C และใช้ Wizard DNA clean up Kit เพื่อทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ จากนั้นเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับ pZErO-2 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ 10 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 0.75-2.0 kb ปริมาณ 40 ng, pZErO-2 ปริมาณ 10 ng ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (อัตราส่วนดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ 4:1), T4 DNA Ligase (Fermentas, USA) 2 ยูนิต, 1x T4 DNA ligation buffer และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat inactivate เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที กำจัดเกลือในปฏิกริยาและตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม glycogen 0.02 mg และ absolute ethanol 30 µl (3 เท่าของปริมาตร) แช่เย็นที่ -80°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C เก็บตะกอนดีเอ็นเอ เติมน้ำ 70% ethanol 30 µl จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C อีกครั้ง เก็บตะกอนแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ส่วนตัว ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 การถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli*

การถ่ายทอคพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 อัตราส่วนระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมกับเซลล์ คือ 1:50 จากนั้นถ่ายทอด้วยวิธี electroporation (BioRad, USA) ที่โปรแกรม 25 μF , 600 โอมห์ และ 2000 โวลต์ (Sambrook *et al.* 1989) เซลล์ที่ถ่ายทอแล้วบ้วนน้ำแข็ง 5 นาที เติม SOC 1 ml นำไปเขย่าที่เครื่องเขย่า ความเร็ว 200 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งสารละลาย 200 μl ไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ และสารละลาย isopropyl-b-d-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 1.0 mM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.8 การคัดเลือกโคลน

โคลนที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะเป็น โคลนที่ได้รับการถ่ายทอดีเอ็นเอลูกผสม เพราะโคลนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าตรงตำแหน่ง lacZ α ทำให้ไม่มีกิจกรรมเกิดขึ้นภายในเซลล์ยีน ccdB จะทำงานไม่ได้ หากเซลล์ไม่ได้รับการถ่ายทอดีเอ็นเอ lacZ α จะชักนำให้ยีน ccdB ตรงตำแหน่ง lacZ α สร้างโปรตีนซึ่งเป็นพิษกับเอนไซม์ topoisomerase II (DNA gyrase) ทำให้กระบวนการจำลองดีเอ็นเอดำเนินต่อไปไม่ได้ เลยทำให้เซลล์ที่ไม่มีการถ่ายทอจะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

3.2.9 การเก็บโคลน

เก็บโคลนลงในถาดพลาสติกชนิด 96-well plate โดยเขียนชื่อจำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลุม โดยแต่ละหลุมจะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB medium 100 μl ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ พันพาราฟิล์มแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm 37°C นาน 16 ชั่วโมง และเติม 14% glycerol เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C

3.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำโคลนของ *E. coli* มาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB medium ปริมาตร 3 ml ที่มี kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ดังนี้ เติมสารละลาย Resuspension ปริมาตร 250 μl แล้วผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติมสารละลาย Lysis ปริมาตร 250 μl จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จึงเติมสารละลาย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neutralization ปริมาตร 350 μ l แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน GeneJet™ spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมสารละลาย Wash ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย Wash อีกครั้งปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้ Lambda DNA/*Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (Fermentas, USA) วิเคราะห์ผลของเจลด้วยเครื่อง gel documentation และเก็บรักษาพลาสมิดดีเอ็นเออุณหภูมิ -20°C

3.4 การตรวจสอบขนาดของชิ้นยีนที่โคลนในเวกเตอร์ pZErO-2

นำโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเออุณหภูมิห้อง ดังข้อที่ 3.3 จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI กับ *Hind*III (Fermentas, USA) เมื่อดูจากแผนที่เวกเตอร์ของ pZErO-2 จะพบว่าหากใช้เอนไซม์ทั้ง 2 นี้จะได้ชิ้นยีนแยกออกจากเวกเตอร์เนื่องจากว่าตำแหน่งที่โคลนยีนเข้าคือตำแหน่งเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งอยู่ระหว่างตำแหน่งที่เอนไซม์ *Eco*RI กับ *Hind*III ตัด (ภาพผนวกที่ ก1) โดยปริมาตรทั้งหมดของปฏิกิริยา 5 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเออุณหภูมิห้องความเข้มข้นประมาณ 150 ng, 1x tango buffer, *Eco*RI 2.5 ยูนิต, *Hind*III 2.5 ยูนิต และ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จึงบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น heat inactivate ที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบการตัดด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส และเปรียบเทียบผลกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้ 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) แล้ววิเคราะห์ผลของเจลด้วยเครื่อง gel documentation

3.5 การสร้าง shotgun library จาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ

สำหรับการสร้าง shotgun library จาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือจะสร้างจากพอสมิดโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แล้ว โดย fosmid library นี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก Miss ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nguyen Hong Nhung (Department of Food and Bioprocess Technology, School of Environment, Resources and Development, Asia Institute of Technology, Thailand) โดยเป็นไลบรารีที่ได้จากการโคลนยีนจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักเข้าในพอสมิด CopyControl™ pCC1FOS™ Vector (EPICENTRE, USA) (ภาคผนวกที่ ก4) ได้โคลนทั้งหมด 84,190 โคลน มีโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 21 โคลนและ โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 4 โคลน จึงเลือกโคลน Cel5 ที่มีกิจกรรมของเซลลูเลส และ โคลน Xyl15 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสมาทำ shotgun library

ทำการสกัดพอสมิดจากโคลนที่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส โดยเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มจำนวนยีน โดยนำมาเพาะเลี้ยงใน LB medium 5 ml ที่มี chloramphenicol 12.5 µl เลี้ยงที่ 37°C จำนวนรอบที่เขย่า 200 rpm ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มจำนวนโดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 500 µg/ml ใส่ใน LB broth 4.5 ml ที่มี chloramphenicol 12.5 µg/ml และนํ้ายา induction ใน CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre, USA) บ่มที่ 37°C จำนวนรอบที่เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพอสมิดตามวิธีการข้อ 3.3 ทำการตัดพอสมิดจากพอสมิดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ยูนิต จากนั้นปฏิบัติการทำตามวิธีการในข้อ 3.2.6 ทำการโคลนเข้า pZER0-2 (Invitrogen, USA) และถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 ตามวิธีการในข้อ 3.2.7

3.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีการเททับโคโลนีด้วยสับสเตรท

โคลนที่มาจากไลบรารีของโค ทำการปิเปตเชื้อจาก 96-well plate 2 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 µg/ml และสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เกลี่ยเซลล์ให้ทั่วอาหาร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเททับ (overlay) ด้วยสับสเตรทที่ประกอบด้วย วุ้น 0.7% AZCL (Azurine cross-linked)-HE-Cellulose หรือ AZCL-Xylan หรือ AZCL-Amylase (Megazyme, Ireland) ที่ความเข้มข้น 0.05 mg หรือ Tributyrin ความเข้มข้น 1 mg ซึ่งคุณสมบัติของ AZCL เป็น dred จับกับสับสเตรท สามารถใช้ทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยการเกิดสีฟ้ารอบๆ โคโลนี และ enhance buffer 0.05% จากห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ (ถ้าทดสอบ tributyrin เติม rodamine B ความเข้มข้น 0.01%) จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 20 นาที ถึง 16 ชั่วโมง (Bunterngsook, 2008) เพื่อดูสีฟ้าที่เกิดขึ้นรอบๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนนี้ ถ้าเป็น tributyn จะเป็นวงไสลรอบๆ โคลนนี้ หลังจากการเททับด้วยสับสเตรท เมื่อได้โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์จะนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 µg/ml

ส่วนโคลนที่มาจากไลบรารีของกระบือ หลังจากการทำ shotgun library นำโคลนจาก master plate นำมา sub-culture เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 µg/ml และสารละลาย IPTG 1.0 M นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยสับสเตรท AZCL-HE-Cellulose หรือ AZCL-Xylan เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลนที่ได้มาจาก Cel5 หรือกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสจากโคลนที่ได้จาก Xly15

3.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้ไพรเมอร์ M13F/21 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') ในด้าน Forward และ M13R/pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') ในด้าน Reverse (Reverse) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมจะทำปฏิกิริยาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI3730XL (Applied Biosystem) โดยภายในเครื่องจะมีเครื่องมืออ่านสีฟลูออเรสเซนซ์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลตามลำดับ และแปลผลออกมาเป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์ตามสีที่ติดฉลากไว้ และข้อมูลที่ได้จะทำการวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท MacroGen Service Center ประเทศเกาหลี จากนั้นนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์จาก GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastX ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul *et al.*, 1990)

3.8 การค้นหายีนเซลลูเลสจากข้อมูล pyrosequencing

จาก fosmid library ที่สร้างโดย Miss Nguyen Hong Nhung ดังกล่าวมาแล้วในข้อ 3.5 โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 21 โคลน ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค pyrosequencing จากสถาบันจีโนมของศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค pyrosequencing เป็นการนำโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมด คือ 21 โคลนมารวมกันเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ pyrosequencing เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายของดีเอ็นเอแล้วจะนำสายดีเอ็นเอที่ได้มารวมกัน แล้วทำ contig เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนเซลลูเลสในฐานข้อมูลของ GenBank ใน NCBI พบว่ามียีนเซลลูเลสทั้งหมด 16 ยีน จาก 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

contig โดย contig 00001 และ 00008 มียีนเซลล์ลูเลสที่เป็น full-length จึงเลือก contig00001 มาทำการโคลนและเลือกเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนเซลล์ลูเลส คือ เวกเตอร์ pET28a (+) (Novagen, USA) พิจารณาหาเอนไซม์ที่ไม่ตัดขึ้นยีนแต่ตัดเวกเตอร์ที่ตำแหน่ง cloning site จากนั้นเพิ่มขึ้นยีนโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยออกแบบไพรเมอร์ แล้วนำขึ้นยีนที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas, USA) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา จากนั้นแยกขึ้นยีนออกจาก เวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a (+) เพื่อการแสดงออกของยีนเซลล์ลูเลสต่อไป

3.8.1 การวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pyrosequencing

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความใกล้เคียงกับยีนเซลล์ลูเลสที่มีในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (translation) โดยใช้โปรแกรม Translate tool ของ ExPASy Proteomics Server ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> เพื่อหา start และ stop codon แล้วออกแบบไพรเมอร์ตั้งแต่ start จนถึง stop codon (Gasteiger *et al.*, 2003) เพื่อออกแบบให้ได้ full-length gene และนำลำดับกรดอะมิโนที่ไปหา signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP server ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> เพื่อทำนายลำดับกรดอะมิโนที่เป็น signal peptide จากนั้นออกแบบไพรเมอร์หลังตำแหน่งที่เป็น signal peptide (Bendtsen *et al.*, 2004) จะได้เป็น mature gene จากนั้นพิจารณาความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ว่าเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในกลุ่มใดของระบบเอนไซม์ Carbohydrate-Active Enzymes Database นำลำดับกรดอะมิโนมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม protein Blast จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม BlastX เพื่อพิจารณาความคล้ายกันกับยีนเซลล์ลูเลสในฐานข้อมูล สำหรับการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนขึ้นเข้าสู่เวกเตอร์ จะพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดขึ้นยีนแต่ตัดเวกเตอร์ที่ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์ pET28a (+) คือ BamHI และ XhoI จาก Webcutter 2.0 ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html> (Heiman, 1997)

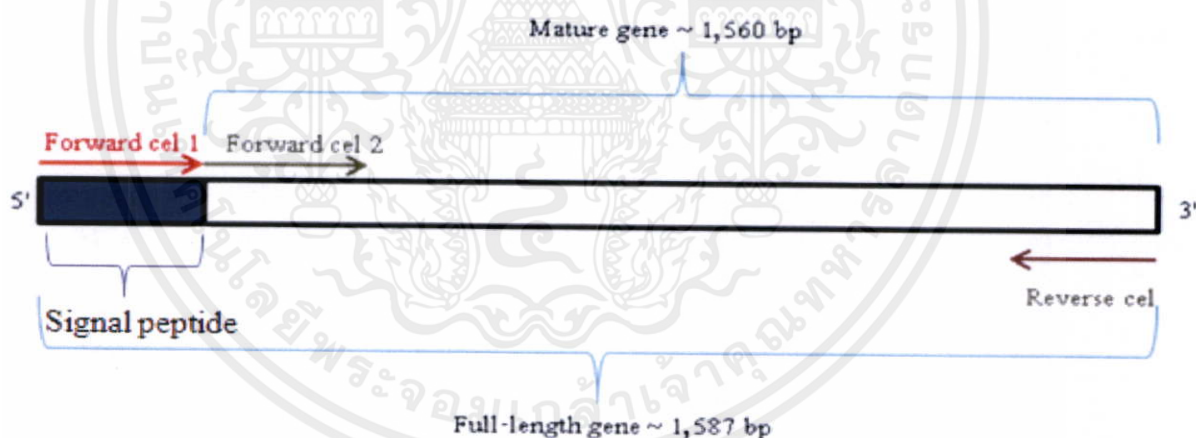
3.8.2 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเซลล์ลูเลสจากข้อมูล pyrosequencing (ภาพที่ 3.2) โดยมี forward primer 2 แบบ คือ 1) แบบสำหรับ full-length gene คือ forward cel 1 (5'-GAATGGA
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TCCATGAGCTTTGCT GCTCAGGCACAG-3') และ 2) แบบสำหรับ mature gene โดยตัด signal peptide ออก คือ forward cel 2 (5'-GCATGGATCCTTTGAAACAGCCAAAGAGGCTGTA-3') เพื่อให้โปรตีนที่ออกมาจากเซลล์นั้นมี reverse primer คือ reverse cel (5'-GCCGCTCGAG TTATTTGACGATGTATTTCTTACC-3') (ภาพที่ 3.2) ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์จะเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ คือ *Bam*HI ด้าน forward และ *Xho*I ด้าน reverse

3.8.3 การสกัดพอสמידจาก fosmid library

คัดเลือกโคลนจาก fosmid library ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์หลายหมายเลข 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16 และ 18 มาเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนยีนในพอสמידลูกผสม ด้วยวิธีในข้อที่ 3.5 จากนั้นมาสกัดพอสמידตามข้อ 3.3 และตรวจสอบปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้ 1 kb DNA ladder (Fermentas, U.S.A)



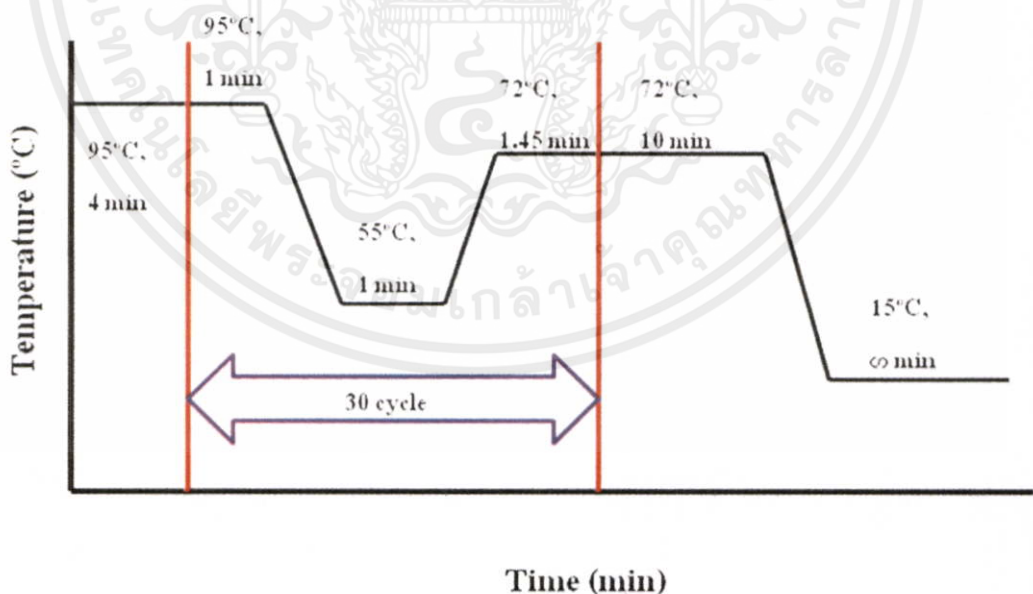
ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนเซลล์หลาย โดยผลผลิตดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์ Forward cel 1 และ Reverse cel จะเป็น full-length gene มีขนาด 1,587 bp และผลผลิตดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์ Forward cel 2 และ Reverse cel จะเป็น mature gene มีขนาด 1,560 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.4 การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 50 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ปริมาณ 50 ng สารละลาย 1X DyNAzyme Buffer (50 mM Tris-HCl, 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Triton X-100), dNTP ความเข้มข้น 10 mM ไพรมอร์ในส่วน of forward cel 1, forward cel 2 และ reverse cel อย่างละ 2 μ M ตามลำดับ เอนไซม์ DyNAzyme™ I DNA Polymerase (Finnzymes, Finland) ความเข้มข้น 1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มที่บ่มปฏิกิริยาใน MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที (ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 55°C เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรมอร์อย่างเหมาะสม ใช้เวลาเป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างเหมาะสม เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิลงที่ 15°C เพื่อรักษาผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ ดังภาพที่ 3.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกสิ่งใดที่ปรากฏในเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, USA) โดยเติม resin buffer 1 ml ในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ เติมน้ำขึ้นย่นที่เป็นผลผลิตพีซีอาร์ 50 µl กลับไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ไปมาเปิดใส่ในไซริงค์ขนาด 3 ml ใช้ plunger เพื่อดันของเหลวออกผ่าน minicolumn ส่วนดีเอ็นเอจะเกาะติดกับซิลิกาใน minicolumn ถ้าง minicolumn ด้วย isopropanol 80% ปริมาณ 2 ml (ก่อนที่จะเติม isopropanol ให้หลอดไซริงค์ออกจาก minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง plunger ออก หลังจากนั้นจึงดีดไซริงค์กับ minicolumn เข้าไปใหม่เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ย้าย minicolumn วางบนไมโครเซ็นทรีฟิวจ์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน minicolumn ออกให้หมด ย้าย minicolumn วางในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำ EB buffer 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดกับซิลิกาละลาย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้สารละลายดีเอ็นเอหลุดออกจาก minicolumn สู่ออกในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อที่ 3.2.2 และใช้ 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน และวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

3.10 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สำหรับการถ่ายยีนด้วย heat shock transformation

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ใน LB medium 5 ml ที่ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น subculture มาเลี้ยงใน LB medium 100 ml ที่ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ได้ 0.4-0.8 (ประมาณ 3-4 ชั่วโมง) วางเซลล์บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย 100 mM CaCl₂ ที่แช่เย็น 20 ml วางบนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย 100 mM CaCl₂ ที่แช่เย็น 1.5 ml วางบนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วละลายด้วย 10% glycerol 50 µl แล้วเก็บรักษาที่ -80°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การโคลนยีนสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ในชุดน้ำยาสำเร็จรูป InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ 10 μ l ประกอบด้วย 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C) พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T 10 ng/ μ l, T4 DNA Ligase (Fermentas, USA), ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์ และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายทอดเข้าสู่ DH5 α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989)

วิธี heat shock นำ competent cell ปริมาตร 100 μ l มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นปิเปตสารละลายที่มีดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 5 μ l ใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 1 ml และนำไปเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ย (spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 μ g/ml IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 μ g/ml จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การคัดเลือกโคโลนีเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ คัดเลือกโคโลนีสีขาว เนื่องจาก pTZ57R/T (Fermentas, USA) มี *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งจะย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าถูกแทรกด้วยยีนที่โคลนเข้าไปบริเวณ *lacZ* gene จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ และได้ตะกอนสีขาวแทน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวที่ขึ้นมาทำ master plate บนอาหาร LB แบบแข็งที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 μ g/ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีโดยการสุ่มแล้วทำ size screening โดยนำ lysis buffer ไปอุ่นก่อนที่ 37°C ประมาณ 10-30 นาที ปิเปต lysis buffer 40 μ l ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วนำโคโลนีสีขาวใส่ลงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งต่อ 5 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่ 4°C พิจารณาด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยปิเปตมา 20 μ l เปรียบเทียบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ด้วย 1 kb DNA ladder และ pTZ57R/T ซึ่งมีขนาด 2,886 bp เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ด้วยเครื่อง gel documentation เพื่อเลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่กว่า 2,886 bp จากนั้นจึงมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดั่งข้อที่ 3.2.2 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Fermentas ประเทศมาเลเซียใช้ไพรเมอร์ M13pUC-40 เป็นด้าน forward (5'-GTTTCCCAGTC ACGAC-3') และ T7 เป็นด้าน reverse (5'-CGATCAATAACGAGTCGCC-3') จากนั้นนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก Genbank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastX ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เพื่อตรวจสอบว่านิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้วมีความคล้ายกับยีนเซลล์ในฐานข้อมูลหรือไม่ จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pyrosequencing ตรงกันหรือไม่ โดยใช้โปรแกรม Vector NTI ในการเปรียบเทียบ

3.12 การสร้างโคลนเพื่อผลิตเอนไซม์เซลล์ลูเลส

เวกเตอร์ที่ใช้คือ pET28a (+) ซึ่งคุณสมบัติของเวกเตอร์ pET28a (+) เป็นเวกเตอร์ที่เหมาะสมกับงานทดลองที่พิจารณาการแสดงออกของยีน เนื่องจากบริเวณ N-terminal จะมีกรดอะมิโน His-Tag จำนวน 6 ตัว และด้าน C-terminal มีกรดอะมิโน His-Tag จำนวน 6 ตัว ซึ่งจะโคลนยีนเข้าที่ตำแหน่ง BamHI และ XhoI ที่มียีน His-Tag ตรงตำแหน่ง C-terminal เพื่อสามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนได้ง่าย เช่น การทำ western blotting และการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน His-Trap affinity column จากนั้นจะถ่ายทอดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta™ (Novagen) เพื่อพิจารณาการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ต่อไป

3.12.1 การตัดยีนออกจาก pTZ57R/T

นำโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตรงกับข้อมูล pyrosequencing มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามข้อ 3.3 จากนั้นนำพลาสมิดถูกผสมมาตัดด้วย BamHI และ XhoI ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 100 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม 500 ng, 1x Tango buffer, BamHI และ XhoI ความเข้มข้นอย่างละ 35 ยูนิต (Fermentas, USA) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ heat inactivate ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปรียบเทียบผลที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 1 kb marker (Fermentas, USA) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดั่งข้อที่ 3.2.2

3.12.2 การแยกยีนให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

สกัดแยกยีนออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) โดยตัดแถบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัพเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมดแล้วเติม isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่เก็บได้) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน spin column ที่วางอยู่ในหลอด collection tube ปริมาตร 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นล้าง spin column ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 μ l และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจลหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อที่ 3.2.2 เปรียบเทียบโดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ผลที่ได้จากภาพเจลวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gel documentation

3.12.3 การโคลนยีนเข้าพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของโปรตีน

ทำการตัดต่อยีนเข้าสู่พลาสมิด pET28a (+) โดยใช้ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 20 μ l ซึ่งมียีน เซลลูเลสที่มีปลายจากการตัดของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I ปริมาณ 100 ng, พลาสมิด pET28a (+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I ปริมาณ 10 ng, 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8, 25°C), T4 DNA Ligase (Fermentas) ความเข้มข้น 5 ยูนิต และนี้กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น heat inactivate ligase ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที นำดีเอ็นเอถูกผสมถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock ดังข้อ 3.10 จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ยบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin 50 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง ที่มี kanamycin 50 μ g/ml เพื่อทำเป็น master plate แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12.4 การคัดเลือกโคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำโคลนบน master plate มาสกัดพลาสมิดเอ็นเอลูกผสมตามข้อ 3.3 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมมาตัดด้วย *Bam*HI และ *Xho*I ซึ่งมี ปริมาตรทั้งหมด 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดเอ็นเอลูกผสม 100 ng, 1x Tango buffer, *Bam*HI และ *Xho*I ความเข้มข้นอย่างละ 5 ยูนิต (Fermentas, USA) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ heat inactivate ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปรียบเทียบผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 1 kb marker (Fermentas, U.S.A) แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อที่ 3.2.2 ผลที่ได้จากภาพเจลจะต้องพบขนาดดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ ~ 5.4 bp ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pET28a (+) และ ~ 1.5 bp ซึ่งเป็นยีนแบบ full-length gene หรือ mature gene ตามลำดับ จากนั้นจึงส่งพลาสมิดเอ็นเอลูกผสมไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังข้อ 3.7 นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนแปลรหัสให้เป็นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Translate ของ ExPASy ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> แล้วนำโปรตีนที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Vector NTI ในการ alignment และนำโปรตีนที่ได้หากลุ่มของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม protein Blast ของ NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.12.5 การเก็บรักษาโคลน (stock collection)

นำโคลนจาก master plate ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ปริมาตร 500 μ l ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 μ g/ml นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเติม 60% glycerol ปริมาตร 500 μ l จากนั้นจึงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C

3.12.6 การย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta

เนื่องจาก Rosetta™ มียีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ คือ chloramphenicol และบริเวณโครโมโซมของเซลล์ Rosetta™ จะมียีน T7 gene 1 ซึ่งเหมือนกับยีน T7 polymerase เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ยีน T7 gene 1 จะถ่ายทอดรหัสเป็น T7 polymerase แล้วจะไปจับ T7 promoter ของเวกเตอร์ pET28a(+) จากนั้นเกิดการขบวนการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนจากยีนที่เราโคลนเข้าไปนำโคลนบน master plate มาสกัดพลาสมิดเอ็นเอลูกผสมตามข้อ 3.3 จากนั้นจะเข้าสู่ Rosetta™ ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยใช้ Rosetta เป็นเซลล์เจ้าบ้านเมื่อถ่ายเข้า Rosetta จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ยบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin 50 μ g/ml และ chloramphenicol 34 μ g/ml จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ว่าห้ามเอารหัสไปเผยแพร่ ห้ามไปเผยแพร่โดยไม่แจ้งไปยังเจ้าของเอกสาร
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็งที่มี kanamycin 50 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เพื่อทำเป็น master plate แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

