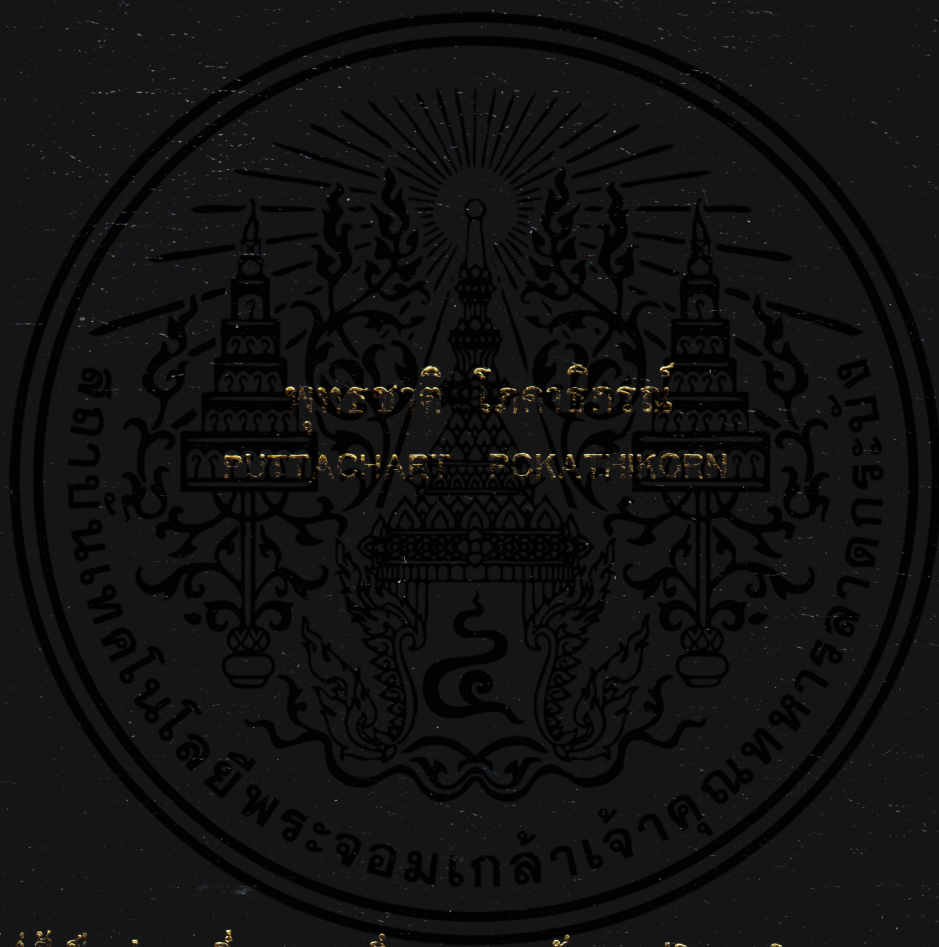


การคัดเลือกและการแสดงออกของยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส  
จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

ISOLATION AND EXPRESSION OF A GENE ENCODING  
 $\beta$ -ENDO GLUCANASE FROM BOVINE RUMEN BACTERIA



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMUTL-2010-AG-M-081-047

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกและการแสดงออกของยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส  
จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

ISOLATION AND EXPRESSION OF A GENE ENCODING  
 $\beta$ -ENDO GLUCANASE FROM BOVINE RUMEN BACTERIA



1110432

พุทชาติ โภคาธิกรณ์

PUTTACHART POKATHIKORN

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 110432  
วัน,เดือน,ปี - 2 พ.ย. 2553

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตวศาสตร์  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา พ.ศ. 2553 จนถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2010-AG-M-031-047

**ISOLATION AND EXPRESSION OF A GENE ENCODING  
β-ENDO GLUCANASE FROM BOVINE RUMEN BACTERIA**



**PUTTACHART POKATHIKORN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE  
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

เอกสารนี้เป็นเอกสารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ 2010 อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**KMITL-2010-AG-M-031-047**



**COPYRIGHT 2010**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY** ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG** รั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการแสดงออกของยีนเบต้าแอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค
นักศึกษา	นางสาวพุทธชาติ โภคาธิกรณ์
รหัสประจำตัว	48065402
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2553
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์

### บทคัดย่อ

การหายีนของเอนไซม์หรือโปรตีนอื่นๆ ตามธรรมชาติสามารถหาได้โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการสกัดจีโนมโดยตรงจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ การทดลองนี้ทำการคัดเลือกจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ด้วยเทคนิค Sequence-driven analysis ซึ่งจากการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก Degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของ Glycoside hydrolase family 5 พบว่ามีผลผลิตที่คาดว่าจะเป็นส่วนหนึ่งของยีนเอนโดกลูคาเนสทั้งสิ้น 5 ชิ้นส่วนจากโคลน Cel5\_A3, Cel5\_A4, Cel5\_6, Cel5\_A8 และ Cel5\_A12 ซึ่งมีขนาดประมาณ 850 bp และได้สุ่มเลือกชิ้นส่วนจากโคลน Cel5\_A4 เพื่อมาทำการวิเคราะห์หายีนที่สมบูรณ์ ด้วยเทคนิค Genome walking พบว่ามีความยาว 1,590 bp ซึ่งแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 530 กรดอะมิโน ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ endoglucanase A ของเชื้อ *Prevotella copri* 46% และจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolase family 5 เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีน พบ Signal sequence ความยาว 23 กรดอะมิโน จึงทำการโคลนยีนเป็น 2 รูปแบบ คือ Full-length gene และ Mature gene เข้าเวกเตอร์ pET28a(+), pET32a(+), pET43.1a(+) และ pPICZαa พบว่าสามารถพบการแสดงออกของยีน แบบ Mature gene ในเวกเตอร์ pET32a(+) ซึ่งโปรตีนที่ได้อยู่ในรูปของ Inclusion protein และมีการแสดงออกของยีน ทั้งแบบ Mature gene และ Full-length gene ในเวกเตอร์ pET43.1a(+) ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) ซึ่งโปรตีนอยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งจากการยืนยันด้วยเทคนิค Western blotting พบว่าโปรตีนจาก Mature gene (Cel5\_A4M) มีระดับการแสดงออกมากกว่าโปรตีนจาก Full-length gene (Cel5\_A4F) จึงเลือก Cel5\_A4M มาใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าสามารถย่อยซับสเตรต CMC ได้ โดยทำงานได้ดีที่ pH 5.0 และ อุณหภูมิ 50°C โดยมีค่า Specific activity ต่อ CMC เท่ากับ  $73.12 \pm 2.73$  Unit/mg

<b>Thesis Title</b>	Isolation and Expression of a Gene Encoding $\beta$ -endo Glucanase from Bovine Ruminal Bacteria
<b>Student</b>	Ms.Puttachart Pokathikorn
<b>Student ID.</b>	48065402
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Animal Science
<b>Year</b>	2010
<b>Thesis Advisor</b>	Assist.Prof.Dr.Kanya Jirajaroenrat
<b>Thesis Co-Advisor</b>	Dr.Sutipa Tanapongpipat

## ABSTRACT

The molecular genetic technique was used to identify target genes or proteins from environmental DNA. This research reports the isolation of a new endoglucanase gene from bovine ruminal bacteria using the sequence-driven analysis technique. Degenerate primers were designed based on conserved sequence of glycoside hydrolase family 5 and the resulting PCR product of 850 bp was identified from 5 clones which were Cel5\_A3, Cel5\_A4, Cel5\_6, Cel5\_A8 and Cel5\_A12. Clone Cel5\_A4 was then selected to amplify flanking region by genome walking technique. The obtained full length endoglucanase gene consisted of 1,590 which encoded a putative protein of 530 amino acids. Comparison of the amino acid of Cel5\_A4 with protein from Genbank database showed that Cel5\_A4 exhibited 46% identity to endoglucanase A from *Prevotella copri* belong to members of glycoside hydrolase family 5. This protein also harbored secretion signal sequence of 23 amino acids. Thus, to express this enzyme, either full-length or mature gene without its putative signal sequence was subsequence into cloned into pET28a(+), pET32a(+), pET43.1a(+) and pPICZ $\alpha$  expression vectors. The recombinant clone of mature gene from pET32a(+) was expressed as inclusion protein whereas both full-length gene (Cel5\_A4F) and mature gene (Cel5\_A4M) from pET43.1a(+) were expressed as soluble form. Western blotting technique analysis showed that the level of expression of Cel5\_A4M was higher expression than that of Cel5\_A4F. The recombinant Cel5\_A4M was then purified and characterize. It exhibited specific activity of 73.12 $\pm$ 2.73 Unit/mg when CMC was used as a substrate and optimal working condition was found at 50°C and pH 5.0.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ. ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร. ลีลี่ เอื้อวิไลจิตร ดร.ปิยนันท์ หาญพิชานูชัย คุณกฤตพงศ์ แซ่ตั้ง คุณพีรดา พรหมคอนกอย รวมทั้งนักวิจัยและผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ห้องปฏิบัติการวิจัยเอนไซม์เทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณอาจารย์นายสัตวแพทย์ ชนาธิป ธรรมการ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากรูเมนของโค

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาสัตวศาสตร์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้าขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาสัตวศาสตร์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ ในคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมากจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พุทธชาติ โภคาธิกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
รายการคำย่อ.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....	2
1.5 ระยะเวลาในการวิจัย.....	2
1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ภาวะอาหารของโค.....	4
2.1.1 ภาวะรูเมน.....	5
2.1.2 ภาวะรังผึ้ง.....	5
2.1.3 ภาวะสามสิบก๊ีบ.....	6
2.1.4 ภาวะแพะแท้.....	6
2.2 แบคทีเรียในภาวะรูเมน.....	6
2.2.1 หน้าที่หลักของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในภาวะรูเมน.....	10
2.3 คาร์โบไฮเดรต.....	13
2.3.1 ประเภทของคาร์โบไฮเดรต.....	14
2.4 เอนไซม์.....	17
2.4.1 การจำแนกตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์.....	17
2.4.2 การจำแนกตามความคล้ายของลำดับกรดอะมิโน.....	18
2.4.3 ประเภทและหน้าที่ของเอนไซม์เซลลูเลส.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลเป็นกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.4 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์.....	23
2.5 เมทาจีโนมิกไลบรารี (Metagenomic library) .....	23
2.5.1 Function-driven analysis.....	25
2.5.2 Sequence-driven analysis.....	27
2.5.3 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของเทคนิค function-driven analysis และ sequence-driven analysis.....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....	30
3.2 เครื่องมือ.....	30
3.3 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค และการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง.....	31
3.3.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโค.....	31
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมน.....	31
3.4 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	32
3.4.1 การออกแบบ Degenerate primer .....	32
3.4.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	32
3.4.3 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอ ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า.....	33
3.5 การถ่ายถอดชิ้นส่วนยีน (Partial Gene) เอนโดเซลลูเลสและการคัดเลือกโคลน.....	33
3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้เป็น Competent cell .....	33
3.5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับเวกเตอร์ .....	34
3.5.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ Competent cell ด้วยวิธี Heat shock.....	34
3.5.4 การคัดเลือกโคลนโดยเทคนิค Blue/white screening .....	34
3.5.5 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit.....	35
3.5.6 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	35
3.5.7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล .....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 การทำ Genome Walking ด้วยเทคนิค Semi-random, Two stepped PCR .....	36
3.6.1 การออกแบบ Specific primer.....	36
3.6.2 การทำ ST-PCR .....	36
3.7 การทำ Genome Walking ด้วย Advantage <sup>®</sup> Genomic (Clontech) .....	38
3.7.1 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	38
3.7.2 การทำ Digested DNA ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Wizard <sup>®</sup> DNA Clean-up System.....	38
3.7.3 การเชื่อมต่อ Digested DNA กับ GenomeWalker Adaptor.....	39
3.7.4 การทำพีซีอาร์.....	39
3.7.5 การสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากเจลอะกาโรส ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit.....	40
3.7.6 การโคลนและคัดเลือกโคลนส่วนของชิ้นส่วนยีนเอนโคเซลลูเลส.....	41
3.7.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเชื่อมต่อดำดับนิวคลีโอไทด์.....	41
3.8 การโคลนยีนเอนโคกลูคาเนสที่สมบูรณ์.....	41
3.8.1 การเพิ่มจำนวนยีนเอนโคกลูคาเนสที่สมบูรณ์จากจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	41
3.8.2 การโคลนและการคัดเลือกโคลนด้วยวิธี Size screening.....	42
3.8.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์กับฐานข้อมูล.....	42
3.8.4 การวิเคราะห์หาบริเวณ Cleavage site, Restriction site และ Rare codon.....	43
3.9 การเตรียมยีนและเวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน.....	43
3.9.1 การเตรียมเวกเตอร์.....	43
3.9.2 การออกแบบไพรมเมอร์ .....	44
3.9.3 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิดลูกผสม และการทำให้บริสุทธิ์.....	45
3.10 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> ... ..	46
3.10.1 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมลงสู่แบคทีเรียพาหะและการตรวจสอบยีน.....	46
3.10.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย <i>E.coli</i> .....	46
3.10.3 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE.....	47
3.10.4 Western blotting.....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.10.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย HisTrap™ HP Column.....	47
3.10.6 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	47
3.11 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ <i>Pichia pastoris</i> .....	48
3.11.1 การเตรียมเชื้อ <i>P. pastoris</i> ให้เป็น competent cell.....	48
3.11.2 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมลงสู่ <i>P. pastoris</i> competent cell และการตรวจสอบยีน.....	48
3.11.3 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์.....	49
3.11.4 การตรวจสอบปริมาณยีนที่โคลนด้วยวิธีพีซีอาร์.....	49
3.11.5 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในยีสต์.....	49
3.12 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์.....	50
3.12.1 การทดสอบด้วย Carboxymethyl cellulase (CMC) ด้วยวิธี DNS.....	50
3.12.2 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดี.....	50
3.12.3 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี.....	50
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล .....</b>	<b>51</b>
4.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโค.....	52
4.2 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเอนโคเซลลูเลสจากแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	53
4.2.1 ผลการออกแบบ Degenerate primer.....	53
4.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	54
4.3 ผลการถ่ายถอดชิ้นส่วนยีนเบต้าเอนโคกลูคาเนสและการคัดเลือกโคลน.....	55
4.3.1 การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	55
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	56
4.4 ผลการทำ Genome walking ด้วยเทคนิค ST-PCR และการคัดเลือกโคลน.....	58
4.4.1 ผลการออกแบบ specific primer.....	58
4.4.2 ผลการทำ ST-PCR.....	59
4.4.3 ผลการคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	62
4.5 ผลการทำ Genome Walking ด้วย Advantage® Genomic.....	63
4.5.1 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	63
4.5.2 ผลการทำ genome walking.....	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดูแบบลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.3 ผลการคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	67
4.5.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอน โคกลูคาเนส.....	68
4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลของยีน Cel5_A4.....	69
4.6.1 ผลการคัดเลือกและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนเอน โคเซลลูเลส.....	69
4.6.2 ผลการวิเคราะห์หาบริเวณ Cleavage site, Restriction site และ Rare codon.....	72
4.7 ผลการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> .....	73
4.7.1 ผลการเตรียมยีนและการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....	73
4.7.2 ผลการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย <i>E.coli</i> .....	75
4.8 ผลการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ <i>Pichia pastoris</i> .....	79
4.8.1 ผลการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนในยีสต์ <i>P. pastoris</i> .....	79
4.9 ผลการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย HisTrap™ HP Column.....	80
4.10 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์.....	82
4.10.1 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	82
4.10.2 ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงาน ของเอนไซม์.....	83
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	85
บรรณานุกรม.....	87
ภาคผนวก.....	98
ภาคผนวก ก แผนที่เวกเตอร์.....	98
ภาคผนวก ข สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และยาปฏิชีวนะ.....	104
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน.....	111
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ประวัติดูเขียน.....	127

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน อาหารและผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์.....	11
2.2 การศึกษาเมทาจีโนมิกของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	12
2.3 จำแนกเอนไซม์เซลลูเลสตามกลุ่มของ glycoside hydrolase และตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์.....	20
2.4 การค้นพบขึ้นจากเทคนิค function-driven analysis.....	25
2.5 การเปรียบเทียบวิธี function-driven analysis และ sequence-driven analysis.....	29
3.1 ลักษณะจำเพาะของเวกเตอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการเตรียมเวกเตอร์.....	44
4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับ กรดอะมิโนจากฐานข้อมูล.....	57
4.2 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล.....	70
4.3 การเลือกใช้แบคทีเรียพาทะกับพลาสมิดลูกผสมในการทดลอง.....	75
4.4 คุณสมบัติของเอนไซม์เอนโคกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....	84
ตารางภาคผนวกที่	
ข1 แสดงอัตราส่วนการผสมสารละลาย 1X phosphate buffer.....	107
ค1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	122
ค2 ตารางแปลรหัสพันธุกรรม (genetic code).....	124
ค3 รหัส IUB code.....	125

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนต่างๆ ในกระเพาะอาหารของโค.....	4
2.2 โครงสร้างจากผิวเซลล์ของแบคทีเรีย <i>Fibrobacter succinogens</i> .....	8
2.3 ลำดับชั้นของโครงสร้างผนังเซลล์พืช.....	8
2.4 แบบจำลองเซลล์โลโซมของเชื้อ <i>Clostridium thermocellum</i> .....	9
2.5 ลักษณะการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกระเพาะรูเมน.....	10
2.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตย่อยได้ในกระเพาะรูเมนของโค.....	13
2.7 สูตรโครงสร้างแบบเป็นวงชนิดอัลฟา ( $\alpha$ ) และเบต้า ( $\beta$ ) ของกลูโคส.....	14
2.8 การจัดเรียงตัวของเซลล์โลสในผนังเซลล์พืช.....	17
2.9 ลักษณะโครงสร้าง 3D ของเอนไซม์ Glycoside hydrolase แฟมิลีต่างๆ.....	19
2.10 ลักษณะของ Active site ของเอนไซม์ในกลุ่ม Glycoside hydrolase.....	21
2.11 เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลล์โลส.....	22
2.12 การทำเมทาจีโนมิกในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	24
2.13 ลักษณะการทำงานของระบบ Intracellular screen.....	27
3.1 ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา ST-PCR.....	37
3.2 ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากการใช้ GenomeWalker Adaptor .....	39
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโค ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	52
4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	53
4.3 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	54
4.4 ผลการตัดพลาสมิดที่สุ่มเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> และ <i>BamHI</i> ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	55
4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่นำมาออกแบบไพรเมอร์.....	58
4.6 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา Primary PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	59
4.7 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา Secondary PCR โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์จาก primary PCR 1:50 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
โดยไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

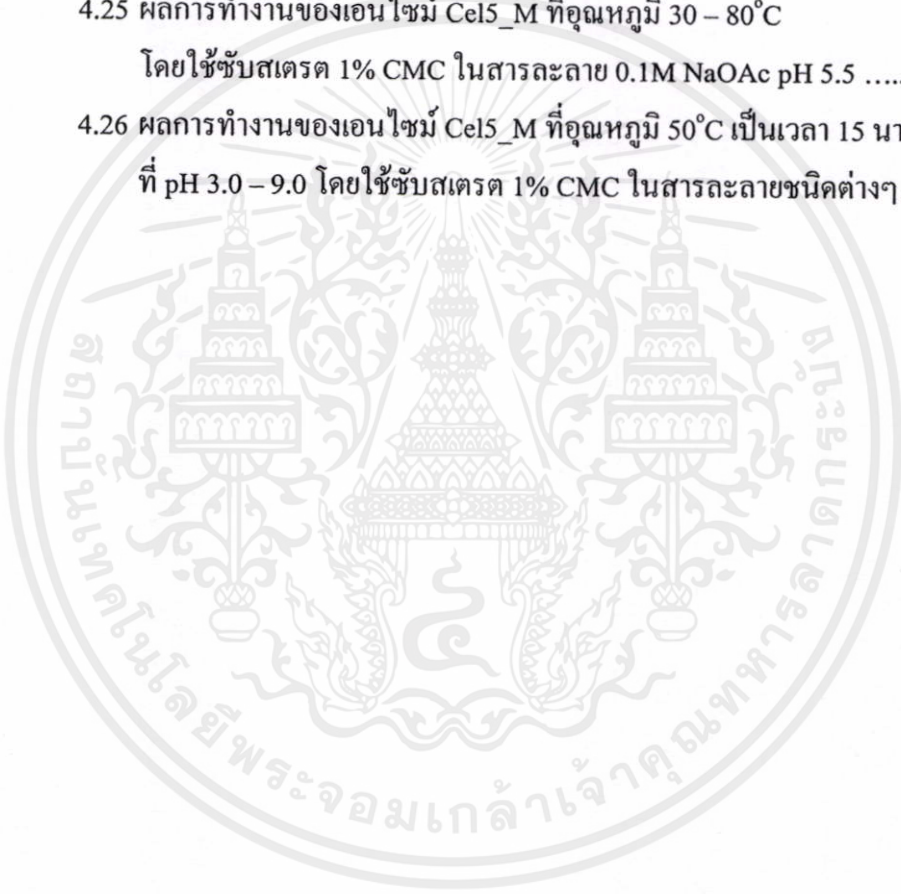
## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค Gel extraction ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	61
4.9 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> กับ <i>BamHI</i> ของพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/A4_Dw(d2) ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ....	62
4.10 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	63
4.11 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา Primary PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	64
4.12 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา Secondary PCR โดยใช้ผลผลิตจาก primary PCR เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	65
4.13 ผลการทำ gel extraction ของผลผลิตพีซีอาร์อาร์ ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	66
4.14 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> กับ <i>BamHI</i> ของพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/A4_Up ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	67
4.15 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน กับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank.....	68
4.16 ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีน <i>Cel5_A4</i> ตรวจสอบด้วย 1 % เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	69
4.17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Cel5_A4</i> และลำดับกรดอะมิโน จากฐานข้อมูล Genbank.....	71
4.18 ผลการหา signal sequence ของยีน <i>Cel5_A4</i> ด้วยโปรแกรม signalP 3.0.....	72
4.19 ตัวอย่างขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา colony PCR ของโคลน pET43.1/Cel5_F และ pET43.1/Cel5_M ตรวจสอบด้วย 0.8 % เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	74
4.20 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน pET32a/Cel5_F ด้วย 10% SDS-PAGE .....	76
4.21 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการป็นแยกจากโคลน pET32a/Cel5_F ด้วย 10% SDS-PAGE และการทำ Western blotting .....	77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คำปรึกษาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.22 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการปั่นแยกจากโคลน pET43.1a/Cel5_M และ pET43.1a/Cel5_F ด้วย 10% SDS-PAGE .....	78
4.23 ผลการวิเคราะห์โปรตีนผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ HP column ที่ความเข้มข้นของ imidazole ต่างกัน .....	80
4.24 ผลการทำโปรตีนให้เข้มข้นด้วย Affinity column.....	81
4.25 ผลการทำงานของเอนไซม์ Cel5_M ที่อุณหภูมิ 30 – 80°C โดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลาย 0.1M NaOAc pH 5.5 .....	82
4.26 ผลการทำงานของเอนไซม์ Cel5_M ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ pH 3.0 – 9.0 โดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลายชนิดต่างๆ.....	83



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพภาคผนวกที่	หน้า
ก1 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	98
ก2 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pET28a.....	99
ก3 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pET32a.....	101
ก4 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pET43.1a.....	102
ก5 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pPICZαa.....	103
ค1 แสดงบริเวณอนุรักษ์ของยีนเบต้าเอน โคกลูคาเนส ในกลุ่ม Glycoside hydrolase family 5.....	111
ค2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5_A3.....	112
ค3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5_A4.....	113
ค4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5_A6.....	114
ค5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5_A8.....	115
ค6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5_A12.....	116
ค7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างที่สุ่มเลือก กับลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มตัวอย่าง.....	117
ค8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของยีน Cel5_A4.....	119
ค9 แสดงบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน Cel5_A4 ด้วยโปรแกรม pDRAW32.....	120
ค10 แสดงผลการหา Rare codon ของยีน Cel5_A4 ด้วย โปรแกรม Rare Codon Calculator (RaCC).....	121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## รายการคำย่อ

$\mu\text{l}$	=	ไมโครลิตร
ml	=	มิลลิลิตร
L	=	ลิตร
ng	=	นาโนกรัม
$\mu\text{g}$	=	ไมโครกรัม
mg	=	มิลลิกรัม
bp	=	คู่เบส
kb	=	กิโลเบส
kDa	=	กิโลดาลตัน
$\mu\text{M}$	=	ไมโครโมล
mM	=	มิลลิโมลาร์
M	=	โมลาร์
MW	=	น้ำหนักโมเลกุล
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
nm	=	นาโนเมตร
rpm	=	รอบต่อนาที
mA	=	มิลลิแอมแปร์
Unit	=	ยูนิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยจัดว่าเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตสัตว์ อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ระบบการจัดการฟาร์มที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงอาหารสัตว์ซึ่งนับว่าเป็นหัวใจสำคัญของการผลิตสัตว์ วัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนมากได้มาจากพืช ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานและโปรตีนที่สำคัญสำหรับสัตว์ แต่วัตถุดิบที่ได้จากพืชมักมีองค์ประกอบที่ขัดขวางต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารของสัตว์ หรือที่เรียกว่า สารต้านโภชนา (antinutritional factor, ANF) เช่น ลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่เป็นโครงสร้างสำคัญของเซลล์พืช มีปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ ส่วนมากจะพบในชัง, เปลือก, ราก, ลำต้น และใบของพืชอาหารสัตว์ (ศรีสกุล วรจันทร์. 2539) การปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนาในวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้น สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ เช่น การบด หรือการย่อยสลายทางเคมี เช่น การหมัก หรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จำเพาะ เป็นการปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ที่น่าสนใจวิธีหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เป็นการทำงานของโปรตีนที่มีความสามารถย่อยโมเลกุลที่ซับซ้อนให้เป็นโมเลกุลเล็กๆ ในรูปที่สามารถดูดซึมได้ เอนไซม์มีความจำเพาะสูง ทั้งต่อชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และชนิดของซับสเตรตของปฏิกิริยา นอกจากนี้แล้วเอนไซม์ยังเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือ ไม่ต้องใช้อุณหภูมิ และความกดอากาศสูง ซึ่งจะเหมาะกับการผลิตอาหารสัตว์ เพื่อรักษาระดับของโภชนาในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งแหล่งที่มาของเอนไซม์ มีทั้งจากพืช, สัตว์ หรือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรีย ซึ่งมีแบคทีเรียมากมายหลายชนิดที่สามารถแยกได้จากธรรมชาติภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ ทำให้ได้เอนไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปด้วย

เอนไซม์ที่สำคัญในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลักคือ เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้อีกเป็นสามประเภท คือ เอกโซเซลลูเลส, เอนโดกลูคาเนส (เอนโดเซลลูเลส) และเซลโลไบโอส ซึ่งมีความแตกต่างในการตัดจำเพาะของเอนไซม์ ซึ่งการวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่สามารถตัดสายเซลลูโลสสายยาวให้มีขนาดสั้นลง ทำให้ง่ายต่อการสลายเซลลูโลสจากผนังเซลล์พืช ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์สูงสุดคือกลูโคส ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนต้น มักได้แก่แบคทีเรียจำพวก *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ

แบคทีเรียที่ไม่ต้องใช้ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งยากต่อการเพาะเลี้ยง แต่ในปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic Engineering) สามารถตัดต่อยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ ไปใส่ในจุลินทรีย์เจ้าบ้านชนิดอื่น ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะปกติ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ได้ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ จึงมีเป้าหมายเพื่อทำการหาข้อกำหนดการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ หรือเพื่อประโยชน์ในงานด้านอื่นๆ ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดเลือกยีนสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค
- 2) เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
- 3) เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ได้

## 1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

- 1) ห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) ห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี หน่วยปฏิบัติการ Bioresource Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 3) ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอน คือ

- 1) เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโค และสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้งหมด
- 2) การโคลนยีนเอนโดกลูคาเนสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์
- 3) ถ่ายทอดยีนเอนโดกลูคาเนสไปยัง *Escherichia coli* และตรวจสอบโคลนที่ได้
- 4) ศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนส
- 5) ศึกษาลักษณะการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้

## 1.5 ระยะเวลาในการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ใช้เวลาในการทำงานวิจัยตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2550 ถึงเดือนธันวาคม 2553  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นผู้มีสิทธิพิเศษสงวนลิขสิทธิ์และต้องขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ก่อนนำไปใช้

## 1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ยื่นกำหนดการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค
- 2) ทราบถึงคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่แสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli*

*coli*



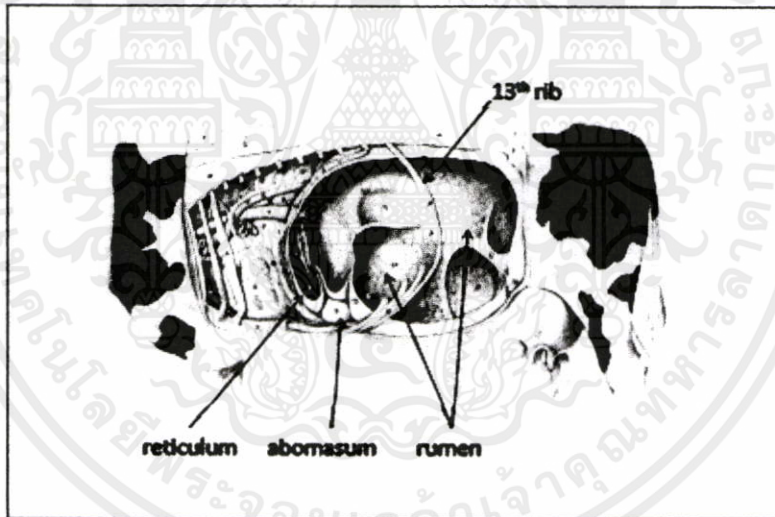
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระเพาะอาหารของโค

โคเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งมีกระเพาะอาหารแบบกระเพาะรวม ประกอบด้วยกระเพาะ 4 ส่วน คือ กระเพาะรูเมน หรือกระเพาะผ้ำขี้วัว (rumen), กระเพาะรังผึ้ง (reticulum), กระเพาะสามติบกลีบ (omasum) และกระเพาะแท้ (abomasum) (ภาพที่ 2.1) ซึ่งตั้งแต่กระเพาะรูเมนจนถึงกระเพาะสามติบกลีบ จัดได้ว่าเป็นกระเพาะส่วนหน้า (fore stomach) เรียกรวมว่า esophageal sacculum เยื่อหุ้มของกระเพาะอาหารส่วนหน้า เป็นส่วน esophageal region หรือ nonglandular region ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีต่อมสร้างน้ำย่อยอยู่และเยื่อหุ้มเป็นชนิด stratified squamous epithelium โดยในกระเพาะส่วนนี้มีการหมักอาหารโดยการย่อยโดยเชื้อจุลินทรีย์ และทยอยส่งไปยังกระเพาะแท้ และลำไส้เล็ก ( วิโรจน์ จันทรรัตน์. 2540)



ภาพที่ 2.1 ส่วนต่างๆ ในกระเพาะอาหารของโค (ที่มา: Nickle *et al.* 1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.1 กระเพาะรูเมน

กระเพาะรูเมนเป็นกระเพาะส่วนแรกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยทางส่วนหน้าเชื่อมติดกับหลอดอาหาร กระเพาะส่วนรูเมนมีขอบเขตจากกระบังลมจนถึงส่วนเชิงกราน และอยู่ทางด้านซ้ายของช่องท้อง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ dorsal sac และ ventral sac กระเพาะส่วนนี้ในลูกโคที่เกิดใหม่ จะมีขนาดเล็กกว่ากระเพาะแท้ แต่เมื่อโตเต็มที่จะมีความจุประมาณ 200 ลิตรอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไป จะมีการย่อยเกิดขึ้นที่ส่วนของรูเมน โดยอาศัยปฏิกิริยาการหมัก (fermentation) โดยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อโปรโตซัวบางชนิด กระเพาะรูเมนมีหน้าที่เก็บอาหาร เพื่อรอกการสำรอกเข้าสู่ปากสำหรับการเคี้ยวใหม่ และเป็นแหล่งที่หมักบูดของอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยเกี่ยวกับการดูดซึมของกรดไขมันระเหยได้และผลผลิตอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในรูเมน และผนังรูเมนยังช่วยบีบตัวเพื่อขับไล่แก๊สซึ่งเป็นผลผลิตจากการหมักบูด เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) และมีเทน (CH<sub>4</sub>) อีกด้วย

เนื่องจากกระเพาะรูเมนเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นสภาพภายในกระเพาะรูเมนจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตและทำกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ (ฉลอง วชิราภากร. 2541) ดังนี้

- 1) ปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter content) วัตถุแห้งในรูเมนมักจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์กินว่ามีความชื้นสูงแค่ไหน เช่น ในหญ้าสดหรือ หญ้าหมัก จะมีปริมาณความชื้นสูงกว่าหญ้าแห้ง หรือฟาง เป็นต้น โดยปริมาณวัตถุแห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 10 – 15%
- 2) อุณหภูมิภายใน (temperature) ภายในรูเมนมีอุณหภูมิประมาณ 38 – 42 °C
- 3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มักมีค่าอยู่ในช่วง 6.0-7.0 แต่เนื่องจากการย่อยและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ในรูเมน อาจทำให้เกิดกรดมากพอที่จะทำให้ pH ลดลงมาถึง 2.5 – 3.0 ได้ แต่ในน้ำลายของสัตว์มีฟอสเฟตและไบคาร์บอเนตที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างอยู่นอกจากนี้กรดที่เกิดขึ้นมักถูกดูดซึมออกไปใช้งานอย่างรวดเร็ว ดังนั้นค่า pH ในรูเมนจึงไม่มีสภาพเป็นกรดมากนัก
- 4) สภาพไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) เนื่องจากในรูเมนมีสภาพเป็นดังหมักที่เป็นระบบปิด ดังนั้นจุลินทรีย์ในรูเมนส่วนใหญ่จึงเป็นประเภทไม่ใช้ออกซิเจน

### 2.1.2 กระเพาะรังผึ้ง

กระเพาะรังผึ้งเป็นส่วนหนึ่งของกระเพาะที่มีขนาดเล็กที่สุด เชื้อเมือกมีลักษณะเป็นสันคล้ายรังผึ้ง และเซลล์บุผิวเป็น stratified squamous epithelium กระเพาะส่วนนี้อยู่ต่อหลังกระบังลม และตรงตำแหน่งเดียวกับหัวใจ กระเพาะอาหารส่วนนี้จะทำหน้าที่ช่วยในการขับอาหารกลับสู่ลำคอหรือควบคุมอาหารที่ย่อยแล้วบางส่วน ส่งต่อไปยังกระเพาะสามลิบกลีบ

### 2.1.3 กระเพาะสามลิบกليب

กระเพาะสามลิบกليبมีรูปร่างกลม ผนังภายในประกอบไปด้วยแผ่นกล้ามเนื้อที่เป็นกลีบ โดยยื่นออกมาจากด้านบน เชื่อมเมือกส่วน papillar ลื่นๆ ช่วยในการดูดซึมสารอาหารประเภทกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการบีบตัวเพื่อขับอาหารให้เข้าสู่กระเพาะแท้

### 2.1.4 กระเพาะแท้

กระเพาะแท้เป็นกระเพาะที่มีต่อมสร้างน้ำย่อย และน้ำกรดของสัตว์กระเพาะรวม มีเยื่อภายในเป็นแบบ simple columnar epithelium ที่ผลิตน้ำเมือกออกมาเพื่อช่วยป้องกันกรดเกลือในน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร

ในสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว กระเพาะรูเมนจะมีปริมาตรถึง 80% ในขณะที่กระเพาะส่วนอื่นๆ คือ กระเพาะรังผึ้ง, กระเพาะสามลิบกليب และกระเพาะแท้ มีความจุ 5, 7 และ 8% ตามลำดับ

## 2.2 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนนั้น ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ปริมาณ  $10^{10}$  -  $10^{11}$  เซลล์/มล, โปรโตซัว  $10^5$  -  $10^7$  เซลล์/มล และเชื้อราประมาณ  $10^5$  เซลล์/มล ของปริมาณของเหลวในกระเพาะรูเมน (Orpin and Joblin. 1997; Williams and Coleman. 1997) แต่แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการย่อยสลายอาหารสูง ทั้งยังสามารถสร้างสารอาหารจำพวกโปรตีน ไขมัน ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต และกรดไขมันระเหยได้ที่จำเป็นได้ปริมาณมากอีกด้วย (Williams and Coleman. 1997) ซึ่งโคสามารถดูดซึมผลผลิตจากการย่อยของจุลินทรีย์เหล่านี้ทางผนังของกระเพาะรูเมน เพื่อนำไปใช้ในการดำรงชีวิต และสร้างผลผลิต โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะแบคทีเรีย สามารถแบ่งย่อยตามบริเวณที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียได้เป็น 5 ประเภท คือ

- 1) แบคทีเรียที่ลอยอยู่อย่างอิสระในกระเพาะรูเมน
- 2) แบคทีเรียที่เกาะอยู่กับชิ้นส่วนของอาหารอย่างหลวมๆ
- 3) แบคทีเรียที่ติดแน่นอยู่กับชิ้นส่วนของอาหาร
- 4) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณเยื่อผิวของกระเพาะรูเมน
- 5) แบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวของโปรโตซัวหรืออุ้งหุ้มสปอร์ของเชื้อรา (Cheng and Costerton. 1980; McAllister *et al.* 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ซึ่งแบคทีเรียที่อาศัย โดยการเกาะติดกับอาหาร (กลุ่มที่ 2 และ 3) เป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากที่สุดถึงประมาณ 75 % ของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Craig *et al.* 1987; Fosberg and Lam. 1977; Minato *et al.* 1993) และในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เกาะติดกับอาหารนี้ มีจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์

เอนโคกลูคาเนสและไซลาเนส 88 - 91 % , อะไมเลส 70% และ โปรตีเอส 75 % (Minato *et al.* 1993; Williams and Strachan. 1984) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียในกลุ่มที่เกาะติดอยู่กับอาหารเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับกระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะรูเมน ส่วนแบคทีเรียที่ลอยอยู่อย่างอิสระในของเหลวของกระเพาะรูเมน และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณเยื่อผิวของกระเพาะรูเมนนั้นมีส่วนช่วยในการย่อยของอาหารเพียงเล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียที่อาศัยโดยการเกาะติดอยู่กับพื้นผิวของโปรโตซัวและเชื้อรา (ประมาณ 1 % ของประชากรทั้งหมด) แทบไม่ส่วนในการย่อยอาหารในกระเพาะรูเมน (Williams and Strachan. 1984)

โดยลักษณะการเข้าเกาะผนังเซลล์พืชของแบคทีเรีย สามารถอธิบายได้เป็น 4 ระยะ คือ

1) แบคทีเรียพบกับอนุภาคของเซลล์พืช ซึ่งการที่แบคทีเรียสามารถมาเจอกับอนุภาคของเซลล์พืชยังหาข้อสรุปไม่ได้ เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีแฟลกเจลล่า หรือซีเลียเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ อีกทั้งการเคลื่อนที่ของอาหารในกระเพาะรูเมนมีน้อย (Weimer. 1996) ดังนั้นสมมติฐานเบื้องต้นคือการเจอกันของแบคทีเรียกับอนุภาคของเซลล์พืช ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียและอนุภาคของอาหารที่อยู่ในกระเพาะรูเมน

2) แบคทีเรียเริ่มทำการเกาะกับผนังเซลล์พืชอย่างไม่จำเพาะ ด้วยการยึดเหนี่ยวของแรงแรงแควาลัวร์ (van der Waals force) เมื่อแบคทีเรียเข้าใกล้กับผนังเซลล์พืชในระยะ 2 - 50 nm (Busscher and Weerkamp. 1987; Pell and Schofield. 1993) นอกจากนี้ยังพบการยึดเหนี่ยวด้วยแรงทางเคมีชีวภาพของแบคทีเรีย ด้วยชั้นของไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) ซึ่งค้นพบโดย Costerton *et al.* (1981) ซึ่งประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์, ไกลโคโปรตีน หรือ โปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Fibrobacter succinogens* และเป็นโครงสร้างประเภทเปปทิโดไกลแคนที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Ruminococcus flavefaciens* หรือ *Ruminococcus albus* ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถยึดติดกับพื้นผิวต่างๆ ทำให้แบคทีเรียสามารถจับกับพื้นผิวของเซลล์พืชที่ไม่จำเพาะได้ แต่พืชอาหารสัตว์บางชนิดที่มีคิวติน (cutin) เคลือบผิวจะเป็นตัวขัดขวางการเข้าเกาะของไกลโคคาลิกซ์ ดังนั้นจึงต้องอาศัยขบวนการทางกายภาพ คือการเคี้ยวเอื้อง เพื่อให้คิวตินที่เคลือบผิวของพืชอาหารสัตว์แตกออก และเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการเข้าเกาะของเชื้อแบคทีเรีย

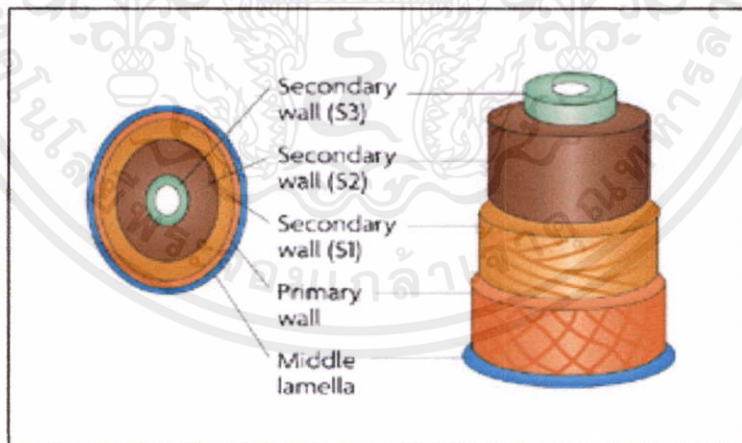
3) แบคทีเรียสร้างพันธะที่จำเพาะระหว่างเชื้อแบคทีเรียและซับสเตรตการเกิดพันธะแบบจำเพาะจะเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียสามารถจดจำซับสเตรตได้ (Pell and Schofield. 1993) โครงสร้างของผิวเซลล์แบคทีเรียจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยจะมีการรวมตัวของตุ่มที่ยื่นออกมาจากชั้นของไกลโคคาลิกซ์ เรียกว่า adhesin เพื่อยึดติดกับผนังเซลล์ของพืช (ภาพที่ 2.2) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการย่อยจะเกิดขึ้นในระยะที่ 4 เมื่อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนขึ้นบนซับสเตรต แต่ถ้าแบคทีเรียเข้าเกาะในบริเวณที่ไม่สามารถย่อยได้ จะไม่มีการเพิ่มจำนวนแต่อย่างใด

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของสำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าวของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างที่เป็นตุ่มยื่นออกมาจากผิวเซลล์แบคทีเรีย *F.succinogenes* เพื่อยึดติดกับ ซับสเตรต (ก) และลักษณะการเกิดโคโลนีบนพื้นผิวของซับสเตรต (ข) (ที่มา: Miron *et al.* 2001)

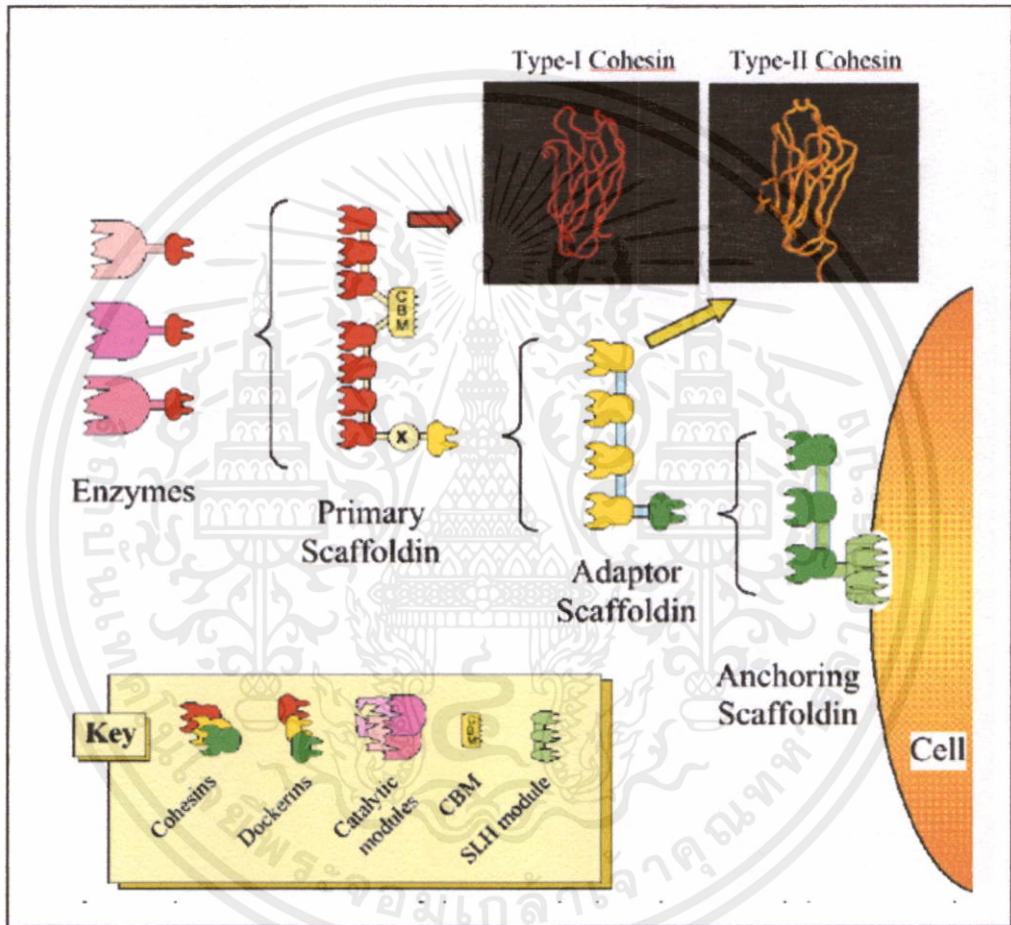
4) แบคทีเรียทำการเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของผนังเซลล์พืช โดยในบริเวณที่มีเนื้อเยื่อพืช มาก จะมีการแพร่กระจายของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว และจะเกิดการย่อยจากด้านในของผนังเซลล์ พืชออกมาด้านนอก กล่าวคือ จะเกิดการย่อยจากชั้น S3, S2 และ S1 ของผนังชั้นที่สองของเซลล์ พืชตามลำดับ (ภาพที่ 2.3) จากนั้นจึงเกิดการย่อยในชั้นของมิดเดิลลามลลา เป็นขั้นสุดท้าย (Cheng *et al.* 1983; McAllister *et al.* 1994; Weimer. 1996) นอกจากนี้ Akin (1989) ยังค้นพบว่ารูปแบบ การย่อยส่วนประกอบของพืชโดยแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน มักเริ่มต้นจาก mesophyll, phloem, epidermis, parenchyma bundle sheath, sclerenchyma, lignified vascular xylem ตามลำดับ



ภาพที่ 2.3 ลำดับชั้นของ โครงสร้างผนังเซลล์พืช (ที่มา: Sticklen. 2008)

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกลุ่มของเอนไซม์ขนาดใหญ่ ที่เรียกว่า เซลลูโลซอสม (cellulosome) ซึ่งมักจะอยู่บนบริเวณที่เป็นตุ่มยื่น (protuberances) บนผิวของแบคทีเรียเมื่อไม่ผ่านการมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนหรือวิธีทาง immunochemical ซึ่งมักจะพบในแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน รวมถึงแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วย (Lamed *et al.* 1983, 1987; Miron *et al.*

1989, 1990) ซึ่งงานวิจัยส่วนมากที่ศึกษาจากเชื้อในกลุ่ม *Clostridium spp.* ระบุว่า เชื้อในกลุ่มนี้มักมีการทำงานของเอนไซม์ร่วมกันเป็นเซลลูโลโซม (cellulosome) ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ มี scaffoldins หรือ cellulosome-integrating protein ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนที่ใช้ยึดส่วน catalytic domain ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และ cellulose-binding domain (CBD) เข้าด้วยกัน จากนั้นจึงยึดติดกับผิวของแบคทีเรียประกอบด้วย cohesin และ dockerin หรือที่เรียกว่า anchoring protein อีกชั้นหนึ่ง (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 แบบจำลองเซลลูโลโซมของเชื้อ *Clostridium thermocellum* (ที่มา: Bayer, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1 หน้าที่หลักของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน

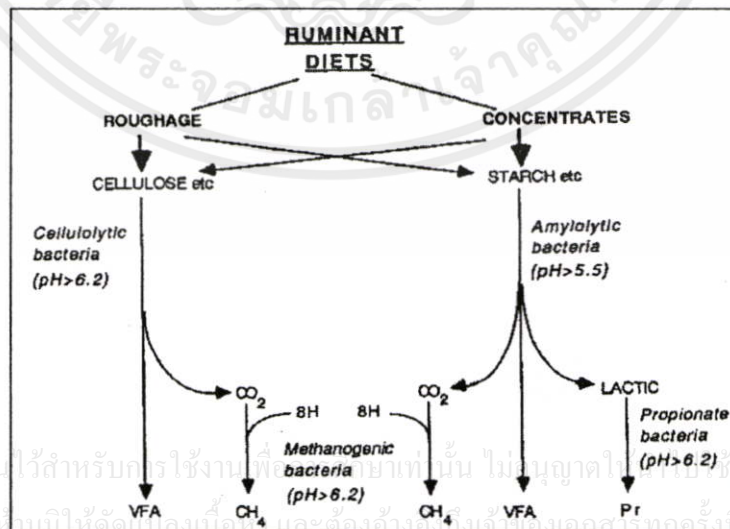
จุลินทรีย์ที่อาศัยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น มีหน้าที่สำคัญ ดังต่อไปนี้ (วิโรจน์ จันทรรัตน์. 2540; Lee. 2007)