3.13 การทดสอบการแสดงออกของยีนที่ได้จากการโคลน

3.13.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

sub-culture โคโลนีจาก master plate นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 µg/ml, chloramphenicol 34 µg/ml และ IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยสับสเตรท AZCL-HE-Cellulose ดังข้อ 3.6

3.13.2 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย western blot

เนื่องจากว่าบริเวณที่โคลนยีนเข้าสู่ pET28a(+) นั้นมีโปรตีน histidine (His-Tag) บริเวณ C-terminal เพื่อวิเคราะห์ความน่าจะเป็นในการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากการโคลน สามารถใช้ antibody ที่จับกับโปรตีน histidine ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการทำ western blot ได้โดยการนำโปรตีน 20 µl ไปวิเคราะห์ด้วยเจล 12 % SDS-PAGE เป็นเวลา 110 นาที 15 mA ใช้ pre-stain protein marker (Fermentas, U.S.A) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน จากนั้นนำแผ่นเจลที่มีโปรตีนอยู่ ไปวางบนกระดาษกรองโดยให้ด้านดำเป็นด้านล่างจากนั้นวาง Hybond-ECL-nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Sweden) ทับบนเจลแล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า 150 mA เป็นเวลา 90 นาที ในสารละลาย transfer จากนั้นแกะ membrane ออกจากแผ่นเจล แล้วนำ membrane ไปล้างด้วยสารละลาย TSBT pH 7.5 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที โดยวางบน rocker ทำการ block โปรตีนด้วย 5% skim milk ที่ละลายในสารละลาย TSBT pH 7.5 นำไปวางบน rocker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยสารละลาย TSBT pH 7.5 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจับด้วย primary-antibody ตัวแรก คือ Anti-HIS ใน 5% skim milk ที่ละลายในสารละลาย TSBT pH 7.5 โดยมีอัตราส่วน 1: 2000 แล้วนำไปวางบน rocker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยสารละลาย TSBT pH 7.5 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จับโปรตีนอีกครั้งด้วย secondary-antibody คือ Anti-mouse-IgG-HRP ใน 5% skim milk ที่ละลายในสารละลาย TSBT pH 7.5 โดยมีอัตราส่วน 1: 2000 แล้วนำไปวางบน rocker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยสารละลาย TSBT pH 7.5 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมสับสเตรท ECL (solution A และ solution B อัตราส่วน 1:1) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปประกบบนแผ่นฟิล์มในห้องมืดเป็นเวลา 30 วินาที ถึง 5 นาที แล้วนำแผ่นฟิล์มไปล้างในสารละลาย developer จนกระทั่งเห็น signal โปรตีนแล้วจึงล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปล้างในสารละลาย fixer จนกระทั่งแผ่นฟิล์มสะอาด แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าอีกครั้ง จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มไปตากให้แห้ง นำแผ่นฟิล์มไปเปรียบเทียบกับ pre-stain protein marker บน membrane เพื่อวิเคราะห์ขนาดโปรตีนที่จับกับ His-Tag ได้ ซึ่งควรจะมีขนาด ~ 60.6 kDa (น้ำหนักโปรตีนนี้รวมโปรตีน His-Tag ด้วย) ตรวจสอบขนาดของโปรตีน โดย Protein Calculator v3.3 เข้าอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

3.14 การเลี้ยงเซลล์แบบ large scale

นำโคโลนีบน master plate มาเลี้ยงใน flask ขนาด 2 L โดยมี LB broth ปริมาตร 1,200 ml ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin ปริมาตร 50 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จนกระทั่งเซลล์มีความเข้มข้น จนวัดค่า OD₆₀₀ ได้ 0.5 จากนั้นเหนี่ยวนำเซลล์โดยใช้ IPTG 1.0 mM จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 100 mM ที่ pH 7.5 แล้วนำเซลล์มาสกัดโปรตีนด้วยเครื่อง sonicator ที่ amplitude 60% เป็นเวลา 9 นาที บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกโปรตีนที่เป็น soluble โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจล 12% SDS-PAGE และ Coomassie Blue R-250 เป็นเวลา 110 นาที 15 mA ใช้ unstained protein marker (Fermentas, USA) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน จากนั้นทำให้ cellulolytic protein บริสุทธิ์ โดยใช้ His-Trap affinity column (Amersham Biosciences, Sweden) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

3.15 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification)

นำ cellulolytic protein มากรองโดยผ่าน filter (Whatman, Germany) ขนาด 0.22 µM แล้วมาทำให้เข้มข้นโดยการนำมาผ่าน Amicon Ultrafiltration Unit (Millipore, USA) จากนั้นนำ cellulolytic protein มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ His-Trap affinity column โดยหลักการทำงานของ column คือ เมื่อนำโปรตีนผ่าน column ที่มี Nickel(II)sulfate อยู่ในซึ่งมีคุณสมบัติสามารถจับกับ histidine ได้เมื่อ elute โปรตีนด้วย imidazole โปรตีนที่จับกับ histidine จะหลุดออกมา เนื่องจาก imidazole มีความแรงในการไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ side chain สามารถจับกับโปรตีน histidine ได้จึงทำให้โปรตีนที่จับกับ His อยู่จึงหลุดออกมาพร้อม imidazole (Amersham Biosciences, Sweden) วิธีการคือ ให้โปรตีนจับกับ column โดยใช้ binding buffer ปริมาตร 5 ml (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl และ 40 mM imidazole pH 7.4) อัตราการผ่านของ buffer คิดเป็น 1 ml/min จากนั้นทำการ wash ด้วย binding buffer ปริมาตร 5 ml อีกครั้ง แล้ว elute โปรตีนด้วย elution buffer 2 ชนิด ดังนี้ elution buffer 1 (20 mM sodium phosphate pH 7.4, 0.5 M NaCl และ 100 mM imidazole) และ elution buffer 2 (20 mM sodium phosphate pH 7.4, 0.5 M NaCl และ 200 mM imidazole) เมื่อโปรตีนหลุดออกมาจะนำโปรตีนมาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Blue R-250 จากนั้นนำมาวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay kit (Biorad, USA)

3.16 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ (enzyme characterization)

ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์นั้น เพื่อพิจารณาว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนมีคุณสมบัติที่ดีจะนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมหรือไม่ จะต้องวิเคราะห์คุณสมบัติจากการทนความร้อน ทนต่อกรด-ด่าง และความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทตัวใดบ้าง เพื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ที่จากงานวิจัยอื่นๆ และเป็นแนวทางในการพัฒนาเอนไซม์ต่อไป ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ในการย่อยสลายสับสเตรทที่อยู่ในประเภทของเซลลูโลส ซึ่งสับสเตรทที่ใช้วิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างและอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด และวิเคราะห์การทนกรด-ด่างและทนความร้อนของเอนไซม์ คือ carboxymethyl cellulose (CMC) ที่ความเข้มข้น 1.0% ซึ่งจะได้ผลผลิตหลังจากการย่อยสลาย คือ น้ำตาลกลูโคส จากนั้นจะวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน 0, 5, 10, 25 และ 50 mM ซึ่งจะใช้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก) เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมดประมาณ 1 ml โดยมีเอนไซม์เซลลูเลส 40 μ l, 1% CMC ในสารละลาย pH ต่างๆ 300 μ l และเติม DNS 680 μ l หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำปฏิกิริยาทั้งหมดไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที (Halliwell and Vincent. 1981 ; Anonymous. 2000; Figueiredo *et al.* 2001) แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเปิดปฏิกิริยา 100 μ l ลงใน 96 well-plate แล้ววัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm (Miller. 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16.1 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (optimal pH)

ก่อนจะวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ในการทนกรด-ด่าง ทนความร้อน หรือความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรท จะต้องวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนว่าสามารถทำงานได้ดีที่ค่ากรด-ด่างที่เท่าไร โดยเริ่มพิจารณาตั้งแต่ ค่า pH 3–10 โดยละลาย 1 % CMC ในสารละลาย ดังนี้ pH 3-4 จะใช้ glycine ที่ความเข้มข้น 0.2 M, pH 5-5.5 จะใช้ NaOAc ความเข้มข้น 0.2 M, pH 6 จะใช้ potassium phosphate ที่ความเข้มข้น 0.2 M pH 7-9 จะใช้ Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 0.2 M และ pH 10 จะใช้ glycine-NaOH ที่ความเข้มข้น 0.2 M จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ตามปฏิกิริยาดังข้อ 3.16

3.16.2 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (optimal temperature)

หลังจากวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ดีที่สุดแล้วจะวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทจะแตกต่างกันซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 35°C-80°C โดยใช้ 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสดังข้อ 3.16

3.16.3 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนความเป็นกรด - ด่าง (pH stability)

เมื่อวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด จากนั้นจะวิเคราะห์หาความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ผสมกับสารละลายที่ pH ต่างกัน ในอัตราส่วน 1:3 เริ่มตั้งแต่ pH 2.6–10 โดยใช้สารละลาย ดังนี้ pH 2.6-4 จะใช้ 0.2 M glycine, pH 5-5.5 จะใช้ 0.2 M NaOAc, pH 6 จะใช้ 0.2 M potassium phosphate, pH 7-9 จะใช้ 0.2 M Tris-HCl และ pH 10 จะใช้ 0.2 M glycine-NaOH แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปีเปิดเอนไซม์ที่บ่มในสารละลายมา 80 μ l แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ดังข้อ 3.16 โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผสมกับสารละลาย pH ต่างกัน โดยไม่มีการบ่มทิ้งไว้

3.16.4 การวิเคราะห์การทนความร้อนของเอนไซม์ (thermo stability)

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการทนต่อกรด-ด่างแล้ว จะวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการทนความร้อน โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40–80°C เป็นเวลาดังแต่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นจึงนำเอนไซม์มาทดสอบ ดังข้อ 3.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16.5 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (substrate specificity)

สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรท จะเลือกใช้สับสเตรททั่วไปที่งานวิจัยใช้ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสแบบใด ดังข้อ 2.2.1 โดยสับสเตรทที่ใช้วิเคราะห์ มีดังนี้ 1% avicel, 1% dextran, 1% HE-Cellulose, 2 mM p-NP- β -D-glucopyranoside, 1 mM MUC (4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside) และ กระดาษกรอง (Whatman no.1, Germany) ขนาด 11.36 mg ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 แล้วทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ดังข้อ 3.16 แต่ในการวัด MUC นั้นจะใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 355 nm

3.17 การวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetics)

เนื่องจากการวิเคราะห์กลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลสจาก CAZY พบว่าเป็นเอนไซม์เซลลูเลสแบบ endoglucanase จึงได้เลือกสับสเตรทที่ใช้วิเคราะห์ คือ CMC และ HE-cellulose เนื่องจากว่าเป็นสับสเตรทที่ใช้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสแบบ endoglucanase โดย CMC ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.2, 0.3, 0.6, 1.0, 2.0 และ 3.0 mg/ml และ HE-Cellulose ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 mg/ml ในการวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ คือ V_{max} กับ K_m มาจากทฤษฎีของ Michaelis-Menten และการคำนวณจะใช้สูตรทฤษฎีของ Lineweaver-Burk ซึ่งจะใช้โปรแกรม Kaleida Graph software package (Synergy Software, USA) ในการวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยใช้วิธี DNS ในการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ได้ดังข้อ 3.16 ซึ่งค่า V_{max} และ K_m เป็นค่าบ่งชี้ที่สำคัญในการบอกถึงสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยค่า V_{max} คือ ค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา และค่า K_m คือ ค่าความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรท ที่ค่า $V_{max}/2$ หมายถึงว่าในปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรทที่เอนไซม์สามารถเข้าจับได้ ดังที่กล่าวในข้อ 2.11

3.18 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลอง (In vitro digestion)

ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อช่วยให้สัตว์สามารถย่อยวัตถุดิบที่ย่อยยากให้ย่อยได้ง่ายขึ้น ทำให้ร่างกายสัตว์ได้รับคุณค่าทางโภชนาจากอาหารได้มากที่สุด จึงได้ทำการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลอง เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เมื่อผสมในอาหารสัตว์แล้วผ่านระบบการย่อยอาหารของสัตว์ปีก ว่าสามารถทนต่อน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารเพื่อให้สัตว์สามารถย่อยอาหารได้อย่างมากขึ้น ในการวิเคราะห์ครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Wu *et al.* (2004) โดยนำเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ทดสอบการย่อยอาหาร สัตว์ไก่อระยะรุ่น (Betagro, Thailand) โดยออกแบบการทดลองดังนี้ treatment 1 ใช้เอนไซม์ 1 unit, treatment 2 เอนไซม์ 2 Unit, treatment 3 เอนไซม์ 3 Unit, treatment 4 เอนไซม์ 4 Unit, treatment 5 เอนไซม์ 5 Unit 5 และ control คือ ไม่ผสมเอนไซม์ลงในอาหารสัตว์ เริ่มการทดลองโดยผสมเอนไซม์ ในอาหารสัตว์ 2 g เติม 0.05 M NaOAc pH 5.7 ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 1.5 M HCl ปริมาตร 1 ml vortex เบาๆ เติม pepsin 3,000 Unit ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จึงเติม pancreatin ที่ละลายใน 1 M NaHCO₃ ปริมาตร 1.3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาบนน้ำแข็ง แล้วล้างด้วยสารละลาย succinate pH 6.0 ปริมาตร 200 ml กรองแยกน้ำตาลกลูโคสและกากเชื้อใย โดยใช้กระดาษกรอง 40 ashless (Whatman no.1, Germany) วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้ดัง 3.16 และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อใยโดยนำกระดาษกรองที่มีกาก อาหารอบที่อุณหภูมิ 105°C 19 ชั่วโมง แล้วส่งวิเคราะห์เชื้อใยโดยห้องปฏิบัติการวิเคราะห์และ ตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกยีนเซลล์เลสหรือยีนไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคหรือกระบือ โดยอาศัยแนวทางในการทำการทดลอง 3 แนวทางด้วยกัน คือ 1) การคัดแยกยีนจากเมทาจีโนมิกไลบรารี (plasmid library) ของจุลินทรีย์ในรูเมนของโค 2) การคัดแยกโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์เลสและเอนไซม์ไซแลนเนสจาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนของกระบือ และ 3) การคัดแยกยีนโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ด้วย pyrosequencing จากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์เลสจาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนของกระบือ

4.1 การจำแนกยีนเซลล์เลสหรือไซแลนเนสจากเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนของโค

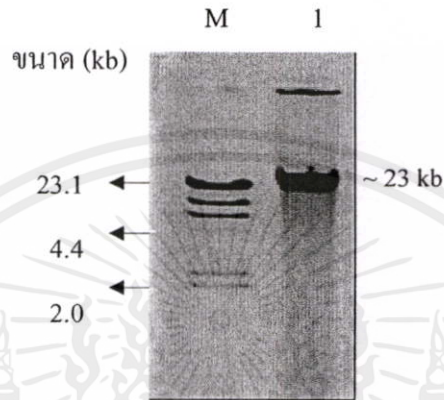
ในการสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนของโค เริ่มต้นจากการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของโคด้วยวิธีทางเคมีและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนของโค โดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แล้วโคลนเข้าพลาสมิด pZerO-2 และถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* จากนั้นนำโคลนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีเทป จากนั้นนำโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ผลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในรูเมนของโค

เมื่อสกัดจีโนมดีเอ็นเอ โดยตัดแปลงวิธีจาก Zhou *et al.* (1996) ตามข้อที่ 3.2 เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอโดยรวมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวในกระเพาะรูเมน พบว่าสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณ 50 μ l ต่อของเหลว 300 μ l เมื่อตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากภาพ 4.1 ใน Lane 1 เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานใน Lane M คือ lambda DNA/*HindIII* ขนาดดีเอ็นเอที่ได้อยู่ที่ 23.1 kb หรือใหญ่กว่า และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) มีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 3.2 μ g/ μ l จากปริมาตรทั้งหมด 50 μ l เมื่อพิจารณาประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.87 และค่า A_{260}/A_{230} เท่ากับ 1.85 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และปริมาณเพียงพอในการนำไปสร้างเมทาจีโนมิกไลบรารีได้ โดยค่า A_{260}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายานาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A_{280}/A_{260} ที่ใกล้เคียง 2 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนอยู่น้อย และค่า A_{260}/A_{230} ที่ใกล้เคียง 2 แสดงว่ามี humic acids ปนเปื้อนน้อย ดัง Sharma และคณะ (2008) ได้กล่าวไว้ว่าดีเอ็นเอจะมีความบริสุทธิ์ที่ค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-2.0

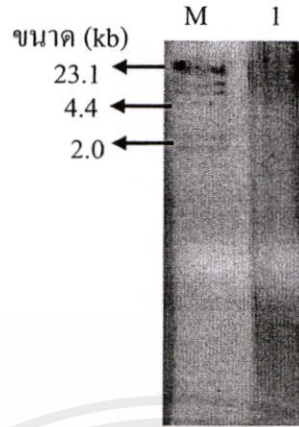


ภาพที่ 4.1 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวของกระเพาะรูเมน โคตรตรวจสอบด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng Lambda DNA/*Hind* III) Lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัด

4.1.2 ผลของการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI

หลังจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โคลนเข้าเวกเตอร์และวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Gel documentation โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ lambda DNA/*Hind*III จากภาพที่ 4.2 Lane 1 จะเห็นว่าดีเอ็นเอถูกตัดจนเห็นเป็นชิ้นดีเอ็นเอหลายขนาด smear ตลอดทั้งแนว ซึ่งจะนำไปใช้แยกขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

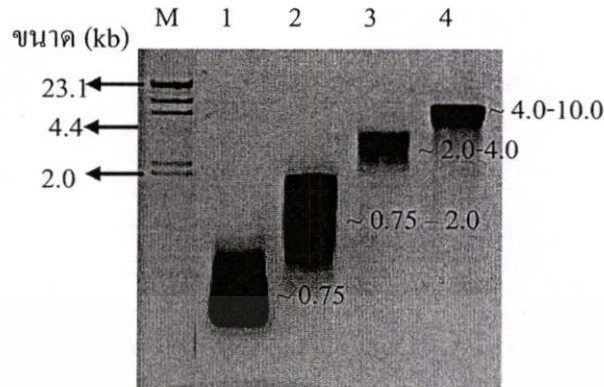


ภาพที่ 4.2 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* บน 0.8% อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng Lambda DNA/*Hind* III) Lane 1 คือ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งเห็นเป็นชิ้นดีเอ็นเอหลายขนาด

4.1.3 ผลของการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี *troughing method*

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* มาแยกขนาดด้วยวิธี DNA *troughing method* ดังข้อที่ 3.5 เพื่อทำการคัดเลือกขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการโคลนเข้าพลาสมิด pZErO-2 โดยเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด 4 ช่วงขนาด ได้แก่ ขนาดต่ำกว่า 0.75 kb ขนาด 0.75-2.0 kb ขนาด 2.0-4.0 kb และ ขนาด 4.0-10.0 kb ตามลำดับ จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย lambda DNA/*Hind*III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน นำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง Gel documentation (ภาพที่ 4.3) หลังจากการแยกชิ้นดีเอ็นเอจะพบว่า ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกชิ้นดีเอ็นเอจากการเก็บช่วงที่ 2, 3 และ 4 มาโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ เนื่องจากมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ควรจะมียีนเอ็นไซม์เซลลูเลสหรือไซแลนเนส (เนื่องจากยีนของเอ็นไซม์เซลลูเลสหรือไซแลนเนสส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 0.5-2 kb) และมีขนาดเหมาะสมในการโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ และมีปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมากพอที่จะนำไปโคลนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

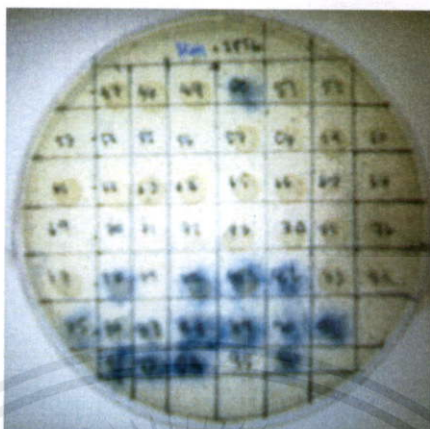


ภาพที่ 4.3 ผลการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี DNA troughing method บน 0.8% อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng Lambda DNA/*Hind* III) Lane ที่ 1-4 คือ การเก็บดีเอ็นเอครั้งที่ 1-4 ตามลำดับ

4.1.4 ผลการตรวจสอบโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์

หลังจากนำชิ้นดีเอ็นเอ โคลนเข้า pZER-2 และถ่ายเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ TOP 10 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Kanamycin และตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นจากการเก็บดีเอ็นเอในช่วงที่ 2 พบว่า ได้ 1.4×10^4 โคโลนี จึงเก็บ โคโลนีใน 96-well plate แล้วทำการตรวจสอบหาโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ โดยปิเปตเชื้อจาก 96-well plate หลุมละ 2 μ l หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเททับด้วยสับสเตรตดังข้อที่ 3.10 (ภาพที่ 4.4) ผลที่ได้จากการเททับด้วยสับสเตรต AZCL-Xylan ลงบนเชื้อที่รับชิ้นดีเอ็นเอจากการเก็บช่วงที่ 2 จะเห็นเป็นสีฟ้ารอบๆเชื้อ แสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งจุดที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์มีอยู่ 23 จุด แต่เมื่อเททับด้วยสับสเตรตชนิดอื่น ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์แต่อย่างใด ส่วนโคโลนีที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอในช่วงที่ 3 แล้ว โคลนเข้าเวกเตอร์เมื่อเททับด้วยสับสเตรต ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์แต่อย่างใด และจากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของการเก็บช่วงที่ 4 เมื่อโคลนเข้าเวกเตอร์ไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นบนเพลท อาจเนื่องมาจากว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าเวกเตอร์มีขนาดใหญ่เกินไป จึงไม่สามารถโคลนเข้าไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

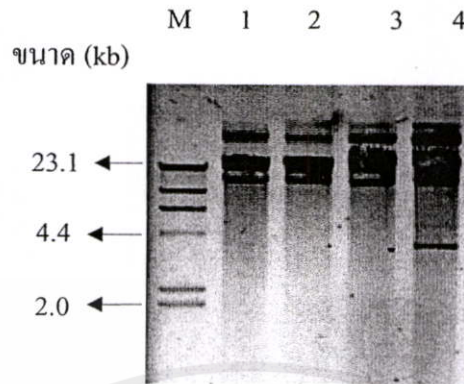


ภาพที่ 4.4 ผลของการแทบโคลินี้ด้วยสับสเตรท AZCL-Xylan บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งเกิดสีฟ้ารอบๆ จุดที่หยดเชื้อลงไปบนเพลทซึ่งบ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

4.1.5 ผลการสกัดพลาสมิดลูกผสมเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากเลือกโคลินี้จาก 23 หลุมที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก 96 หลุม มาทำ master plate จากนั้นเชื้อโคลินี้ให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี kanamycine และสารละลาย IPTG จากนั้นเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสอีกครั้งด้วยวิธีแทบ นำโคลินี้ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสมาสกัดพลาสมิดและทำการสกัดพลาสมิด เมื่อวิเคราะห์ผลจากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และเปรียบเทียบความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ lambda DNA/*Hind*III ด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพที่ 4.5) พบว่าได้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดได้ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng Lambda DNA/*Hind* III) Lane ที่ 1 - 4 คือ โคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไซแลนเนส

4.1.6 ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดจากโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 955 bp จึงวิเคราะห์ความคล้ายกันกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastX ของ NCBI ผลที่ได้ คือ พบความคล้ายกันกับยีน hypothetical protein CLOSPI_01518 ของ *Clostridium spiroforme* DSM 1552 (ZP_02867683) โดยมีความคล้ายคลึงกัน 55% แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ความคล้ายกันของยีนไซแลนเนสในฐานข้อมูลได้ แม้จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ไซแลนเนสจากไลบรารีของโคลนด้วยการเททับด้วยสับสเตรท AZCL-Xylan ก็ตาม ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์ไซแลนเนสจากโคลนนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เมื่อผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่สามารถยืนยันว่าโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสอาจจะมีชิ้นส่วนของไซแลนเนสอยู่จึงได้ทำการคัดแยกยีนในแนวทางที่ 2 ต่อไป

4.2 การจำแนกยีนเซลล์เลสหรือไซแลนเนสจาก shotgun library ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ

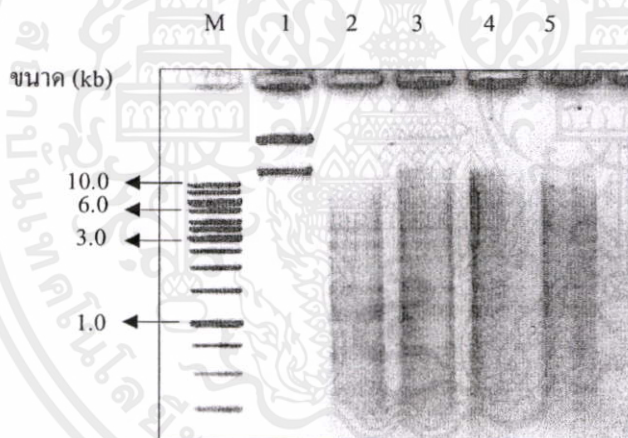
สำหรับการสร้าง shotgun library จากโคลนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์เลส และเอนไซม์ไซแลนเนส เริ่มจากสกัดพอสמידลูกผสม เนื่องจากว่าในการสร้างไลบรารีนี้ได้เลือกเวกเตอร์คือพอสמידเนื่องจากพอสמידสามารถบรรจุชิ้นดีเอ็นเอได้ ~ 40 kb ซึ่งคาดว่าน่าจะ ได้ชิ้นยีนเซลล์เลสหรือไซแลนเนสแบบ full-length ได้ จึงได้นำพอสמידลูกผสมตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI จากนั้น โคลนเข้า pZER0-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเฉพาะเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่สู่สาธารณะ การนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* จากนั้นนำโคลนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเททัป โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.2.1 ผลของการตัดฟอสมิดลูกผสมที่ได้จาก fosmid library