1) ช่วยย่อยอาหารเยื่อใย เนื่องจากพืชที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไป จะมีคาร์โบไฮเดรต ในรูปของแป้งและเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสัตว์กระเพาะเคี้ยวรวมถึงกระเพาะอาหารของมนุษย์ ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่เอนไซม์ที่ผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน จะสามารถย่อยสลายเซลลูโลส รวมถึงสารประกอบเซลลูโลสชนิดอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส ให้เป็น กรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดบิวทริก (butyric acid), กรดโพรไพโอนิก (propionic acid) เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 60 – 80% ของพลังงานทั้งหมดที่ได้จากกรดไขมันระเหยได้ (ภาพที่ 2.5)

2) ช่วยสร้างโปรตีน เชื้อจุลินทรีย์ในรูเมน สามารถใช้สารประกอบโตรเจนที่ไม่ใช่ โปรตีนเช่น ยูเรีย หรือแอมโมเนีย ให้ไปเป็นโปรตีนของตัวเชื้อจุลินทรีย์เองได้ ด้วยเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ย่อยจนเกิดเป็นแอมโมเนีย จากนั้นจุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียเหล่านี้ในการดำรงชีวิตและ เพิ่มจำนวน โดยต้องอาศัยแหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ที่ตายแล้วจะถูกย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะแท้ เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนอีกทางหนึ่งด้วย

3) ช่วยย่อยอาหารจำพวกไขมัน กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกระเพาะรูเมนจะถูกทำให้อิ่มตัวโดยกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) จากนั้นไขมันจะถูกย่อยสลายต่อ ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรไพโอนิก

4) สร้างวิตามินบี ซี และ เค จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนสามารถสร้างวิตามินเหล่านี้ และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง



ภาพที่ 2.5 ลักษณะการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียชนิดต่างๆในกระเพาะรูเมน (ที่มา: Lee. 2007)

จุลินทรีย์ที่อาศัยในกระเพาะรูเมนของโค มีความแตกต่างในการใช้แหล่งอาหารเป็นสารตั้งต้น และผลผลิตสุดท้ายที่เชื่อสามารถสังเคราะห์ได้ เช่น *Ruminococcus sp.* ใช้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นและสังเคราะห์ อะซิเตด, ฟอ์เมต, ไฮโดรเจน *Prevotella sp.* ใช้แป้ง, เพกติน, ไซแลน เป็นสารตั้งต้นและสังเคราะห์ ซักซิเนต, อะซิเตด, ฟอ์เมต และ *Clostridium sp.* ใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้นและสังเคราะห์อะซิเตด, บิวทิเรต และ โพรพิโอเนต เป็นต้น (ตาราง 2.1)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน, อาหารและผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์

Species	Ruminal niche	Fermentation products
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CU	S, F, A
<i>Ruminococcus albus</i>	CU, HC	A, F, E, H <sub>2</sub>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CU, HC	S, F, A, H <sub>2</sub>
<i>Eubacterium ruminantium</i>	HC, DX, SU	A, F, B, L
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	ST	S, F, A, E
<i>Streptococcus bovis</i>	ST, SU	L, A, F, E
<i>Succinomonas amylolytica</i>	ST	S, A, P
<i>Prevotella ruminicola, albensis brevis and bryantii</i>	ST, PC, XY, SU	S, A, F, P
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	ST, CU, HC, PC	B, F, A, H <sub>2</sub>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	AA	Br, A
<i>Clostridium aminophilum</i>	AA	A, B
<i>Clostridium sticklanfii</i>	AA	A, Br, B, P

หมายเหตุ : CU, cellulose; HC, hemicellulose; DX, dextrans; SU, sugar; ST, starch; PC, pectin; XY, xylan; S, succinate; AA, amino acid; H<sub>2</sub>, hydrogen; F, formate; A, acetate; E, ethanol; B, butyrate; L, lactate; P, propionate; Br, branched-chain volatile fatty acids (ที่มา: คัดแปลงจาก Russell and Rychlik. 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากความแตกต่างของการใช้สารตั้งต้น และผลผลิตสุดท้ายที่สังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นแหล่งใหญ่ในการศึกษาเมทาจีโนมิก เพื่อคัดเลือกเอนไซม์หรือสารเคมี มาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม, เกษตรกรรม หรือการนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังศึกษาเชื้อจุลินทรีย์หรือการศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่างๆ เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียที่ป้องกันหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เป็นต้น (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 การศึกษาเมทาจีโนมิกของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

เป้าหมาย	ความคาดหวัง
<b>Novel biocatalysts</b>	เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมอาหารสัตว์, อุตสาหกรรมสิ่งทอ, อุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมยางรถยนต์ เป็นต้น โดยสามารถใช้เอนไซม์ทั้งในกระบวนการผลิตและการกำจัดของเสียจากกระบวนการผลิต
<b>Novel microbial species</b>	ศึกษาระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เพื่อนำแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้สัตว์ต่างชนิดกัน โดยการเสริมลงในอาหารสัตว์ หรือใช้เป็น pre-biotic ในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์
<b>Genes and enzymes</b>	การใช้แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารเป็นแหล่งในการศึกษาเพื่อพัฒนาเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือพลาสมิดเวกเตอร์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาด้านพันธุกรรมของพืช
<b>Antimicrobial substances</b>	คัดเลือกแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารเพื่อใช้เป็นแบคทีเรียที่ป้องกันหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
<b>Methanogens</b>	คัดเลือก methanogen และ methaogenesis จากประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน เพื่อการพัฒนาและปรับปรุงให้มีการสร้างก๊าซมีเทนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องให้ลดลง

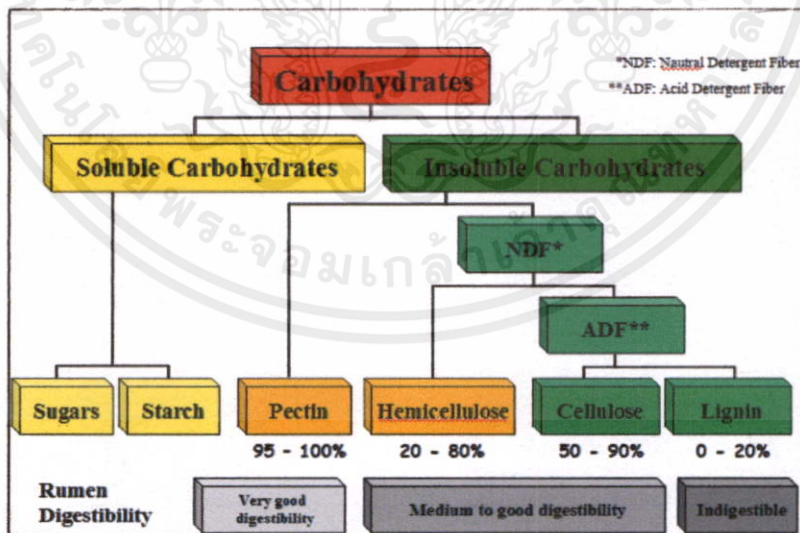
ที่มา: Singh *et al.* 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) หรือแซ็กคาไรด์ (saccharide) เป็นองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีอยู่มากที่สุดในพืชประมาณร้อยละ 50 – 80 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสะสม และองค์ประกอบโครงสร้างของเซลล์ คาร์โบไฮเดรตเป็น โมเลกุลที่ประกอบไปด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีอัตราส่วนปรกติของไฮโดรเจนต่อออกซิเจนเป็น 2 ต่อ 1 ดังนั้น ส่วนใหญ่จึงมีสูตรเป็น  $(CH_2O)_n$  นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น คาร์โบไฮเดรตจัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า พอลิไฮดรอกซีอัลดีไฮด์ (polyhydroxy aldehydes) หรือ พอลิไฮดรอกซีคีโตน (polyhydroxy ketones) หมายความว่า เป็นสารประกอบอัลดีไฮด์หรือคีโตนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หลายหมู่ใน โมเลกุลทำหน้าที่เป็น หมู่ฟังก์ชัน

เมื่อวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของพืชตามวิธีการของ Van Soest อาหารสัตว์สามารถแยกเชื้อใยออกเป็นชนิดต่างๆ คือ คาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble carbohydrate) คือน้ำตาลและแป้ง ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble carbohydrate) เมื่อนำมาต้มด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent) ส่วนที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์และเพกตินจะละลายออกมาส่วนที่เหลืออยู่คือส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เรียกว่า neutral detergent fiber (NDF) เมื่อนำไปทำละลายในสารละลายที่เป็นกรดจะไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสออกมา เหลือเฉพาะเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นเชื้อใยที่ย่อยสลายยาก ที่เรียกว่า acid detergent fiber (ADF) (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตย่อยได้ในกระเพาะรูเมนของโค (ที่มา: คัดแปลงจาก Mazzia and เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า Walker, 2008)

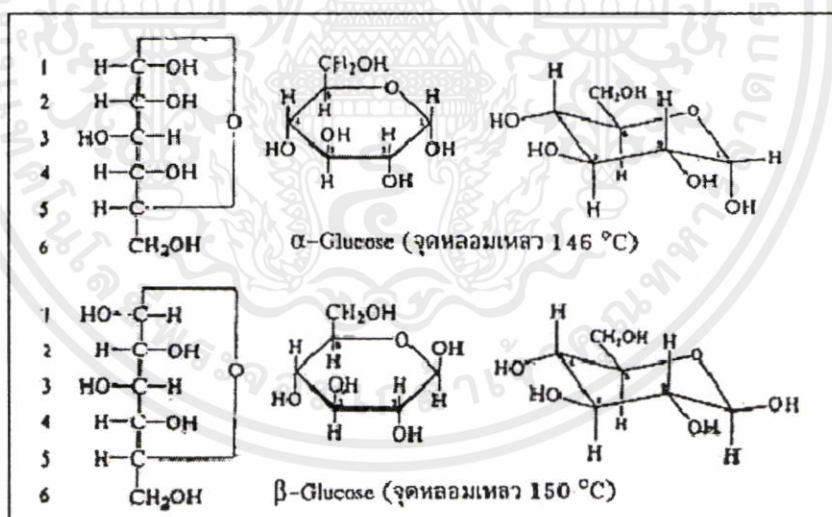
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.1 ประเภทของคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1) โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharides) หรือ น้ำตาลเชิงเดี่ยว คือคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กที่สุด ประกอบด้วย พอลิไฮดรอกซีอัลดีไฮด์ หรือพอลิไฮดรอกซีคีโตนเพียงหน่วยเดียว มีสูตรทั่วไปเป็น  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  โดย  $n$  มีค่าตั้งแต่ 3 ถึง 8 การเรียกชื่อทั่วไปของโมโนแซ็กคาไรด์จะเรียกชื่อตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนแล้วลงท้ายด้วย -อ (ose) เช่น เพนโทส ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) หรือ เฮกโซส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) นอกจากนี้การเรียกชื่อทั่วไปของโมโนแซ็กคาไรด์บางครั้งจะบ่งบอกชนิดของหมู่ฟังก์ชันด้วย เช่น อัลโดเพนโทส หรือ คีโตเฮกโซส เป็นต้น

น้ำตาลแต่ละชนิดยังแบ่งเป็นชนิดย่อยๆ อีกหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีสูตรโมเลกุลเหมือนกัน แต่มีสูตรโครงสร้างต่างกัน เรียกว่า เป็นไอโซเมอร์กัน (structural isomer) ตัวอย่างเช่น น้ำตาลเฮกโซสที่มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  แต่สามารถเขียนเป็นสูตรโครงสร้างได้ต่างกัน ซึ่งน้ำตาลกลูโคส แมนโนส กาแลกโตส และ กูโลส เป็นน้ำตาลอัลโดส ส่วนน้ำตาลฟรุคโตส และ ทาลาโลส เป็นน้ำตาลคีโตส แต่น้ำตาลส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างแบบเป็นวงซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรกว่า เช่น กลูโคส (ภาพที่ 2.7) โดยถ้าหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งจับอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 อยู่ได้ระนาบของวง เรียกว่าแบบอัลฟา ( $\alpha$ ) แต่ถ้าอยู่บนระนาบของวง เรียกว่าแบบเบต้า ( $\beta$ ) ตามลำดับ



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างแบบเป็นวงชนิดอัลฟา ( $\alpha$ ) และเบต้า ( $\beta$ ) ของกลูโคส (ที่มา: สุจิตรา รตนะมโน. ม.ป.ป)

ความสำคัญของน้ำตาลเหล่านี้ เพื่อเป็นโครงสร้างพื้นฐานของคาร์โบไฮเดรตที่มีความซับซ้อนมากขึ้น นอกจากนี้โมโนแซ็กคาไรด์ยังอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์อีกด้วย

2) โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharides) เป็นน้ำตาลที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ 2 ถึง 10 โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ผลจากการย่อยสลายจะได้น้ำตาลเชิงเดี่ยว 2 – 6 โมเลกุล ที่พบมากได้แก่ ซูโครส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งภายในพืช

ทั้งโมโนแซ็กคาไรด์ และโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถละลายได้ในน้ำ และเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำตาลที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ของพืช

3) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) หรือไกลแคน (glycan) เป็นสารประกอบที่ซับซ้อนกว่าคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์หลายๆ โมเลกุลรวมกันโดยเกิดพันธะระหว่างกันและกัน ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) แต่เป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเกิดขึ้นด้วย จึงเรียกปฏิกิริยาแบบนี้ว่า ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันแบบควบแน่น (condensation polymerization) มีสูตรทั่วไปเป็น  $(C_6H_{10}O_5)_n$  พอลิแซ็กคาไรด์สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่

### 3.1) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่สะสมอาหาร (storage polysaccharide)

3.1.1) แป้ง (starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืช ซึ่งพบทั้งในใบ ราก ผล และเมล็ด แป้งมีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 10,000 ถึง 1,000,000 มีสูตรทั่วไปเป็น  $(C_6H_{10}O_5)_n$  นอกจากนั้นยังพบว่าแป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์สองชนิด และทั้งสองชนิดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส แต่มีมวลโมเลกุลและโครงสร้างต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดในแป้ง ได้แก่ อะไมโลส (amylose) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 250 ถึง 300 โมเลกุล ต่อกันเป็นโซ่ยาวแบบไม่มีกิ่ง ขดเป็นเกลียวแบบเฮลิกซ์ (helix) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) มีโครงสร้างต่างจากอะไมโลสคือ นอกจากกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาวแล้วยังมีการต่อแบบกิ่งด้วย โดยกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาว 12 ถึง 25 โมเลกุลจะแตกกิ่งครั้งหนึ่ง และส่วนที่เป็นโซ่กิ่งมีกลูโคสต่อกัน 20 ถึง 25 โมเลกุล อะไมโลเพกตินประกอบด้วยกลูโคส 2,000 ถึง 200,000 โมเลกุล โดยปกติในแป้งมีอะไมโลสประมาณร้อยละ 10 ถึง 30 และอะไมโลเพกติน ประมาณร้อยละ 70 ถึง 90

3.1.2) ไกลโคเจน (glycogen) หรืออาจเรียกว่าแป้งในสัตว์ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากกลูโคสจำนวนมากมารวมกัน มีโครงสร้างคล้ายอะไมโลเพกตินในแป้ง แต่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า คือมีมวลโมเลกุลประมาณ 1,000,000 ถึง 4,000,000 และมีการแตกกิ่งมากกว่า กล่าวคือโซ่หลักของอะไมโลเพกตินมีการแตกกิ่งทุกๆ 12 ถึง 25 โมเลกุลของกลูโคส แต่ในไกลโคเจนจะมีการแตกกิ่งทุกๆ 8 ถึง 10 โมเลกุลของกลูโคส และโซ่กิ่งประกอบด้วยกลูโคส 8 ถึง 12 โมเลกุลต่อกัน ไกลโคเจนเป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมที่พบมากในตับและกล้ามเนื้อของคนและสัตว์ ใช้สำหรับเป็นแหล่งของพลังงานเพราะเมื่อร่างกายต้องการก็สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นกลูโคสได้อีก นอกจากนั้นไกลโคเจนในตับยังมีประโยชน์ในการมีไว้เพื่อปรับระดับกลูโคสในเลือดให้คงที่

3.1.3) เดกซ์แทรน (dextran) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สะสมในยีสต์และแบคทีเรีย ประกอบด้วยหน่วยย่อยน้ำตาลเป็นน้ำตาลกลูโคสเท่านั้นเหมือนกันแป้งและไกลโคเจน แต่ต่างกันที่ กลูโคสต่อกันด้วยพันธะ (1 – 6) และมีการแตกกิ่งด้วยพันธะ (1 – 2) พันธะ (1 – 3) หรือพันธะ (1 – 4) ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต

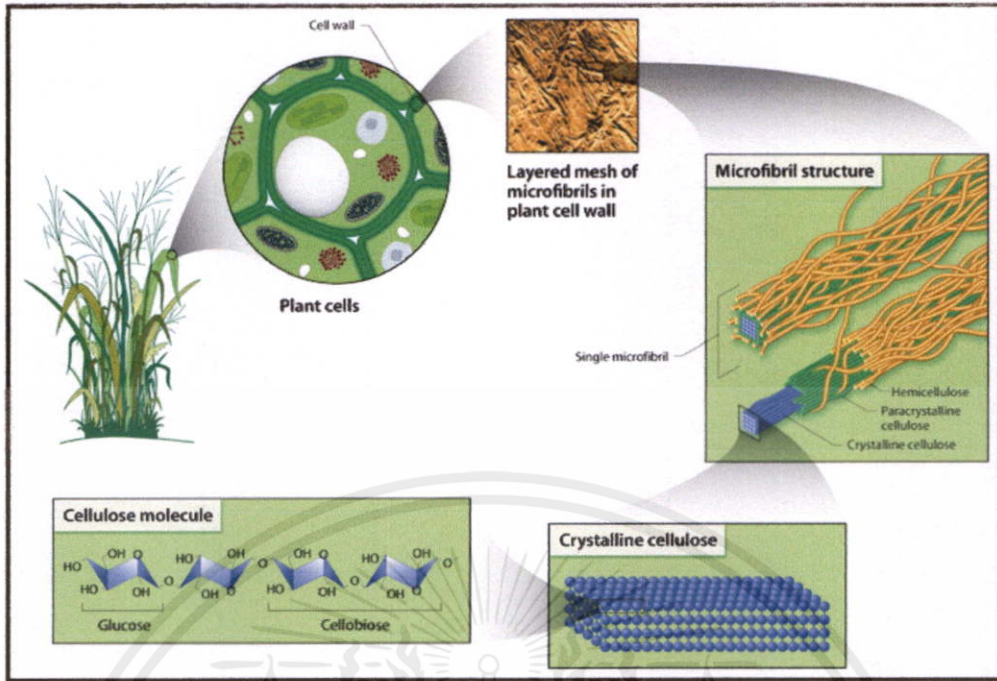
### 3.2) พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้าง (structural polysaccharide)

3.2.1) เซลลูโลส (cellulose) เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือโมเลกุลของ D- กลูโคส 1,000 ถึง 10,000 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ 200,000 ถึง 2,000,000 หน่วยย่อยพื้นฐานคือ เซลโลไบโอส (cellulobiose) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ - (1 – 4) ไกลโคซิดิก โดยที่ไม่มีการแตกกิ่ง (ภาพที่ 2.8) จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค X-ray diffraction โมเลกุลของเซลลูโลสจะอยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงขนานกัน แต่ละเส้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้อยู่รวมกันเป็นมัด มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่าไฟบริล (fibril)

3.2.2) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย โมโนแซ็กคาไรด์ หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่คือ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส ในส่วนผสมที่แตกต่างกันไป และมีการแตกกิ่งในระดับต่างๆ โดยมีหน่วยย่อยตั้งแต่ 40 ถึง 200 หน่วย

3.2.3) เพกติน (pectin) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายวุ้นข้น พบอยู่ทั่วไป ใน มิดเดิล ลามลลา (middle lamella) โดยแทรกอยู่กับโมเลกุลของเซลลูโลสและทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมระหว่างผนังเซลล์ที่อยู่ติดกัน สารประกอบเพกตินประกอบด้วยกรดเพกติก (pectic acid) เพกตินและ โปรโตเพกติน (protopectins) แต่ละชนิดประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D-galacturonic acid เป็นส่วนใหญ่ และต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ - (1 – 4) นอกจากนี้ยังอาจจะพบน้ำตาล โมโนแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น เช่น อะราบิโนส กาแลคโตส แมนโนส และไซโลส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 แสดงการจัดเรียงตัวของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช (ที่มา: U.S. Department of Energy Office of Science, 2005)

## 2.4 เอนไซม์

เอนไซม์ คือ โปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมกับภาวะภายในเซลล์และอวัยวะของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่เรียกว่า ซับสเตรท เนื่องจากเอนไซม์มีบริเวณที่เรียกว่า บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับส่วนของซับสเตรทในด้านขนาด รูปร่าง และธรรมชาติทางเคมี จึงทำให้เกิด โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรท นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น

### 2.4.1 การจำแนกตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์

การจำแนกชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ และความจำเพาะต่อซับสเตรต จะจำแนกตามกลุ่มที่ได้กำหนดไว้ใน Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) ตามด้วยรหัสชุดของเอนไซม์ (enzyme commission number; EC No.) ซึ่งถูกกำหนดด้วยลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ โดยตัวเลขชุดแรกบอกลักษณะของเอนไซม์ ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอกลักษณะของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่สี่จะช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาลักษณะเดียวกันออกจากกัน โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้นั้น เป็นเอนไซม์ที่มีรหัสเอนไซม์ เป็น 3.2.1.X ซึ่งตัวเลข

ชุดแรก ที่เป็นเลข 3 นั้น หมายถึงเอนไซม์พวกไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolytic reaction) ดังนี้

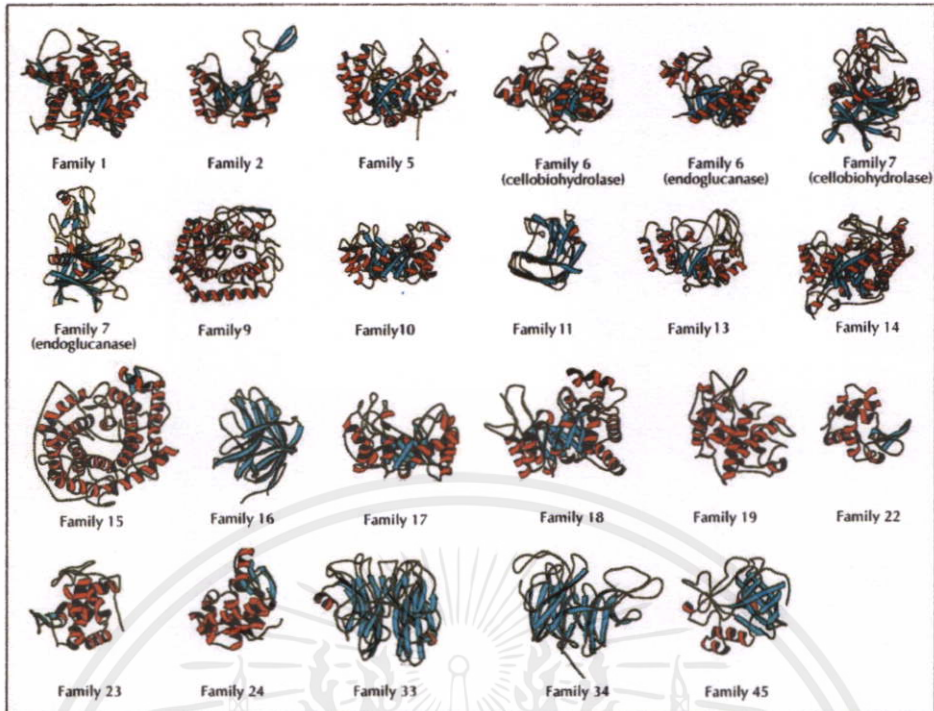


ตัวเลขชุดที่สองซึ่งเป็นเลข 2 นั้น บอกถึงพันธะที่ถูกแยกสลายด้วยน้ำ คือพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond, เชื่อมหน่วยของน้ำตาล) ส่วนตัวเลขชุดที่สามซึ่งเป็นเลข 1 บอกถึงรายละเอียดของพันธะที่ถูกสลายด้วยน้ำ ในที่นี้คือเอนไซม์จะเข้าสลายบริเวณ โมเลกุลของออกซิเจน และหมู่ไกลโคซิล ส่วนตัวเลขชุดที่สี่ จะบอกถึงซับสเตรตของเอนไซม์ สำหรับในกรณีของไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) จะมีรหัสเดียวกัน (พัชรา วีระกะลัส. 2541)