เพื่อการแยกยีนเซลลูเลสและไซแลนเนสจากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์จึงนำโคลน Cel5 และ Xyl15 จาก fosmid library มาเพิ่มจำนวนขึ้นโดยการเหนี่ยวนำตามวิธีในข้อ 3.5 และสกัดฟอสมิดลูกผสม จากนั้นจึงนำฟอสมิดลูกผสมตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แบบ partial digestion แล้ววิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพ 4.6) แสดงให้เห็นว่าฟอสมิดลูกผสมถูกตัดจนได้ชิ้นยีนหลายขนาด โดยได้ขนาดชิ้นของฟอสมิดลูกผสมที่ถูกตัดตั้งแต่ ~0.25-10.0 kb ขึ้นไป (เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 1 kb DNA ladder) ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมที่น่าจะมียีนเซลลูเลสหรือไซแลนเนสและเหมาะที่จะนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อนำไปสร้าง shotgun library ต่อไป

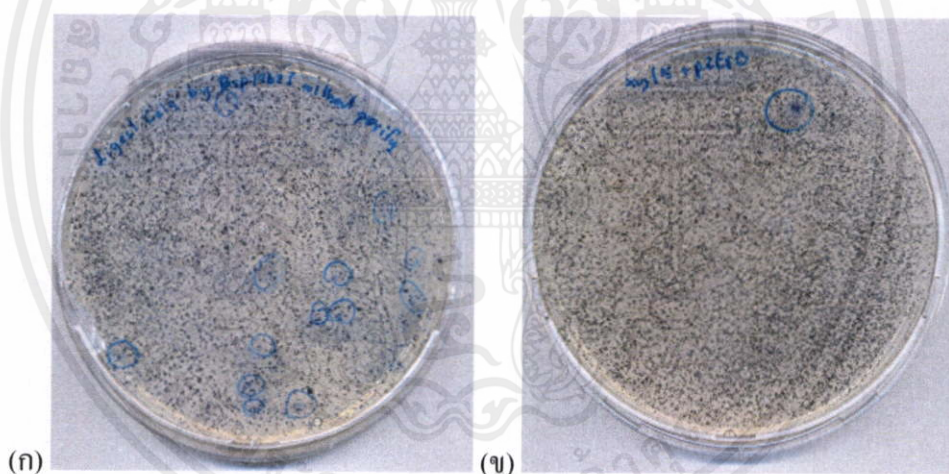


ภาพที่ 4.6 การตัดฟอสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder) Lane 1 คือ พลาสมิด pZER0-2 และ Lane ที่ 2-3 คือ ฟอสมิดจากโคลน Cel5 และ Lane ที่ 4-5 คือ ฟอสมิดจากโคลน Xyl15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการตรวจสอบโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์จาก shotgun library

หลังจากทำ shotgun library โดยการนำชิ้นยีนของพอสמידลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* หลายขนาดมาโคลนเข้าเวกเตอร์ pZErO-2 จากการโคลนครั้งนี้ พบว่าโคลนที่มาจาก *Cel5* ได้ 3.5×10^4 โคลโลนี และโคลนที่มาจาก *Xyl15* ได้ 1.4×10^4 โคลโลนี (ภาพที่ 4.7) เมื่อตรวจสอบโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเทหับ พบว่าโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ของ shotgun library จากโคลน *Cel5* มีเกิดสีฟ้ารอบๆ โคลโลนี จำนวน 13 โคลน (ภาพที่ 4.7ก) แสดงว่าโคลนเหล่านี้น่าจะได้รับการขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนเซลลูเลสซึ่งสามารถแสดงออกได้ด้วย lacZ promoter ของพลาสมิด pZErO-2 และเมื่อตรวจสอบโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสของ shotgun library จากโคลน *Xyl15* พบโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสของ *Xyl15* จำนวน 1 โคลน (ภาพที่ 4.7ข) แสดงว่าโคลนเหล่านี้น่าจะได้รับการขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนไซแลนเนสซึ่งสามารถแสดงออกได้ จึงนำโคลนเหล่านั้นไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อหา ยีนเซลลูเลสหรือไซแลนเนสต่อไป

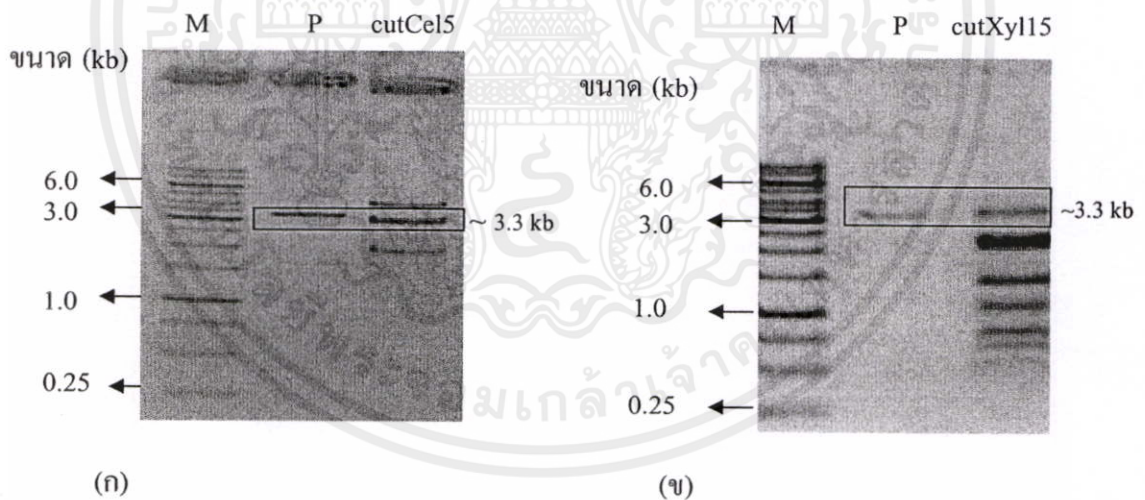


ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจาก shotgun library ของโคลน *Cel5* (ก) พบโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเกิดสีฟ้ารอบๆ โคลโลนีจำนวน 13 โคลน และ *Xyl15* พบโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสของ *xyl15* จำนวน 1 โคลน (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของการตรวจสอบการโคลนซึ้นยีนเข้าสู่ pZErO-2

เพื่อทำการแยกยีนเซลล์หรือไซแลนเนสจากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์และไซแลนเนสที่ตรวจสอบด้วยวิธีเทปแล้ว จึงสุ่มเลือกโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์และไซแลนเนสจากทั้งหมด 13 โคลนและจากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 1 โคลนเพื่อตรวจสอบซึ้นยีนที่โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pZErO-2 ด้วยการใช้อินไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* (ภาพที่ 4.8) พบว่า หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 1 kb DNA ladder ของโคลนจาก Cel5 มีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบด้วยกัน โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด ~3.3 kb ซึ่งตรงกับขนาดของเวกเตอร์ pZErO-2 และแถบดีเอ็นเอขนาด ~5.0 kb และ ~2.0 kb แสดงว่าซึ้นยีนขนาด ~5.0 kb หรือ ~2.0 kb อาจมี full-length gene ของเซลล์ และหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ของโคลนที่มาจาก Xyl15 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นหลายแถบ ซึ่งมีดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดตรงกับขนาดของเวกเตอร์ pZErO-2 คือ ~3.3 kb นอกจากนั้นยังมีแถบดีเอ็นเอหลายขนาด ดังนี้ ~2.0, ~1.5, ~1.0, ~0.75 และ 0.50 kb ซึ่งซึ้นดีเอ็นเอขนาดเหล่านี้จะมีซึ้นใดซึ้นหนึ่งที่มี full-length gene ของไซแลนเนส จึงส่งพลาสติกดีเอ็นเอผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการโคลนซึ้นยีนของ Cel5 (ก) และ Xyl15 (ข) ที่ถูกโคลนเข้าเวกเตอร์ pZErO-2 ด้วยการตัดของ เอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้ดีเอ็นเอหลายขนาด โดยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.3 kb มีขนาดเท่ากับขนาดของพลาสมิด pZErO-2 โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder) และ Lane P คือ pZErO-2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ขนาด ~3.3 kb

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดจากโคลน Cel5 และ Xyl15 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยซึ่งใช้ไพรเมอร์ M13F เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastX ของ NCBI ดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน Cel5 สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง ~624 bp พบความคล้ายกันกับยีน endo-1, 4- β -xylanase precursor ของ uncultured microorganism (AAS85781) จาก ลำไส้ของแมลงโดยมีความคล้ายคลึงกัน 49% แต่ไม่พบความคล้ายกับยีนเซลล์ูเลสในฐานข้อมูล เนื่องจากว่า chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์หลังจาก 625 bp ขึ้นไปมีลักษณะเป็น peak ซ้อนกัน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงทำให้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวแค่ 624 bp ไปวิเคราะห์ความคล้ายกันของยีนเซลล์ูเลสของฐานข้อมูล NCBI จึงไม่พบความคล้ายกันของยีนเซลล์ูเลส (ภาคผนวก ข1) และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากโคลน Xyl15 สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,213 bp พบความคล้ายกันกับยีน endo-1,4- β -xylanase precursor ของ *Fibrobacter succinogenes* (YP_003250510) โดยมีความคล้ายคลึงกัน 94% (ภาคผนวก ข2) แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน reverse ได้เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมีขนาดใหญ่มากเกินไปที่จะวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบธรรมดา เมื่อพิจารณาความคล้ายกันของยีนไซแลนเนสที่ได้จากการทำ shotgun library และจากนักวิจัยที่ทำการทดลองแบบนี้ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน พบว่ายีนที่ได้จากการทดลองมีความคล้ายกัน และตรงกับยีน endo-1,4- β -xylanase precursor ของ *Fibrobacter succinogenes* (YP_003250510) ของ NCBI จึงไม่ต้องการงานซ้ำ ดังนั้นจึงได้ทำการคัดแยกยีนจากแนวทางที่ 3 คือ ข้อมูล pyrosequencing ของพอสมิดลูกผสมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ูเลสจาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือต่อไป ซึ่งในแนวทางนี้เราสามารถคัดแยกยีนที่เป็น full-length gene จากข้อมูล pyrosequencing ได้เลย

4.3 การจำแนกยีนเซลล์ูเลสจากข้อมูล pyrosequencing ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ

ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค pyrosequencing ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fosmid library จากจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือที่สร้างโดย Miss Nguyen Hong Nhung (Department of Food and Bioprocess Technology, School of Environment, Resources and Development, Asia Institute of Technology, Thailand) หลังจากที่ได้เลือก contig00001 เนื่องจากเป็น full-length gene ที่มี start และ stop codon ดังเหตุผลในข้อ 3.8 จึงมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่ม

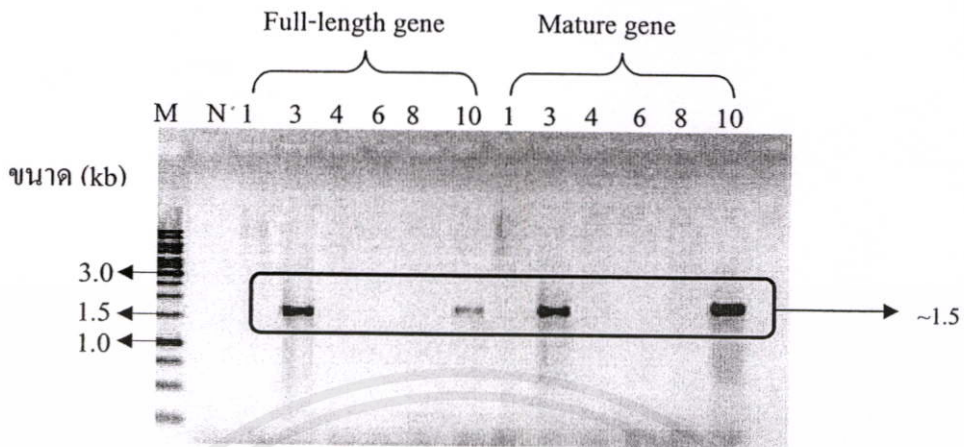
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณซึ้นยีนเซลล์จากโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.3.1 การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำโคลนใน fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนของกระบือที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์หมายเลข 1, 3, 4, 6, 8 และ 10 มาเพาะเลี้ยงและสกัดฟอสมิดลูกผสม จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใช้เพิ่มปริมาณยีนเซลล์ ตามข้อ 3.5 โดยในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ 2 แบบ คือ แบบ full-length gene และแบบ mature gene โดยการตัด signal peptide ออก ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SignalP พบว่ายีนเซลล์นี้มี signal peptide อยู่ในการออกแบบไพรเมอร์แบบตัด signal peptide ออกไป เนื่องจากบริเวณที่เป็นตำแหน่งของ signal peptide จะทำหน้าที่นำเอาสายโปรตีนจากไรโบโซมเข้าสู่ endoplasmic reticulum lumen โดย signal peptide จะจับกับโปรตีนจำเพาะชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า signal-recognition particle (SRP) รวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้มีการหยุดการสังเคราะห์โปรตีนชั่วคราวขึ้น เพื่อให้แน่ใจว่าไรโบโซมนั้นจับกับ endoplasmic reticulum membrane และโปรตีนนั้นไม่ถูกปล่อยสู่ไซโทพลาสซึมหรือถูกเอนไซม์ย่อยสลายไป เมื่อการสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลงจะมีเอนไซม์ signal peptidase ตัด signal peptide จากนั้นจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ protease ใน endoplasmic reticulum ในขณะที่โปรตีนที่สมบูรณ์จะถูกปล่อยเข้าสู่ endoplasmic reticulum lumen ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนที่จะแสดงออกได้จะอยู่หลัง signal peptide ในการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีนเซลล์ด้าน forward มี 2 แบบ ดังนี้ แบบ full-length gene คือ forward cel 1 จะทำหน้าที่จับเบสตั้งแต่ตัวแรก คือ start codon และแบบ mature gene คือ forward cel 2 จะจับเบสตัดจากเบสที่เป็นตำแหน่ง signal peptide และในด้าน reverse คือ reverse cel ดังอธิบายในข้อ 3.8.2 โดยตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 4.9) หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณซึ้นยีนเซลล์ ทำให้ได้ซึ้นยีน 2 ขนาด เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 1 kb DNA ladder พบว่าโคลนหมายเลข 3 และ 10 ได้ยีนเซลล์ทั้งแบบ full-length gene และแบบ mature gene ขนาด ~1.5 bp แสดงว่าฟอสมิดโคลนหมายเลข 3 และ 10 เป็นโคลนที่มียีนเซลล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตาม contig00001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



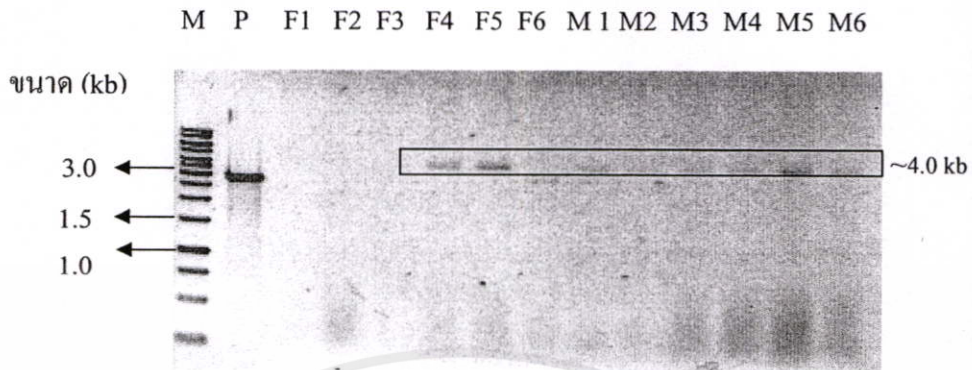
ภาพที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์แบบ full-length gene และแบบ mature gene ของโคลน หมายเลข 1, 3, 4, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ซึ่งขนาดของชิ้นยีน คือ ~ 1.5 kb บน 0.8% อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder) และ Lane N คือ negative control

4.3.2 ผลของการโคลนยีนสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin, X-gal และ IPTG โดยการสุ่มโคลนสีขาวจำนวน 6 โคลนจากการโคลนยีนแบบ full-length gene และ 6 โคลนจากการโคลนยีนแบบ mature gene มาทำ size screening เพื่อคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายทอดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งควรมีขนาดใหญ่กว่าขนาดเวกเตอร์ ~2.8 bp ขึ้นไปเพื่อส่งพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป เมื่อวิเคราะห์ภาพเจลหลังจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ pTZ57R/T (ภาพที่ 4.10) พบว่าพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคลนหมายเลข F4 และ F5 ของ full-length gene และ พบว่าพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคลนหมายเลข M1-M6 ของ mature gene Lane มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของ pTZ57R/T แสดงว่าการเชื่อมต่อยีนกับเวกเตอร์ประสบความสำเร็จได้ยีนเซลล์ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ จึงเลือกโคลนหมายเลข F4 จาก full-length gene และโคลนหมายเลข M4 จาก mature gene ให้ชื่อว่า CelF4 และ CelM4 ตามลำดับ แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ส่วนเลนหมายเลข F6 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเท่ากับขนาดของเวกเตอร์ แสดงว่ายีนเซลล์ไม่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานในเพื่อการศึกษาค้นคว้าวิจัยเท่านั้น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ผลของการทำ size screening ของโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อของยีนเซลล์ูเลสแบบ full-length gene หมายเลข F1-F6 และแบบ mature gene หมายเลข M1-M6 ในเวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อคัดเลือกโคลนในการสังเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ บน 0.8% อะกาโรส เจล โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder) และ Lane P คือ pTZ57R/T ที่มีขนาด ~2.8 bp

4.3.3 ผลของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ูเลส

หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนแบบ full-length gene หมายเลข CelF4 และแบบ mature gene หมายเลข CelM4 โดยใช้ไพรเมอร์ด้าน forward เป็น M13pUC-40 และ T7 เป็นด้าน reverse เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 แบบ มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อมูล pyrosequencing โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (ภาพที่ 4.11) พบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และโคลนเข้า pTZ57R/T ตรงกับข้อมูล pyrosequencing ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนกระบือ และเมื่อนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก Genbank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN เมื่อเข้าโปรแกรมแล้วผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน CelF4 และโคลน CelM4 ซึ่งมีความเหมือนกับยีนเซลล์ูเลสของ uncultured microorganism (ACA61137) 80% และ 81% ตามลำดับ โดยยีนเซลล์ูเลสในฐานข้อมูลเป็นยีนที่คัดแยกได้จากจุลินทรีย์ในรูเมนของกระบือ (Duan *et al.* 2009) เช่นเดียวกับยีนเซลล์ูเลสที่แยกได้จากการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		1	50
full	(1)	ATGAGCTTTGCTGCTCAGGCACAGGATTTTGA AACAGCCAAAGAGGCTGT	
meture	(1)	-----TTTGA AACAGCCAAAGAGGCTGT	
Pyrosequencing	(1)	ATGAGCTTTGCTGCTCAGGCACAGGATTTTGA AACAGCCAAAGAGGCTGT	
Consensus	(1)	ATGAGCTTTGCTGCTCAGGCACAGGATTTTGA AACAGCCAAAGAGGCTGT	100
full	(51)	AAAGAACATGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATACCCTCGATGCCTGTA	
meture	(24)	AAAGAACATGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATACCCTCGATGCCTGTA	
Pyrosequencing	(51)	AAAGAACATGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATACCCTCGATGCCTGTA	
Consensus	(51)	AAAGAACATGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATACCCTCGATGCCTGTA	150
full	(101)	GCGGAAGTGCCGAGGGACTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAACCCGTC	
meture	(74)	GCGGAAGTGCCGAGGGACTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAACCCGTC	
Pyrosequencing	(101)	GCGGAAGTGCCGAGGGACTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAACCCGTC	
Consensus	(101)	GCGGAAGTGCCGAGGGACTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAACCCGTC	200
full	(151)	ACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGATGAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCAT	
meture	(124)	ACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGATGAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCAT	
Pyrosequencing	(151)	ACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGATGAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCAT	
Consensus	(151)	ACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGATGAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCAT	250
full	(201)	CCGCGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACACGAACGGCAAGGTGG	
meture	(174)	CCGCGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACACGAACGGCAAGGTGG	
Pyrosequencing	(201)	CCGCGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACACGAACGGCAAGGTGG	
Consensus	(201)	CCGCGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACACGAACGGCAAGGTGG	300
full	(251)	ACGAAGCATGGATGAAGCGTGTTCACGAAGTGGTCGACTATGTGATCAAC	
meture	(224)	ACGAAGCATGGATGAAGCGTGTTCACGAAGTGGTCGACTATGTGATCAAC	
Pyrosequencing	(251)	ACGAAGCATGGATGAAGCGTGTTCACGAAGTGGTCGACTATGTGATCAAC	
Consensus	(251)	ACGAAGCATGGATGAAGCGTGTTCACGAAGTGGTCGACTATGTGATCAAC	350
full	(301)	GCGGGGTTGTA CTGTCATCGTGAACGTC CATCAGCACACCGGGCAGGGCAC	
meture	(274)	GCGGGGTTGTA CTGTCATCGTGAACGTC CATCAGCACACCGGGCAGGGCAC	
Pyrosequencing	(301)	GCGGGGTTGTA CTGTCATCGTGAACGTC CATCAGCACACCGGGCAGGGCAC	
Consensus	(301)	GCGGGGTTGTA CTGTCATCGTGAACGTC CATCAGCACACCGGGCAGGGCAC	400
full	(351)	CCAATGGCTGCATGCCAGTACGACAACTTACAACAAAGTGAAGAGCAAGT	
meture	(324)	CCAATGGCTGCATGCCAGTACGACAACTTACAACAAAGTGAAGAGCAAGT	
Pyrosequencing	(351)	CCAATGGCTGCATGCCAGTACGACAACTTACAACAAAGTGAAGAGCAAGT	
Consensus	(351)	CCAATGGCTGCATGCCAGTACGACAACTTACAACAAAGTGAAGAGCAAGT	450
full	(401)	ATGAATACCTGTGGAAGCAAATTGCCACAGAATTC AAGGACTACGACCAG	
meture	(374)	ATGAATACCTGTGGAAGCAAATTGCCACAGAATTC AAGGACTACGACCAG	
Pyrosequencing	(401)	ATGAATACCTGTGGAAGCAAATTGCCACAGAATTC AAGGACTACGACCAG	
Consensus	(401)	ATGAATACCTGTGGAAGCAAATTGCCACAGAATTC AAGGACTACGACCAG	

ภาพที่ 4.11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing และจากการโคลนเข้า pTZ57R/T แบบ full-length gene (CelF4) และแบบ mature gene (CelM4) สีฟ้าทับบนอักษรแสดงบริเวณที่เป็น signal peptide และสีเหลืองแสดงความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนนั้นเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		451	500
full	(451)	AAGCTGCTCTTTGAATCCTACAACGAAATGCTGGATGACAATAACAGATG	
meture	(424)	AAGCTGCTCTTTGAATCCTACAACGAAATGCTGGATGACAATAACAGATG	
Pyrosequencing	(451)	AAGCTGCTCTTTGAATCCTACAACGAAATGCTGGATGACAATAACAGATG	
Consensus	(451)	AAGCTGCTCTTTGAATCCTACAACGAAATGCTGGATGACAATAACAGATG	
		501	550
full	(501)	GAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAAGGCCATCAACAGCTATGCCA	
meture	(474)	GAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAAGGCCATCAACAGCTATGCCA	
Pyrosequencing	(501)	GAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAAGGCCATCAACAGCTATGCCA	
Consensus	(501)	GAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAAGGCCATCAACAGCTATGCCA	
		551	600
full	(551)	AGAGTTTCGTGACGACCCGTGCGTAATACGGGTGGCAACAACACGAAGCGC	
meture	(524)	AGAGTTTCGTGACGACCCGTGCGTAATACGGGTGGCAACAACACGAAGCGC	
Pyrosequencing	(551)	AGAGTTTCGTGACGACCCGTGCGTAATACGGGTGGCAACAACACGAAGCGC	
Consensus	(551)	AGAGTTTCGTGACGACCCGTGCGTAATACGGGTGGCAACAACACGAAGCGC	
		601	650
full	(601)	AACCTGGTAGTGAATGACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATGAA	
meture	(574)	AACCTGGTAGTGAATGACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATGAA	
Pyrosequencing	(601)	AACCTGGTAGTGAATGACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATGAA	
Consensus	(601)	AACCTGGTAGTGAATGACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATGAA	
		651	700
full	(651)	AGCGCTTGAGTTGCCGGAAAATACAGGTCATATCATATTCCTCAACTGCACA	
meture	(624)	AGCGCTTGAGTTGCCGGAAAATACAGGTCATATCATATTCCTCAACTGCACA	
Pyrosequencing	(651)	AGCGCTTGAGTTGCCGGAAAATACAGGTCATATCATATTCCTCAACTGCACA	
Consensus	(651)	AGCGCTTGAGTTGCCGGAAAATACAGGTCATATCATATTCCTCAACTGCACA	
		701	750
full	(701)	GCTATGCCAACTGGCAGAAATGAGAGCAATGCCAAAAAGAAATCGACAAC	
meture	(674)	GCTATGCCAACTGGCAGAAATGAGAGCAATGCCAAAAAGAAATCGACAAC	
Pyrosequencing	(701)	GCTATGCCAACTGGCAGAAATGAGAGCAATGCCAAAAAGAAATCGACAAC	
Consensus	(701)	GCTATGCCAACTGGCAGAAATGAGAGCAATGCCAAAAAGAAATCGACAAC	
		751	800
full	(751)	CTGATCAGCAACATCAAAAACGAATCTGCTCAACAGGGCTCCTGTGATCAT	
meture	(724)	CTGATCAGCAACATCAAAAACGAATCTGCTCAACAGGGCTCCTGTGATCAT	
Pyrosequencing	(751)	CTGATCAGCAACATCAAAAACGAATCTGCTCAACAGGGCTCCTGTGATCAT	
Consensus	(751)	CTGATCAGCAACATCAAAAACGAATCTGCTCAACAGGGCTCCTGTGATCAT	
		801	850
full	(801)	GGGGAATATGCCACATTACCACATGGCCCTCGAATATCGACTATTACA	
meture	(774)	GGGGAATATGCCACATTACCACATGGCCCTCGAATATCGACTATTACA	
Pyrosequencing	(801)	GGGGAATATGCCACATTACCACATGGCCCTCGAATATCGACTATTACA	
Consensus	(801)	GGGGAATATGCCACATTACCACATGGCCCTCGAATATCGACTATTACA	
		851	900
full	(851)	ACACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACTATCTCGTCAAGCAG	
meture	(824)	ACACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACTATCTCGTCAAGCAG	
Pyrosequencing	(851)	ACACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACTATCTCGTCAAGCAG	
Consensus	(851)	ACACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACTATCTCGTCAAGCAG	
		901	950
full	(901)	CCGAAGATAGCTGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCGACGG	
meture	(874)	CCGAAGATAGCTGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCGACGG	
Pyrosequencing	(901)	CCGAAGATAGCTGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCGACGG	
Consensus	(901)	CCGAAGATAGCTGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCGACGG	

ภาพที่ 4.11 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing และจากการโคลนเข้า

pTZ57R/T แบบ full-length gene (CelF4) และแบบ mature gene (CelM4) ที่ฟ้าทับบน

อักษรแสดงบริเวณที่เป็น signal peptide และสีเหลืองแสดงความเหมือนกันกับลำดับนิว

คลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการวิจัยเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่ในเชิงพาณิชย์ การนำ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		951	1000
full	(951)	TTCTTCCCCTCTCTGCCTGTATTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGC	
meture	(924)	TTCTTCCCCTCTCTGCCTGTATTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGC	
Pyrosequencing	(951)	TTCTTCCCCTCTCTGCCTGTATTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGC	
Consensus	(951)	TTCTTCCCCTCTCTGCCTGTATTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGC	
		1001	1050
full	(1001)	TCATCAATGCCTACTACGGCACTACCAAGGGGTATCAGTTTCCCTCGACT	
meture	(974)	TCATCAATGCCTACTACGGCACTACCAAGGGGTATCAGTTTCCCTCGACT	
Pyrosequencing	(1001)	TCATCAATGCCTACTACGGCACTACCAAGGGGTATCAGTTTCCCTCGACT	
Consensus	(1001)	TCATCAATGCCTACTACGGCACTACCAAGGGGTATCAGTTTCCCTCGACT	
		1051	1100
full	(1051)	TCAACCACTGAAATCATTACACCGTGAAATACAATGATGAGTGGTCTGA	
meture	(1024)	TCAACCACTGAAATCATTACACCGTGAAATACAATGATGAGTGGTCTGA	
Pyrosequencing	(1051)	TCAACCACTGAAATCATTACACCGTGAAATACAATGATGAGTGGTCTGA	
Consensus	(1051)	TCAACCACTGAAATCATTACACCGTGAAATACAATGATGAGTGGTCTGA	
		1101	1150
full	(1101)	GGCCTTCTCTTCGGAGATTGGAACCGTACGGCCGTGAAACTGAGCGACT	
meture	(1074)	GGCCTTCTCTTCGGAGATTGGAACCGTACGGCCGTGAAACTGAGCGACT	
Pyrosequencing	(1101)	GGCCTTCTCTTCGGAGATTGGAACCGTACGGCCGTGAAACTGAGCGACT	
Consensus	(1101)	GGCCTTCTCTTCGGAGATTGGAACCGTACGGCCGTGAAACTGAGCGACT	
		1151	1200
full	(1151)	ATAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAGCTATGCCGGCAAACCTG	
meture	(1124)	ATAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAGCTATGCCGGCAAACCTG	
Pyrosequencing	(1151)	ATAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAGCTATGCCGGCAAACCTG	
Consensus	(1151)	ATAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAGCTATGCCGGCAAACCTG	
		1201	1250
full	(1201)	CAGATAAAAAGTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCAAAGAGCA	
meture	(1174)	CAGATAAAAAGTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCAAAGAGCA	
Pyrosequencing	(1201)	CAGATAAAAAGTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCAAAGAGCA	
Consensus	(1201)	CAGATAAAAAGTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCAAAGAGCA	
		1251	1300
full	(1251)	GTATATTCCATTGACTTCCGGTTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGG	
meture	(1224)	GTATATTCCATTGACTTCCGGTTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGG	
Pyrosequencing	(1251)	GTATATTCCATTGACTTCCGGTTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGG	
Consensus	(1251)	GTATATTCCATTGACTTCCGGTTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGG	
		1301	1350
full	(1301)	CTGCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGGGCATCACACTACAGACCTTTTCC	
meture	(1274)	CTGCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGGGCATCACACTACAGACCTTTTCC	
Pyrosequencing	(1301)	CTGCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGGGCATCACACTACAGACCTTTTCC	
Consensus	(1301)	CTGCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGGGCATCACACTACAGACCTTTTCC	
		1351	1400
full	(1351)	GGTGCCTGACGGCCAAAGGTGAAGAAAAGCCACCTCATCAAGGCTGACGG	
meture	(1324)	GGTGCCTGACGGCCAAAGGTGAAGAAAAGCCACCTCATCAAGGCTGACGG	
Pyrosequencing	(1351)	GGTGCCTGACGGCCAAAGGTGAAGAAAAGCCACCTCATCAAGGCTGACGG	
Consensus	(1351)	GGTGCCTGACGGCCAAAGGTGAAGAAAAGCCACCTCATCAAGGCTGACGG	
		1401	1450
full	(1401)	TTCAGAGACCAACCTGACCGTAACGGCAGCCTGGGGTTGCCAAGTGAGCC	
meture	(1374)	TTCAGAGACCAACCTGACCGTAACGGCAGCCTGGGGTTGCCAAGTGAGCC	
Pyrosequencing	(1401)	TTCAGAGACCAACCTGACCGTAACGGCAGCCTGGGGTTGCCAAGTGAGCC	
Consensus	(1401)	TTCAGAGACCAACCTGACCGTAACGGCAGCCTGGGGTTGCCAAGTGAGCC	

ภาพที่ 4.11 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing และจากการโคลนเข้า pTZ57R/T แบบ full-length gene (CelF4) และแบบ mature gene (CelM4) สีฟ้าทับบนอักษรแสดงบริเวณที่เป็น signal peptide และสีเหลืองแสดงความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนนั้นเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		1451		1500
full	(1451)	AGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAAAAGCCACGCAGACCGAGGGG		
meture	(1424)	AGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAAAAGCCACGCAGACCGAGGGG		
Pyrosequencing	(1451)	AGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAAAAGCCACGCAGACCGAGGGG		
Consensus	(1451)	AGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAAAAGCCACGCAGACCGAGGGG		
		1501		1550
full	(1501)	GCCGCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCTCAAAAAGGCAT		
meture	(1474)	GCCGCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCTCAAAAAGGCAT		
Pyrosequencing	(1501)	GCCGCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCTCAAAAAGGCAT		
Consensus	(1501)	GCCGCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCTCAAAAAGGCAT		
		1551		1587
full	(1551)	CTACATCCAAGACGGTAAGAAATACATCGTCAAAATAA		
meture	(1524)	CTACATCCAAGACGGTAAGAAATACATCGTCAAAATAA		
Pyrosequencing	(1551)	CTACATCCAAGACGGTAAGAAATACATCGTCAAAATAA		
Consensus	(1551)	CTACATCCAAGACGGTAAGAAATACATCGTCAAAATAA		

ภาพที่ 4.11 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing และจากการโคลนเข้า pTZ57R/T แบบ full-length gene (CelF4) และแบบ mature gene (CelM4) สีฟ้าทับบนอักษรแสดงบริเวณที่เป็น signal peptide และสีเหลืองแสดงความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนนั้นเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูล pyrosequencing ทั้งหมด

4.4 ผลของการสร้างโคลนเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

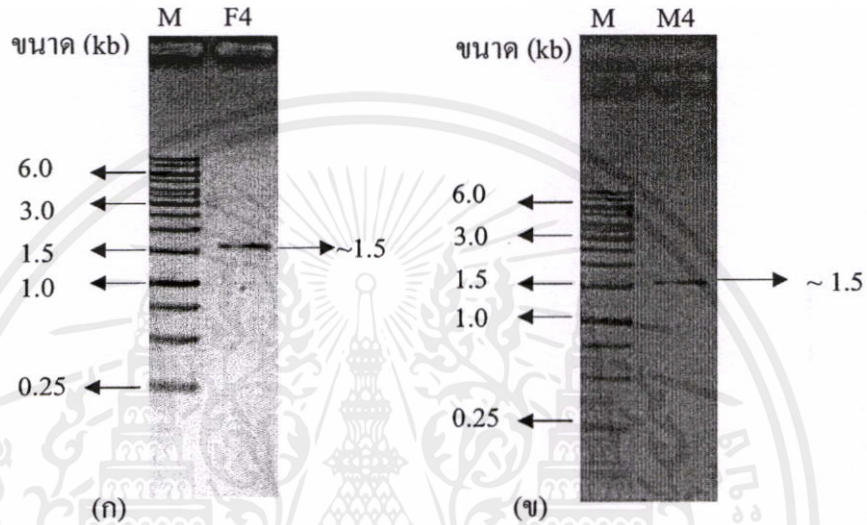
หลังจากได้ยีนเซลลูเลสที่สมบูรณ์แล้ว ทำการ โคลนเข้าเวกเตอร์ pET 28a(+) โดยมี His-Tag ต่อที่ C-terminus ของยีน CelF4 หรือ CelM4 แล้วถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta™ ซึ่งมียีน T7 gene 1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ยีน T7 gene 1 จะถ่ายถอดรหัสเป็น T7 polymerase แล้วจะไปจับ T7 promoter ของเวกเตอร์ pET28a(+) เกิดกระบวนการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.4.1 การตัดยีนออกจาก pTZ57R/T และแยกยีนให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

หลังจากตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์แบบ full-length gene และแบบ mature gene เมื่อเปรียบเทียบแล้วตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing จึงนำโคลน CelF4 และ CelM4 มาสกัดเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ BamHI และ XhoI แล้วสกัดแยกชิ้นยีนออกจากเจลโดยตัดชิ้นยีนขนาดประมาณ ~1.5 bp ทำให้บริสุทธิ์จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งใช้ 1

เอกสาร 1 kb DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 4.12) พบว่าหลังจากการตัดชิ้นยีนออกจากพลาสมิดแล้วพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งใช้ 1 ไม่ว่างรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอลูกผสมแล้วนำมาแยกยีนให้บริสุทธิ์ ทำให้ได้ชิ้นยีนที่มีขนาด ~1.5 bp (ภาพที่ 4.11ก) ของ CelF4 (ภาพที่ 4.11ข) และของ CelM4 ซึ่งขนาดของชิ้นยีนตรงกับขนาดของยีนที่ต้องการ แสดงให้เห็นว่าน่าจะเป็นชิ้นดีเอ็นเอยีนเซลล์ที่ถูกตัด จึงนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pET28a (+) เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

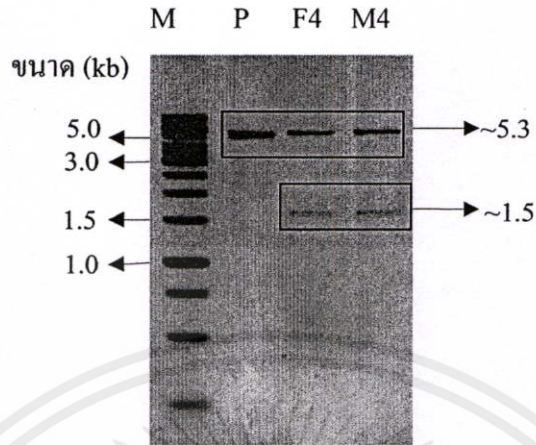


ภาพที่ 4.12 ผลการตัดชิ้นยีนออกจากเวกเตอร์ pTZ57R/T ชิ้นดีเอ็นเอขนาด ~1.5 bp ได้จากโคลน CelF4 (ก) และจากโคลน CelM4 (ข) บน 0.8% อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder)

4.4.2 ผลของการตรวจสอบการโคลนชิ้นยีนเข้าสู่ pET28a (+)

หลังจากนำชิ้นยีนแยกให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจลแล้วโคลนเข้า pET28a (+) จากนั้นถ่ายเข้า *E. coli* DH5 α แล้วสุ่มเลือกโคลนที่ได้จากการถ่ายถอดชิ้นยีนมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I เปรียบเทียบผลที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 1 kb DNA ladder ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่อะกาโรสเจล วิเคราะห์เจลด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพที่ 4.13) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ ขนาด ~5.3 bp ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pET28a (+) และขนาด ~1.5 bp ซึ่งน่าจะเป็นชิ้นยีนเซลล์ที่ถูกตัดที่โคลนเข้าไป จึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

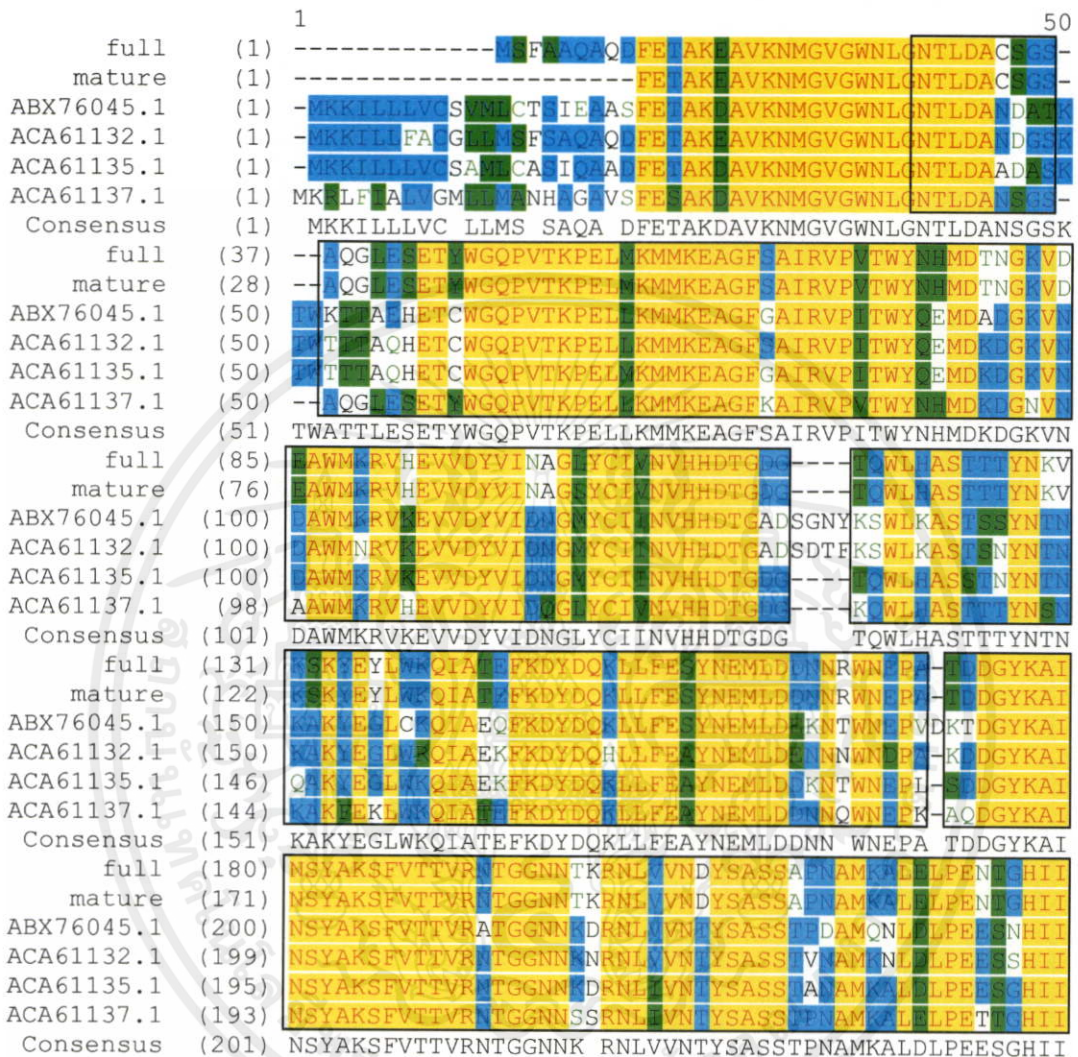


ภาพที่ 4.13 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โคลน F4 และ M4 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I บน 0.8% อะกาโรสเจล โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 ng 1 kb DNA ladder) และ Lane P คือ เวกเตอร์ pET28a (+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I ขนาด ~5.3 kb พบว่า นอกจากมีแถบดีเอ็นเอที่เท่ากับขนาดเวกเตอร์ยังมีแถบดีเอ็นเอขนาด ~1.5 kb ซึ่งตรงกับขนาดของยีนเซลล์ลูเลสที่โคลนเข้าไป

4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลน CelF4 และ CelM4 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter เป็นด้าน forward และไพรเมอร์ T7 reverse เป็นด้าน reverse จากนั้นนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก CelF4 และ CelM4 มีความถูกต้องและเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน CelF4 และ CelM4 ไปทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate ของ ExPASy พบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนมีความยาว 528 และ 519 กรดอะมิโน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14) นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูเลสที่รายงานในฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ ยีนเซลล์ลูเลสของ uncultured microorganism ที่แยกจากกรูเมนของโค (ABX76045) และยีนเซลล์ลูเลสของ uncultured microorganism ที่แยกจากกรูเมนของกระปือ (ACA61132, ACA61135 และ ACA61137) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล 68%, 71%, 73% และ 80% ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากโคลน CelF4 (full) และโคลน CelM4 (mature) กับจากลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ABX76045 ที่แยกได้จากรูเมนของโคนม และ ACA61132.1, ACA61135.1 และ ACA61137 ที่แยกได้จากรูเมนของกระบือ มีความคล้ายคลึงกัน 68%, 71%, 73% และ 80% ตามลำดับ บริเวณที่เป็นกรอบสีดำ คือ conserved region ของ glycoside hydrolase family 5

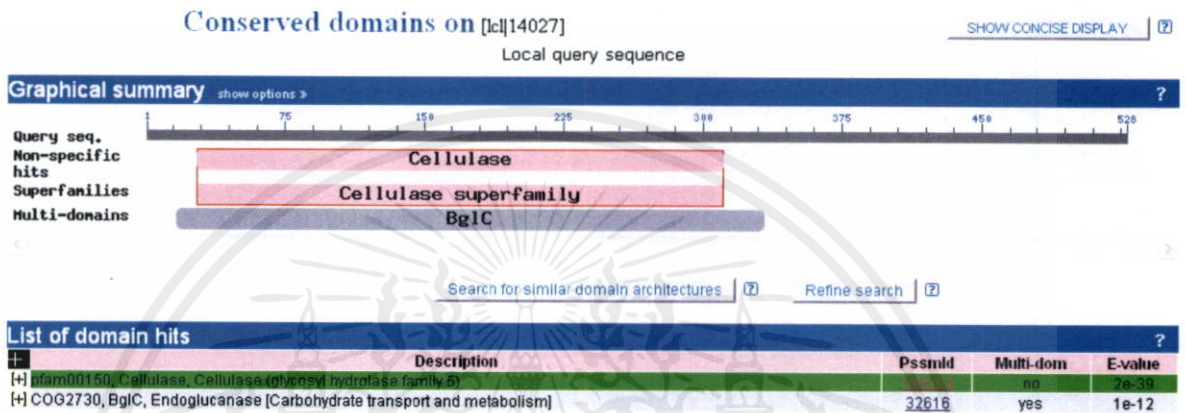
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

full	(474)	VTAAWGCIVQRI---VGIHPKATQTEG---AVYILSGQRVQNPQKGIY
mature	(465)	VTAAWGCIVQRI---VGIHPKATQTEG---AVYILSGQRVQNPQKGIY
ABX76045.1	(493)	VTAAWGCTVIAKTPPKPGIHQLKTEADGTYLQGRVQNPQKGIY
ACA61132.1	(494)	IKAWGCIVSISLSPKTSGITNQLNKRASDAIYILQGRVIAKPRKGIY
ACA61135.1	(494)	VIAAWGCIVSISL---AAPSGISLSPNKESEQIYLNGRISTPHKGIY
ACA61137.1	(492)	IKAWGCIVSISL---AIGISTAVPST---DIYDLSGRRVQNPQKGIY
Consensus	(501)	VTAAWGCEVSSSES TGIRSVKAI TEG AIYNLSGQRVQNPQKGIY
full	(519)	IQDGGKIVMK
mature	(510)	IQDGGKIVMK
ABX76045.1	(543)	IQDGGKIVMK
ACA61132.1	(544)	IQDGGKIVMAQ
ACA61135.1	(543)	IQDGGKIVMK
ACA61137.1	(537)	IKDGGKIVKQ
Consensus	(551)	IQDGGKIVMK

ภาพที่ 4.14 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากโคลน CelF4 (full) และโคลน CelM4 (mature) กับจากลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ABX76045 ที่แยกได้จากรูเมนของโคนม และ ACA61132.1, ACA61135.1 และ ACA61137 ที่แยกได้จากรูเมนของกระบือ มีความคล้ายคลึงกัน 68%, 71%, 73% และ 80% ตามลำดับ บริเวณที่เป็นกรอบสีดำ คือ conserved region ของ glycoside hydrolase family 5

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากโคลน CelF4 และ CelM4 ไปจัดกลุ่มในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม protein Blast (ภาพที่ 4.15) พบว่าเซลล์เลสที่ได้จากการทดลองนี้จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycosyl hydrolase family 5 และมี multi domain ลักษณะเดียวกับ BglC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายแบบ endoglucanase เอนไซม์กลุ่ม glycosyl hydrolase family 5 หรือเรียกอีกชื่อว่า cellulase family 5 เป็นกลุ่มเอนไซม์ β -glycohydrolase ที่ใหญ่ที่สุด ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์กว่า 60 ชนิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีลักษณะโครงสร้างแบบ (Bl)_α-fold และทำงานแบบ retention of configuration (substrate และ ผลผลิตมีโครงสร้างแบบทิศทางเดียวกัน) นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CelF4 และ CelM4 กับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลล์เลสอื่นๆ ในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 5 พบว่า CelF4 และ CelM4 มีกรดอะมิโน Asn-Glu ที่ลำดับ 158-159 ของ CelF4 ซึ่งน่าจะเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญใน catabolic domain ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลล์เลส โดย Glu ที่ตำแหน่ง 159 น่าจะทำหน้าที่เป็น protein donor นอกจากนี้ Glu ที่ตำแหน่ง 269 ก็ถูกพบทั้งใน CelM4 และเซลล์เลสอื่นๆ และน่าจะทำหน้าที่สำคัญใน catabolic domain (Sakon *et al.* 1996 and Duan *et al.* 2009) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ด้วย BlastX ไม่พบ carbohydrate binding

domain (CBD) อยู่ใน CelF4 และ CelM4 จึงเป็นไปได้ว่าไม่มี CBD โดยมีการค้นพบเซลล์ที่ไม่มี CBD อยู่บ้างและเซลล์ที่ไม่มี CBD อาจทำงานได้ดีในขบวนการฟอกสีผ้ายีนส์ที่ไม่ทำให้สีกลับเข้าไปติดผ้าอีก (Kanokratana *et al.* 2008)



ภาพที่ 4.15 ผลการจัดกลุ่มเอนไซม์จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5

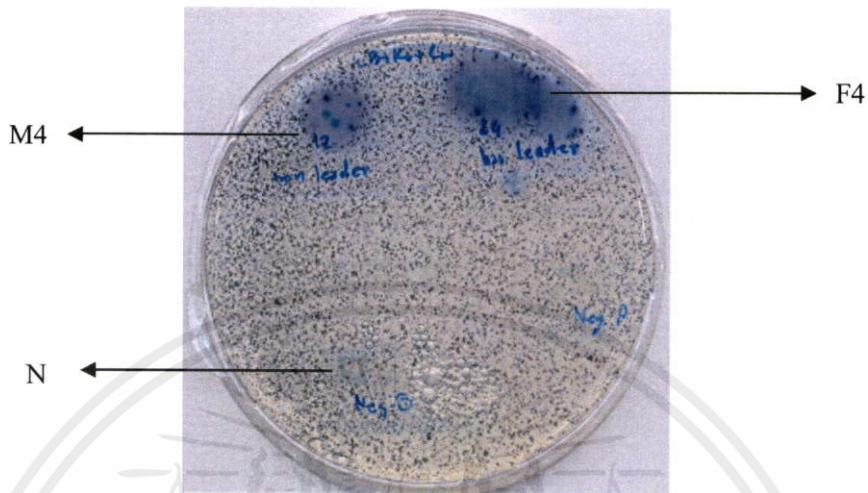
4.5 ผลของการทดสอบการแสดงออกของยีนเซลล์ลูเลส

เมื่อได้โปรตีนจากการโคลนยีนเซลล์ลูเลสเข้าสู่ pET28a (+) เวกเตอร์โดยถ่ายเข้า *E.coli* Rossetta จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วย 1.0 mM IPTG แล้วนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลล์ลูเลสและยีนย่นการแสดงออกของโปรตีน โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.5.1 ผลของการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลล์ลูเลส

หลังจาก sub-culture โคโลนีจาก master plate ของโคโลนี CelF4 และ โคโลนี CelM4 นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทดสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยวิธีเททัป (ภาพที่ 4.16) พบว่ามีโคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ลูเลสโดยมีสีฟ้าเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีทั้งโคโลนีที่ได้จาก CelF4 และ CelM4 จึงเลือกโคโลนี CelM4 มาสกัดโปรตีนเพื่อพิจารณาคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