#### 2.4.2 การจำแนกตามความคล้ายของลำดับกรดอะมิโน

การจำแนกเอนไซม์ตามฐานข้อมูล carbohydrate-active enzyme (CAZy) เป็นการจำแนกชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะความคล้ายของกรดอะมิโน และโครงสร้างของโปรตีน เนื่องจากการจำแนกเอนไซม์ตามลักษณะการจำเพาะต่อซับสเตรต อาจมีข้อจำกัดในการจำแนกเอนไซม์บางชนิดที่ไม่สามารถศึกษาลักษณะการทำงานของเอนไซม์นั้นได้ แต่การจำแนกโดยใช้ความคล้ายของกรดอะมิโน สามารถสะท้อนถึงลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ได้ดีกว่า โดยสามารถแสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ในรูปแบบของโครงสร้าง three dimensional (3D; ภาพที่ 2.9) ซึ่งเอนไซม์ในแฟมิลีเดียวกัน จะมีความคล้ายคลึงกันของโครงสร้าง 3D นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ในกลุ่มและยังง่ายต่อการศึกษาลักษณะของการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 ลักษณะ โครงสร้าง 3D ของเอนไซม์ glycoside hydrolase แฟมิลี่ต่างๆ (ที่มา: Davies and Henrissat, 1995)

โดยเอนไซม์ที่จำแนกโดยใช้ฐานข้อมูล CAZy นั้น ในแฟมิลี่เดียวกันอาจมีความจำเพาะต่อซับสเตรตต่างกัน การจำแนกเอนไซม์บนเว็บไซต์ URL: <http://www.cazy.org> (Davies and Henrissat, 1995) ซึ่งในปัจจุบัน สามารถจำแนกชนิดเอนไซม์ได้เป็น 5 คลาส ดังนี้

1) Glycoside hydrolase (GHs) ประกอบด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม glycosidase และ transglycosidase แบ่งย่อยได้เป็น 115 แฟมิลี่ ที่ทำหน้าที่ในการ hydrolysis และ/หรือ transglycosilation ของพันธะไกลโคซิดิก เอนไซม์ในคลาสนี้เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่สุดตามระบบการจำแนกบนฐานข้อมูล CAZy เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางด้านการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ หรือในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส สามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญเช่น *Ruminococcus sp.*, *Orpinomyces sp.* และ *Piromyces sp.* ได้เป็น 14 แฟมิลี่ เอนไซม์เอกโซเซลลูเลส จำแนกได้ 6 แฟมิลี่ และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จำแนกได้ 2 แฟมิลี่ (ตารางที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 จำแนกเอนไซม์เซลลูเลสตามกลุ่มของ glycoside hydrolase และตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

Enzyme	GH families	Rumen microorganism (GH families)
Endocellulase	5, 6, 7, 8, 9, 10,12, 26, 44,	<i>Butyrvibrio fibrisolvens</i> (5, 9)
(3.2.1.4)	45, 48, 51, 61, 74	<i>Fibrobacter succinogens</i> (5, 51, 9)
		<i>Neocallimastix frontalis</i> (5)
		<i>Neocallimastix patriciarum</i> (5, 6)
		<i>Orpinomyces joyonii</i> (5)
		<i>Orpinomyces</i> sp. (5, 6)
		<i>Piromyces equi</i> (45, 5, 48)
		<i>Piromyces rhizinflata</i> (5)
		<i>Prevotella ruminicola</i> (26, 5, 9)
		<i>Ruminococcus albus</i> (5, 9)
		<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (44, 5, 9)
Exocellulase	5, 6, 7, 9, 10, 48	<i>Neocallimastix patriciarum</i> (6)
(3.2.1.91)		<i>Piromyces rhizinflata</i> (6)
		<i>Orpinomyces</i> sp. (6)
$\beta$ -Glucosidase	1, 3	<i>Butyrvibrio fibrisolvens</i> (3)
3.2.1.21		<i>Orpinomyces</i> sp. (1)
		<i>Piromyces</i> sp. (3)
		<i>Prevotella albensis</i> (3)
		<i>Prevotella ruminicola</i> (3)
		<i>Ruminococcus albus</i> (3)

ที่มา: Krause *et al.* 2003

2) Glycosyltransferase (GTs) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลต่างๆ สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 92 แฟมิลี

3) Polysaccharide lyase (PLs) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกในตำแหน่งที่มี uronic acid อยู่ โดยกระบวนการ  $\beta$ -elimination ปัจจุบันมี 21 แฟมิลี

4) Carbohydrate esterase (CEs) เป็นเอนไซม์ที่ย้ายหมู่เอสเทอร์ ออกจากโมโนแซคคาไรด์, โอลิโกแซคคาไรด์ และ พอลิแซคคาไรด์ แบ่งออกเป็น 16 แฟมิลี แต่ข้อแตกต่างระหว่าง carbohydrate esterase กับ esterase ชนิดอื่นๆ นั้นมีน้อยมาก ซึ่งการจำแนกโดยอาศัยความคล้ายของกรดอะมิโนนี้ บางครั้งรวมถึงเอนไซม์ที่เป็น non-carbohydrate esterase ด้วย

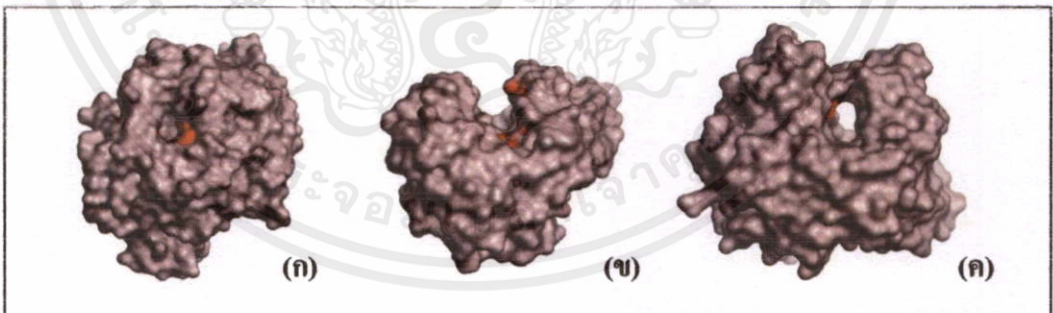
5) Carbohydrate-binding module (CBMs) โปรีตีนในกลุ่มนี้ไม่ใช่เอนไซม์ แต่เป็น โปรีตีนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม carbohydrate active enzyme เนื่องจากเป็น โปรีตีนที่ใช้ยึดจับกับซับสเตรตของเอนไซม์ ปัจจุบันมี 59 แฟมิลี

จากการศึกษาโครงสร้าง 3D ของเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase พบว่าถึงแม้จะมี ลักษณะโครงสร้างต่างกัน แต่มีบริเวณ active site ที่คล้ายคลึงกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท (Davies and Henrissat. 1995; ภาพที่ 2.10) คือ

1) แบบกระเปาะ (pocket or crater) โครงสร้างลักษณะนี้จะปรากฏในเอนไซม์จำพวก monosaccharidase เช่น  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase และพวก exopolysaccharidase เช่น glucoamylase และ  $\beta$ -amylase โครงสร้างลักษณะนี้จะจำเพาะกับซับสเตรตที่มีปลายเป็น non-reducing chain

2) แบบร่อง (cleft or groove) โครงสร้างนี้เป็นโครงสร้างที่มีบริเวณ active site เป็นปลายเปิด ทำให้สามารถเข้าจับกับน้ำตาลภายในสายพอลิแซคคาไรด์ได้ มักพบในเอนไซม์จำพวก endo-acting polysaccharidase เช่น endocellulase,  $\alpha$ -amylases, xylanase และ  $\beta$ -1,3-glucanase เป็นต้น

3) แบบอุโมงค์ (tunnel) โครงสร้างลักษณะนี้พบได้ในเอนไซม์ cellobiohydrolase ซึ่งจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่มีโครงสร้างแบบร่อง โดยสายพอลิแซคคาไรด์ที่ถูกตัดจนเป็นสายยาว จะร้อยผ่านโครงสร้างแบบอุโมงค์นี้ แต่ในปัจจุบันไม่ทราบแน่ชัดว่าซับสเตรตสามารถลอดผ่านอุโมงค์นี้ได้หรือไม่ และมีความจำเพาะกับด้านใดด้านหนึ่งกับโครงสร้างของเอนไซม์นี้หรือไม่



ภาพที่ 2.10 แสดงลักษณะของ active site ของเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase (ก) แบบกระเปาะ (ข) แบบร่อง และ (ค) แบบอุโมงค์ (ที่มา: คัดแปลงจาก Davies and Henrissat. 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

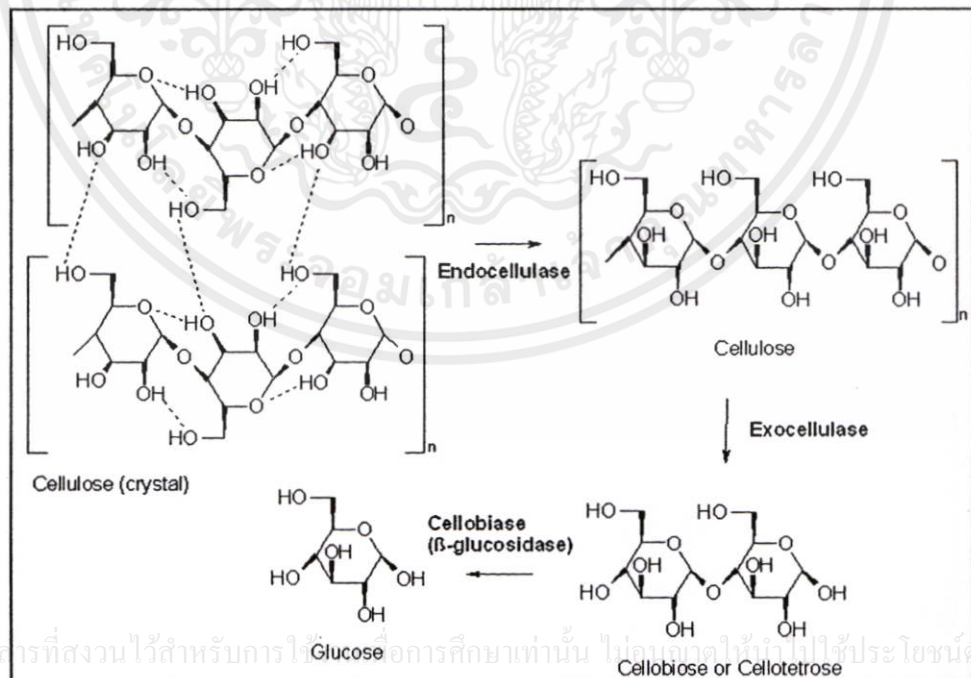
### 2.4.3 ประเภทและหน้าที่ของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสได้ คือเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) หมายถึง กลุ่มไฮโดรเลสที่ย่อยสลายซับซ้อนที่มีพันธะไกลโคซิดิก ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด (multicomponent enzyme; ภาพที่ 2.11) คือ

1) Endo- $\beta$ -1,4 - glucanase หรือ 1,4 - $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายสายพอลิเมอร์ภายในสายอย่างอิสระ ได้ผลผลิตเป็น โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และกลูโคส

2) Exo-  $\beta$  - 1,4 - glucanase หรือ 1,4 -  $\beta$  -D - glucan cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายสายพอลิเมอร์จากปลายสายด้านที่ไม่มีหมูรีควิวซ์ไปอย่างมีระเบียบ และมีการเปลี่ยนโครงรูปของผลผลิตจาก  $\beta$  ไปเป็น  $\alpha$  - configuration ได้ผลผลิตเป็น เซลโลไบโอสและกลูโคส

3)  $\beta$  - Glucosidase หรือ cellobiase (EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสถึงเฮกซาออส (กลูโคสจาก 2 - 6 ยูนิต) แต่อัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อพอลิเมอร์มีความยาวสายมาก และผลผลิตที่ได้คือกลูโคส ซึ่งมีรูปเปลี่ยนไปจากเดิม เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการทำงานร่วมกับเอนไซม์เบต้าแอนโคกลูคาเนส และเบต้าเอกโซกลูคาเนส ที่จะช่วยย่อยจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น D-glucose ที่บริสุทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ภาพที่ 2.11 แสดงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (ที่มา: BerskerBen. 2008)

#### 2.4.4 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์

เอนไซม์เซลล์จะมีความมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อได้ทำงานร่วมกันระหว่างกลุ่มย่อยของเอนไซม์ ซึ่งเรียกว่า synergism (Lynd *et al.* 2002) มีทั้งสิ้น 4 รูปแบบ คือ

1) endo-exo synergism เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ endoglucanase และเอนไซม์ exoglucanase มักจะพบการย่อยแบบนี้ในเชื้อยีสที่มีขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มพื้นที่สำหรับให้เอนไซม์ cellobiohydrolases เข้าย่อย

2) exo - exo synergism เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ exoglucanase 2 ชนิดที่ย่อยสายเซลลูโลสจากปลายทั้งสองข้างเข้าหากัน

3) การทำงานร่วมกันระหว่าง exoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสสายสั้นๆ หรือ เซลโลไบโอส

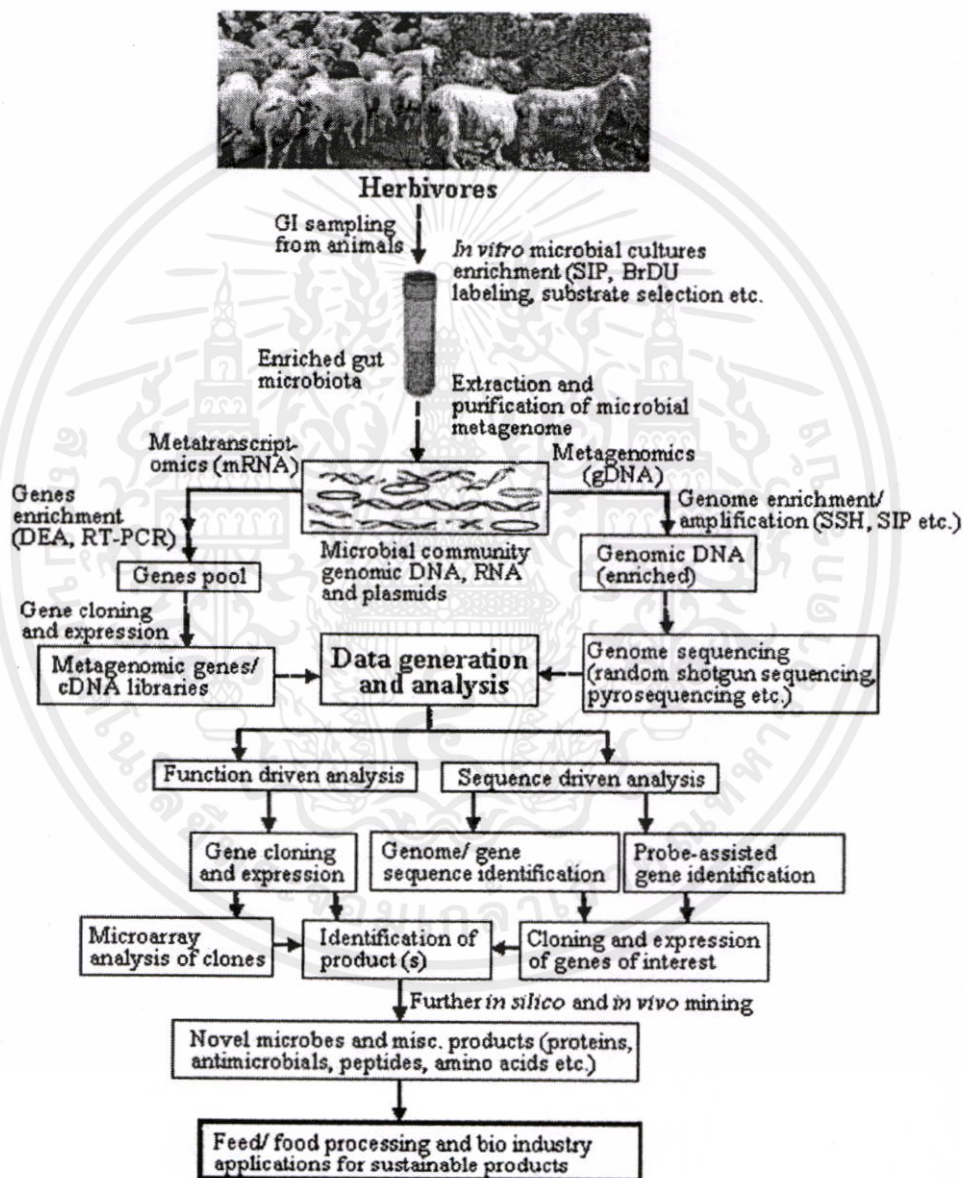
4) การทำงานเป็นกลุ่มระหว่าง catalytic domain กับ cellulose binding domain เพื่อการยึดเกาะพื้นผิวของเซลลูโลส

ในปัจจุบัน เอนไซม์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ, อุตสาหกรรมกระดาษ, อุตสาหกรรมอาหาร เช่น การนำมาผสมในอาหารสัตว์ หรือการนำมาผลิตพลังงานทดแทน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างหลักของพืชและเป็นองค์ประกอบหลักของวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงได้มีเป้าหมายในการหาเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะเอนไซม์จากแบคทีเรีย เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่อยู่ในภาวะใช้งานได้ในงานอุตสาหกรรม โดยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะโค เป็นอีกหนึ่งแหล่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากโคเป็นสัตว์ที่กินอาหารจำพวกเยื่อใยเป็นหลัก และไม่สามารถย่อยสลายเยื่อใยเหล่านั้นด้วยเอนไซม์ของตัวเอง ต้องอาศัยเอนไซม์จากแบคทีเรีย แต่เนื่องจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเป็นแบคทีเรียจำพวกไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ยากในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาหาเอนไซม์จากแบคทีเรียเหล่านี้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคที่เรียกว่า เมทาจีโนมิก (metagenomic)

#### 2.5 เมทาจีโนมิกไลบรารี (metagenomic library)

เทคนิคเมทาจีโนมิก เป็นเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และดีเอ็นเอเทคโนโลยีที่ใช้ในการแยกชิ้นที่สนใจจากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงวิธีการในภาพที่ 2.12 เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะที่น่าสนใจ แต่จุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้นั้นมีประมาณ 1% ของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น เพราะจุลินทรีย์บางชนิดอาจเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่สามารถควบคุมได้ในห้องปฏิบัติการ หรือมีค่าใช้จ่ายสูงในการเพาะเลี้ยง เช่น เติบโตในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง หรือในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นต้น ทำให้เป็นข้อจำกัดในการศึกษา ดังนั้นเทคนิคเมทาจี

โนมิกส์โลบราจีจึงเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มความหลากหลายในการหาชิ้นจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ โดยเป้าหมายของการหาชิ้นจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในแหล่งธรรมชาตินั้นจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยีนที่ต้องการศึกษา เช่น ต้องการศึกษาเอนไซม์ของแบคทีเรียที่สามารถทนร้อนได้ มักจะเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อน หรือต้องการศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยอาหารจำพวกเยื่อใยได้เป็นอย่างดี มักจะเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารของปลวกหรือสัตว์กระเพาะรวม เป็นต้น จากนั้นจึงค้นหาชิ้นที่ต้องการซึ่งสามารถจำแนกวิธีการวิเคราะห์ได้เป็น 2 วิธีคือ



ภาพที่ 2.12 แสดงการทำเมทาจีโนมิกส์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ที่มา: Singh *et al.* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (2008))  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.1 Function-driven analysis

เทคนิคนี้อาศัยการวิเคราะห์ลักษณะจำเพาะในการแสดงออกของยีนที่สนใจ ในแบคทีเรียตัวรับ ตามลักษณะของโคลนที่แสดงออกตามลักษณะทางเคมีชีวภาพหรือทางระดับโมเลกุล (sequencing) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่เร็ว และมักใช้ในการคัดเลือกโคลนเพื่อค้นหา, หรือสารที่ใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรม รวมถึงเอนไซม์ต่างๆ เช่น Rees *et al.* 2003 ได้ใช้เทคนิคนี้ในการค้นหาอินไลเปสและเซลล์ลูเลสที่สามารถทนต่อความเป็นเบสได้ โดยทำการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม haloalkaliphilic ซึ่งพบมากในทะเลสาบในแถบประเทศเคนยา และอียิปต์ ซึ่งจากการทดลองสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียนี้ และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3A1* เลือกรขนาด 2-10 kb มาโคลนลงเวกเตอร์ pBK-CMV เพื่อตรวจจับโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เซลล์ลูเลส โดยการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1%CMC/ congo red พบยีนขนาด 3,410 และ 3,796 bp ซึ่งมีความคล้ายกับยีน CEL ของเชื้อ *Fusobacterium mortiferum* 29% และ *B.halodurans* 67% ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tributyrin สำหรับตรวจจับการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปส พบยีนขนาด 4,313 และ 2,285 bp ซึ่งมีความคล้ายกับยีน LIP ของเชื้อ *Salmonella typhymurium* 67% และ *Vibrio cholerae* 42% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 แสดงการค้นพบยีนจากเทคนิค function-driven analysis

Library	Incidence of positive clones	Activity	Insert (bp)	%Identity
Crater Lake environment	1/36,000	CEL	3,410	29% <i>Fusobacterium mortiferum</i>
Lake Nakuru, minimal carboxymethylcellulose enrichment	1/15,000	CEL	3,796	67% <i>B.halodurans</i>
Lake Elmenteita environment	1/100,000	LIP	4,313	67% <i>Salmonella typhymurium</i>
Lake Elmenteita, minimal olive-oil enrichment	1/30,000	LIP	2,285	42% <i>Vibrio cholerae</i>

ดัดแปลงจาก Rees *et al.* (2003)

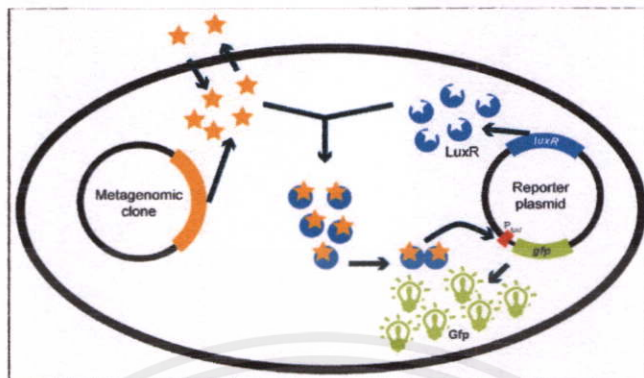
Voget *et al.* (2006) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลล์ลูเลสที่ได้จากเทคนิคเมทาจีโนมิกจากแบคทีเรียในดิน โดยในครั้งแรกศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์โดยใช้คอสמיד pWE15 จากนั้นสกัดคอสמידจากโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2% CMC นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* โคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ19R แล้วคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์อีกครั้ง ซึ่งวิธีการนี้จะเป็นการลดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และสามารถยืนยันได้ว่ามียีนเซลล์ลูเลสอยู่จริง จากนั้นจึงวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ผ่านการคัดเลือก พบยีนขนาด 1,092 bp ที่มีความเหมือนกับยีน *cel5A* ของ *Cellvibrio mixtus* 77%

นอกจากนี้เทคนิค function-driven analysis ยังเป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาเอนไซม์จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนอย่างกว้างขวาง เช่น Cunningham *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาหาเอ็นเซลลูเลส จากแบคทีเรีย *R. flavefaciens* โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3A* จากนั้นโคลนเข้าเวกเตอร์ pUC13 พบว่ามี 17 โคลนจาก  $10^4$  โคลน ที่มีการแสดงออกเอนไซม์ CMCase จากนั้นตรวจจับยีนด้วยวิธี hybridization โดยการออกแบบโพรบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *endA* ซึ่งสามารถตรวจจับได้ 3 โคลน จากชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 10, 15 และ 16 kb เมื่อแปลรหัสแล้วได้โปรตีนขนาด 455 กรดอะมิโน และมีความเหมือนกับเอนไซม์ endoglucanase E ของ *C. thermocellum* 56% และ *R. albus* 61% และปี 1994 Vercoe *et al.* ได้ใช้วิธีนี้ศึกษาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน beta-endoglucanase จาก แบคทีเรีย *R. flavefaciens* FD-1 โดยนำจีโนมิกไลบรารี *EcoRI* ที่มีขนาด 2.3 kb ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส และไซทานเนส มาสกัดพลาสมิดและนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ start codon อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 289-291 และยีนมีขนาดทั้งสิ้น 1,215 bp แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 405 กรดอะมิโน และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล พบว่า มีความเหมือนกับยีน *endE4* ของ *Thermomonospora fusca* 36 %

Wereszka *et al.* (2004) ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาเอ็นเซลลูเลสจากโปรโตซัวในกระเพาะรูเมน *Epidinium ecaudatum* โดยการโคลน cDNA ลงในเวกเตอร์ ZAP Express จากนั้นศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.1% CMC แล้วเททับด้วย congo red จากนั้นนำโคลนที่คัดเลือกมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มียีนขนาด 1,518 bp และเป็นเอนไซม์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5