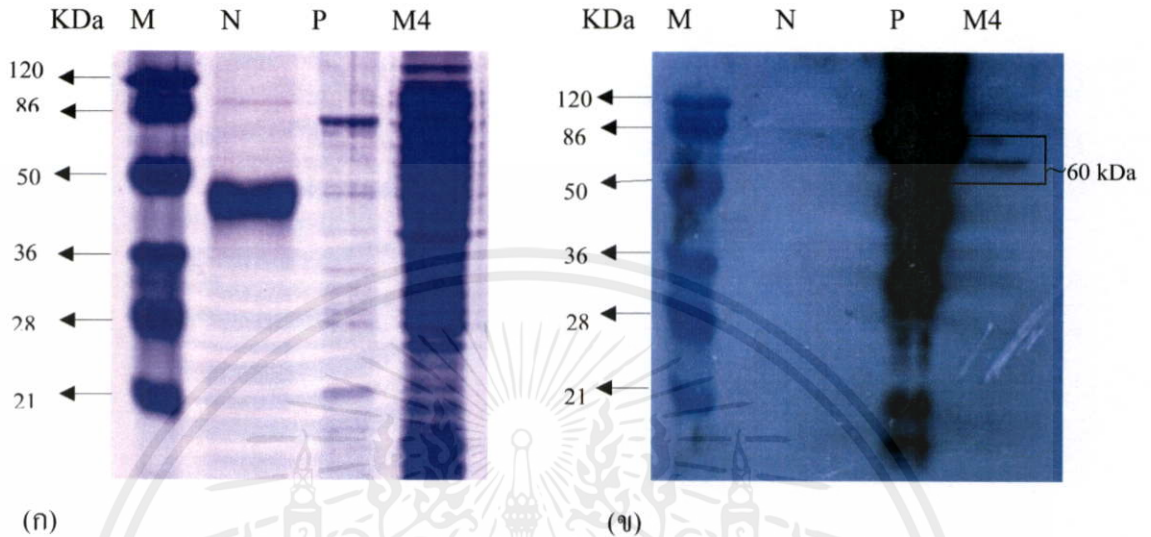


ภาพที่ 4.16 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของโคลน CelM4 และโคลน CelF4 โดยมีสีฟ้าเกิดขึ้นรอบๆ โคลนี และ N คือ โคลนที่ไม่มี insert

4.5.2 ผลของการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย western blotting

หลังจากเหนี่ยวนำโคลนด้วย 1.0 mM IPTG และสกัดโปรตีนจาก CelM4 นำโปรตีนที่ได้มาทดสอบการแสดงออกของ His-tag ด้วย western blotting เนื่องจากว่าบริเวณที่โคลนยีน CelM4 เข้าสู่ pET28a(+) นั้นโคลนให้ His-Tag ติดกับ C-terminus ของ CelM4 จึงสามารถใช้ antibody ที่จับกับ His มาจับโปรตีนกับโปรตีนได้ โดยทำตามข้อที่ 3.13.2 หลังจากประกบแผ่นฟิล์มกับ membrane แล้วนำแผ่นฟิล์มไปตากให้แห้งเมื่อวิเคราะห์ดูพบการแสดงออกของโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ pre-stained protein marker (ภาพที่ 4.17) จะเห็นการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาด ~60 kDa (น้ำหนักโปรตีนนี้รวม His-Tag ด้วย) ซึ่งเป็นน้ำหนักที่ถูกต้องตามที่คาดไว้ แสดงว่าโปรตีนเชื่อมต่อกับ His จริงซึ่งสามารถแสดงออกได้ใน *E.coli* Rosetta™ และสามารถนำโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน His-Trap affinity column ได้ซึ่ง column นี้มี nickel column มีคุณสมบัติในการจับกับโปรตีน histidine เมื่อ elute โปรตีนด้วย imidazole จะได้โปรตีนเฉพาะของเราแค่ตัวเดียว เพราะ imidazole จะไปจับ nickel column และจะไปแทนที่โปรตีนของเราให้หลุดออกมาจาก column

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

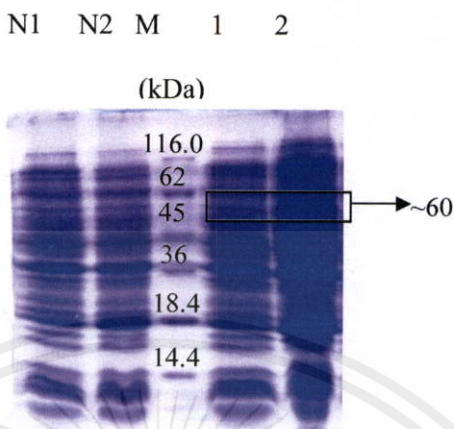


ภาพที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากโคลน CelM4 ด้วย 12% SDS-PAGE (ก) และการแสดงออกของโปรตีนที่เชื่อมกับ His-Tag หลังทำ western blot (ข) โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน pre-stain protein marker (Fermentas, U.S.A.) 10 µl Lane N คือ โปรตีนที่ไม่เชื่อมต่อกับ His-Tag Lane ปริมาณ 5 µl Lane P คือ โปรตีนที่เชื่อมต่อกับ His-Tag 15 µl และ Lane M4 คือ โปรตีนที่สกัดจากโคลน CelM4 ปริมาณ 40 µl น้ำหนักโปรตีนที่ได้จะเท่ากับ 60.6 kDa

4.6 ผลของการเลี้ยงเซลล์แบบ large scale

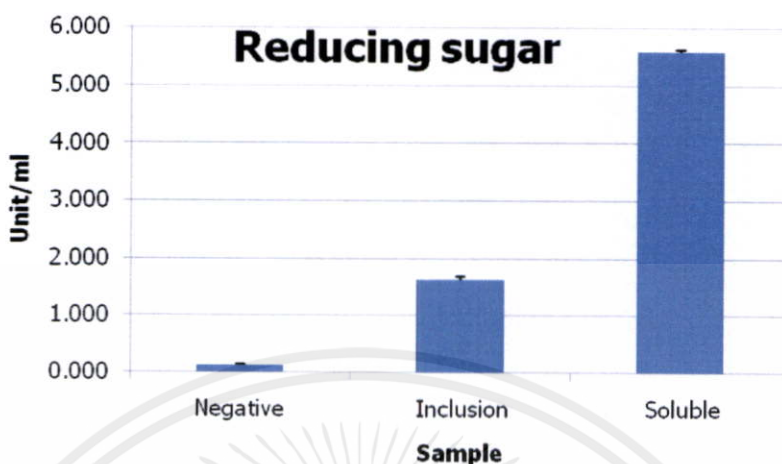
เมื่อนำโคลน CelM4 มาเลี้ยงใน flask ขนาด 2 ลิตร และเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจล 12% SDS-PAGE และเมื่อเทียบกับโปรตีนที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (ภาพที่ 4.18) พบว่าจะเห็นแถบโปรตีนที่มีขนาด ~ 60 kDa แต่หากจะพิจารณาการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ไม่สามารถพิจารณาได้แน่ชัด เนื่องจากในการโหลด โปรตีนเพื่อวิเคราะห์ด้วยเจลนั้นได้โหลดโปรตีนในปริมาณไม่เท่ากันเนื่องจากการโหลดโปรตีนที่ได้จากการโคลน Cel4 และเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG มีการฟุ้งของสีจึงต้องโหลดโปรตีนเพิ่มลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 โปรตีนที่สกัดจากการเลี้ยงโคลนแบบ large scale บน 12% SDS-PAGE โดย Lane N1 คือ โปรตีนจากโคลน pET28a(+) 15 μ l ที่ไม่เหนี่ยวนำ Lane N2 คือ โปรตีนจากโคลน pET28a(+) ที่เหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG ปริมาณ 15 μ l Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน unstained protein marker (Fermentas, U.S.A.) ปริมาณ 5 μ l Lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน CelM4 ที่ไม่เหนี่ยวนำ ปริมาณ 15 μ l และ Lane 2 คือ โปรตีนโคลน CelM4 ที่เหนี่ยวนำ ด้วย 1.0 mM IPTG ปริมาณ 40 μ l

และนอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่สกัดได้ว่าอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) หรือส่วนที่ละลายน้ำ (soluble) โดยการนำโปรตีนที่สกัดได้มาทดสอบการย่อย สับสเตรท คือ 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยวิธี DNS ตามข้อ 3.16 (ภาพที่ 4.19) ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ ได้จากการนำส่วน inclusion และส่วน soluble จากโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า ส่วน soluble มีปริมาณ น้ำตาลกลูโคสมากกว่าส่วน inclusion แสดงว่าโปรตีนที่สกัดได้นั้นอยู่ในส่วนที่เป็น soluble มากกว่า inclusion body



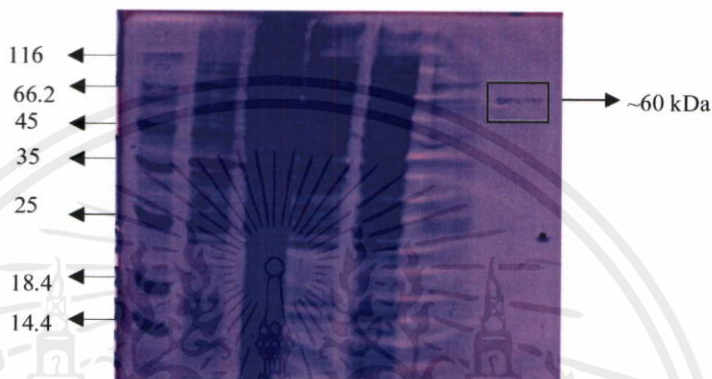
ภาพที่ 4.19 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดสอบการย่อยสลายของโปรตีนที่สกัดได้ในรูป inclusion และ soluble ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการโคลน CelM4 จะอยู่ในรูปของ soluble

4.7 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์

หลังจากเลี้ยงเซลล์แบบ large scale แล้วสกัดได้โปรตีนของ โคลน CelM4 จากนั้นทำให้มีความเข้มข้นขึ้นโดยใช้ Amicon Ultrafiltration Unit แล้วนำโปรตีนผ่านลงใน His-Trap affinity column ที่มี Nickel(II)sulfate เนื่องจากโคลนของ CelM4 เชื่อมต่อกับโปรตีน His-Tag อยู่จึงสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap affinity column โดย elute โปรตีนใน column ด้วย imidazole แล้วนำโปรตีนมาวิเคราะห์ด้วยเจล 12% SDS-PAGE และเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 4.20) พบว่าโปรตีน CelM4 ที่เชื่อมต่อกับ His-Tag อยู่จะหลุดด้วย elution buffer 2 ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 0.5 M NaCl และ 200 mM imidazole และด้วย elution buffer 1 (ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนกับ elution buffer 2 แต่ต่างตรงใช้ 100 mM imidazole) แต่โปรตีนที่หลุดด้วย elution buffer 1 มีหลายชนิดไม่บริสุทธิ์จึงไม่นำมาใช้ต่อ ส่วนโปรตีนที่หลุดจาก column ด้วย elution buffer 2 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จะเห็นว่าได้โปรตีนแถบเดียวค่อนข้างบริสุทธิ์ มีขนาด ~60 kDa ตามที่คาดไว้ จึงคิดว่าจะได้โปรตีนที่มาจากโคลนยีน CelM4 เข้าไปเพียงโปรตีนเดียว โดยไม่มีโปรตีนที่หลงเหลือมาจาก *E.coli* หรือมีเหลือน้อยมากจึงทำให้นำโปรตีนที่ได้จากการ elute ด้วย elution buffer 2 ไปทดสอบคุณสมบัติเอนไซม์ต่อไป และเมื่อวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนมีความเข้มข้น 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานในการวัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 1-6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ จากการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย His-Trap affinity column แต่จากภาพที่ 4.20 จะพบว่าในช่วงที่ทำการไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

wash column นั้นมีโปรตีนหลุดออกมาเยอะ ซึ่งอาจเป็นเพราะรีบ wash column มากเกินไป ซึ่งควรจะใช้ความเร็วประมาณ 1 min/1 ml แต่สามารถนำโปรตีนที่หลุดออกมาจากการ wash มาผ่าน column อีกครั้งได้

kDa M N 1 2 3 4 5



ภาพที่ 4.20 ผลของการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่าน His-Trap affinity column บน 12% SDS-PAGE ซึ่ง Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน unstained protein marker (Fermentas, U.S.A.) 10 μ l Lane N คือ โปรตีนจากโคลน pET28a (+) 15 μ l Lane 1 คือ โปรตีน CelM4 ก่อนทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 15 μ l Lane 2 คือ โปรตีนที่ไม่จับ column ปริมาณ 15 μ l Lane 3 คือ โปรตีนที่ล้างผ่าน column ปริมาณ 15 μ l Lane 4 คือ โปรตีนที่ชะด้วย elution buffer 1 ผ่าน column ปริมาณ 15 μ l และ Lane 5 คือ โปรตีนที่ชะด้วย elution buffer 2 ผ่าน column ปริมาณ 40 μ l ซึ่งโปรตีนที่มีการเชื่อมต่อกับ His-Tag หลุดออกมาใน elution buffer 2

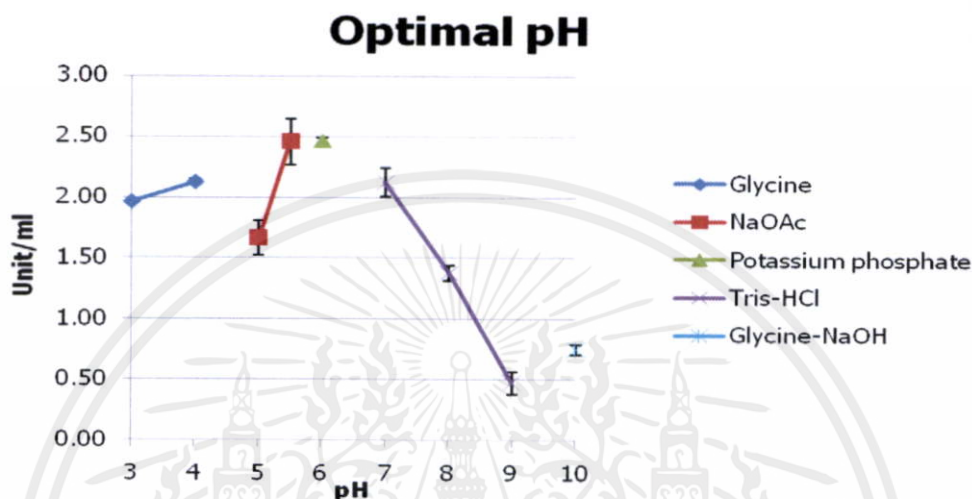
4.8 ผลของการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ (enzyme characterization)

4.8.1 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำโปรตีนจากโคลน CelM4 มาทดสอบการทำงานโดยใช้สับสเตรท คือ 1% CMC (carboxymethyl cellulose) ในสารละลายที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3.0-10.0 จากนั้นนำปฏิกิริยามาบ่มที่อุณหภูมิ 50°C แล้วนำน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยามาวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 540 nm (ภาพที่ 4.21) พบว่าเอนไซม์เซลล์ลีสจากโคลน CelM4 สามารถทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกรดหรือกลาง (3-7) ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.5 โดยให้น้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดคือ 2.46 ± 0.19 Unit/ml และทำงานได้ไม่ดีเมื่อสับสเตรทอยู่ในสารละลายที่เป็นด่าง เนื่องจากว่าเอนไซม์เซลล์ลีสนั้นสามารถทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสถานะที่เป็นกรดได้ตั้งแต่ pH 2.0-6.0 (Gao *et al.* 2008; Koga *et al.* 2008; Ren *et al.* 2007; Bischoff *et al.* 2006; Lima *et al.* 2005; Kalra *et al.* 1986 and Lee *et al.* 1985)

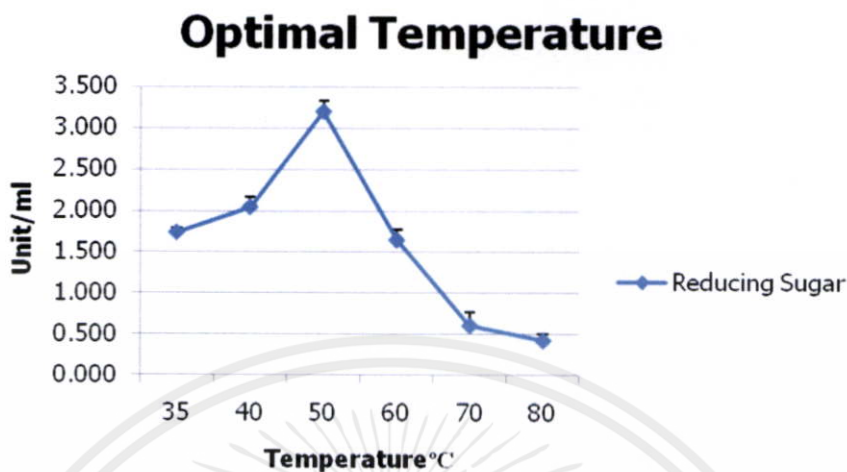


ภาพที่ 4.21 ผลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CelM4 ที่ pH 3-10 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ 1% CMC เป็นสับสเตรท ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ pH 5.5 ได้ ปริมาณกลูโคส 2.46 ± 0.19 Unit/ml

4.8.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำโปรตีนจากโคลน CelM4 มาทดสอบการทำงานโดยใช้สับสเตรท 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 ใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยา 30 นาที โดยการบ่มปฏิกิริยาตั้งแต่ 35°C-80°C หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ได้ด้วยวิธี DNS เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ได้ (ภาพที่ 4.22) พบว่าเอนไซม์เริ่มทำงานที่อุณหภูมิ 35°C จนถึง 50°C ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C มากที่สุดโดยให้น้ำตาลกลูโคสสูง คือ 3.2 ± 0.13 Unit/ml เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มปฏิกิริยาสูงมากกว่า 60°C พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และลดลงต่ำสุดที่อุณหภูมิ 80°C ซึ่งในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 30°C-65°C (Gao *et al.* 2008; Koga *et al.* 2008; Bischoff *et al.* 2006; Lima *et al.* 2005 and Kalra *et al.* 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

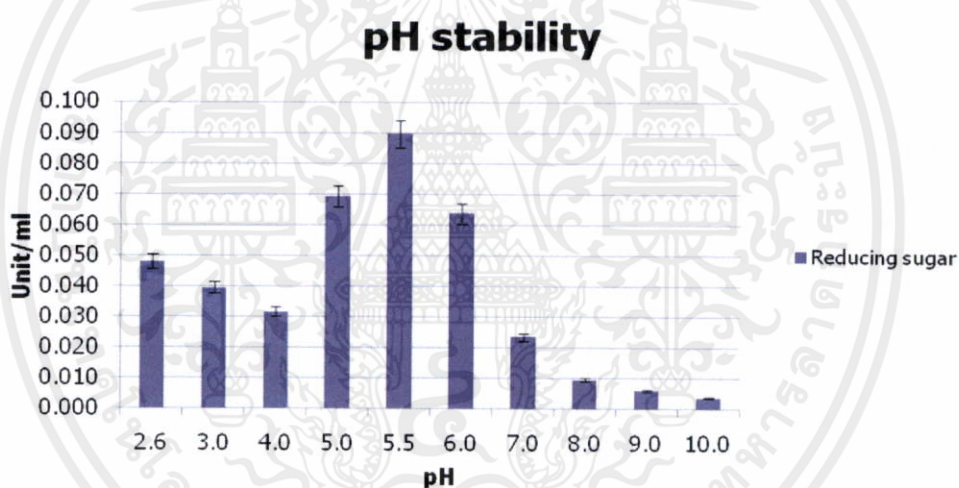


ภาพที่ 4.22 ผลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CelM4 ที่อุณหภูมิ 35°C-80°C โดยใช้ 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50°C โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส คือ 3.2 ± 0.13 Unit/ml และทำงานลดลงตั้งแต่ 60°C-80°C

4.8.3 ความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์

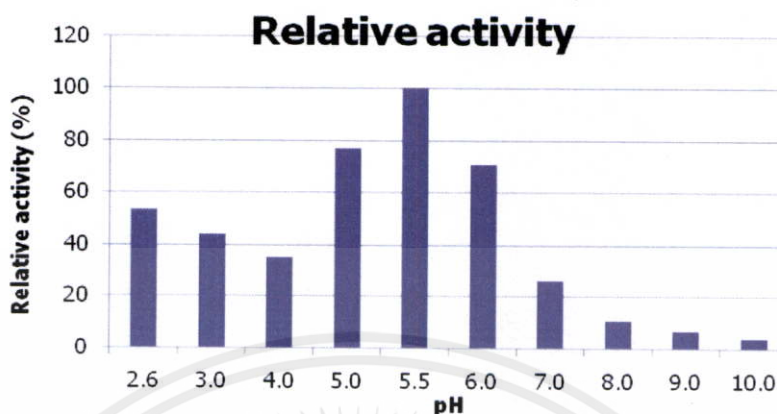
เมื่อนำโปรตีนจากโคลน CelM4 มาแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาบ่มในสารละลายที่ pH 2.6-10 ในอัตราส่วน 1:3 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนที่สองนำมาผสมกับสารละลายที่ pH 2.6-10 ปริมาตร 24.6 μ l โดยปริมาตรของเอนไซม์ 13.4 μ l แล้วนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ทันที จากนั้นนำเอนไซม์มาทดสอบการย่อย 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยา โดยนำปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายหักจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่บ่มในสารละลาย (ภาพ 4.23) พบว่า เอนไซม์จากโคลน CelM4 สามารถย่อยสลาย CMC ได้ในสภาวะที่เป็นกรดตั้งแต่ pH 2.6 จนถึง pH 5.0 ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC เพิ่มขึ้นที่ pH 5.5 โดยปริมาณกลูโคสที่ได้มีค่าประมาณ 0.09 ± 0.01 Unit/ml และประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC ลดลง เมื่อผสมเอนไซม์ในสารละลายที่มี pH 6.0-10 ขณะที่ในสารละลาย pH 9 และ 10 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย CMC ต่ำมาก โดยระยะเวลาของการบ่มโปรตีนในสารละลายที่ค่า pH ต่างๆ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ (ภาพที่ 4.24) ซึ่งค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) ของการทำงานของเอนไซม์ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดต่างมีค่า 100%, 77%, 71% และ

54% ที่ pH 5.5, 5.0, 6.0 และ 2.6 ตามลำดับ ดังนั้น อาจสรุปได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CeIM4 สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี และไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นด่างได้ ซึ่งความสามารถในการทนกรด-ด่างของเอนไซม์เซลลูเลส จะสามารถทนได้ที่ pH 2.0-6.0 เป็นเวลา 20-30 นาที (Gao *et al.* 2008; Bischoff *et al.* 2006; Lima *et al.* 2005; Kalra *et al.* 1986 and Lee *et al.* 1985) จะเห็นว่าจากการที่ CeIM4 ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรดหรือกลาง (3-7) และมีความสามารถในการทนกรด (2.6-6) น่าจะทำให้ CeIM4 มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ผสมกับอาหารสัตว์ เพื่อให้สัตว์ได้รับสารอาหารมากขึ้นในกระเพาะรูเมนซึ่งมี pH อยู่ประมาณ 4-7 นอกจากนี้ยังสามารถใช้ CeIM4 ในการฟอกสีผ้า และในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ซึ่งมี pH ค่อนข้างเป็นกรดในกระบวนการผลิต



ภาพที่ 4.23 ความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CeIM4 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการผสมเอนไซม์กับสารละลาย pH 2.6-10.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง นำมาทดสอบการย่อย 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 ซึ่งเอนไซม์สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ ตั้งแต่ pH 2.6-6.0 โดยสามารถทนที่ค่า pH 5.5 ได้มากที่สุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.09 ± 0.01 Unit/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.24 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของการทำงานของเอนไซม์จากการผสมเอนไซม์กับสารละลาย pH 2.6-10.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง นำมาทดสอบการย่อย 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 สามารถทนที่ค่า pH 5.5 ได้มากที่สุดรองลงมา คือ 5.0, 6.0 และ 2.6

4.8.4 ความสามารถในการทนความร้อนเอนไซม์

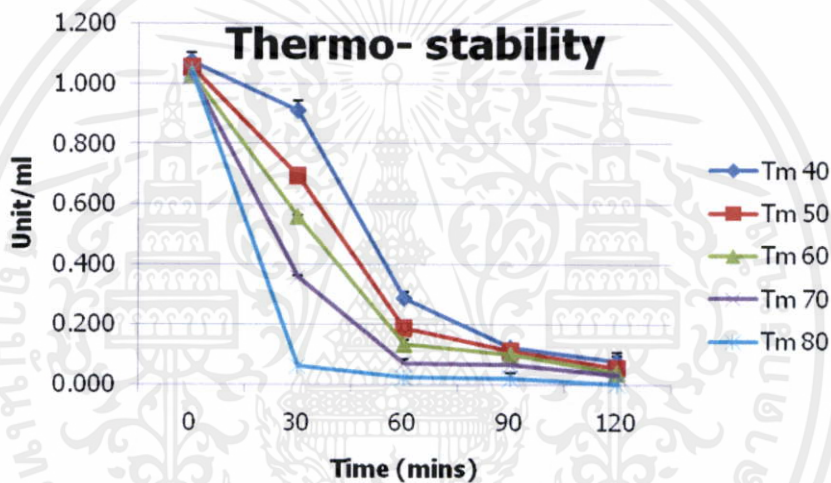
เมื่อนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40°C –80°C เป็นเวลาดังแต่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ก่อนนำมาทดสอบการย่อยสลาย 1% ของ CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc ที่ pH 5.5 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาหลังจากที่บ่มเอนไซม์เซลล์ลูเลสที่อุณหภูมิต่างกัน (ภาพที่ 4.25) พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีก่อนบ่มโดยวัดค่าปริมาณกลูโคสได้ประมาณ 1.05 ± 0.03 Unit/ml (ภาพที่ 4.26) ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์ก่อนบ่มเท่ากับ 100%

เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ 40°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนจะนำเอนไซม์มาบ่ม หลังจากเวลาผ่านไป 60, 90 และ 120 นาที พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC เริ่มลดลง โดยวัดค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ ดังนี้ 0.29 ± 0.02 , 0.13 ± 0.00 และ 0.08 ± 0.03 Unit/ml ตามลำดับ และค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที เท่ากับ 85%, 27%, 12% และ 7% ตามลำดับ

เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงโดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.69 ± 0.01 Unit/ml และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่เวลา 60-120 นาที พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC ของเอนไซม์ลดลงมากตามลำดับ และค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที มีค่าเท่ากับ 66%, 18%, 11% และ 5% ตามลำดับ

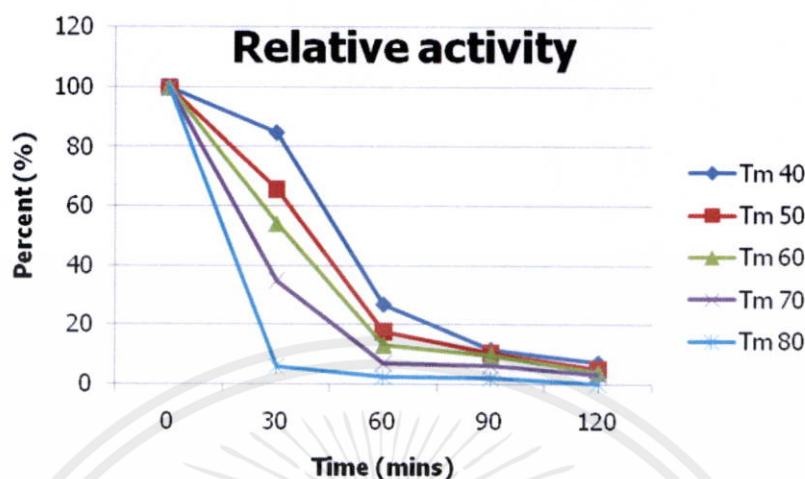
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทางสงวน อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60°C, 70°C และ 80°C เป็นเวลา 30-120 นาที พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย CMC ลดต่ำลงมาก แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จากโคลน CeIM4 ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C-80°C ในการทำงานของเอนไซม์เซลล์เหล่านั้นสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 30°C-40°C เป็นเวลา 30-40 นาที และทำงานได้ไม่ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 60°C ขึ้นไป เนื่องจากว่าคุณสมบัติของเอนไซม์เซลล์เหล่านั้นไม่สามารถทนความร้อนได้มาก (Kalra *et al.* 1986 and Eriksen and Goksoyr. 1976) เอนไซม์ CeIM4 จึงเหมาะกับการใช้กระบวนการอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนต่ำกว่า 60°C



ภาพที่ 4.25 ความสามารถในการทนความร้อนของเอนไซม์เซลลูเลสจากโคลน CeIM4 เส้นกราฟแสดงอุณหภูมิของการบ่มเอนไซม์ตั้งแต่ 40°C-80 °C ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบการย่อย 1% CMC ในสารละลาย 0.2 M NaOAc ที่ pH 5.5 ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยสลายได้หลังจากที่ถูกบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที และประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงเมื่อบ่มเอนไซม์นานขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

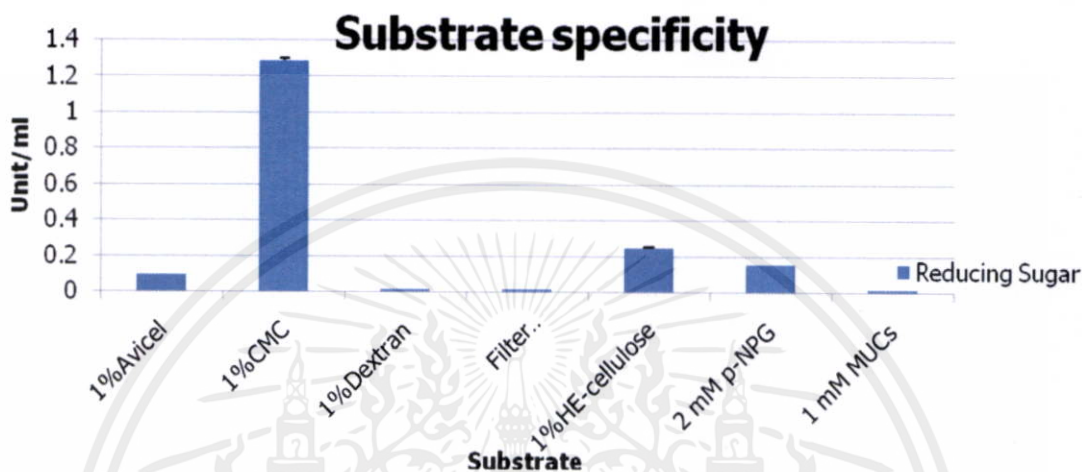


ภาพที่ 4.26 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของการทำงานเอนไซม์ในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิของการบ่มเอนไซม์ตั้งแต่ 40°C-80°C ตามลำดับ เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ยังสามารถย่อยสลายได้คิดเป็น 85%

4.8.5 ผลของการวิเคราะห์การย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส

สับสเตรทที่ใช้วิเคราะห์ ได้แก่ 1% avicel, 1% CMC, 1% dextran, 1% HE-Cellulose, 2 mM p-NP-β-D-glucopyranoside (p-NPG), 1 mM MUC (4-methylumbelliferyl-β-D-cellobioside) และกระดาษกรอง (Whatman no.1) ปริมาณ 11.36 mg ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNS แล้วนำไปวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm แต่ในการวัด MUC นั้นจะใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 355 nm จากการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเทียบผลการวิเคราะห์น้ำตาลกับโปรตีนที่สกัดจากโคลนที่ไม่มี insert (negative control) (ภาพที่ 4.27) พบว่าเอนไซม์จากโคลน CelM4 สามารถย่อยสลายสับสเตรท CMC ได้ดีที่สุด และย่อย HE-Cellulose ได้ด้วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 1.49 ± 0.07 และ 0.24 ± 0.02 Unit/ml ตามลำดับ การที่เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการโคลน CelM4 สามารถย่อยสลายสับสเตรท CMC และ HE-Cellulose ได้ แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม endoglucanase จึงย่อยสลายสับสเตรทอื่นได้เล็กน้อยหรือไม่ได้เลย เช่น p-NPG ต้องใช้เอนไซม์ β-glucosidase, avicel ใช้ endoglucanase และ exoglucanase, dextran ใช้ dextrinase, MUC ที่ต้องใช้เอนไซม์ใน exoglucanase ในการย่อย และกระดาษกรองใช้เอนไซม์ 2 ชนิดทำงานร่วมกัน คือ endoglucanase และ exoglucanase ในการย่อย (Han *et al.*, 1995) ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่มีการย่อยสลายสับสเตรทแบบ endoglucanase จะสามารถย่อยสลายสับสเตรท ดังต่อไปนี้ acid-swollen cellulose, pNPC,

carboxymethylcellulose, hydroxyethylcellulose, barley β -glucan และ lichenan (Bischoff *et al.* 2006; Bhat and Bhat. 1997; Kim *et al.* 1992 and Lee *et al.* 1985)



ภาพที่ 4.27 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการทำปฏิกิริยาการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆของเอนไซม์ที่ได้จากโคลน CelM4 ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อย CMC, HE-Cellulose, p-NPG และ avicel ตามลำดับ โดยสามารถย่อย CMC ได้ดีที่สุด

4.9 ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการพิจารณาผลของการย่อยสับสเตรทจึงเลือกสับสเตรท 2 ชนิด ได้แก่ CMC และ HE-Cellulose มาวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ปริมาณสับสเตรท ดังนี้ CMC ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.2, 0.3, 0.6, 1.0, 2.0 และ 3.0 mg/ml และ HE-Cellulose ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 mg/ml ในการวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์จะใช้ทฤษฎีของ Lineweaver-Burk และคำนวณโดยใช้สูตรของ Michaelis-Menten ในการวิเคราะห์ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์จะใช้วิธี DNS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ โดยสับสเตรทจะอยู่ในสารละลาย 0.2 M NaOAc pH 5.5 จากนั้นนำค่าที่ได้จากปริมาณน้ำตาลกลูโคสเข้าโปรแกรม Kaleida Graph software package (Synergy Software, USA) พบว่าค่า V_{max} และ K_m เมื่อใช้สับสเตรท CMC มีค่า V_{max} เท่ากับ 2.94 ± 0.21 $\mu\text{mole/mg protein}$ และ K_m เท่ากับ 1.89 ± 0.25 mM และ ค่า V_{max} และ K_m ของสับสเตรท HE-Cellulose มีค่า V_{max} เท่ากับ 0.52 ± 0.06 $\mu\text{mole/mg protein}$ และ K_m เท่ากับ 1.45 ± 0.46 mM ซึ่งค่า V_{max} บ่งบอกถึงอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา เมื่อเปรียบเทียบกับค่า V_{max} ระหว่างสับสเตรท

CMC และ HE-Cellulose พบว่าในโปรตีน 1 mg เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรท CMC เท่ากับ 2.94 μmole ซึ่งมีค่ามากกว่าโปรตีน 1 mg ที่เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรท HE-Cellulose มีค่าเท่ากับ 0.52 μmole และค่า K_m บ่งบอกถึงค่าคงที่ของค่าความเข้มข้นของสับสเตรทเมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด และบ่งบอกความสามารถของเอนไซม์ในการเข้าจับสับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบค่า K_m ระหว่างสับสเตรท CMC และ HE-Cellulose พบว่าที่ความเร็วครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุดในปฏิกิริยาความเข้มข้นของสับสเตรท CMC ที่ใช้เท่ากับ 1.89 mM ซึ่งมากกว่าสับสเตรท HE-Cellulose ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.45 mM หมายความว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน CelM4 ชอบจับกับสับสเตรท HE-cellulose มากกว่า CMC เนื่องจากว่าปริมาณความเข้มข้นของ HE-cellulose ที่เอนไซม์เข้าจับนั้นมีค่าน้อยกว่า CMC ซึ่งค่า K_m ของเอนไซม์ endoglucanase ที่ได้จากแบคทีเรียเมื่อย่อยสับสเตรท CMC จะมีค่า 1.8 mM (Epygen biotech industrial. nd.) Chinedu *et al.* 2008 กล่าวว่า *Penicillium chrysogenum* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีคุณสมบัติดีที่สุดซึ่งมีค่า V_{max} เมื่อย่อยสับสเตรท CMC เท่ากับ $10.0 \pm 0.4 \mu\text{mole min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ และค่า K_m $11.8 \pm 0.4 \text{ gL}^{-1}$ เมื่อเปรียบเทียบค่า V_{max} พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน CelM4 น้อยกว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *P. chrysogenum* แสดงว่าเอนไซม์จาก CelM4 มีคุณสมบัติในการเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่มีความเร็วต่ำกว่า เอนไซม์ที่ได้จาก *P. chrysogenum* และค่า K_m เมื่อเปรียบเทียบที่หน่วยเท่ากัน พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *P. chrysogenum* นั้นสามารถเข้าจับ CMC ที่ปริมาณความเข้มข้นที่น้อยกว่า

ตารางที่ 4.1 ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสโคลน CelM4

สับสเตรท	V_{max} ($\mu\text{mole}/\text{mg}$)	K_m (mM)
CMC	2.94 \pm 0.21	1.89 \pm 0.25
HE-Cellulose	0.52 \pm 0.06	1.45 \pm 0.46

เห็นได้ว่า CelM4 มีความสามารถในการย่อย CMC ได้เร็วกว่า HE-cellulose แต่มีความสามารถในการจับกับ CMC และ HE-cellulose ได้พอกัน (โดยที่ค่า K_m ใกล้เคียงกัน) นอกจากนี้ค่า V_{max} ของ CelM4 กับ CMC ยังอยู่ในช่วงของค่า V_{max} ของเซลลูเลสอื่นๆ ในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 5 ที่มี

ในฐานข้อมูล (Duan *et al.* 2009) โดยที่ค่า V_{max} ของ CelM4 อาจถือว่าไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเซลลูเลสอื่นๆ ที่มีกิจกรรมสูงๆ อาจเนื่องจากไม่พบ Carbohydrate Binding Domain ใน CelM4 จึงทำให้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

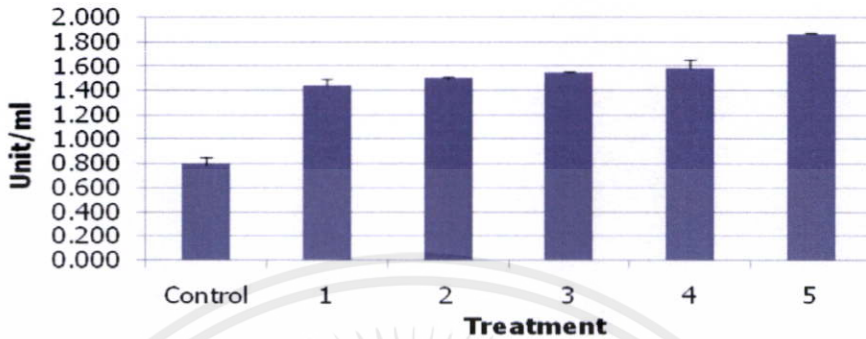
เท่าเซลล์ที่มี CBD แต่อาจจะทำให้เหมาะกับการฟอกสีผ้าโดยทำให้สีกลับมาติดผ้าได้น้อย ดังที่กล่าวมาแล้ว

4.10 ผลการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลอง

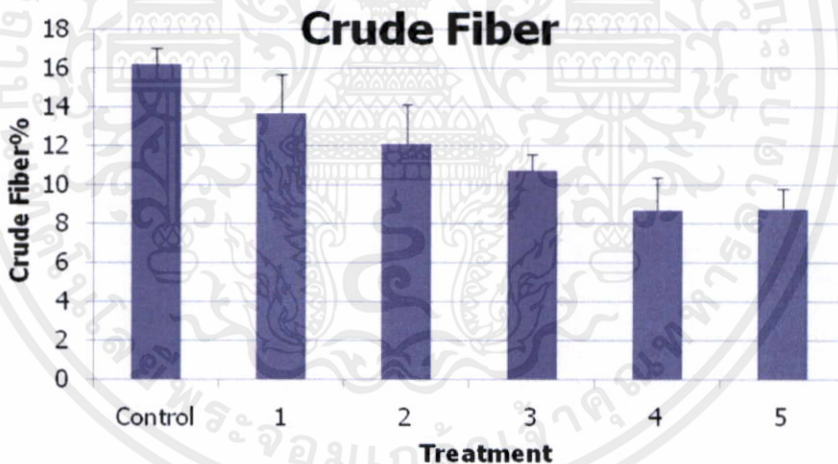
เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการทนต่อกรด-ด่างพบว่าเอนไซม์สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ หากนำเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนของ CelM4 มาผสมกับอาหารสัตว์และจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีก ประสิทธิภาพของเอนไซม์ของ CelM4 น่าจะสามารถทำงานได้ เมื่อตั้งอยู่ในกระเพาะอาหารสัตว์ที่มีความเป็นกรดสูงมาก จึงนำเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน CelM4 ผสมกับอาหารสัตว์ปีก และจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ 1, 2, 3, 4 และ 5 Unit ผสมลงในอาหารสัตว์ 2 g จากนั้นจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลองดัง 3.18 (ภาพที่ 4.28) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดลองจะพบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่ใส่เข้าไป treatment 1-5 มีค่าดังนี้ 1.40, 1.50, 1.55, 1.59 และ 1.87 Unit/ml เมื่อเปรียบเทียบกับ control คือ ไม่ผสมเอนไซม์ในอาหารสัตว์จะพบว่าน้ำตาลที่ได้เพียง 0.79 Unit/ml ซึ่งน้อยกว่าเกือบครึ่งหนึ่งของ treatment 1 และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ค่าเชื้อไขที่วิเคราะห์ได้ (ภาพที่ 4.29) พบว่า เปอร์เซ็นต์เชื้อไขที่ได้จากการทดลองลดลงตามลำดับ จาก treatment 1-5 ดังนี้ 13.73, 12.12, 10.77, 8.71 และ 8.78% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ค่าเชื้อไขของ control พบว่า 16.23% แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน CelM4 เมื่อนำมาผสมกับอาหารสัตว์สามารถย่อยพวกวัตถุดิบที่ย่อยยากได้ทำให้กากเชื้อไขในอาหารสัตว์ลดลง เอนไซม์สามารถนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อสัตว์ได้รับคุณค่าทางโภชนาจากอาหารได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reducing sugar



ภาพที่ 4.28 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีก โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการผสมเอนไซม์ตาม treatment 1-5 จะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของเอนไซม์ที่ใส่เข้าไปตามลำดับ โดยมี control คือไม่ได้ใส่เอนไซม์ลงในอาหารสัตว์



ภาพที่ 4.29 เปอร์เซนต์เชื้อใยที่ได้จากการจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีก จากการผสมเอนไซม์ตาม treatment 1-5 โดยมี control คือไม่ได้ใส่เอนไซม์ลงในอาหารสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการแนวทางในการสร้างเมทาจีโนมิกส์ไลบรารีจากจุลินทรีย์ในรูเมนของโคและกระบือ 3 แนวทาง ทำให้ได้โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซแลนเนส โดยเมทาจีโนมิกส์ไลบรารีของจุลินทรีย์ในรูเมนโคมีประสิทธิภาพจากการโคลน คือ 1.4×10^4 โคลนี แล้วเก็บโคลนใน 96 well-plate 10 โคลนต่อ 1 หลุม เมื่อนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเททัปัสเตรท คือ AZCL-Xylan พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 23 หลุม แต่เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BlastX ไม่พบความคล้ายกันของยีนไซแลนเนสในฐานข้อมูล GenBank แต่พบความคล้ายกันกับยีน hypothetical protein CLOSPI_01518 ของ *Clostridium spiroforme* DSM 1552 อยู่ 55% (ZP_02867683)

ส่วนshotgun library ที่สร้างจากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cel5) และเอนไซม์ไซแลนเนส (Xyl15) ซึ่งมาจาก fosmid library ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ มีประสิทธิภาพจากการโคลนของ Cel5 คือ 3.5×10^4 โคลนี และ Xyl15 มี 1.4×10^4 โคลนี เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติของโคลนโดยการเททัปัสเตรท คือ AZCL-HE-Cellulose และ AZCL-Xylan จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 13 โคลน และกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส จำนวน 1 โคลน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่า จากโคลน Cel5 มีความคล้ายกันกับยีน endo-1, 4- β -xylanase precursor ของ uncultured microorganism (AAS85781) จากลำไส้ของแมลง 49% แต่ไม่พบความคล้ายกันกับยีนเซลลูเลสในฐานข้อมูล และลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลน Xyl15 พบความคล้ายกันกับยีน endo-1,4- β -xylanase precursor ของ *Fibrobacter succinogenes* (YP_003250510) 94% แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน reverse ได้ เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมีขนาดใหญ่มากเกินไปที่จะวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบธรรมดา

สำหรับการแยกยีนเซลลูเลสโดยการหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ (full-length gene) จากข้อมูล pyrosequencing ที่ได้จากโคลนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการทำ fosmid library ทำให้ได้ยีน 2 แบบ คือ full-length gene (CelF4) และ mature gene (CelM4) เมื่อนำขึ้นยีนโคลนเข้า pET28a (+) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่า มีความเหมือนกับยีนเซลลูเลสของ uncultured microorganism (ACA61137) 80% และ 81% ตามลำดับ โดยยีนเซลลูเลสในฐานข้อมูลเป็นยีนที่คัดแยกได้จากจุลินทรีย์ในรูเมนของกระบือ และเมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 แบบ มาเปรียบเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูล pyrosequencing โดยใช้โปรแกรม Vector NTI จะพบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์และโคลนเข้า pET28a(+) ตรงกับข้อมูล pyrosequencing ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือ

จากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของ CelF4 และ CelM4 เพื่อจัดกลุ่มในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม protein Blast พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycosyl hydrolase family 5 และมี multi domain ลักษณะเดียวกับ BglC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายสเตรทแบบ endoglucanase และเมื่อทดสอบโคลนจาก CelF4 และ CelM4 ที่ถ่ายถอดเข้าสู่ Rosetta™ ด้วยวิธีเทป พบว่าโคลน CelM4 และ CelF4 มีการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นเลือกโคลน CelM4 มาสกัดโปรตีนเพื่อพิจารณาการแสดงออกของเอนไซม์ที่โคลน CelM4 เข้าสู่ pET28a(+) และถ่ายถอดเข้า Rosetta™

ในการทำ western blotting พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่เชื่อมกับ His-Tag เนื่องจากได้โคลนขึ้น CelM4 ตรง C-terminal ที่เชื่อมต่อกับ His-Tag ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ปรากฏว่ามีคุณสมบัติทนกรดได้ และทำงานได้ดีที่ pH 5.5 และที่อุณหภูมิ 50°C จากการทดสอบโดยใช้ 1% CMC เป็นสับสเตรท นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จาก CelM4 นั้นสามารถย่อยสลายสเตรท CMC, HE-Cellulose, p-NPG และ avicel ได้ แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม endoglucanase

เมื่อพิจารณาค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ CelM4 ของสับสเตรท CMC มีค่า V_{max} 2.94 ± 0.21 $\mu\text{mole/mg protein}$ และ K_m 1.89 ± 0.25 mM และค่าจลศาสตร์ของสับสเตรท HE-Cellulose มีค่า V_{max} 0.52 ± 0.06 $\mu\text{mole/mg protein}$ และ K_m ได้ 1.45 ± 0.46 mM สรุปได้ว่าเอนไซม์ CelM4 สามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรท CMC ได้เร็วกว่า HE-Cellulose แต่เอนไซม์ชอบเข้าจับสับสเตรทของ HE-cellulose มากกว่าเนื่องจากว่าในปริมาณความเข้มข้นของ HE-cellulose นั้นใช้ปริมาณน้อยกว่า CMC ที่เอนไซม์เข้าจับ แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน CelM4 ชอบจับ HE-cellulose มากกว่า CMC

ในปัจจุบันเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการค้าทั่วไปได้มาจาก *Trichoderma* and *Aspergillus species* ซึ่ง *P.chrysogenum* (PCL 501 สามารถผลิตเอนไซม์ 1, 4- β -endoglucanases, β -glucosidases และ xylanases ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่น แต่จาก 3 แนวทางในการสร้างเมทาจีโนมคไลบรารี่ครั้งนี้พบว่าจากการคัดแยกยีนเซลลูเลสจากข้อมูล pyrosequencing สามารถนำเอนไซม์ที่ได้จากโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส มาพัฒนาเพื่อใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมการฟอกสีผ้า หรือ ด้านอาหารสัตว์ เป็นต้น เนื่องจากว่าเอนไซม์เซลลูเลสทั่วไปมีคุณสมบัติทนกรดที่ pH 2.0-6.0 และทนความร้อนได้ 30°C–40°C เป็นเวลา 30-40 นาที ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสมีความสามารถในการทนต่อกรดได้นาน 3 ชั่วโมง ทนต่ออุณหภูมิที่ 40°C เป็นเวลา 30 นาที และสามารถย่อยสลายสเตรทแบบ endoglucanase ได้ และเมื่อนำเอนไซม์มาผสมลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสามารถเข้าถึงได้ฟรีโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสัตว์โดยจำลองการย่อยอาหารของสัตว์ปีกในหลอดทดลอง พบว่าเอนไซม์สามารถช่วยย่อยอาหารสัตว์และทนต่อสภาวะที่เป็นกรดมากในกระเพาะอาหารสัตว์ ซึ่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่ใส่เข้าไป และเชื้อยีสที่ร่างกายสัตว์ย่อยได้ยากลดลง โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จาก treatment 1-5 มีค่าดังนี้ 1.40, 1.50, 1.55, 1.59 และ 1.87 Unit/ml และเปอร์เซ็นต์เชื้อยีส 13.73, 12.12, 10.77, 8.71 และ 8.78% ตามลำดับ นอกจากนี้โคเลนของเมทาจีโนมิกไลบรารีจากจุลินทรีย์ในรูเมน โคยังสามารถหากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้หากมีสับสเตรทที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้นๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จกกลณี เขาวภาคย์โสภณ. มปป. บทที่ 1 เมตตาบอติซิมและการควบคุม. เอกสารประกอบการเรียนวิชา
ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. ขอนแก่น:
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 6. เชียงใหม่: ธนบรรณการพิมพ์.

พรรณธิพา ธงทอง. 2547. “การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.”
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มติชนออนไลน์. 2552. ใบบ่อเทกร่งลดนำเข้าเอนไซม์เพนโตซานสเลียงสัตว์. [Online]. Available :
http://www.matichon.co.th/news_detail.php?newsid=1231636103&groupid=03&catid=04..
11/11/2009

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ขอนแก่น. ฟันนี้พับลิชชิง.

รัตติยา แวนนุกูล. 2546. “การศึกษาเซลลูโลโซมจาก *Bacillus circulans* B6.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร) มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิเชียร ลีสุข. 2532. “การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus*
fuigatus Freseniuss รหัส 4-45-1F.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุทัย คันโธ. 2533. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์. สุกรสาส์น ปีที่ 17 ฉบับ 65.

Ahmadian, A., Lundeberg, J., Nyrén, P., Uhlén, M., Ronaghi, M. 2000. Analysis of the p53 tumor
suppressor gene by pyrosequencing. **Biotechniques**. 28: 140-144.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. "Basic local alignment search tool".
Journal of Molecular Biology. 215 (3): 403-410.