เทคนิคเมทาจีโนมิกนี้ ได้มีการ พัฒนาเวกเตอร์พาหะที่ใช้ในการคัดเลือกลำดับต่างๆกัน โดยขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เวกเตอร์พาหะสามารถรับได้ เช่น การใช้พลาสมิด จะเหมาะกับการโคลนชิ้นส่วนยีนที่มีขนาดอยู่ในช่วง 0.5 – 3 kb การใช้ bacteriophage เหมาะสำหรับการโคลนชิ้นยีนขนาด 8 – 20 kb, การใช้ cosmid หรือ fosmid ซึ่งเหมาะกับการโคลนยีนขนาดประมาณ 35 – 50 kb รวมไปถึงการใช้ bacterial artificial chromosome (BAC) หรือ yeast artificial chromosome (YAC) ในกรณีต้องการ โคลนชิ้นส่วนยีนขนาดใหญ่ (75-1000 kb) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการคัดเลือกลำดับยีนให้มีความสะดวกและรวดเร็วขึ้น เช่น Williamson *et al.* (2005) ได้คิดค้นวิธี intracellular screen เรียกว่า METREX (metabolite-regulated expression) โดยบรรจุ reporter plasmid ลงในเซลล์ทำให้เซลล์มี biosensor ที่สามารถจับกับ protein signal ที่สร้างจากเมทาจีโนมิกโคลนได้ และเกิดการสร้าง GFP (green fluorescence protein) ขึ้นมา ซึ่งสามารถคัดเลือกลำดับยีนที่ต้องการได้ด้วยการส่องด้วยกล้อง florescence microscope (ภาพที่ 2.13) จากนั้นจึงพัฒนาต่อมาเป็นวิธี SIGEX (substrate-induced gene expression screening) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้การ

เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยซับซ้อน โดยในเวกเตอร์จะมียีน *gfp* เพื่อช่วยในการคัดเลือกโคลน (Kimura, 2006)



ภาพที่ 2.13 แสดงลักษณะการทำงานของระบบ Intracellular screen (ที่มา: Yun and Ryu, 2005)

### 2.5.2 Sequence-driven analysis

เทคนิคนี้เป็นวิธีการดั่งยีนเป้าหมายโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสจากตำแหน่งของบริเวณจำเพาะหรือบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ต้องการศึกษา (conserve sequence) เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำไฮบริดไลเซชัน (hybridization probes) หรือนำมาออกแบบ degenerate primer สำหรับเทคนิคพีซีอาร์จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อคัดเลือกโคลนของเมทาจีโนมิกไลบรารีที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่สนใจ จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนของยีนที่ได้มาหาชิ้นที่สมบูรณ์ ด้วยเทคนิค Genome walking มีหลักการในการศึกษาคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนส่วนที่อยู่ด้าน 5' และด้าน 3' จากชิ้นส่วนอนุรักษ์ของยีนที่หาได้ โดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนนั้น และทำการเพิ่มจำนวนโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ซึ่ง Guo and Xiong, (2006) ได้แบ่งวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ 2 วิธี คือ

1) preprocessing dependent เป็นวิธีที่จะทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็น adapter จากนั้นเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยใช้ specific primer ซึ่งจับจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นยีนนั้น และ primer อีกด้านที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ adapter ดังการทดลองของ Toyoda and Minato, (2002) ที่ศึกษาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีน cellulose-binding protein A (CBPA) จาก *Eubacterium cellulosolvens* 5 โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. cellulosolvens* 5 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์  $\lambda$ ZAP แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นเพียงส่วนของยีน CBPA ที่ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงใช้เทคนิคดังกล่าว เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์ ได้ยีนที่มีขนาด 3,453 bp และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าบริเวณไม่เข้ารหัสใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คิดแปลลงเป็นภาษาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไป catalytic domain มีความเหมือนกับเอนไซม์ *celZ* ของ *Clostridium stercorarium* 43%, *celA* ของ

*Anaerocellum thermophilum* 44% และ *celA* ของ *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 44 % ตามลำดับ

2) preprocessing independent เป็นวิธีที่เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยอาศัย specific primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนของยีน คู่กับ semi random primer เพื่อหาลำดับเบสทั้งทางด้าน upstream และ downstream ของชิ้นส่วนอนุรักษ์ของยีน เป้าหมาย เช่น Sakamoto *et al.* (2005) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษายีน  $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$  จากเชื้อ *Lentinula edodes* โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน  $\text{exo-glucanase}$  จากยีสต์ ได้ชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาดประมาณ 400 bp ออกแบบ specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำมาทำ 5' และ 3' RACE PCR ได้ยีนที่สมบูรณ์ขนาด 1.2 kb และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลแล้วพบว่า เหมือนกับยีน *AbEXG1* ของ *A.bisporus* 67% และเหมือนกับ  $\text{exo-glucanase}$  จากยีสต์ เช่นยีน *EXG1* ของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Exg1* ของ *Candida albicans* ซึ่งยีนที่ค้นพบถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 และ Hou *et al.* (2007) ได้ศึกษาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีน cellobiohydrolase 1 (CBH 1) จาก *Penicillium chrysogenum* FS010 โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน CBH1 ทำให้ได้ชิ้นส่วนของยีนที่มีความยาว 1,062 bp จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนของยีนมาหาชิ้นที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction (TAIL-PCR) ทำให้ได้ยีนที่สมบูรณ์ที่มีความยาว 2,940 bp เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล พบว่า มีความเหมือนกับ CBH1 ของ *P. janthinellum* 70.37% , *A. aculeatus* 66.91% และ *P. occitanis* 62.08 %

### 2.5.3 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของเทคนิค function-driven analysis และ sequence-driven analysis

วิธีการหาชิ้นจากเทคนิคเมทาจีโนมิกจากเทคนิค function-driven analysis เป็นเทคนิคที่สามารถคัดเลือก โคลนที่มียีนที่สมบูรณ์ และมีการแสดงออกของยีนที่ใช้งานได้จริง จากกระบวนการคัดเลือก แต่มีข้อเสียที่อาจจะมียีนที่สมบูรณ์อยู่ใน โคลนนั้น แต่สถานะไม่เหมาะสมในการแสดงออกทำให้พลาดโอกาสในการศึกษายีนนั้นไป ส่วนเทคนิค sequence-driven analysis มีข้อดีคือ สามารถดึงยีนที่สนใจได้จากข้อมูลของบริเวณอนุรักษ์ของยีน โดยตรง แต่ข้อเสียคือไม่สามารถคาดเดาได้ว่ายีนนั้นมีการแสดงออกในสถานะใด (ตารางที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.5 แสดงการเปรียบเทียบวิธี function-driven และ sequence-driven analysis

	Function-driven analysis	Sequence-driven analysis
หลักการทํางาน	ศึกษาจากการแสดงออกของเอนไซม์	ศึกษาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนด้วยเทคนิค southern hybridization หรือ PCR
ข้อดี	สามารถเจอยีนที่สมบูรณ์และมีการแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน	ไม่มีข้อจำกัดของการแสดงออกร่วมของยีน (heterologous expression)
ข้อเสีย	ต้องคำนึงถึงตัวแปรต่างๆ ในการแสดงออกของยีน ซึ่งบางครั้งอาจไม่ตรงกับความสามารถของเซลล์เจ้าบ้าน หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมในการแสดงออกของยีน	ต้องทราบลำดับอนุรักษ์ของยีนที่ต้องการศึกษาและไม่สามารถรู้ได้ว่ายีนที่หาได้นั้นสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์และพร้อมทํางานได้หรือไม่

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yun and Ryu. (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

#### 3.1 อุปกรณ์การทดลอง

- 1) ออโตปีเปต ขนาด P2, P20, P200 P1000 และ P5000
- 2) บีกเกอร์ ขนาด 50, 200, 500 และ 1000 ml
- 3) หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ 1.5 ml
- 4) หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 ml
- 5) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 250, 500, 1000 และ 2000 ml
- 6) ผ้าขาวบาง ซ้อนดักสาร แท่งคนสารละลาย magnetic bar
- 7) Thermometer
- 8) หม้อต้มน้ำ

#### 3.2 เครื่องมือ

- 1) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ
- 2) ตู้บ่มเชื้อ ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า
- 3) เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 4) เครื่องชั่งมาตรฐาน
- 5) ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง
- 6) เครื่องทำปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน MyCycler™
- 7) spectrophotometer และ gel document
- 8) pH meter
- 9) gel electrophoresis
- 10) SDS-gel electrophoresis

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ จะแสดงไว้ในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค และการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโค

เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของ โคที่เจาะกระเพาะในช่วงเช้าก่อนให้อาหาร จากโคที่เลี้ยงในฟาร์มของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 วัน วันละ 1,000 ml กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำของเหลวที่ได้จากกระเพาะรูเมน แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85% แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 ml แล้วเก็บตัวอย่าง ที่  $-80^{\circ}\text{C}$

#### 3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมน

การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมน (ดัดแปลงจาก Tajima *et. al.* 1999) โดยนำของเหลว 300  $\mu\text{l}$  ผสมกับสารละลาย extraction buffer 300  $\mu\text{l}$  และ proteinaseK (ความเข้มข้นสุดท้าย 20 mg/ml) นำตัวอย่างมาบ่มที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 5 รอบ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เก็บของเหลวส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol - chloroform - isoamyl alcohol (25 : 24 : 1 โดยปริมาตร) 600  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของเหลวมาเติม 5.3 M sodium chloride (NaCl) 0.2 เท่าของปริมาตรของเหลว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเก็บส่วนของเหลวมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่าของปริมาตรของเหลวที่เก็บได้ ทำการกลั่นเหลวจนแห้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol 600  $\mu\text{l}$  นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนของเหลว จากนั้นรอให้ตะกอนแห้ง จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (nanodrop ND 1000) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ( $A_{260}$ ) สำหรับดีเอ็นเอ (Ray *et. al.* 2006) และคุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า  $A_{260}/A_{280}$  และ  $A_{260}/A_{230}$  เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เทียบกับกรดนิวคลีอิกและ โปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดตามลำดับ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  และ  $A_{260}/A_{230}$  อยู่ในช่วง 1.8-1.9 (Sambrook *et. al.* 1989) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการของหน่วยงานที่สังกัด ไม่สามารถนำออกเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์

#### 3.4.1 การออกแบบ degenerate primer

ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยการเปรียบเทียบกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของยีนเอนโดกลูคาเนสในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลสากล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ด้วยโปรแกรม ClustalW (ภาพผนวกที่ ค1) โดยเลือกบริเวณอนุรักษ์กลุ่มที่อยู่บริเวณส่วนต้น และส่วนท้ายสุดของกลุ่มตัวอย่าง นำมาออกแบบ degenerate primer

โดยโปรตีนหนึ่งตัว สามารถแปลรหัสได้จากโคดอน (codon) มากกว่าหนึ่งชนิด (ตารางผนวกที่ ค2) ดังนั้นบางตำแหน่งของไพรเมอร์ อาจแปลรหัสได้หลายเบส เมื่อนำมาออกแบบ degenerate primer จึงมีเบสบางตำแหน่งที่สามารถแทนที่กันได้ ตามรหัสของ IUPAC (ตารางผนวกที่ ค3)

#### 3.4.2 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคที่ได้โดยใช้ไพรเมอร์ Cel5\_F และ Cel5\_R โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 100 ng สารละลาย 1X Taq Buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% Tween 20) with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dNTP 200  $\mu$ M, ไพรเมอร์ Cel5\_F 0.5  $\mu$ M, ไพรเมอร์ Cel5\_R 0.5  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu$ M, เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas<sup>®</sup>) 1 U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบสามารถแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 44 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวของนิวคลีโอไทด์อิสระและเหมาะสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้นิวคลีโอไทด์อิสระสามารถต่อกันเป็นสายนิวคลีโอไทด์อย่างครบถ้วน จึงถือได้ว่าเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

### 3.4.3 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผสมกับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 และทำการวิเคราะห์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 % ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ 1X TBE pH 8.0 โดยใช้ 100 bp ladder (Fermantas®) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เชื่อมกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลอะกาโรสข้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำอีก 5 นาที จึงนำ แถบดีเอ็นเอ ไปตรวจ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene genius; Bio Imaging System)

## 3.5 การถ่ายถอดชิ้นส่วนยีน (partial gene) เอนโดกลูคาเนสและการคัดเลือกโคลน

### 3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้เป็น competent cell

การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E.coli* DH5α ตามวิธีการของ Inoue *et. al.* (1990) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 18 °C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทั้งหมด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตรรวม 200 ml บ่มที่อุณหภูมิ 18 เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าประมาณ 0.3 – 0.4 จึงถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองขนาด 50 ml ตั้งหลอดทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส และละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 16 ml ต่อหลอด ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส จากนั้นเติมสารละลาย TB ที่แช่เย็น 4 ml ต่อหลอด เขย่าเบาๆ จนตะกอนละลายจนหมด แล้วจึงค่อยๆ เติมสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7% ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับเวกเตอร์ (ligation)

นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ ซึ่งเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนนี้คือ pTZ57R/T (Fermentas®) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของดีเอ็นเอผลผลิตต่อเวกเตอร์เท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 10  $\mu$ l ประกอบด้วย 1X ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP ; pH 7.8 ที่อุณหภูมิ 25 °C), เวกเตอร์ pTZ57R/T 55 , ดีเอ็นเอผลผลิต 150 ng, เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas®) ความเข้มข้น 5 U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง

### 3.5.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ด้วยวิธี heat shock

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) ทำโดยนำ competent cell ปริมาตร 100  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดปฏิกิริยาที่ได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10  $\mu$ l ใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งประมาณ 2 – 3 นาที เติมน้ำเลี้ยงเชื้อ luria-bertani broth (LB broth) 900  $\mu$ l แล้วจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ luria-bertani agar (LB agar; ภาคผนวก ข) ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml, isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80  $\mu$ g/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง

### 3.5.4 การคัดเลือกโคลนโดยเทคนิค blue/white screening

เนื่องจาก pTZ57R/T เป็นเวกเตอร์ที่มีส่วนของ  $\alpha$ -subunit ของ *lacZ* ในขณะที่ *E.coli* มี  $\Omega$ -subunit ของ *lacZ* โดยทั้ง 2 subunit จะรวมกันได้เป็นเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase เมื่อทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตเข้าไปในเวกเตอร์ จะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างส่วน  $\alpha$ -subunit ของ *lacZ* จึงไม่เกิดการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase โดยการตรวจสอบทำได้โดยการใช้ X-gal เป็นซับสเตรตในกรณีที่ไม่มียีนดีเอ็นเอผลผลิตอยู่ในเวกเตอร์ การสร้าง  $\alpha$ -subunit จะเกิดขึ้น ทำให้ได้เป็นเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ไปทำการย่อย substrate X-gal ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นสารสีฟ้าทำให้มองเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วนในกรณีที่มีดีเอ็นเอผลผลิตอยู่ในเวกเตอร์จะไม่เกิดการสร้าง  $\beta$ -galactosidase จึงไม่เกิดการย่อย X-gal โคโลนีที่ได้จึงเป็นสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.5 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit

สุ่มเลือกโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml ปริมาตร 3 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เติมน้ำ resuspension buffer ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติมน้ำ lysis buffer ปริมาตร 250 µl กลับหลอดไปมา 4 – 6 ครั้ง แล้วจึงเติมน้ำ neutralization buffer ปริมาตร 350 µl กลับหลอดไปมา 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบีบหลอดของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอด GeneJet™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง เติมน้ำ wash buffer ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 35 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 – 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

### 3.5.6 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ BamHI

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.5.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ BamHI (Fermentas®) เนื่องจากเวกเตอร์ pTZ57R/T มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของยีนเอนโคจกานเนสที่ได้ทำการสอดแทรกเข้าไปได้ โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, 1X buffer Y Tango™ with BSA (3.3 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM magnesium acetate, 6.6 mM potassium acetate, 0.01 mg/ml BSA) ปริมาตร 2 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ BamHI อย่างละ 3 U, และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3 จากนั้นทำการสุ่มเลือกพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วมีการสอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนในขนาดที่ต้องการ มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Service Center ประเทศเกาหลี) ด้วยไพรเมอร์ M13F เป็นไพรเมอร์ด้าน forward และไพรเมอร์ T7 (ตารางผนวกที่ ค1) เป็นไพรเมอร์ด้าน reverse เพื่อหา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเอนโคจกานเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.5.6 มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTX (basic local alignment search tools) จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) หรือความคล้าย (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อหาบริเวณ conserve sequence เพื่อยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ทำการโคลนได้นั้น มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นยีนเอนโดกลูคาเนส ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 จากนั้นจึงสุ่มเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนฐานข้อมูลน้อยกว่า 80 % เพื่อนำมาหา full length gene ของเอนโดกลูคาเนสที่เป็นยีนใหม่ต่อไป

## 3.6 การทำ genome walking ด้วยเทคนิค semi-random, two stepped PCR (ST-PCR)

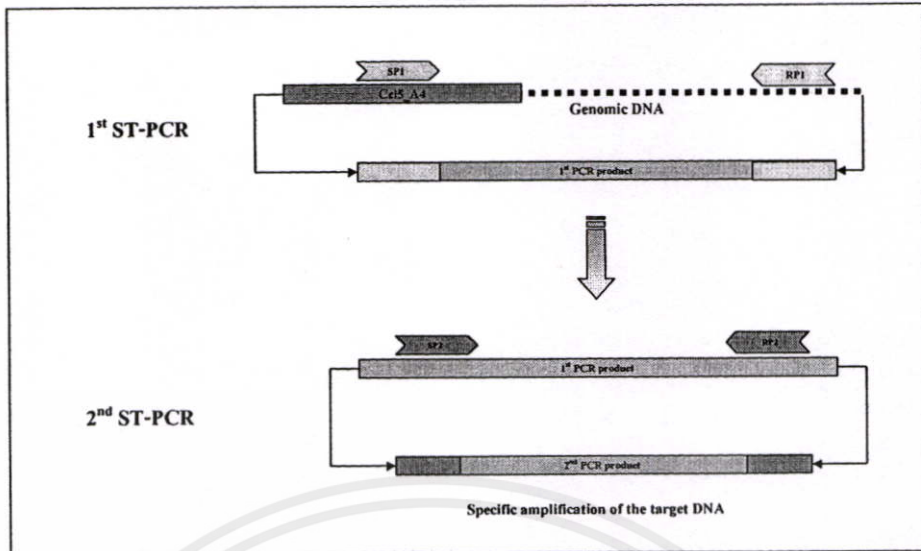
### 3.6.1 การออกแบบ specific primer

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สุ่มเลือก จากข้อ 3.5.7 มาออกแบบ specific primer เพื่อหาส่วนต่อจาก ชิ้นส่วนยีนที่ได้ ด้วยโปรแกรม primer premier 5.0 โดยออกแบบ forward primer จากปลายทางด้าน 5' และ reverse primer จากปลายด้าน 3' ของชิ้นส่วนยีนที่เป็นต้นแบบ ซึ่งออกแบบด้านละ 2 ไพร์เมอร์จึงได้ไพร์เมอร์ที่ชื่อว่า Up\_SP1 และ Up\_SP2 เป็นไพร์เมอร์สำหรับด้าน upstream และไพร์เมอร์ Dw\_SP1 และ Dw\_SP2 เป็นไพร์เมอร์ด้าน downstream (ตารางผนวกที่ ค1)

### 3.6.2 การทำ ST-PCR

การหาส่วนต่อของชิ้นส่วนยีนเพื่อให้ได้ full length gene ที่สมบูรณ์ ด้วยเทคนิค ST-PCR ตามวิธีการของ Guo and Xiong. (2006) โดยในการทำ primary PCR จะใช้ specific primer (SP1; ตารางผนวกที่ ค1) คู่กับ semi-random primer ที่มีความแตกต่างกันในบริเวณปลาย 3' (ST1, BMP1 และ BMP2; ตารางผนวกที่ ค1) ซึ่งความแตกต่างนี้จะช่วยเพิ่มโอกาสในการจับแบบสุ่มของไพร์เมอร์บนจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย เมื่อทำ primary PCR เสร็จแล้วจะเพิ่มความ specific โดยการทำให้ secondary หรือ nested PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ SP2 และ ST2 (ภาพที่ 3.1) เพื่อยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ได้เป็นส่วนของยีนในบริเวณที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา ST-PCR โดย SP คือ specific primer, RP คือ semi-random primer

การทำ primary PCR มีปริมาตร 25  $\mu$ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng, สารละลาย 1X *Taq* buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% Tween 20) with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dNTP ความเข้มข้น 200  $\mu$ M, specific primer (SP1) ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ M, semi-random primer (ST1 หรือ BMP1 หรือ BMP2) ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu$ M, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas®) ความเข้มข้น 1 U และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นเป็น 94  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเริ่มวงจรของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 42  $^\circ\text{C}$  ในรอบแรก และลดลงรอบละ 1  $^\circ\text{C}$  จนถึงอุณหภูมิ 37  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาทีต่อรอบ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 นาที จำนวนทั้งสิ้น 6 รอบ จึงเริ่มปฏิกิริยาในวงจรที่สอง โดยกำหนดอุณหภูมิ 94  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 55  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72  $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 25 วงรอบ จึงถือว่าสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต ในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่า ของความเข้มข้นเริ่มแรก จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจางนี้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกิริยา nested PCR รอบที่สอง โดยในรอบนี้จะใช้ไพรเมอร์ SP2 คู่กับไพรเมอร์ ST2 โดยในปฏิกิริยา 25  $\mu$ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจาง 1  $\mu$ l, สารละลาย 1X *Taq* buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% Tween 20) with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dNTP ความเข้มข้น 200  $\mu$ M, ไพรเมอร์ SP2 ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ M, ไพรเมอร์ ST2 ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu$ M,

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas®) ความเข้มข้น 1 U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิเป็น 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 วนรอบ จึงถือว่าสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต ในเจลอะกาโรส 1.0% ตามวิธีการในข้อ 3.4.3 จากนั้นคัดเลือกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ (ในกรณีที่มีผลผลิตพีซีอาร์หลายขนาด)

### 3.7 การทำ genome walking ด้วย GenomeWalker™ universal kit

#### 3.7.1 การตัดจีโนมดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดจีโนมดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นส่วนที่มีปลายเป็นปลายตัด (blunt end) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับ adaptor ของชุด GenomeWalker™ universal kit (clontech) ได้ ด้วยเอนไซม์ *DraI*, *PvuII* และ *EcoRV* โดยคาดหวังว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะจะสุมตัดบนจีโนมดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กับชิ้นส่วนยีน จนสามารถเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ โดยในแต่ละปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วย จีโนมดีเอ็นเอ 5.0 µg, 1X restriction enzyme buffer, restriction enzyme 100 U และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยา 1 µl มาตรวจสอบลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ ในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

#### 3.7.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Wizard® DNA clean-up System

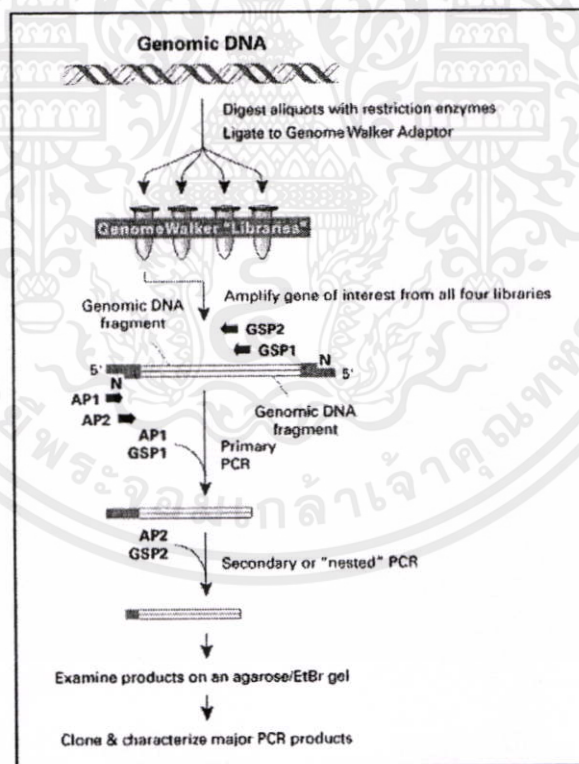
นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดโดย เอนไซม์ตัดจำเพาะ มาเติมด้วย Wizard® DNA clean-up resin (Promega) 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ในไซริงค์ขนาด 5.0 ml ที่ติดกับ minicolumn ไว้ แล้วดันก้าน plunger เบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอสามารถเกาะติดกับซิลิกาใน minicolumn และสารละลายที่เหลือจะไหลออกไป จากนั้นเติม isopropanol 80 % ปริมาตร 2.0 ml ค่อยๆ ดันก้าน plunger เพื่อให้ isopropanol ล้างสารละลายที่ยังคงค้างอยู่กับดีเอ็นเอ จากนั้นถอด minicolumn ออกจากไซริงค์ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้าย minicolumn ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 ml หลอดใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อให้ minicolumn แห้งสนิท แล้วจึงเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 70 °C ปริมาตร 35 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 - 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดกับซิลิกาละลายออกมา จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้สารละลายดีเอ็นเอไหลออกจาก minicolumn จึงนำสารละลายดีเอ็นเอไปทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.7.3 การเชื่อมต่อ digested DNA กับ GenomeWalker adaptor

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด และทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3.7.2 มาเชื่อมต่อกับ GenomeWalker adaptor (Clontech) โดยในปฏิกิริยา 8.0  $\mu$ l ประกอบด้วย digested DNA 4  $\mu$ l, GenomeWalker adaptor 1.9  $\mu$ l, 10X ligation buffer 1.6  $\mu$ l และเอนไซม์ T4 DNA ligase 0.5  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที

### 3.7.4 การทำพีซีอาร์

ในปฏิกิริยาการทำพีซีอาร์เพื่อหาส่วนของยีนโดยใช้ GenomeWalker Adaptor โดยในปฏิกิริยา primary PCR ต้องอาศัยไพรเมอร์ AP1 และ AP2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ Adaptor คู่กับไพรเมอร์ SP1 และ SP2 (จากข้อ 3.6.1) โดยในปฏิกิริยา Primary PCR จะใช้ไพรเมอร์ AP1 คู่กับ ไพรเมอร์ SP1 เสร็จแล้วจะเพิ่มความ specific โดยการทำ Secondary หรือ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AP2 และ ST2 (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ลักษณะการเกิดดีเอ็นเอผลผลิตจากการใช้ GenomeWalker adaptor (ที่มา: Clontech laboratory, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยในปฏิกิริยา primary PCR 25.0  $\mu$ l ประกอบด้วย 1X *Tth* PCR reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 9.3 at 25°C), 15 mM KOAc, 0.02% Triton X-100), 1X advantage genomic polymerase mix (0.10 – 0.20 units/ $\mu$ l *Tth* DNA polymerase, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l *Tth*Start antibody, 1.0% glycerol, 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.6 mM KCl, 1.1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM AP1, 0.2 mM SP1 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยวงรอบแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิ เป็น 72 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 7 วงรอบ จากนั้นเริ่มวงรอบที่สอง โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 67 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 32 วงรอบ จากนั้นคงอุณหภูมิ 67 °C ต่ออีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1.0  $\mu$ l มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต ในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

จากนั้นนำผลผลิตจาก primary PCR มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:50 เท่าของความเข้มข้นเริ่มแรก เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใน secondary PCR 25  $\mu$ l ประกอบด้วย 1X *Tth* PCR reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 9.3 at 25°C), 15 mM KOAc, 0.02% Triton X-100), 1X advantage genomic polymerase mix (0.10 – 0.20 units/ $\mu$ l *Tth* DNA polymerase, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l *Tth*Start antibody, 1.0% glycerol, 0.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.6 mM KCl), 1.1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM AP2, 0.2 mM SP2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยวงรอบแรกเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิ เป็น 72 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 5 วงรอบ จากนั้นเริ่มวงรอบที่สอง โดยกำหนดอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 25 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 67 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 25 วงรอบ จากนั้นคงอุณหภูมิ 67 °C ต่ออีก 4 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1.0  $\mu$ l มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต ในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3 จากนั้นคัดเลือกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ (ในกรณีที่มีผลผลิตพีซีอาร์หลายขนาด)

### 3.7.5 การสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากเจลอะกาโรสและทำให้บริสุทธิ์

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดจากข้อ 3.6.2 และ 3.7.4 ลงในเจลอะกาโรส 1.0 % ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) โดยตัดเจลครอบแถบของผลผลิตพีซีอาร์ตามขนาดที่ต้องการ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เดิมบัพเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด จึงเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 – 10 นาที จากนั้นบีบอัดสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา

1 นาที ที่ซึ่งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 700  $\mu$ l ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ที่ซึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 35  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 – 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดได้ในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

### 3.7.6 การโคลนและคัดเลือกโคลนส่วนต่อของชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.7.5 มาทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T และนำเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสม จาก โคลนที่คัดเลือกด้วยวิธี blue/white screening เพื่อตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังวิธีการข้อ 3.5.2 – 3.5.6 จากนั้นสุ่มเลือกพลาสมิดลูกผสมเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.7.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกมาด้วยไพรมเมอร์ M13F และ ไพรมเมอร์ T7 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ทั้งทางด้านปลาย 5' (upstream) และ ปลาย 3' (downstream) มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสที่ได้ในขั้นตอนแรก ด้วยโปรแกรม ContigExpress (InfoMax, Inc.200) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อหาจุดเริ่มต้น (start codon) และจุดสิ้นสุดของยีน (stop codon) ซึ่งในกรณีที่ยังไม่พบจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของยีน ต้องทำการหาส่วนต่อของยีนเพิ่มเติมตามวิธีการข้อ 3.6.1 – 3.6.2 เมื่อพบจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของยีนได้แล้วจึงทำการทดลองขั้นต่อไป

## 3.8 การโคลนยีนเอนโดกลูคาเนสที่สมบูรณ์ (full length gene)

### 3.8.1 การเพิ่มจำนวนยีนเอนโดกลูคาเนสที่สมบูรณ์จากจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนครบถ้วนแล้ว จะทำการดึง Full length gene ออกจากจีโนมิกดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องออกแบบ specific primer ของยีนนี้ ด้วยโปรแกรม primer premier 5.0 โดยออกแบบไพรมเมอร์ที่จับอย่างจำเพาะในบริเวณเริ่มต้นและท้ายสุดของยีน โดยกำหนดให้ไพรมเมอร์คู่นี้มีชื่อว่า A4\_Cel5 primer (ตารางผนวกที่ ก1) จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยา 25  $\mu$ l ประกอบด้วย ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng, สารละลาย 1X *Taq* buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20) with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dNTP ความเข้มข้น 200

$\mu\text{M}$ , ไพรมอร์ Cel5\_F ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{M}$ , ไพรมอร์ Cel5\_R ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{M}$ , เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 1 U และ ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

จากนั้นนำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 47 °C เป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ จากนั้นจึงคงอุณหภูมิที่ 72 °C ต่ออีก 10 นาที เป็นการสิ้นสุดปฏิกิริยา

### 3.8.2 การโคลนและการคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส 1.0 % (ข้อ 3.4.3) และทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard® DNA cleanup system (ข้อ 3.7.2) จากนั้นเชื่อมต่อผลผลิตเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T โคลนลงสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม (ข้อ 3.5.2 – 3.5.4) จากนั้นทำการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อหาโคลนที่มี DNA insert ด้วยวิธี size screening โดยการใช้ไม้อัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อเก็บโคโลนีสีขาวใส่ลงใน lysis buffer เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 – 10 นาที จากนั้นจึงบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ต่ออีก 5 – 10 นาที จากนั้นจึงตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเจลอะกาโรส 0.8 % จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วย GeneJet™ plasmid miniprep kit ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามวิธีการข้อ 3.5.6 จึงนำพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรมอร์ M13F และไพรมอร์ T7

### 3.8.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์กับฐานข้อมูล

เมื่อทราบผลการวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์แล้วจึงทำการตรวจวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลจาก NCBI อีกครั้ง ด้วยโปรแกรม BLASTX เพื่อยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าเป็นยีนในกลุ่มของเอนโดกลูคาเนส นำพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกมาเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดลองต่อไป

### 3.8.4 การวิเคราะห์หาบริเวณ cleavage site, restriction site และ rare codon

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพื่อมาวิเคราะห์หาบริเวณ cleavage site และ restriction enzyme site ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) และโปรแกรม RestrictionMapper version 3 (<http://www.restrictionmapper.org>) ตามลำดับเพื่อนำข้อมูลไปใช้ประกอบการทำการทดลองในขั้นต่อไป

นอกจากนี้การแปลรหัสจากดีเอ็นเอเป็นโปรตีน ต้องอาศัย tRNA (transfer RNA) ที่มีบริเวณ anticodon ซึ่งเป็นคู่สมกับ codon บนสาย mRNA (messenger RNA) แต่ในแบคทีเรีย *E. coli* มักขาดแคลน tRNA ของ codon: AUG, AGG, AGA, CUA, CCC และ GGA หรือที่เรียกว่า rare codon ซึ่งถ้าในยีนมี codon เหล่านี้อยู่เป็นจำนวนมาก อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลรหัสหรือไม่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หา rare codon เพื่อนำข้อมูลมาพิจารณาในการเลือกใช้แบคทีเรียที่เหมาะสม (pET system manual) ด้วยโปรแกรม rare codon calculator (RaCC) (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>)

## 3.9 การเตรียมยีนและเวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน

### 3.9.1 การเตรียมเวกเตอร์

หลักการในการเลือกใช้เวกเตอร์ (pET system manual) ขึ้นอยู่กับ ความต้องการในการนำโปรตีนไปประยุกต์ใช้, ข้อมูลเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิด และ วิธีการโคลน ซึ่งจากการทดลองนี้ ต้องการโปรตีนในรูปของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein) ซึ่งมีปลายด้านใดด้านหนึ่งติดอยู่กับ His\*tag เพื่อสะดวกในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือเวกเตอร์ pET28a (ภาพผนวก ก2), pET32a (ภาพผนวก ก3), pET43.1a (ภาพผนวก ก4) ซึ่งเป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยในเวกเตอร์กลุ่มนี้เป็นดีเอ็นเอพาหะที่ได้รับ T7 promoter มาจากพลาสมิด pBR322 ซึ่งเป็น strong promoter มีการจำลองตัวสูงและเป็นระบบที่สามารถใช้กับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างกว้างขวาง และ Tag แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการใช้งานต่างกัน เช่น T7\*Tag, His\*Tag, HSV\*Tag และ Nus\*Tag ใช้เพื่อตรวจสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยใช้เทคนิค Wester blotting, T7\*Tag, S\*Tag และ His\*Tag มีประโยชน์ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หรือ Trx\*Tag และ Nus\*Tag ซึ่งเป็นตัวช่วยให้โปรตีนที่ผลิตได้มีความเสถียร และอยู่ในรูปของ soluble protein โดยในเวกเตอร์ pET28a มี T7\*Tag, pET32a มี s\*Tag และ Trx\*Tag ที่ปลาย N-terminal ส่วน pET43.1a มี HSV\*Tag และ Nus\*Tag ที่ปลาย C-terminal (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะจำเพาะของเวกเตอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการเตรียมเวกเตอร์

Vector	anti-biotic	restriction enzyme		T7lac	T7*	S*	Trx*	HSV*	Nus*	protease
		5'	3'							
pET28a	kan	<i>NcoI</i>	<i>HindIII</i>	/	I	-	-	-	-	T
pET32a	amp	<i>NcoI</i>	<i>HindIII</i>	/	-	I	N	-	-	T, E
pET43.1a	amp	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	/	-	I	-	C	C	T, E

หมายเหตุ: I = internal tag, N = N-terminal tag, C = C-terminal tag

T = thrombin cleavage site E = enterokinase cleavage site

(ที่มา: Novagen. 2003)

ส่วนเวกเตอร์ pPICZαa (ภาคผนวกที่ ก5) เป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* โดยการเตรียมเวกเตอร์เริ่มจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์แต่ละชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสมิด จากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีการในข้อ 3.3.5 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ตารางที่ 3.1) โดยในปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 µg, 1X buffer with BSA ปริมาตร 5 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างละ 1 µl, และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ alkaline phosphatase, calf intestinal (CIAP) 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 65 °C เป็นเวลา 10 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3 และทำให้เวกเตอร์ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Wizard® DNA clean-up system ตามวิธีการในข้อ 3.7.2

### 3.9.2 การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำการโคลนใน expression vector นั้น จะมีบริเวณของ enzyme restriction site ต่อกออกมาจากส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้จับกับส่วนของยีน เพื่อให้สามารถนำไปเชื่อมต่อกับ expression vector ได้ ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดในส่วนของเวกเตอร์ได้แต่ไม่ตัดในยีน โดยออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกใน *E.coli* ด้านปลาย 5' เป็น 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ที่ออกแบบตั้งแต่จุดเริ่มต้นของยีน (full length gene) และไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการตัดบริเวณ cleavage site ออกไป (mature gene) และการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' จะออกแบบโดยตัด stop codon ออกไป เพื่อให้ยีนเชื่อมต่อกับ His\*Tag ของเวกเตอร์ โดยไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ของเวกเตอร์ pET28a และ pET32a จะมีบริเวณตัดของเอนไซม์ *NcoI* และไพรเมอร์ของเวกเตอร์ pET43.1a จะมีบริเวณตัดของเอนไซม์ *BamHI* ส่วนไพรเมอร์ด้านปลาย 3' ของทั้งสามเวกเตอร์จะมีบริเวณตัดของเอนไซม์ *HindIII* (ตารางผนวกที่ ก1)

ส่วนไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ (*P. pastoris*) นั้น จะออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 5' โดยทำการตัดบริเวณ cleavage site ของยีนออกไป เนื่องจากในพลาสมิดเวกเตอร์มี  $\alpha$ -factor signal sequence ซึ่งทำหน้าที่พาโปรตีนออกจากเซลล์อยู่แล้ว โดยในไพรเมอร์ด้านปลาย 5' และ 3' จะมีบริเวณตัดของเอนไซม์ XhoI และ SalI ตามลำดับ

### 3.9.3 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิดลูกผสมและการทำให้บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนนี้ ใช้พลาสมิดลูกผสมที่ได้คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.8.3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 100 ng สารละลาย 1X *Pfu* buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin), 1% (v/v) Triton X-100) with 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , dNTP ความเข้มข้น 200  $\mu$ M, ไพรเมอร์ ความเข้มข้นอย่างละ 0.4  $\mu$ M, เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 0.03 U และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 55 °C เป็นเวลา 1 นาที จึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 °C เป็นเวลา 4 นาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จึงเสร็จขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากนั้นนำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในปฏิกิริยา 50  $\mu$ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอผลผลิต 1  $\mu$ g, 1X buffer ปริมาตร 5  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างละ 0.5  $\mu$ l, และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 65 °C เป็นเวลา 10 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% ตามวิธีการในข้อ 3.4.3 และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Wizard® DNA clean-up system ตามวิธีการในข้อ 3.7.2

### 3.10 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

#### 3.10.1 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมลงสู่แบคทีเรียพาหะและการตรวจสอบยีน

นำเวกเตอร์และยีนที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.1 และ 3.8.3 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase โคลนลงสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening และตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สุ่มตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET28a/ce5\_A4(F), pET28a/ce5\_A4(M), pET32a/cel5\_A4(F), pET32a/cel5\_A4(M), pET43.1a/cel5\_A4(F) และ pET43.1a/cel5\_A4(M) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกได้ถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell 3 strains ซึ่งมีคุณสมบัติต่างกัน คือ BL21(DE3) ใช้ในการแสดงออกทั่วไป Rosetta(DE3) มี T7 polymerase รองรับการแสดงออกของเวกเตอร์ที่มี T7 promoter และมี tRNA สำหรับ rare codon ส่วน Rosetta gami (DE3) มีการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้มีการสร้างพันธะ disulfide ขึ้นใน cytoplasmic และมี tRNA สำหรับ rare codon (Novagen. 2003) ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการในข้อ 3.5.3 จากนั้นตรวจสอบปริมาณบีแอนท์โคลนด้วยวิธี size screening (ข้อ 3.8.2) สกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกด้วยวิธีการนี้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้ในแต่ละชนิดอีกครั้ง เพื่อคัดเลือกโคลนที่จะใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

#### 3.10.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli*

แยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.9.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชีวนะสำหรับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ปริมาตร 5 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเชื้อ 1 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 100 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นแสง 600 nm ได้ประมาณ 0.5 - 0.7 จึงเหนี่ยวนำให้ยีนมีการแสดงออกด้วยการเติม Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM เขย่าต่อที่อุณหภูมิ 37 °C ต่ออีก 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X phosphate buffer ปริมาตร 10 ml เขย่าให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ด้วยเครื่อง sonicator โดยใช้ความถี่ 60 % ทำงานและหยุด สลับกันครั้งละ 10 วินาที รวมเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เก็บแยกส่วนของเหลวและตะกอน เพื่อตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.10.3 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.9.2 ผสมกับ 5x SDS dye loading buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ในเจล polyacrylamide ซึ่งมีความเข้มข้นของเจลชั้นล่าง (separating gel) 12 % และความเข้มข้นของเจลชั้นบน (stacking gel) 4 % โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7 x 10 x 0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 15 mA ต่อเจล เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำเจลไปย้อมด้วย coomassie blue staining buffer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย destaining buffer ประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมองเห็นแถบโปรตีน

### 3.10.4 เทคนิค Western blotting

ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ transfer buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า นำแผ่นเมมเบรนมา block ด้วย blocking buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน จึงนำมาล้างใน phosphate buffered saline with Tween-20 (PBST) นาน 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในแอนติบอดีตัวที่ 1 (mouse anti-His) เจือจาง 1:30,000 นาน 1 ชั่วโมง จึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที มาแช่ต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG alkaline phosphatase) เจือจาง 1:2,000 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวที่ 1 จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จึงแช่แผ่นเมมเบรนในซับสเตรต (NBT กับ BCIP) จนกระทั่งปรากฏแถบสีน้ำเงินของ His\*Tag โปรตีน

### 3.10.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย HisTrap™ HP column

ทำการเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมใช้งานด้วยการเติม binding buffer ผ่านไซริงค์ปริมาตร 3 cv (column volume) จากนั้นเติมโปรตีนที่เติม imidazole ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 mM ปริมาตร 2 cv ผ่านคอลัมน์ ล้างด้วย binding buffer 3 cv จะโปรตีนด้วย elution buffer ปริมาตร 3 cv โดยมีความเข้มข้น imidazole 100, 200, 300, 400 และ 500 mM ตามลำดับ เก็บของเหลวในแต่ละส่วน มาตรวจสอบว่าโปรตีนที่ต้องการออกมาในส่วนใดด้วย SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.10.3

### 3.10.6 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ทำการกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีนโดยนำ bovine serum albumin (BSA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8  $\mu\text{g}$  ในน้ำกลั่น 800  $\mu\text{l}$  จากนั้นเติมน้ำยาคูโปรตีน (BioRad) 200  $\mu\text{l}$  เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 nm นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณสมการถดถอย  $y = ax + b$  โดยค่า  $y$  เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

จากนั้นนำโปรตีนที่ต้องการวัด 20  $\mu$ l ละลายในน้ำกลั่น 780  $\mu$ l เติมน้ำยาคูโปรตีน (BioRad) 200  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น โดยแทนค่า  $y$  ด้วยค่าการดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาค่า  $x$  (ความเข้มข้นของสารละลาย) เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

### 3.11 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ *Pichia pastoris*

#### 3.11.1 การเตรียมเชื้อ *P. pastoris* ให้เป็น competent cell

เชื้อเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract peptone dextrose medium (YPD) ปริมาตร 3 ml ในหลอดทดลองขนาด 50 ml เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง เปิดเชื้อที่ได้ปริมาตร 500  $\mu$ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD 100 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30 °C จนกระทั่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm ได้ประมาณ 1.3 – 1.5 จึงนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (แช่เย็น) ปริมาตร 100 ml นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างตะกอนด้วย น้ำกลั่น 50 ml, 1M sorbitol 4 ml และ 1M sorbitol 200  $\mu$ l ตามลำดับ competent cell ที่ได้ ควรใช้ให้หมดในวันที่เตรียม

#### 3.11.2 การโคลนดีเอ็นเอสายผสมลงสู่ *P. pastoris* competent cell

นำพลาสมิดเวกเตอร์และยีนที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.1 และ 3.9.3 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase จากนั้นคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening และตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สุ่มตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pPICZ $\alpha$ /cel5\_A4 จากนั้นนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SacI เพื่อให้ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง เหมาะกับการแทรกเข้าไปในสายจีโนมของยีสต์ จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ โคลนเข้า *P. pastoris* ด้วยวิธี electroporation โดยนำดีเอ็นเอสายผสม 10  $\mu$ l ผสมลงใน competent cell 80  $\mu$ l จากนั้นย้ายลงใน electroporation cuvette ขนาด 0.2 ml แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 1.5 kv, 25 $\mu$ F, 200 ohm เติม 1M sorbitol 1 ml ย้ายลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml วางไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 1 – 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่ผสม zeocin บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 3 – 7 วัน หรือกระทั่งเกิดโคโลนีของยีสต์

### 3.11.3 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์

สุ่มเลือกโคโลนีเพื่อนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Hoskins. (1997) โดยเชื้อเชื้อลงใน YPD 10 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C ทิ้งไว้ประมาณ 12 – 16 ชั่วโมง ปิเปิดเชื้อ 1 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนใน SCED (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA; pH 8.0) 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 50 นาที เติม 1% SDS 200 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที เติม 5M KOAc 150 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนของเหลวลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของของเหลวที่เก็บได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm, อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย TE buffer 700 µl เติม 10 mg/ml RNaseA 3 µl บ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1 โดยปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของเหลวใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ล้างด้วย chloroform : isoamyl ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม 7.5 M ammonium acetate 0.5 เท่าของปริมาตรและ absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทิ้งไว้จนกระทั่งตะกอนแห้ง จึงละลายด้วย TE buffer 50 µl

### 3.11.4 การตรวจสอบปริมาณบีแอนท์โคลนด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบปริมาณบีแอนท์โคลน ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 3'AOX และ 5'AOX (ตารางภาคผนวกที่ ค1) และใช้อุณหภูมิในช่วง annealing ที่ 55 °C จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สกัดได้ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 % ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

### 3.11.5 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในยีสต์

เชื้อเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบจากข้อ 3.11.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY 25 ml ใน flask ขนาด 250 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C จนกระทั่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm ได้ประมาณ 2 – 6 (ประมาณ 12 – 16 ชั่วโมง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY ปริมาตร 5 ml ในหลอดทดลองขนาด 50 ml เติม absolute methanol จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3% จากนั้นเก็บตัวอย่างครั้งละ 200 µl และเติม absolute methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บของเหลวที่ได้ ตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.10.3

### 3.12 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์

#### 3.12.1 การทดสอบการย่อย carboxymethyl cellulose (CMC) ด้วยวิธี DNS

ในการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS method) ซึ่งรายงานโดย Miller. (1959) โดยจะวิเคราะห์คุณสมบัติจากการทนร้อน ทนต่อกรด-ด่าง โดยใช้ซับสเตรต CMC ซึ่งเป็นซับสเตรตจำเพาะของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการทดสอบ เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยา โดยปีเปตสารละลายซับสเตรต 1% CMC ใน 0.1 M sodium acetate buffer (NaOAc; pH5.5) 300  $\mu$ l ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ 40  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C ต่ออีก 30 นาที จากนั้นจึงเติม DNS solution 680  $\mu$ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็ง จากนั้นปีเปตปฏิกิริยา 100  $\mu$ l เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm (Ghose. 1987)

เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้กลูโคสเป็นมาตรฐานจากนั้นคำนวณค่าสมการถดถอย และคำนวณค่า x ที่ได้ ตามวิธีการในข้อ 3.9.6 จากนั้นจึงนำค่า x ที่ได้ มาคำนวณหาค่า international unit (IU) ด้วยสูตร

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

#### 3.12.2 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (optimal temperature)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ภาวะอุณหภูมิต่างๆ เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทดสอบด้วยซับสเตรต 1% CMC ในสารละลาย 0.1M NaOAc pH 5.5 และใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน ตั้งแต่ 30 – 80 °C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังข้อ 3.12.1

#### 3.12.3 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (optimal pH)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างกัน เพื่อหาช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยจะทำปฏิกิริยาในอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดจากข้อ 3.12.2 จากนั้นจะทำการทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ pH 3.0-9.0 โดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลายชนิดต่างๆ โดยที่ pH 3.0 จะใช้สารละลาย 0.1M glycine, pH 4.0-6.0 ใช้สารละลาย 0.1M NaOAc และ pH 7.0-9.0 ใช้สารละลาย 0.1M Tris-HCl เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังข้อ 3.12.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เฉพาะเรื่องเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