Anonymous. 2000. **Cellulase from *Penicillium Funiculosum***. [Online]. Available :
<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-123.pdf>, 12/06/2009

American Fiber Manufacturers Association. 1997. **Fiber source: cellulose**. [Online]. Available :

<http://www.fibersource.com/F-TUTOR/cellulose.htm#chemistry>, 15/08/2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเอาไว้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Beguín, P. and Aubert, J.P. 2000. "Cellulase." **Journal Encyclopedia of microbiology**. 744-758.
- Bendtsen JD , Nielsen H, von Heijne G and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**. 340:783-795.
- Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997. "Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications." **Biotechnology Advances**. 15: 583-620.
- Bischoff, K. M., Liu, S. Q., and Hughes, S. R. 2006. "Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361." **Process Biochemistry**. 42(7): 1150-1154.
- Brulc, J. M., Antonopoulos, D.A., Miller M.E.B., Wilsona, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Nelson, K.E., and White, Bryan A. 2007. "Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases." **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 106(6): 1948-1953.
- Bunternsook, Benjarat. 2008. "Metagenomic Library Construction and Isolation of a Novel Lipase Gene from Peat Swamp Forest Soil." Master of Science (Biotechnology). King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Chaplin, M. 2008. **Polysaccharide Structure**. [Online]. Available : <http://www.lsbu.ac.uk/bêtise/0102/www.lsbu.ac.uk/water/hypol.html>, 18/09/2009
- Chinedu, S.N., Nwinyi, C.O. and Okochi, V.I. 2008. " Properties of Endoglucanase of *Penicillium chrysogenum* PCL501." **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. 2(3): 738-746
- Church, D. C. 1969. **Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants**. Volume I. Oregon State University. Higuchi T (1997) *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*. Springer, New York. 131–233.
- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. 1993. "β-1,4 D-xylan degrading enzyme system: biochemistry, molecular biology and application." **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 17: 259-289.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Courtois, S. C., Cappellano, M., Francois, M. B., Philippe, X. F., Gérard, N., H., Asuncion, M., Steven, J. K., Joern, H., M., Paul, S. O., Renaud, R. A., N., Michel, G., Pascale, J., Pascal, S. and Jean, L.P. 2003. "Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products." **Applied and Environmental Microbiology**. 69: 49-55.
- Cowan, D.A., Arslanoglu, A., Burton, S.G., Baker, G.C., Cameron, R.A., Smith, J.J. and Meyer, Q. 2004. "Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst." **Biochemical Society Transactions**. 32: 298-303.
- Cowan D.A., Quinton, M., William, S., Samson, M., Rory, C. and Pia, W. 2005. "Metagenomic gene discovery: past, present and future." **Trends in Biotechnology** . 23: 6.
- Duan, C.J. , Xian, L .Z., Feng, G.C., Y., Pang, H., Bai, X.L ., Tang, J.L., Ma, Q. S. and Feng, J.X. 2009. "Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens." **Journal of Applied Microbiology**.
- Eriksen, J. and Goksoyr, J. 1976. "The Effect of Temperature on Growth and Cellulase (β -1,4-Endoglucanase) Production in the Compost Fungus *Chaetomium therrnophile* var. *dissitum*." **Archieves of Microbiology**. 110: 233-238.
- Epygen biotech industrial. nd. "A Kinetic Predictability Study of Cellulase Effectiveness for Cellulosic Fuelor Fibre Hydrolysis." **Epygen Biotech Industrial**.
- Fan L., Gharpuray, M., Lee, Y. 1987. "*Cellulose Hydrolysis*. Berlin." **Springer Verlag**. 3: 1-68.
- Feng, Y., Cheng, J.D., Hao P., Xin, C.M., Chun, F.W., Yuan, Y., Ya, L. H., Jie , W., Ji, L.T. and Jia, X.F. 2007. "Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases." **Applied Microbiology Biotechnology**. 75: 319-328.
- Figueiredo, M.S.R.B., Krickler, J.A. and Anderson, A.J. 2001. "Digestive Enzyme Activities in The Alimentary tract of Red Claw Crayfish, *Cherax Quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae)." **Journal of Crustacean Biology**. 21(2): 334-344.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gao, J., Wen, H., Zhu D., Yuan M., Guan F. and Xi Y. 2008. "Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover." **Bioresource Technology**. 99(16): 7623-7629.
- 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 Research**. 31:3784-3788.
- Halliwell, G. and Ruth, V. 1981. "The action on cellulose and its derivatives of a purified 1,4- β -glucanase from *Trichoderma koningii*." **Biochemical Journal**. 199: 409-417.
- Han, S.J., Yoo, Y.J. and Kang, H.S. 1995. "Characterization of bifunction cellulose and its structural gene: the *cel* gene of *Bacillus sp.* DO4 has exo- and endoglucanase activity." **Biochemical Journal**. 270: 26012-26019.
- Harnpicharnchai, P. 2007. "An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method." **Applied Microbiology**. 45: 387.
- Heiman M. 1997. **Webcutter 2.0**. Online available: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>, 12/07/2009
- Henrissat B., and Davies G. 1997. Structural and sequence-base classification of glycoside hydrolase. **Gene**. 7:637-644.
- Hungate, R.E. 1966. **The Rumen and Its Microbes**. New York: Academic Press.
- Hyung, K.K., Yeo, J.J., Won, C. C., Hyoung, S.R., Oh, T. K. and Jung, K.L. 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. **FEM Microbiology Letters**. 235: 349 – 355.
- Invitrogen . 2009. Nucleic Acid Purification: **Single Stranded Templates for Pyrosequencing**. [Online]. Available : <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Purification-and-Analysis/napamisc/Capture-of-Biotinylated-Targets/Single-Stranded-Templates-for-Pyrosequencing.html>, 12/07/2009
- Kalra, M.K., Idhu, M .S. S. and Sandh, D.K. 1986. "Partial purification, characterization and regulation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*." **Journal of Applied Bacteriology** .61: 73-80.

- Kamra, D.N. 2005. "Rumen microbial ecosystem." **Current Science**. Vol. 89: 1.p. 124-135.
- Kanokratana, P., Chantasinh, D., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2008. "Identification and expression of cellobiohydrolase (CBHI) gene from an endophytic fungus, *Fusicoccum* sp. (BCC4124) in *Pichia pastoris*." **Protein Expression and Purification**. 58:148-53.
- Kataeva, A. I., Sung, J. Y., Phuongan, D., Farris, L. P. II, Yanbin, Y., Fengfeng, Z., Wen, C. C., Ying, X., Lynne, G., David, R. S., John, C. Detter, L. J., Hauser, J. W., and Michael, W. A. 2009. "Genome Sequence of the Anaerobic, Thermophilic, and Cellulolytic Bacterium "*Anaerocellum thermophilum*" DSM 6725." **The Journal of Bacteriology**. 191(11): 3760–3761.
- Kim, U. J., Hiroaki, S., Pieter, J. J., Bruce, B. and Melvin, I. S. 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. **Molecular biology**. 20(5): 1083-1085
- Kimball J. W. 2006. **Pyrosequencing**. [Online]. Available : <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Pyrosequencing.html>., 18/09/2009
- Koga, J., Baba, Y., Shimonaka, A., Nishimura, T., Hanamura, S., and Kono, T. 2008. "Purification and Characterization of a New Family 45 Endoglucanase STCE1 from *Staphylotrichum coccosporum* and Its Overproduction in *Humicola insolens*." **Applied and Environmental Microbiology**. 74(13): 4210–4217.
- Lammle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C. and Brunner, H. 2007. "Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning." **Journal of Biotechnology**. 127: 575–592.
- Lee, I. C. 2007. "Section 3: Rumen Microbiology & Fermentation." **Animal Nutrition Handbook**. n.p.
- Lee, F.S., Forsberg W. C., and Gibbins, L.N. 1985. " Cellulolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*." **Applied and Environmental Microbiology**. 50(2): 220-228.
- Lee, W. S., Keehoon, W., He, K.L., Jin, C.K., Gyung, J.C. and Kwang, Y.C. 2004. "Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms." **Applied Microbiology Biotechnology**. 65: 720–726.

- Lima, A.O.S., Quecine, M.C., Fungaro, M.H.P., Andreote, F.D., Walter, Jr .M., Araújo, L.W., Márcio, C.S.F., Pizzirani, K.A.A. and Azevedo, L.J. 2005. "Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 68: 57-65.
- Manuel, F., Olga, V. G., Tatyana, N. C. , Amit, N. K., Dolores, R. D., Vitor, A. P., Martins, D. S., Carsten, S., Kieran, E., Graeme, J., Alexander, N., Michail, M. Y., Kenneth, N. T. and Peter, N. G. 2005. "Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora." **Environmental Microbiology**. 7(12): 1996 – 2010.
- McClellan, P. 1997. Cloning and molecular analysis of gene: Cloning Vectors. [Online]. Available : <http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclellan/plsc431/cloning/clone3.htm>., 18/09/2009
- McKnight, A.J. 2004. **Pyrosequencing Protocol**. [Online]. Available : <http://www.qub.ac.uk/nephres/Methods/Pyrosequencing%20Protocol.pdf>., 18/09/2009
- Miller ,G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31(42): 6–8.
- Nobutada, K. 2006. "Metagenomics : Access to Unculturable Microbes in the Environment." **Microbes and Environments**. 21: 201-215.
- Petterson, J.A. 1992." Ruminal Micrology." **In Encyclopedia of Microbiology vol.4 Sandiego:** Academic press.
- Qrskov ,E.R. and Ryle, M. 1990. **Energy Nutrition in Ruminants**. London: Oxford. Elsevier.
- Rakesh, S., Ranjan, R., Raj, K.K., and Grover, A. 2005. "Unculturable bacterial diversity: An untapped resource." **Current Science**. 89: 72-77.
- Raphael, L. 2004. **Bacterial cellulosomes**. [Online]. Available : <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/lamed/cellulosome>., 12/07/2009
- Ray, C. S., Kundu, S., and Thakur, A. R. 2006. "Microbial DNA extraction from samples of varied origin." **Current Science**. 91(12): 1697-1700.
- Reese, E.T. Ralph, G. H. S. and Hillel, S. L. 1950. "The biological degradation of soluble cellulose derivative and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis." **The Journal of Bacteriology**. 59: 485-497.

- Reese, E.T. 1976." History of the cellulose program at the U.S.army Natick development centre." **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. 6: 9-20.
- Reilly, P.I. 1980. "Xylanase; Structure and function of *Myothecium verrucaria* for fuel and chemicals." **Basic life science**. 18: 111-131.
- Ren, Z., Ward ,T.E., Logan , B.E., Regan, J.M. 2007 . "Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic Clostridium species." **Journal Applied Microbiology**. 103(6):2258-2266.
- Roe, B.A. nd. **Oligonucleotide universal primers used for DNA sequencing**. [Online]. Available : http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_adxCDE.html., 12/08/2009
- Rondon, M. R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T. H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L. Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman R.M. 2000. "Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms." **Applied and Environmental Microbiology**. 66(6): 2541-2547.
- Sakon, J., Adney, W.S., Himmel, M.E., Thomas, S.R., and P. Andrew Karplus, P.A. 1996. "Crystal Structure of Thermostable Family 5 Endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in Complex with Cellotetraose." **Biochemical**. 35:10648-10660
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring Harbor III**. New York: Cold Spring Habor Press.
- Schloss, D.P. and Handelsman, J. 2003. "Biotechnological prospects from metagenomics." **Environmental Biotechnology**. 14: 303-310.
- Sharma, K., Kumar, A. M. and Misra R. S. 2008. "A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops." **African Journal of Biotechnology**. 7 (8) : 1018-1022.
- Shelswell, K. J. 2004. **Metagenomics : The science of Biological Diversity** [Online]. Available : <http://www.scq.ubc.ca/metagenomics-the-science-of-biological-diversity/>., 12/07/2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Soo, J. Ki., Chang, M. L., Bo, R. H., Min, Y. K., Yun, S. Y., Sang, H. Y., Bon, S. K. and Hong, K. J.. 2008. **Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria.** Pusan National University, Busan, Korea.
- Sternberg, D., Vijayakumar, P. and Reesen, E.T. 1997. "β-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose." **Canadian Journal of Microbiology.** 23: 139-147.
- Sunna, A. and Ahtranikian, G. 1997. "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria." **Critical Reviews in Biotechnology.** 17: 36-67.
- Tomme, P., Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R. 1995. "Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi." **Advances in Microbial Physiology.** 37: 1-81.
- Uchiyama, T. and Watanabe, K. 2008. "Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries." **Nature Protocols.** 3:7.
- Vergin, K.L., Urbach, E., Stein, J.L., DeLong, E.F., Lanoil, B.D. and Giovannoni, S.J. 1998. "Screening of a Fosmid Library of Marine Environmental Genomic DNA Fragments Reveals Four Clones Related to Members of the Order *Planctomycetales*." **Applied and Environmental Microbiology.** 64(8): 3075-3078.
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., and Streit, W.R. 2003. "Prospecting for Novel Biocatalysts in Soil Metagenome." **Applied Environmental Microbiology.** 69: 6235-6242.
- Wanapat, M. and Pimpa, O. 1999. "Effect of ruminal NH₃-N level on ruminal bacteria fermentation purine derivative digestibility and rice straw intake in swamp buffalo." **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.** 12: 904-907.
- Walter, J., Mangold, M. and Tannock, G.W. 2005. "Construction, Analysis and β-Glucanase Screening of a Bacterial Artificial Chromosome Library from the Large Bowel Microbiota of Mice". **Environmental Microbiology.** 71: 2347-2354.
- Weimer, D.J. 1996. "Ruminal cellulolytic bacteria." **Information Conference with Dairy and Forage Industries 1996.** US Dairy Forage Research Center.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wolfgang, H.S. 2004. **Microbial**. [Online]. Available : <http://www.wzw.tum.de/mbiotec/cellmo.htm>,11/03/2008
- Woolcock, J.B. 1991. **Microbiology of Animal and Animal Products**. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Wu, Y.B., Ravindran, V., Pierce, J. และ Hendriks, W.H. 2004. "Influence of Three Phytase Preparations in Broiler Diets Based on Wheat or Corn: *In vitro* Measurements of Nutrient Release." **International Journal of Poultry Science**. 3 (7): 450-455
- Yamada, K., Takeshi, T., Shinya, K., Toyokazu, Y., Satoshi, T. and Shigeaki, H.2008. "Retrieval of entire genes from environmental DNA by inverse PCR with pre-amplification of target genes using primers containing locked nucleic acids." **Environmental Microbiology**. 10(4): 978–987.
- Yun, J.and Ryu, S. 2005. "Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it." **Microbial Cell Factories**. 4: 8.
- Yun, J., Seowon, K., Sulhee, P., Hyunjin, Y., Myo, J.K., Sunggi, H. and Sangyeol, R. 2004. "Characterization of a Novel Amylolytic Enzyme Encoded by a Gene from a Soil-Derived Metagenomic Library." **Applied Environmental Microbiology**. 70: 7229-7235.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

อุปกรณ์ สารละลายและแผนที่เวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อุปกรณ์

- auto pipett ขนาด P2, P20, P200 และ P1000
- บีกเกอร์ขนาด 50, 200 และ 1000 ml
- หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ และหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 ml
- เครื่องนึ่งให้ความร้อน เครื่องปั่นเหวี่ยง หม้อต้มน้ำ และตู้บ่ม
- เครื่องทำปฏิกิริยาอุกโฆฟอติเมอเรส MyCycler™
- เครื่องวัด spectrophotometer และ gel document
- pH meter thermometer และเครื่องชั่งมาตรฐาน
- ผ้าขาวบาง ซ้อนตักสาร และแท่งคนสารละลาย
- เครื่องปั๊ม

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Zhou *et al.* (1996)

Extraction buffer

- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 100 mM sodium EDTA (pH 8.0)
- 100 mM sodium phosphate (pH 8.0)
- 1.5 M NaCl, 1% CTAB

3. สารเคมีที่ใช้ในตรวจวิเคราะห์แยกขนาดดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

1) สารละลาย 5X TBE (Tris-borate)

ผสม Tris-borate 54 g Boric acid 27.5 g และ 0.5 M EDTA (pH 8) 20 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 ml เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 5X TBE เป็น 1X TBE

2) 6X loading buffer

ผสม 0.25 % Bromophenol blue และ 30% Glycerol ในน้ำกลั่น 1 ml เก็บที่ 4 °C

3) สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์จำนวน 0.5 mg ในน้ำกลั่น 1 ml เก็บในขวดสีน้ำตาล (เอธิเดียมโบร

โมไซด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือเวลาเตรียมสารละลาย) นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) Lambda DNA/*Hind*III (Fermantas)

5) 1 Kb marker (Fermantas)

4. สารเคมีที่ใช้ในการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

สารละลาย 50x TAE buffer (Tris- acetate)

ผสม Tris- borate 242 g Acetic acid 57.1 ml และ 0.5 M EDTA (pH 8) 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 ml เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 50x TAE เป็น 1x TAE

5. ชุดทดสอบสำเร็จรูป

1) ชุดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Purified DNA) Wizard[®] DNA Clean-up System (Promega)

- Wizard[®] DNA Clean-up Resin

- Isopropanol

- น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

- Minicolumn

2) ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

- บัฟเฟอร์ QG (Solubilization buffer)

- บัฟเฟอร์ PE (Wash buffer)

- Isopropanol

- น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

- Spin column

3) ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermantas)

- สารละลาย Resuspension buffer

- สารละลาย Lysis buffer

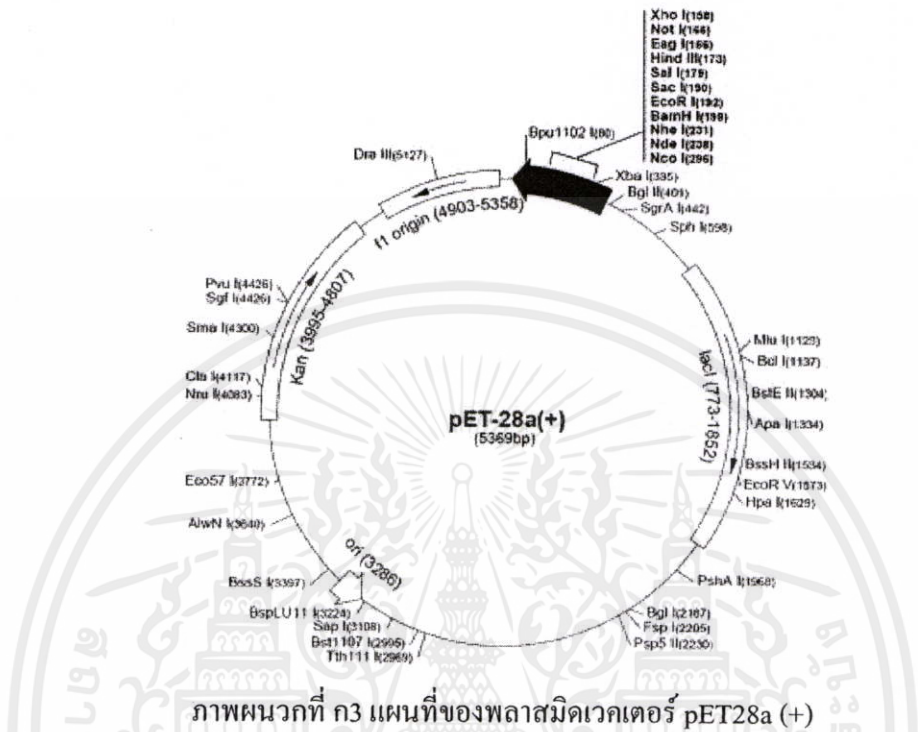
- สารละลาย Neutralization buffer

- น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

- Spin column

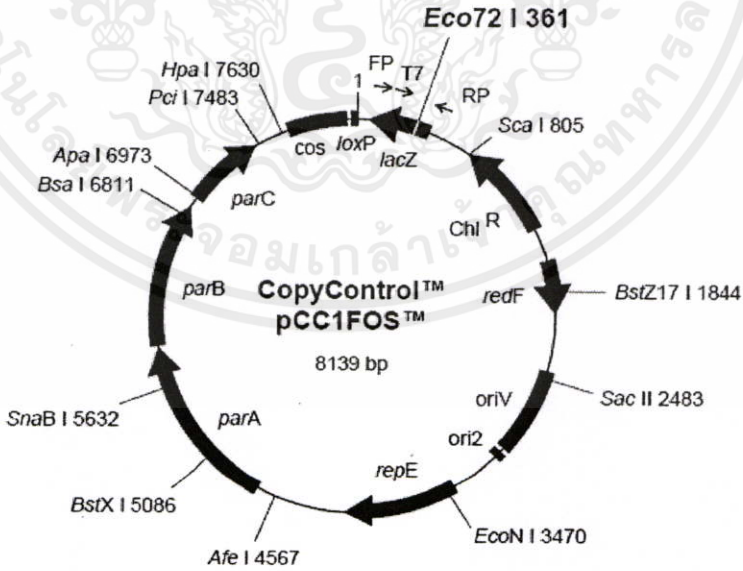
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) แผนที่ของเวกเตอร์ pET28a (+) (Novagen)



ภาพผนวกที่ 3 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a (+)

7) แผนที่ของพอสมิด pCC1FOS™ (EPICENTRE)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาพผนวกที่ 4 แผนที่ของพอสมิด pCC1FOS™ นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Restriction Enzyme

- 1) 10 Unit/ μ l *Bam*HI (Fermentas)
- 2) 10 Unit/ μ l *Bsp*143I (Fermentas)
- 3) 10 Unit/ μ l *Eco*RI (Fermentas)
- 4) 10 Unit/ μ l *Hind*III (Fermentas)
- 5) 10 ยู Unit/ μ l *Xho*I (Fermentas)

7. เอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

เอนไซม์ DyNAzyme™ I DNA Polymerase ความเข้มข้น 500 μ l

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

- Bacto-tryptone 10.0 g
- Yeast extract 5.0 g
- NaCl 5.0 g

เตรียมในน้ำ 1 L ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani agar)

- Bacto-tryptone 10.0 g
- Yeast extract 5.0 g
- NaCl 5.0 g
- Agar 15.0 g

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 L ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Agar จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Agar แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC medium (Sambrook and Russell, 2001)

- Tryptone 20.0 g

เอกสารนี้เป็นเอกสาร- Yeast extract 5.0 g การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- NaCl 0.5 g
- KCl 2.5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glucose 20 mM

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 L ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cell

- 1) สารเคมีสำหรับการเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10
 - LB medium
 - dH₂O
 - 10 % glycerol
- 2) สารเคมีสำหรับการเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ DH5α
 - LB medium
 - CaCl₂ 100 mM
 - 10 % glycerol

10. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการมีพลาสมิดลูกผสม

- 1) ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol

เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 12.5 µg/ml และ 34 µg/ml กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C
- 2) ยาปฏิชีวนะ Kanamycin

เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/ml และ กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C
- 3) ยาปฏิชีวนะ Ampicilin

เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml และ กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C
- 4) Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม Stock ที่ความเข้มข้น 0.8 M โดยละลาย 2 g ต่อน้ำ 8 ml หลังจากละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C

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

ละลาย 20 mg ใน Dimethylformamide 400 μ l แล้วเก็บในหลอดที่กันแสงที่อุณหภูมิเก็บที่ -20°C

11. สารเคมีในการทำ size screening

lysis buffer

- EDTA	5	mM
- Sucrose 10 %	5	g
- SDS 0.25 %	0.125	g
- Bromophenol blue 0.05 %	0.025	g
- NaOH 100 mM		
- KCl 10 mM		
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	46	ml

12. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1) 5X Protein sample buffer

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

2) 10X Protein running buffer สำหรับ 1 L

- Tris-base	30	g
- Glycine	144	g
- SDS	10	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) Destaining buffer

- Methanol 200 ml
- Acetic acid 200 ml
- น้ำกลั่น 1600 ml

4) Coomassie Brilliant Blue stain สำหรับ 2 L

- Coomassie brilliant blue powder 2 g
- Methanol 1 L
- Acetic acid 200 ml
- น้ำกลั่น 800 ml

5) Ammonium persulfate 10 %

ละลาย ammonium persulfate 100 mg ในน้ำกลั่น 1 ml

6) Unstained Protein Molecular Weight marker (Fermentas)

7) การเตรียมเจลเพื่อทำ SDS-PAGE

เจลมี 2 ชนิด ดังนี้ separating 12 % และ stacking 4 % ในการเตรียมทั้ง 2 เจล แสดงดังตาราง

ผนวก ก 1

ตารางผนวก ก 1 การเตรียม Polyacrylamide gel 12 %

ส่วนประกอบ	Separating gel	Stacking gel
น้ำกลั่น	2 ml	1.5 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	625 µl
10 % SDS	60 µl	25 µl
30% Acrylamide	2.4 ml	334 µl
10 % Ammonium persulfate	30 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl

13. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western Blot

1) Transfer buffer

- Tris- base 3.03 g
- Glycine 14.4 g
- Methanol 200 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คิดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้ได้ 1 L เก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C

2) TSBT pH 7.5

Tris buffered saline (TBS)

- Tris – base 4.5 g

- Sodium Chloride 8 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้ได้ 1 L แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5 จากนั้นเติม

Tween™-20 ปริมาตร 0.1 % เก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C

3) skim milk 5 % ใน TBST pH 7.5 สำหรับ 50 ml

ชั่ง skim milk 2.5 g จากนั้นละลายใน TBST pH 7.5 สำหรับ 50 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

4) primary antibody

เตรียม skim milk 5 % ใน TBST pH 7.5 ปริมาตร 10 ml โดยชั่ง skim milk 0.5 g จากนั้นเปิด primary antibody ในอัตราส่วน 1:2000 เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

5) secondary antibody

เตรียม skim milk 5 % ใน TBST pH 7.5 ปริมาตร 10 ml โดยชั่ง skim milk 0.5 g จากนั้นเปิด secondary antibody ในอัตราส่วน 1:2000 เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

6) ECL detection reagent (Amersham Biosciences, Sweden)

7) Prestained Protein Molecular Weight marker (Fermentas)

14. การวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (BIO-RAD)

เตรียม bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 160 µl มีความเข้มข้น ดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 µg และเตรียมตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 160 µl จากนั้นเปิด Bio-Rad protein assay reagent ปริมาตร 40 µl ทำใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเปิดปฏิกิริยา 100 µl มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

15. สารเคมีที่ใช้เตรียม 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)