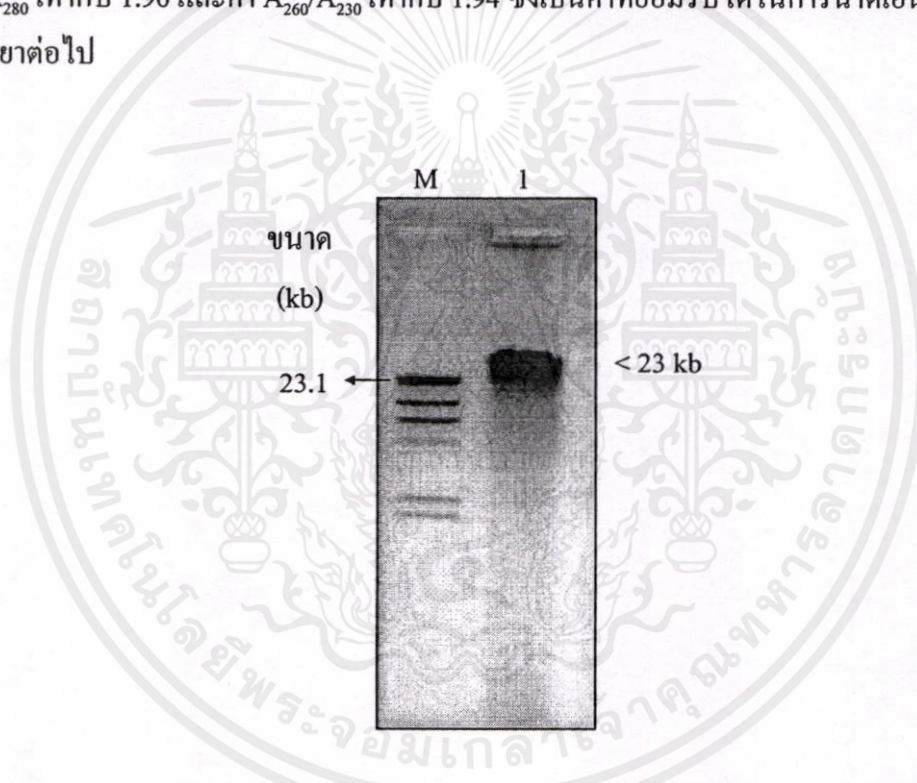
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ในการศึกษาเรื่องการคัดเลือกและการโคลนยีนเอนโดกลูคาเนสจากกระเพาะรูเมนของโคที่แบคทีเรีย *Escherichia coli* เริ่มจากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบมาจากข้อมูลของเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วถ่ายทอดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดลงสู่ competent cell *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากนั้นคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลเพื่อยืนยันว่าเป็นชิ้นส่วนของยีนที่อยู่ในกลุ่มที่ต้องการ คัดเลือกชิ้นส่วนของยีนเพื่อหาส่วนต่อของยีนเพื่อให้ได้ยีนเอนโดกลูคาเนสที่ครบถ้วนด้วยเทคนิค genome walking เมื่อได้ full length ของยีนที่ต้องการแล้วจึงเชื่อมต่อกับ expression vector แล้วถ่ายทอดลงสู่ expression host เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1 ผลการสกัดจีโนมิติเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโค

เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวที่เก็บจากกระเพาะรูเมนของโค โดยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tajima *et. al.* (1999) ตามวิธีการข้อ 3.3.2 แล้ว โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณ 35  $\mu$ l ต่อของเหลว 300  $\mu$ l นำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ โดยภาพที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส จากภาพแสดงให้เห็นว่าจีโนมิติเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่มากกว่า 23.1 kb เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ( $A_{260}$ ) แสดงว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น 436.3 ng/ $\mu$ l และเมื่อพิจารณาคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยดูการปนเปื้อนของกรดฮิวมิก และ โปรตีน ได้จากค่า  $A_{260}/A_{280}$  และ  $A_{260}/A_{230}$  ตามลำดับ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.96 และค่า  $A_{260}/A_{230}$  เท่ากับ 1.94 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการนำดีเอ็นเอไปใช้ในปฏิกิริยาต่อไป



ภาพที่ 4.1 จีโนมิติเอ็นเอที่สกัดจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA *Hind*III 100 ng

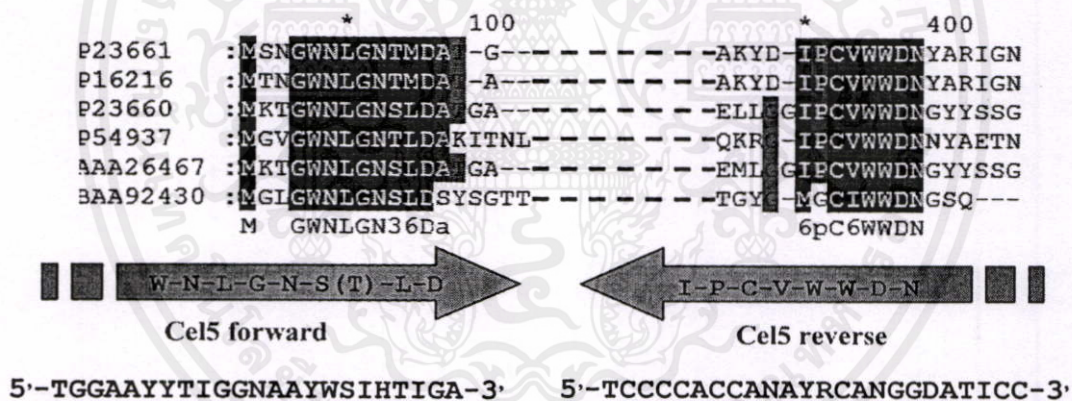
Lane I คือ จีโนมิติเอ็นเอที่ได้จากการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การคัดเลือกชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์

### 4.2.1 ผลการออกแบบ Degenerate primer

การออกแบบ degenerate primer ของยีนเอนโดกลูคาเนส เริ่มจากการศึกษาข้อมูลของยีนจาก <http://www.cazy.org> ซึ่งเป็นเว็บไซต์ที่มีฐานข้อมูลของเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase จากเว็บไซต์ดังกล่าว ทำให้สามารถกำหนดได้ว่าจะศึกษายีนเอนโดกลูคาเนสจาก glycoside hydrolase family 5 เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีข้อมูลของยีนเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนอยู่มาก เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในกลุ่มดังกล่าวมาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม AlignX พบบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนซึ่งนำมาออกแบบไพรเมอร์ด้าน forward คือ W-N-L-G-N-S(T)-L-D แปลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็น 5'-TGGAAYTIGGNAAYWSIHTIGA-3' ส่วนไพรเมอร์ด้าน reverse นำบริเวณอนุรักษ์ I-P-C-V-W-W-D-N มาออกแบบ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'-TCCCCACCANAYRCANGGDATICC-3' (ภาพที่ 4.2) จึงนำลำดับกรดอะมิโนจากบริเวณดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์ Cel5 ซึ่งคาดว่าจะมีขนาดดีเอ็นเอผลผลิตประมาณ 800 – 900 bp (ตารางผนวกที่ ค1)

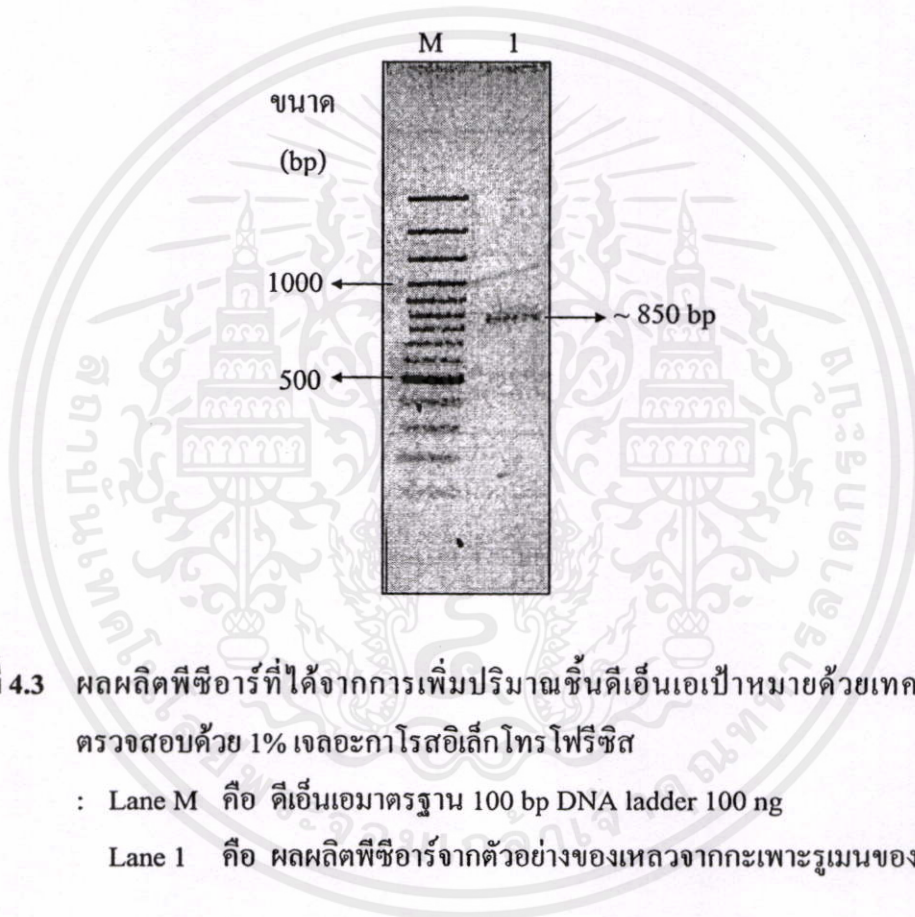


ภาพที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ degenerate primer นั้น นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บน 1% เจลอะกาโรส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 850 bp (ภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็นขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอตามที่ประมาณการไว้



ภาพที่ 4.3 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder 100 ng

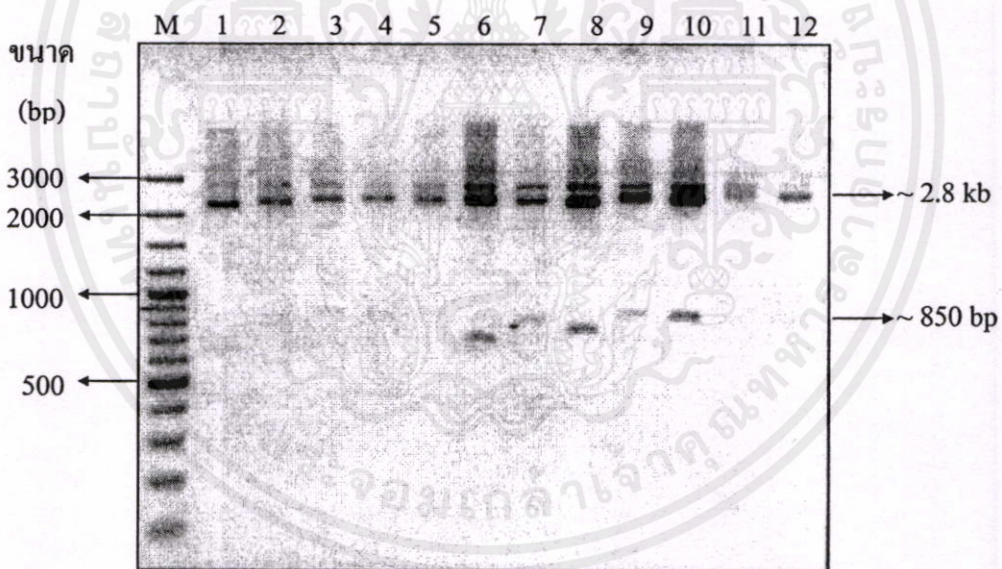
Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างของเหลวจากกะเพาะรูเมนของโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ผลการถ่ายทอดชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสและการคัดเลือกโคลน

#### 4.3.1 การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลจากการนำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 4.2.2 มาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas®) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลลาร์ของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase นำพลาสมิดลูกผสมทั้งหมดทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นจึงคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีนเอนโดกลูคาเนสด้วยเทคนิค blue/white screening จากนั้นสุ่มเลือกโคลนที่ต้องการจำนวน 12 โคลนมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด GeneJet™ plasmid miniprep kit (Fermentas®) แล้วจึงตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI นำปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าดีเอ็นเอผลผลิตที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดไม่เท่ากัน (ภาพที่ 4.4) จึงสุ่มเลือกโคลนจำนวน 8 โคลน คือ A1, A3, A4, A5, A6, A8, A11, A12 ซึ่งเป็นตัวแทนของดีเอ็นเอผลผลิตขนาดต่างๆ เพื่อการตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.4 ผลการตัดพลาสมิดที่สุ่มเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 ng

Lane 1-12 คือ พลาสมิดตัวอย่างที่ A1- A12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มตัวอย่าง 8 โคลน ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 8 โคลนที่นำมาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTX (basic local alignment search tools) พบว่ามี 5 โคลน ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีนเอนโดกลูคาเนสคือ A3, A4, A6, A8 และ A12 โดยโคลน A3 มีความคล้ายกับยีน endo-1,4-beta-glucanase จากเชื้อ *R.s. albus* 61% โคลน A4 และ A12 คล้ายยีน endoglucanase A จาก *P. copri* 46% โคลน A6 คล้ายยีน endoglucanase B จาก *N. patriciarum* 44% และโคลน A8 คล้ายยีน endoglucanase B จาก *R.s. albus* 81% (ตารางที่ 4.1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม translate ของ ExPASy (ภาพผนวกที่ ค2-ค6) และนำลำดับกรดอะมิโนของโคลนทั้ง 5 มาเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของกลุ่มยีนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการออกแบบ degenerate primer พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโคลนทั้งหมด มีบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 (ภาพผนวกที่ ค7)

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Cel5\_A4 และ Cel5\_A6 มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างต่ำ และมีความเหมือนกับแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่ม *Ruminococcus sp.* ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบบ่อยในกระเพาะรูเมนของโค แต่ยังคงมีบริเวณอนุรักษ์ของยีนในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 จึงสุ่มเลือกโคลน Cel5\_A4 ซึ่งมีความเหมือนกับยีน endoglucanase A ของเชื้อ *Prevotella copri* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสิ่งขับถ่ายจากร่างกายมนุษย์เพื่อนำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล

Clone	Accession	Description	Identities
	P12616.1	endo-1,4-beta-glucanase [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	81/131 (61%)
	P23661.1	endoglucanase B [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	82/131 (62%)
Cel5_A3	EFF15708.1	cellulase (glycosyl hydrolase family 5) [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	81/131 (61%)
	NP_347462.1	Endoglucanase family 5 [ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ]	44/133 (58%)
	ACZ98607.1	endoglucanase [ <i>Cellulosilyticum ruminicola</i> ]	20/40 (50%)
	ZP_06250788.1	endoglucanase A [ <i>Prevotella copri</i> ]	133/289 (46%)
	YP_001193127.1	glycoside hydrolase family protein [ <i>Flavobacterium johnsoniae</i> ]	129/252 (51%)
Cel5_A4	ZP_03009677.1	hypothetical protein BACCOP_01539 [ <i>Bacteroides coprocola</i> ]	118/255 (46%)
	ZP_05055480.1	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5), putative [ <i>Verrucomicrobiae bacterium</i> ]	120/253 (47%)
	ADB44000.1	exo-xyloglucanase [uncultured bacterium]	129/277 (46%)
	Q12647.1	endoglucanase B [ <i>Neocallimastix patriciarum</i> ]	133/296 (44%)
	CAB92326.1	endoglucanase 5A [ <i>Piromyces equi</i> ]	140/296 (47%)
Cel5_A6	CBL17440.1	Endoglucanase [ <i>Ruminococcus sp.</i> ]	142/294 (48%)
	P54937.1	endo-1,4-beta-D-glucanase [ <i>Clostridium longisporum</i> ]	120/295 (40%)
	AAD43818.1	endoglucanase precursor [ <i>Piromyces rhizinflatus</i> ]	138/296 (46%)
	P23661.1	endoglucanase B [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	201/246 (81%)
	P16216.1	endo-1,4-beta-glucanase [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	197/246 (80%)
Cel5_A8	EFF15708.1	cellulase (glycosyl hydrolase family 5) [ <i>Ruminococcus albus</i> ]	191/246 (77%)
	CBL35038.1	Endoglucanase [ <i>Eubacterium siraeum</i> ]	96/190 (50%)
	ZP_02422150.1	hypothetical protein EUBSIR_00991 [ <i>Eubacterium siraeum</i> ]	95/190 (50%)
	ZP_06250788.1	endoglucanase A [ <i>Prevotella copri</i> ]	137/293 (46%)
	YP_001193127.1	Glycoside hydrolase family protein [ <i>Flavobacterium johnsoniae</i> ]	129/255 (50%)
Cel5_A12	ZP_03009677.1	hypothetical protein BACCOP_01539 [ <i>Bacteroides coprocola</i> ]	118/256 (46%)
	ZP_05055480.1	Cellulase [ <i>Verrucomicrobiae bacterium</i> ]	122/254 (48%)
	ADB44000.1	exo-xyloglucanase [uncultured bacterium]	130/279 (46%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการทำ genome walking ด้วยเทคนิค ST-PCR และการคัดเลือกโคลน

##### 4.4.1 ผลการออกแบบ specific primer

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน Cel5\_A4 สามารถนำมาออกแบบ specific primer Up\_SP1 และ Up\_SP2 เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน upstream ส่วนไพรเมอร์ Dw\_SP1 และ Dw\_SP2 ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน downstream โดยไพรเมอร์ที่มีรหัส SP2 คือ nested primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพื่อยืนยันว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ผลิตได้นั้น อยู่ในบริเวณที่ต้องการ โดยออกแบบให้อยู่ในบริเวณปลายของผลผลิตพีซีอาร์ในรอบแรก ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความจำเพาะของผลผลิตพีซีอาร์ (ตารางผนวกที่ ค1)

##### >Cel5\_A4

```

.....GGACTTGGGAACCTGGCTGGAGGCTGGTAAG
TCATGGGAGGGCGTCACAACATTCAGCAATAAGGGCGGACTCGGCTCCGAGACAGCTTGG
    ← Up_SP1 →
CAACAGACTAAGACCACGCGAGGCTGTGATCGACTATGTCAAGTCACAGGGCTTCCGCTCT
GTACGCATACCCCTGCGCTTGGGTATGGGGACATATGGCTGATGCCAACAACTACACCATC
    ← Up_SP2 →
GACGCCACATGGATGGCTCGAGTTAAGGAAATCGTTGACTATTGCATCAAAGATGATCTT
TACGTATTATTAACGACCCTGGGACGGCGGGTGGCTTGTGACAACCTGACGGCCACA
GGCGCACAGAAAAGAAAAGAACAAAGCGGTACTCGCAGCCATTTGGACACAAATAGCCAAT
GAATTCCTCGACTATGATGACCATCTCGTCTTTGCCGGGCAGAACGAGCCGCCCATTTGAG
AAGCAATCGGATATCGCTCACTGGTAGAATATCAGCAAACCTTCATCGATGCTGTACGA
GCCACTGGCGGGAACAACGAGAAGCGTCTGCTGGTGGTACAGGGACCAAGTACGGACGTG
    → Dw_SP2 →
GAGAAGACATGCAACTGGCTGGCCGATAAGATGCCTACAGATCCCAGTGGCAAACCTGGCT
GTGGAGATACACTTCTATTATCCCTGGAACCTCTGGGCATGACAGAGGATGCTAATTGG
    → Dw_SP1 →
GGCAACATGTTCTATTACTGGGGGAAAGATAACCACTTCAGCGGATCAAACACAACCCC
CAACTGGGGGCGAAGAAGAACAGATGACTAGTTTGGCAGACCTGTTTGAAGACCAAGTTC
ATTAGATTAAAGGNCAT.....

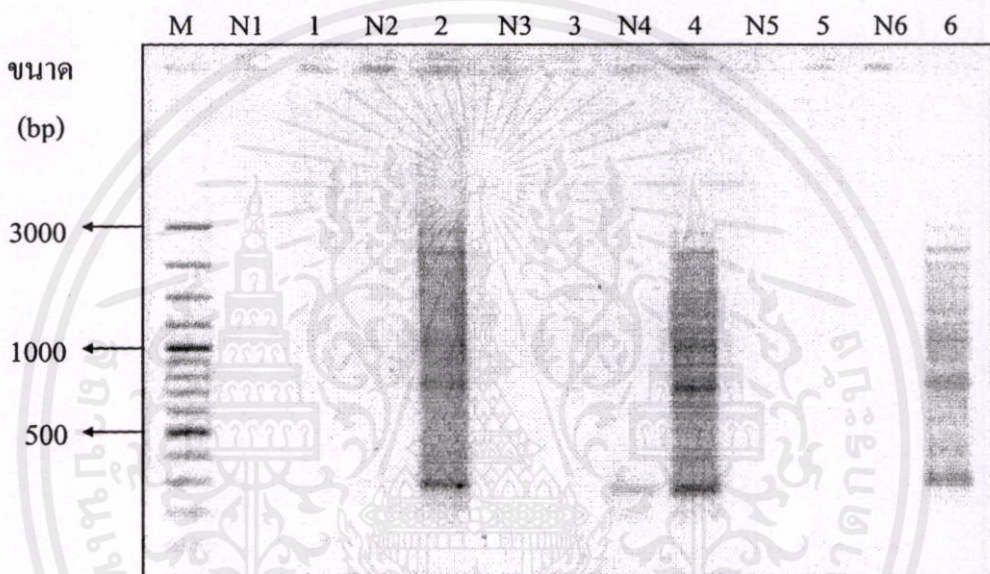
```

ภาพที่ 4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่นำมาออกแบบ specific primer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 ผลการทำ ST-PCR

ในการทำ primary PCR จะใช้จีโนมคิเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์ชุด SP1 คู่กับ semi-random primer (ST1, BMP1 หรือ BMP2; ตารางผนวกที่ ค1) จากการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 4.6) พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดจากการจับคู่ของ semi-random primer กับไพรเมอร์ Dw\_SP1 มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลายขนาด ส่วนผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ Up\_SP1 มองไม่เห็นผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งอาจเป็นเพราะคิเอ็นเอผลผลิตที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยมาก ดังนั้นจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ของทุกปฏิกิริยา เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ secondary PCR



ภาพที่ 4.6 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา Primary PCR โดยใช้จีโนมคิเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

Lane M คือ คิเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 ng

Lane N1-6 คือ Negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) ของแต่ละไพรเมอร์

Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ ST1 กับ Up\_SP1

Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ ST1 กับ Dw\_SP1

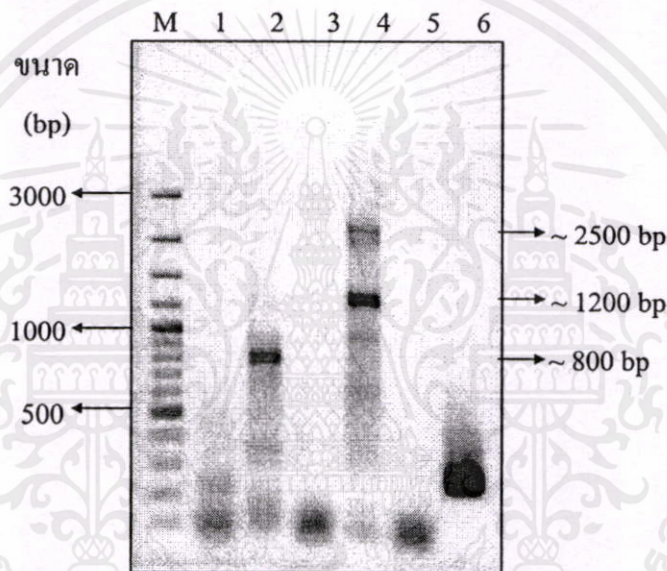
Lane 3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ BMP1 กับ Up\_SP1

Lane 4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ BMP1 กับ Dw\_SP1

Lane 5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ BMP2 กับ Up\_SP1

Lane 6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ BMP2 กับ Dw\_SP1

นำผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา primary PCR มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ secondary PCR โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้นเป็น 1 ใน 50 เท่า และใช้ไพรเมอร์ชุด SP2 คู่กับไพรเมอร์ ST2 ซึ่งผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลายขนาด ซึ่งเป็นดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากไพรเมอร์ Dw\_SP2 แต่ผลผลิตพีซีอาร์ที่เห็นได้ชัดมี 3 ขนาด คือ ผลผลิตจากไพรเมอร์ ST1 กับ Dw\_SP1 (primary primers) มีขนาดประมาณ 800 bp กำหนดให้มีชื่อว่า A4\_Dw(b) และผลผลิตจากไพรเมอร์ BMP1 กับ Dw\_SP1 (primary primers) มีขนาดประมาณ 2,500 bp; A4\_Dw(d1) และ 1,200 bp; A4\_Dw(d2) จึงทำการสกัดผลผลิตพีซีอาร์ทั้ง 3 ขนาด ด้วยวิธี gel extraction

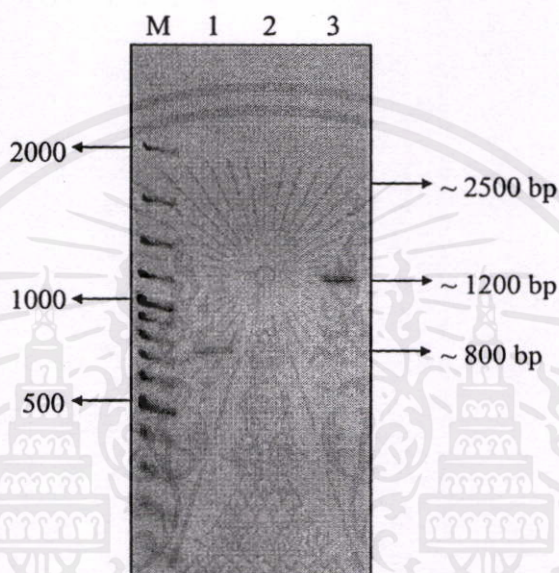


ภาพที่ 4.7 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา secondary PCR โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์จาก primary PCR 1:50 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

- Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder 100 ng
- Lane 1,3,5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ ST2 กับ Up\_SP2
- Lane 2,4,6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ ST2 กับ Dw\_SP2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี gel extraction แล้ว ได้ผลผลิตขนาดประมาณ 800, 1,200, 2,500 bp (ภาพที่ 4.7) จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ทั้ง 3 ขนาดมาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T ด้วยอัตราส่วนความเข้มข้นเป็น 1:3 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วสุ่มเก็บโคลนจากการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white screening เป็น master plate จากนั้นสุ่มสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI เพื่อนำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