- 3,5-dinitrosalicylic acid 10.6 g

- NaOH 19.8 g

- Potassium sodium tartate 306 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	8.3	g
- Phenol	7.6	ml
- น้ำกลั่น (อุ่น)	1,416	ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

ลำดับนิวกฎีไอทีและลำดับกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของโคลน Cel5 จากการสร้าง *shotgun library* ของจุลินทรีย์ในรูเมน กระบือ

โดยใช้ไพรเมอร์ M13F มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้บางส่วนเท่ากับ 624 bp จาก 5'→3'

GTGGCGATAGGGGCGATTGGGCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGG
 ATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCGGGCAAAGAAGTAG
 TACGTTGTTTGTAGGTGTCAATCCGCTGAATGCGCCTGAGCTCTGCCATCCGCTTGAGGGC
 GCAACGTTGGTACTGTTTTTGGCATACTCAACGCTTTGCCCGTTTGCCGGCGCTGTGCC
 GTAACGGTGACGCTGTTATGCGTTCTTGAAACCAGCGTCGGAGCGGGCGACTGCCGCCCT
 GCCTGCTTGCCGGGGTTCAGGCTCTTCGCAAGCCGTAAACTCAAGGGCAAAGCCCAAT
 TAGCATGACCCCCACAATGAGGGTTCATCGCCGCAAAAAGTTTATTTCTCTTTTTTCATTGG
 AAATCTCCAAAATTGACCGCCTTACCCAAAGAGGAGCAAGGCGGCCATGATTTAATTA
 TTGTGGAACCTCACCTGCGTTATCCTGATTTTGTATATGTTTCGCAGGGTTCGCGCCTTCCT
 TATCATCTAAGTTGATCATTTTAAGGATTTTCAGTGATTCTACAAGCTCCCTCCTATAAGCT
 AAATTTCTTTAACTAAATTCTCGCTG

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของโคลน Xyl15 จากการสร้าง *shotgun library* ของจุลินทรีย์ในรูเมน กระบือ

โดยใช้ไพรเมอร์ M13F มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้บางส่วนเท่ากับ 1,213 bp จาก 5'→3'

TGATGGATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCGCCCGAAA
 TTCGATGAGGCGATTGCGAAGGTCCTGCGCTTGTGGAATGCTACTTTAAGCTCGGCATC
 GAAAAGTGCATGGAACGCTACAACGGGAAATAAAAATCGTTATTAAATTTTTTACTTATT
 ATTATTGCCCGTACCAAAAGTGAATTCGGGCTTTTTTATTATATTGAGAATAACCTTTTGG
 TGGAGGTATGTATGGTGAATAAAATTATTATCGCCTTGAGCATGGGACTCACGGCGGGG
 GCCTTGGCACAGGATTTCTGCAGCACGGCCAAACATACTGGTGCAAGCAAAAAAGTGAA
 CGGAAACGAAGTGAACCTCGTACAACGGTGTGGTTACGAGCTTTGGTACGACAGGGCTA

CTTCAGGTTTCGCTTACAATTTATGAAGATGGATCCATGGCATGTTCTTTCCAGAGTGCTG
 GAGACTACCTTTGCCGTGCGGGGCTTTTCGTTTCGATAGCGACAAGAAGTATAGCGAACTT
 GGCGGCGATATGCTTGCAGGAATTTAAGCTCGTGAAGCAGAATATCAATGGCGCCGATTA
 CTCCTATGTTGGTGTCTATGGCTGGATGGAAGAAGTTTCGAAATCCCCGAGTAAGCTGGT
 TGAATATTATGTTGTCGATAACTGGCTGACGGGGTGGAGGCCTGGTGATTGGGTTCGCTAG
 CAATAAGATGGGCGATTACACAATCGATGGCGCGAAATACTCCGTTTATTGGGGTGAAC
 ATACGGGACCTGCCATCAAGACTAATGGCAATACGACTTTTTTGCAGTATTTTCAGCATTTC
 GTGAAAATGCTCGTGATTGCGGAATCATCAATATCAGTGCTCACATGAGACAGTGGGAA
 AAGCTGGGCATGGAGATGGGCAAGCTTTATGAAGCCAAGGGGCTTGGCGAAGCGGGTA
 GCATGAGTAACGGCGTTTTTGGCACGGGGGATTTCCACATATAAAGGTTTACGTTAAGA
 GGGACGAAGTATCTTCCAGTTCGGTTGCGCCAAGCCCAAGTTTTGGGGCGTCATCCGAGT
 TCCTCAAAACTGGGCCGAGTTCTCATCGGAAAAGGTCCGCGAAATCCTCCGAGCCAGTG
 TTGGGGCGTCTTCGATCGGACCCGATTCCGTTAACGGTCAGGGCGCATTTGACAAGGCGGAT
 TATCCAGGTTGAGATGCGGGGATC

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูล pyrosequencing ของจุลินทรีย์ในรูเมนกระบือที่สร้างจาก Fosmid library

จากโคลนที่มี activity ของเซลล์เลข 21 โคลน นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พบว่าโคลนมีความแตกต่างกัน 11 pattern จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้ได้ full-length gene ของเซลล์ โดยเทคนิค pyrosequencing แล้วจึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ contig No.00001 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 27,622 bp นำมา translate เป็นกรดอะมิโนและหา conserve domain ภาพผนวกที่ ข1 จากนั้นหา start และ stop codon เพื่อให้ได้ full-length gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

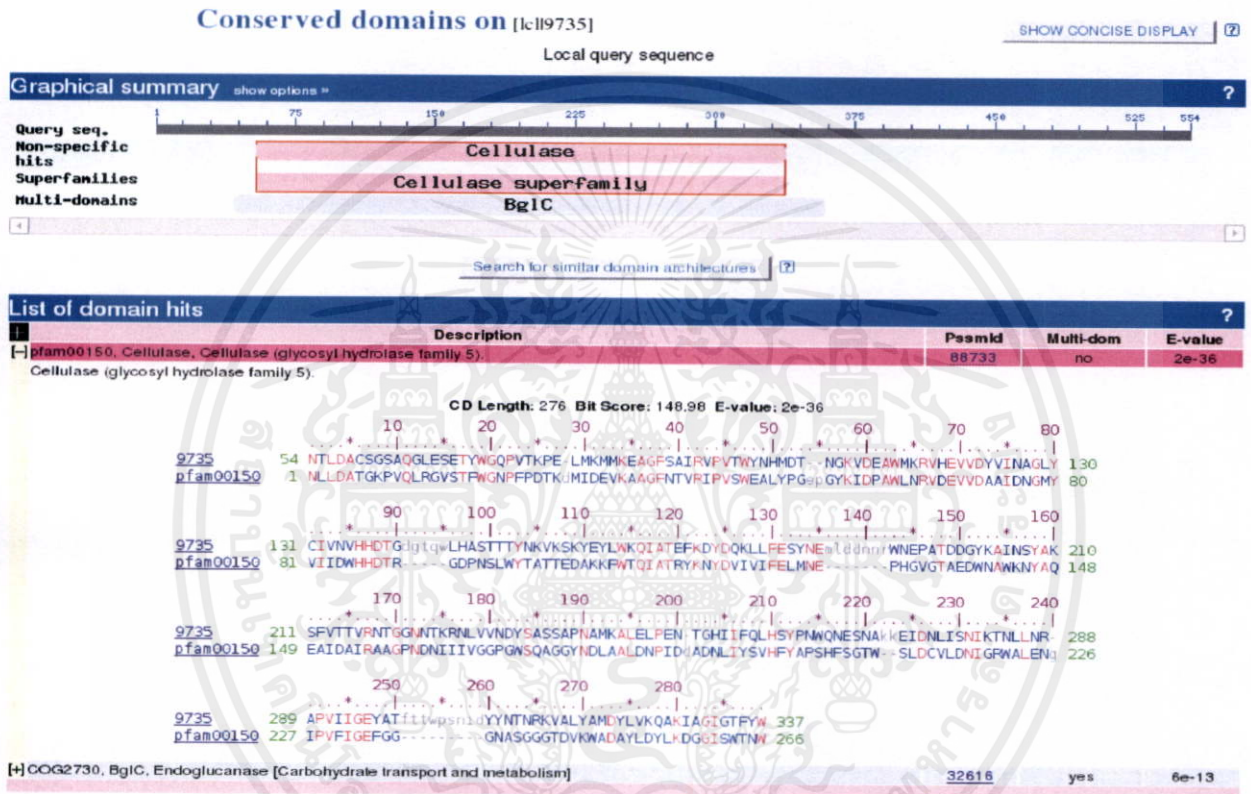
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,671 bp

ATA*AAAAAAGAAATCCCTCGCCAGTTGGCGGGGGATTTTTATTTGCCATCATCTTCAGG
 GCTTATTTGACGATGTATTTCTTACCGTCTTGGATGTAGATGCCTTTTTGAGGATTCTGCA
 CGCGCTGTCCCGAGAGGTTATAGACGGCGCCCTCGGTCTGCGTGGCTTTTACTGGGCGGA
 TGCCAGTCACGGTTTCCTGGCTCACTTCGCAACCCCAGGCTGCCGTTACGGTCAGGTTGG
 TCTCTGAACCGTCAGCCTTGATGAGGGTGGCTTTCTTCACCTTGCCCGTCAGTGCACCGG
 AAAAGGTCTGTAGTGTGATGCCCCAGAATGTAGAGCCGAGCGTGGCAGCCTCGAAGGTT
 CCCTCTGTGATGGCTGAACCGGAAGTCAATGGAATATACTGCTCTTTGAAATCGGTGCCG
 CTTTTTTTGTACCATACACTTTTATCTGCAGTTTGCCGGCATACTGCTGTCGTTTTCCATCTC
 CACGCGAACGCCCTTATAGTCGCTCAGTTTACGGCCGTACGGTTCCAATCTCCGAAGAG
 AAAGGCCTCAGACCACTCATCATTGTATTTACGGTGTAATGATTTTCACTGGTTGAAGT
 CGAGGGAAACTGATACCCCTTGGTAGTGCCGTAGTAGGCATTGATGAGCGTCTCTGCCA
 AGTCAGCCTGGTTGAATACAGGCAGAGAGCGGGAAGAACCGTCGGAAAGACCCATCCA
 GTAGAAGGTGCCAATACCAGCTATCTTCGCCTGCTTGACGAGATAGTCCATGGCATAGA
 GGGCCACTTTGCGATTTCGTGTTGTAATAGTCGATATTCGAGGGCCATGTGGTGAATGTGG
 CATATTCGCCGATGATCACAGGAGCCCTGTTGAGCAGATTTCGTTTTGATGTTGCTGATCA
 GGTGTCGATTTCTTTTTTGGCATTGCTCTCATTCTGCCAGTTGGGATAGCTGTGCAGTTG
 GAATATGATATGACCTGTATTTCCGGCAACTCAAGCGCTTTCATCGCATTGGGAGCACT
 ACTGGCAGAGTAGTCATTCCTACTACCAGGTTGCGCTTCGTGTTGTTGCCACCCGTATTACG
 CACGGTCGTCACGAACTCTTGGCATAGCTGTTGATGGCCTTATAGCCGTCGTCAGTAGC
 AGGCTCGTTCATCTGTTATTGTCATCCAGCATTTCGTTGTAGGATTCAAAGAGCAGCTT
 CTGGTCGTAGTCCTTGAATTCTGTGGCAATTTGCTTCCACAGGTATTCATACTTGCTCTTC
 ACTTTGTTGTAGGTTGTCGTAAGTGGCATGCAGCCATTGGGTGCCGTCGCCGGTGTCTGTA
 TGGACGTTACGATGCAGTACAACCCCGCTTGATCACATAGTCGACCACTTCGTGAACA
 CGCTTCATCCATGCTTCGTCCACCTTGCCGTTTCGTGTCCATATGGTTGTACCATGTCACAG
 GCACGCGGATGGCGCTGAAGCCGGCTTCCTTCATCATCTTCATCAATTCGGGCTTGGTGA
 CGGGTTGTCCCCAGTAAGTCTCCGATTCCAGTCCCTGCGCACTTCCGCTACAGGCATCGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGGTATTCCAGATTCCAGCCACACCCATGTTCTTTACAGCCTCTTTGGCTGTTTCAA
 ATCCTGTGCCTGAGCAGCAAAGCTCATCAACAGGCCTAATACAAAAAGTA*

*อักษรที่กำกับ คือ start และ stop codon



ภาพผนวกที่ ข1 แสดง conserve domain ที่ได้ของกรดอะมิโนจากข้อมูล pyrosequencing โดยใช้โปรแกรม protein Blast จากฐานข้อมูลGenBank

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความเหมือนกันของยีน โดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI เข้าที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันกับยีนเซลล์ลูเลส ของ uncultured microorganism 80% แต่ frame ที่ได้อยู่ใน frame -3 จึงต้อง reverse complementary เข้าที่ http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html ได้ลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ และหา start และ stop codon โดยการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม translate ของ http://www.expasy.ch/cgi-bin/dna_aa ดังนี้

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,587 bp

ATG*AGCTTTGCTGCTCAGGCACAGGATTTTGAACAGCCAAAGAGGCTGTAAAGAACA
 TGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATACCCTCGATGCCTGTAGCGGAAGTGCGCAGGGA
 CTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAACCCGTCACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGAT
 GAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCATCCGCGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACA
 CGAACGGCAAGGTGGACGAAGCATGGATGAAGCGTGTTACGAAGTGGTCGACTATGTG
 ATCAACGCGGGGTTGTA CTGTCATCGTGAACGTCCATCACGACACCGGCGACGGCACCCA
 ATGGCTGCATGCCAGTACGACAACCTACAACAAAGTGAAGAGCAAGTATGAATACCTGT
 GGAAGCAAATTGCCACAGAATTCAAGGACTACGACCAGAAGCTGCTCTTTGAATCCTAC
 AACGAAATGCTGGATGACAATAACAGATGGAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAA
 GGCCATCAACAGCTATGCCAAGAGTTTCGTGACGACCGTGCCTAATACGGGTGGCAACA
 ACACGAAGCGCAACCTGGTAGTGAATGACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATG
 AAAGCGCTTGAGTTGCCGAAAATACAGGTCATATCATATTCCAACCTGCACAGCTATCCC
 AACTGGCAGAATGAGAGCAATGCCAAAAAGAAATCGACAACCTGATCAGCAACATCA
 AAACGAATCTGCTCAACAGGGCTCCTGTGATCATCGGCGAATATGCCACATTCACCACAT
 GGCCCTCGAATATCGACTATTACAACACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACT
 ATCTCGTCAAGCAGGCGAAGATAGCTGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCG
 ACGGTTCTTCCCGCTCTCTGCCTGTATTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGCTCATCA
 ATGCCTACTACGGCACTACCAAGGGGTATCAGTTTCCCTCGACTTCAACCACTGAAATCA
 TTTACACCGTGAAATACAATGATGAGTGGTCTGAGGCCTTTCTCTTCGGAGATTGGAACC
 GTACGGCCGTGAAACTGAGCGACTATAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAG
 CTATGCCGGCAAACCTGCAGATAAAAAGTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCA
 AAGAGCAGTATATTCCATTGACTTCCGTTTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGGCT
 GCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGGGCATCACACTACAGACCTTTTCCGGTGCCTGACG
 GCCAAGGTGAAGAAAGCCACCCTCATCAAGGCTGACGGTTCAGAGACCAACCTGACCGT
 AACGGCAGCCTGGGGTTGCGAAGTGAGCCAGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAA
 AAGCCACGCAGACCGAGGGCGCCGTCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCT
 CAAAAAGGCAAGACGGTAAGAAATACATCGTCAAATAA*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานใช้งานเพื่อการเรียนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณี*อักษรที่กำกับ คือ start และ stop codon

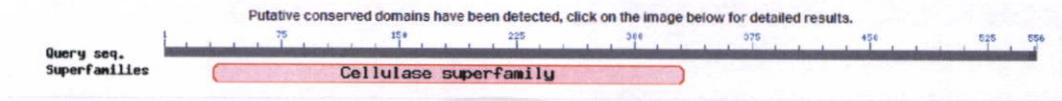
เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความเหมือนกันของยีน โดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันกับยีนเซลล์ของ uncultured microorganism 80% และนำนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจากโปรแกรม translate ได้ frame +1

ลำดับกรดอะมิโนจาก 5'→ 3': 528 aa

Met SFAAQAQDFETAKEAVKNMetGVGWNLGNTLDACSGSAQGLES
 ETYWGQPVTKPELMetKMetMetKEAGFSAIRVPVTWYNHMetDTNGK
 VDEAWMetKRVHEVVDYVINAGLYCIVNVHHDGTGDGTQWLHAST
 TTYNKVKSKYEYLWKQIATEFKDYDQKLLFESYNEMetLDDNNRW
 NEPATDDGYKAINSYAKSFVTTVRNTGGNNTKRNLVVNDYSASS
 APNAMetKALELPENTGHIIFQLHSYPNWQNESNAKKEIDNLISNIK
 TNLLNRAPVIIGEYATFTTWPSNIDYYNTNRKVALYAMetDYLVKQ
 AKIAGIGTFYWMetGLSDGSSRSLPVFNQADLAETLINAYYGTTKG
 YQFPSTSTTEIIYTVKYNDEWSEAFDFGDWNRTAVKLSDYKGV RV
 EMetENDSYAGKLQIKVYGDKKSGTDFKEQYIPLTSGSAITEGTFEA
 ATLGSTFWGITLQTFSGALTAKVKKATLIKADGSETNLTVTAAWG
 CEVSQETVTGIRPVKATQTEGAVYNLSGQQRVQNPQKGIYIQDGKK
 YIVK Stop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

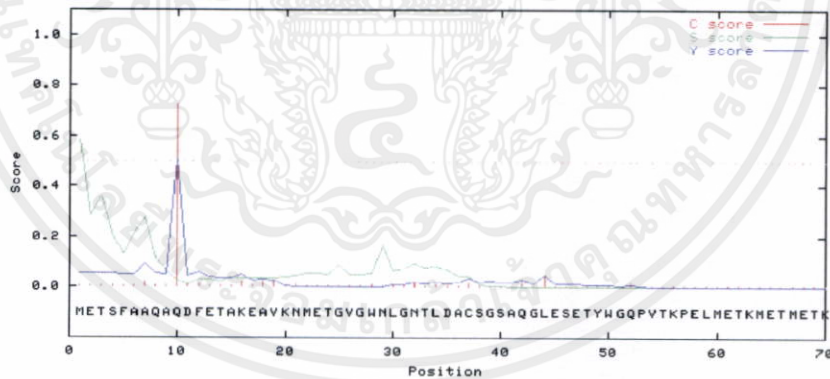
และเมื่อหา conserve domain จากโปรแกรม Blastp ของ NCBI ก็พบว่าเป็นยีนอยู่ในกลุ่มของ ยีนเซลล์ลูลีส มี multi domain คือ ยีน BglC (carbohydrate transport and metabolism) ดังภาพผนวกที่ ข2



ภาพผนวกที่ ข2 แสดง conserve domain ของลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูล pyrosequencing หลังจากทำ reverse complementary แล้ว

2. การหา signal peptide จากลำดับกรดอะมิโน เพื่อออกแบบไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำกรดอะมิโนที่ได้เข้าโปรแกรม SignalP 3.0 server เข้าที่ [http://www.cbs.dtu.dk /services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) พบว่ามี signal peptide ตรงกรดอะมิโนตัวที่ 9 และ 10 ดังภาพผนวกที่ ค 3 และตรงตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 27



```
# data
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 10 0.726 0.52 YES
max. Y 10 0.507 0.33 YES
max. S 1 0.583 0.92 NO
mean S 1-9 0.248 0.49 NO
D 1-9 0.378 0.44 NO
# Most likely cleavage site between pos. 9 and 10: AQA-QD
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูในวงเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ภาพผนวกที่ ข3 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็น signal peptide ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตัด signal peptide ออก มีความยาว 1,560 bp

***TTTGAAACAGCCAAAGAGGGCTGTAAAGAACATGGGTGTGGGCTGGAATCTGGGAAATA**
 CCCTCGATGCCTGTAGCGGAAGTGCGCAGGGACTGGAATCGGAGACTTACTGGGGACAA
 CCCGTCACCAAGCCCGAATTGATGAAGATGATGAAGGAAGCCGGCTTCAGCGCCATCCG
 CGTGCCTGTGACATGGTACAACCATATGGACACGAACGGCAAGGTGGACGAAGCATGGA
 TGAAGCGTGTTCACGAAGTGGTCGACTATGTGATCAACGCGGGGTTGTACTGCATCGTG
 AACGTCCATCACGACACCGGCGACGGCACCCAATGGCTGCATGCCAGTACGACAACCTA
 CAACAAAGTGAAGAGCAAGTATGAATACCTGTGGAAGCAAATTGCCACAGAATTCAAG
 GACTACGACCAGAAGCTGCTCTTTGAATCCTACAACGAAATGCTGGATGACAATAACAG
 ATGGAACGAGCCTGCTACTGACGACGGCTATAAGGCCATCAACAGCTATGCCAAGAGTT
 TCGTGACGACCGTGCCTAATACGGGTGGCAACAACACGAAGCGCAACCTGGTAGTGAAT
 GACTACTCTGCCAGTAGTGCTCCCAATGCGATGAAAGCGCTTGAGTTGCCGGAAAATAC
 AGGTCATATCATATTCCAACCTGCACAGCTATCCCAACTGGCAGAATGAGAGCAATGCCA
 AAAAAGAAATCGACAACCTGATCAGCAACATCAAAACGAATCTGCTCAACAGGGGCTCCT
 GTGATCATCGGCCGAATATGCCACATTCACCACATGGCCCTCGAATATCGACTATTACAAC
 ACGAATCGCAAAGTGGCCCTCTATGCCATGGACTATCTCGTCAAGCAGGCGAAGATAGC
 TGGTATTGGCACCTTCTACTGGATGGGTCTTTCCGACGGTCTTCCCGCTCTCTGCCTGTA
 TTCAACCAGGCTGACTTGGCAGAGACGCTCATCAATGCCTACTACGGCACTACCAAGGG
 GTATCAGTTTCCCTCGACTTCAACCACTGAAATCATTACACCGTGAAATACAATGATGA
 GTGGTCTGAGGCCTTCTCTTCGGAGATTGGAACCGTACGGCCGTGAAACTGAGCGACTA
 TAAGGGCGTTCGCGTGGAGATGGAAAACGACAGCTATGCCGGCAAACCTGCAGATAAAA
 GTGTATGGTGACAAAAAAGCGGCACCGATTTCAAAGAGCAGTATATTCCATTGACTTC
 CGGTCAGCCATCACAGAGGGAACCTTCGAGGCTGCCACGCTCGGCTCTACATTCTGGG
 GCATCACACTACAGACCTTTTCCGGTGCCTGACGGCCAAGGTGAAGAAAGCCACCCTC
 ATCAAGGCTGACGGTTCAGAGACCAACCTGACCGTAACGGCAGCCTGGGGTTGCGAAGT
 GAGCCAGGAAACCGTGACTGGCATCCGCCAGTAAAAGCCACGCAGACCGAGGGCGCC
 GTCTATAACCTCTCGGGACAGCGCGTGCAGAATCCTCAAAAAGGCATCTACATCCAAGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ยังไม่ผ่านการตรวจสอบและแก้ไขใดๆ ทั้งสิ้น หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขออภัยเป็นอย่างสูงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ว่ากรณินี้ * แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดออกไป และตำแหน่งของ stop codon

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความคล้ายกันของยีนโดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันกับยีนเซลล์ของ uncultured microorganism อยู่ 81% และนำนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจากโปรแกรม translate ได้ frame +1

ลำดับกรดอะมิโนจาก 5'→3': 519 aa

FETAKEAVKNMetGVGWNLGNTLDACSGSAQGLESETYWGQPVTK
 PELMetKMetMetKEAGFSAIRVPVTWYNHMetDTNGKVDEAWMetKRV
 HEVVDYVINAGLYCIVNVHHD TGDGTQWLHASTTTYNKVKSKYE
 YLWKQIATEFKDYDQKLLFESYNEMetLDDNNRWNEPATDDGYKA
 INSYAKSFVTTVRNTGGNNTKRNLVVNDYSASSAPNAMetKALELP
 ENTGHIIFQLHSYPNWQNESNAKKEIDNLSNIKTNLLNRAPVIIGE
 YATFTTWPSNIDYYNTNRKVALYAMetDYLVKQAKIAGIGTFYW
 MetGLSDGSSRSLPVFNQADLAETLINAYYGTTKGYQFPSTSTTEII
 YTVKYNDEWSEAFDFGDWRRTAVKLSDYKGV RVEMetENDSYAG
 KLQIKVYGDKKS GTFDFKEQYIPLTSGSAITEGTFEAATLGSTFWGI
 TLQTFSGALTAKVKKATLIKADGSETNLTVTAAWGCEVSQETVTG
 IRPVKATQTEGAVYNLSGQRVQNPQKGIYIQDGKKYIVK Stop

3. ออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากข้อมูลกรดอะมิโนที่หา SignalP 3.0 server จากโปรแกรม SignalP ที่ตำแหน่ง 9 และ 10 สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ ดังตารางผนวกที่ ข1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข1 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับการทำพีซีอาร์

Primer Names	Sequences
forward cel 1	5'-GAATGGATCCATGAGCTTTGCTGCTCAGGCACAG-3' ^๑
forward cel 2	5'-GCATGGATCCCTTTGAAACAGCCAAAGAGGCTGTA-3' ^๑
reverse cel	5'-GCCGCTCGAG TTATTTGACGATGTATTCTTACC-3' ^๒

^๑ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เอ็นไซม์ *Bam*HI ตัดจำเพาะ

^๒ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เอ็นไซม์ *Xho*I ตัดจำเพาะ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวลลิตา มรุเศรษฐ์ เกิดเมื่อวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ.2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราช มงคล วิทยาเขตปทุมธานี พ.ศ.2547 เกียรตินิยมอันดับสอง และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและการประมง สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 และสำเร็จการศึกษาในปี การศึกษา 2552



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้