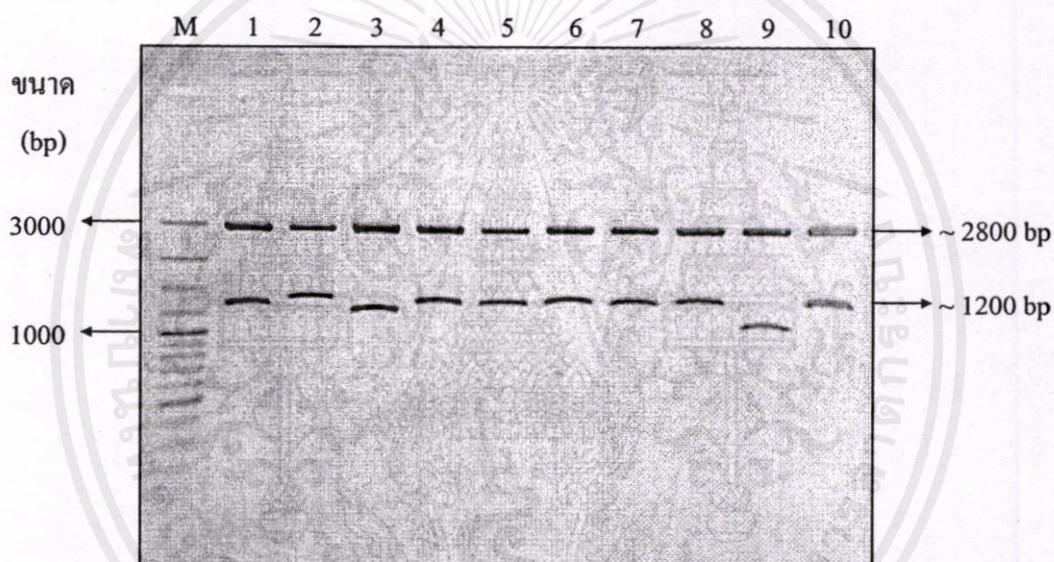
ภาพที่ 4.8 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค gel extraction ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

- Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 ng
- Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ A4\_Dw(b) ขนาดประมาณ 800 bp
- Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ A4\_Dw(d1) ขนาดประมาณ 2,500 bp
- Lane 3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ A4\_Dw(d2) ขนาดประมาณ 1,200 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.3 ผลการคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการโคลนผลผลิตพีซีอาร์เข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T ทำการสุ่มเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue/white screening โดยเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิด จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI และวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสดังภาพที่ 4.9 ซึ่งเป็นตัวอย่างการตัดพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/A4\_Dw(d2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และขนาด 1,000 – 1,200 bp ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย จึงได้คัดเลือกโคลน 3, 4, 5 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้คัดเลือกและสกัดจากเจลอะกาโรส รวมทั้งโคลน 1, 2, 3 จาก pTZ57R/A4\_Dw(b) และ โคลน 2, 7, 8 จาก pTZ57R/A4\_Dw(d1) เพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.9 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI ของพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/A4\_Dw(d2) ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด ~3 kb ซึ่งเป็นขนาดของ pTZ57R/T และแถบดีเอ็นเอขนาด ~ 1,200 bp ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 ng

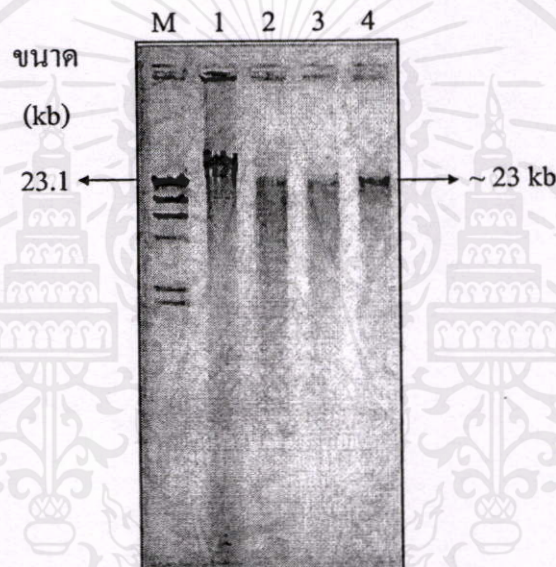
Lane 1-10 คือ pTZ57R/A4\_Dw(d2) โคลนที่ 1 – 10 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 ผลการทำ Genome Walking ด้วย Advantage<sup>®</sup> genomic LA polymerase mix

### 4.5.1 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV*, *PvuII* และ *DraI* จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% เจลอะกาโรส เมื่อนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA *HindIII* ปรากฏว่าเอนไซม์สามารถตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงได้ โดยดูจากปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอลดลง และการเกิดเป็นสเมียร์ (smear) ของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงมากขึ้น ดังแสดงตามภาพที่ 4.10



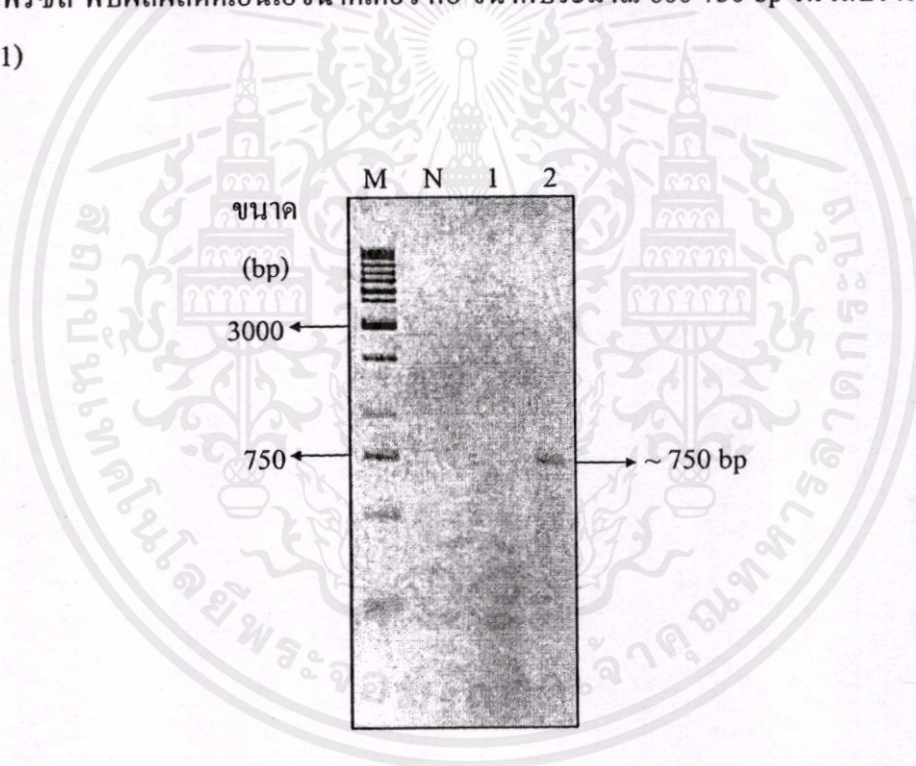
ภาพที่ 4.10 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรส อิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

- Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA *HindIII* 100 ng
- Lane 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอ
- Lane 2 คือ โลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRV*
- Lane 3 คือ โลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII*
- Lane 4 คือ โลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *DraI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ผลการทำ genome walking

จากปฏิกิริยาการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เลือกไลบรารี *EcoRV* และไลบรารี *PvuII* มาทำการทดลองต่อ เพราะจากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ *EcoRV* และ *PvuII* สามารถตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงได้ ขณะเดียวกัน เอนไซม์ *DraI* ยังมีปริมาณดีเอ็นเอที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์มากกว่า จากนั้นนำไลบรารีที่คัดเลือกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard<sup>®</sup> DNA clean-up ก่อนนำมาเชื่อมต่อกับ GenomeWalker adapter และเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากในปฏิกิริยา genome walking ด้วยวิธี ST-PCR ได้ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ด้านปลาย 3' แล้ว ในการทดลองนี้จึงทดลองเฉพาะคู่ไพรเมอร์ด้านปลาย 5' โดยปฏิกิริยา primary PCR จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ AP1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เป็นเบสคู่สมกับ adaptor คู่กับ ไพรเมอร์ Up\_SP1 ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส พบผลผลิตดีเอ็นเอขนาดเดียว คือ ขนาดประมาณ 600-750 bp ในไลบรารี *PvuII* (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา primary PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

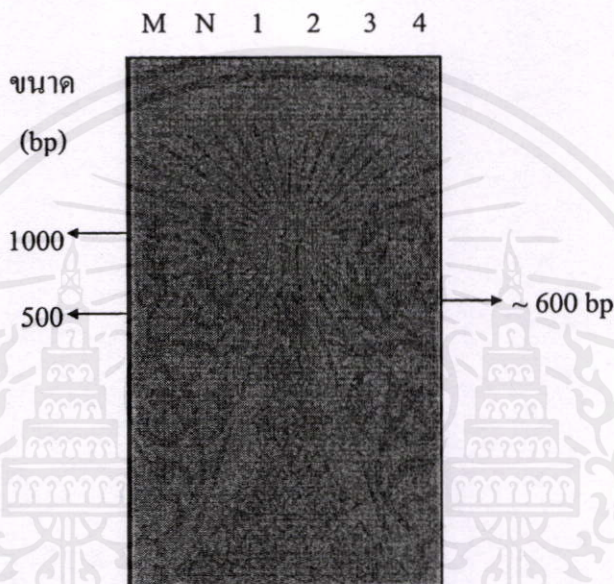
Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder 100 ng

Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRV*

Lane 2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII*

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นต่ำสุดเป็น 1:100 และ 1:500 เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ secondary PCR ด้วยไพรเมอร์ชุด ST2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วมีดีเอ็นเอผลผลิตขนาดประมาณ 600 bp ในไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* โดยพบดีเอ็นเอผลผลิตทั้งจากปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1:100 และ 1:500 แต่ดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1:100 มีความชัดเจนกว่า จึงเลือกผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยานี้เพื่อทำ gel extraction ต่อไป(ภาพที่ 4.12)

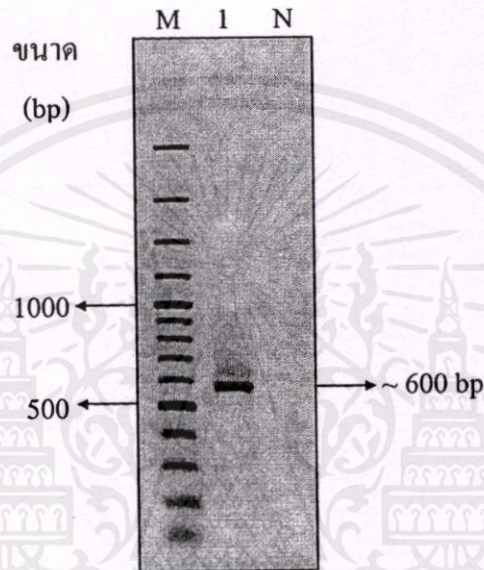


ภาพที่ 4.12 ผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา secondary PCR โดยใช้ผลผลิตจาก primary PCR เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบด้วย 1% เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

- |        |     |   |
|--------|-----|---|
| Lane M | คือ | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder 100 ng   |
| Lane N | คือ | negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ)                        |
| Lane 1 | คือ | ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย <i>EcoRV</i> ที่ความเข้มข้น 1:100 |
| Lane 2 | คือ | ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย <i>PvuII</i> ที่ความเข้มข้น 1:100 |
| Lane 3 | คือ | ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย <i>EcoRV</i> ที่ความเข้มข้น 1:500 |
| Lane 4 | คือ | ผลผลิตพีซีอาร์จากไลบรารีจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วย <i>PvuII</i> ที่ความเข้มข้น 1:500 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่วนกำหนดการวิจัยดำเนินการจัดทำขึ้นเพื่อการดำเนินงานโครงการวิจัย  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี gel extraction (ภาพที่ 4.13) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T ด้วยอัตราส่วนความเข้มข้นเป็น 1:3 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วสุ่มเก็บโคโลนีจากการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white screening เป็น master plate จากนั้นสุ่มสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI เพื่อนำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 4.13 ผลการทำ gel extraction ของผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรส อิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

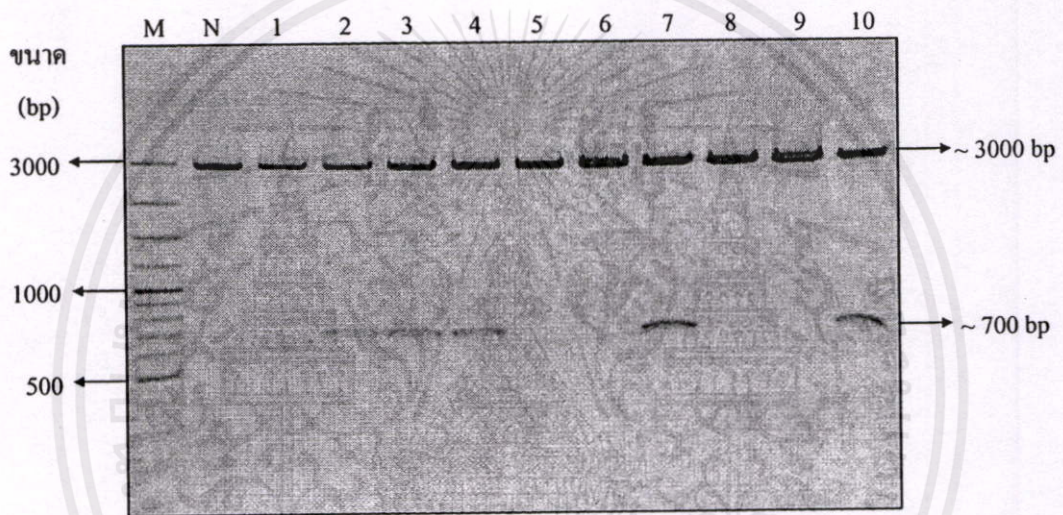
- Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder 100 ng  
 Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำ gel extraction  
 Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

เนื่องจากการทำ genome walking ทั้งสองวิธีนั้น อาศัยการสุ่มจับของ semi-random primer และการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่กระจายตัดบนสายของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าบริเวณจับของไพรเมอร์ และบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะอยู่ใกล้กับยีน *Cel5\_A4* จนสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถคาดเดาได้ว่า วิธีใดจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาหา flanking region ของยีนแต่ละชนิด นอกจากการทดลองทำ ดังเช่นในการทดลองนี้ซึ่งต้องอาศัยการทำทดลองทั้งสองเทคนิค จึงจะได้ยีน *Cel5\_A4* ที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในวงจำกัดเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.3 ผลการคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำมาโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T ด้วยอัตราส่วนความเข้มข้นเป็น 1:3 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค blue/white screening เก็บเป็น master plate จากนั้นสุ่มสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI และวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 4.14) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และขนาดประมาณ 600 - 700 bp ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต จึงคัดเลือกโคลน pTZ57R/A4\_Up 2, 3 และ 4 เพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.14 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I กับ *Bam*HI ของพลาสมิดลูกผสม pTZ57R/A4\_Up ตรวจสอบบน 0.8% เจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด ~3 kb ซึ่งเป็นขนาดของ pTZ57R/T และแถบดีเอ็นเอขนาด ~700 bp ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย

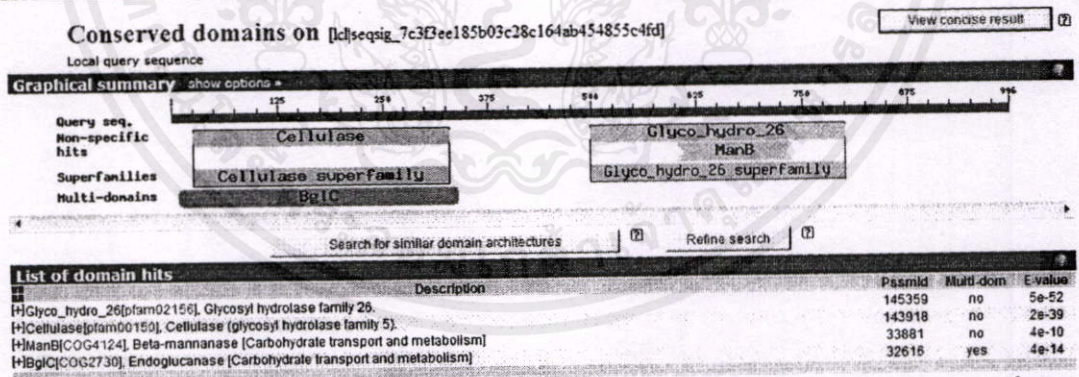
Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder 100 ng

Lane N คือ pTZ57R/T

Lane 1-10 คือ pTZ57R/A4\_Up โคลนที่ 1 - 10 ตามลำดับ

#### 4.5.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดกลูคาเนส

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน A4\_Up มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 โคลน และสามารถเชื่อมต่อกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน Cel5\_A4 ด้วยโปรแกรม ContigExpress ได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทางด้านปลาย 3' (downstream) ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน A4\_Dw(d1) ทั้ง 3 โคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน และสามารถเชื่อมต่อกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน Cel5\_A4 ได้ ส่วนโคลน A4\_Dw(b) และ A4\_Dw(D2) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความแตกต่างกัน จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน A4\_Up1 และ A4\_Dw(d1) มาเชื่อมต่อกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน Cel5\_A4 ผลปรากฏว่าสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของยีน Cel5\_A4 ได้ และพบส่วนของ start codon และ stop codon ของยีน โดยมีขนาดของยีนเท่ากับ 1,590 bp (ภาพผนวก ค8) ซึ่งจากผลการนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปจัดกลุ่มในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม protein BLAST พบว่าส่วนแรกของลำดับกรดอะมิโน หรือส่วนของยีน Cel5\_A4 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolase family 5 และมี multi domain ลักษณะเดียวกับ BglC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยยับสเตรทแบบ endoglucanase (ภาพที่ 4.15) แต่ไม่พบบริเวณ catalytic binding domain นอกจากนี้ส่วนปลาย 3' ที่ต่ออยู่กับยีนเอนโดกลูคาเนสยังพบส่วนของยีนที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 26 หรือยีนแมนนาเนสอีกด้วย



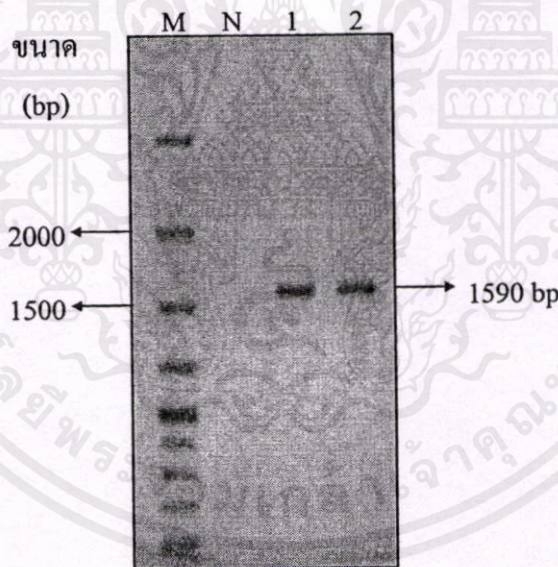
ภาพที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน กับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการทำ genome walking ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 และ glycoside hydrolase family 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลของยีน Cel5\_A4

### 4.6.1 ผลการคัดเลือกและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดกลูคาเนส

จากการทำ genome walking หลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบแล้วว่าได้ข้อมูลของยีนที่สมบูรณ์ จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อดึงยีน Cel5\_A4 ที่สมบูรณ์ออกจากจีโนมิกดีเอ็นเอจากกระเพาะวัว โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน Cel5\_A4 นี้ (ภาคผนวก ค) และทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติ proof reading เพื่อตรวจสอบให้การสร้างสายนิวคลีโอไทด์ของยีนมีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจากผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาด 1,590 bp (ภาพที่ 4.16) ซึ่งเมื่อทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T และเลือกสุ่มตัวอย่างโคลนมาทำการเพื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI* แล้ว โดยพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.6 kb ซึ่งมีขนาดเดียวกันกับชิ้น DNA ของยีนเอนโดกลูคาเนส จึงส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ genome walking ต่อไป



ภาพที่ 4.16 ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีน Cel5\_A4 ตรวจสอบด้วย 1 % เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 ng

Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ระดับความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอเท่ากับ 1:100

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ และ 1:500 ตามลำดับ

ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cel5\_A4 ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเทคนิค genome walking พบว่า ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงสามารถยืนยันได้ว่า เทคนิค genome walking นี้ สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนนั้นๆ ได้ และเมื่อนำยีน Cel5\_A4 มาทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรมแปลรหัสจากเว็บไซต์ ExpASY ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 530 กรดอะมิโน (ภาคผนวก ก8) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลอีกครั้ง พบว่ายีน Cel5\_A4 มีความเหมือนกับเอนไซม์ endoglucanase A จากเชื้อ *Prevotella copri* 46% (ตารางที่ 4.2) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในระบบสิ่งมีชีวิตของมนุษย์

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล

Gene	Accession	Description	Identities
	ZP_06250788.1	endoglucanase A [ <i>Prevotella copri</i> ]	166/356 (46%)
	YP_001193127.1	Glycoside hydrolase family 5 [ <i>Flavobacterium johnsoniae</i> ]	148/308 (48%)
Cel5_A4	ADB44000.1	exo-xyloglucanase [uncultured bacterium]	156/330 (47%)
	ZP_03009677.1	hypothetical protein BACCOP_01539 [ <i>Bacteroides coprocola</i> ]	148/344 (43%)
	ZP_06255045.1	endoglucanase A [ <i>Prevotella oris</i> ]	153/395 (38%)

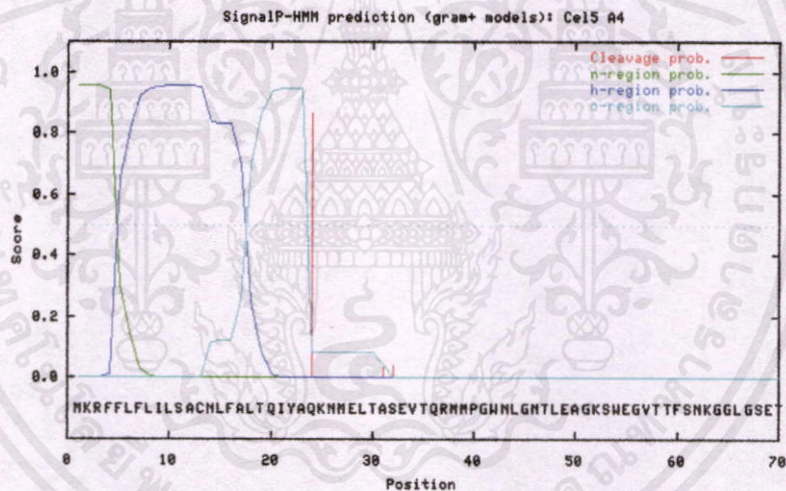
เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนเอนโดกลูคาเนสที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด (ZP\_06250788.1, YP\_001193127.1 และ ZP\_06255045.1) มาทำการเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนเอนโดกลูคาเนสอยู่ด้วย (ภาพที่ 4.17) โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีลักษณะโครงสร้าง 3 มิติ เป็นแบบ ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> และทำงานแบบ retention of configuration (จับสเตรคและผลผลิตมีโครงสร้างคล้ายกัน) โดยมีกรดอะมิโนกลูตามิก (Glu) เป็น catalytic domain และ protein donor ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 พบ Glu ในตำแหน่ง 157 ซึ่งน่าจะเป็นตำแหน่งของ protein donor และตำแหน่งที่ 253 ซึ่งน่าจะเป็นตำแหน่งของ catalytic domain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



#### 4.6.2 ผลการวิเคราะห์หาบริเวณ cleavage site, restriction site และ rare codon

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 มาวิเคราะห์หาบริเวณ cleavage site ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 มีบริเวณที่คาดว่าจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ protease (signal sequence) เพื่อให้ได้เป็น mature protein โดยพบอยู่ในช่วงระหว่างกรดอะมิโนลำดับที่ 23 – 24 (ภาพที่ 4.18) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ ทำให้สามารถจึงทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนได้เป็น 2 ชุด คือ ไพรเมอร์สำหรับ full-length gene และ ไพรเมอร์สำหรับ mature gene ซึ่งหมายถึงไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตัดส่วนของ signal sequence ออก ส่วนผลการวิเคราะห์ restriction enzyme site โปรแกรม restrictionMapper version 3 (<http://www.restrictionmapper.org>; ภาพผนวก ก9) และ rare codon โปรแกรม rare codon calculator (RaCC) (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>; ภาพผนวก ค10) ซึ่งจะถูกนำมาใช้ประกอบในการออกแบบไพรเมอร์และการคัดเลือกแบคทีเรียเจ้าบ้านที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนต่อไป



```
>Cel5_A4
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.955
Max cleavage site probability: 0.866 between pos. 23 and 24
```

ภาพที่ 4.18 ผลการหา signal sequence ของยีน Cel5\_A4 ด้วยโปรแกรม signalP 3.0 โดยเอนไซม์ protease มีบริเวณตัดในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 23-24

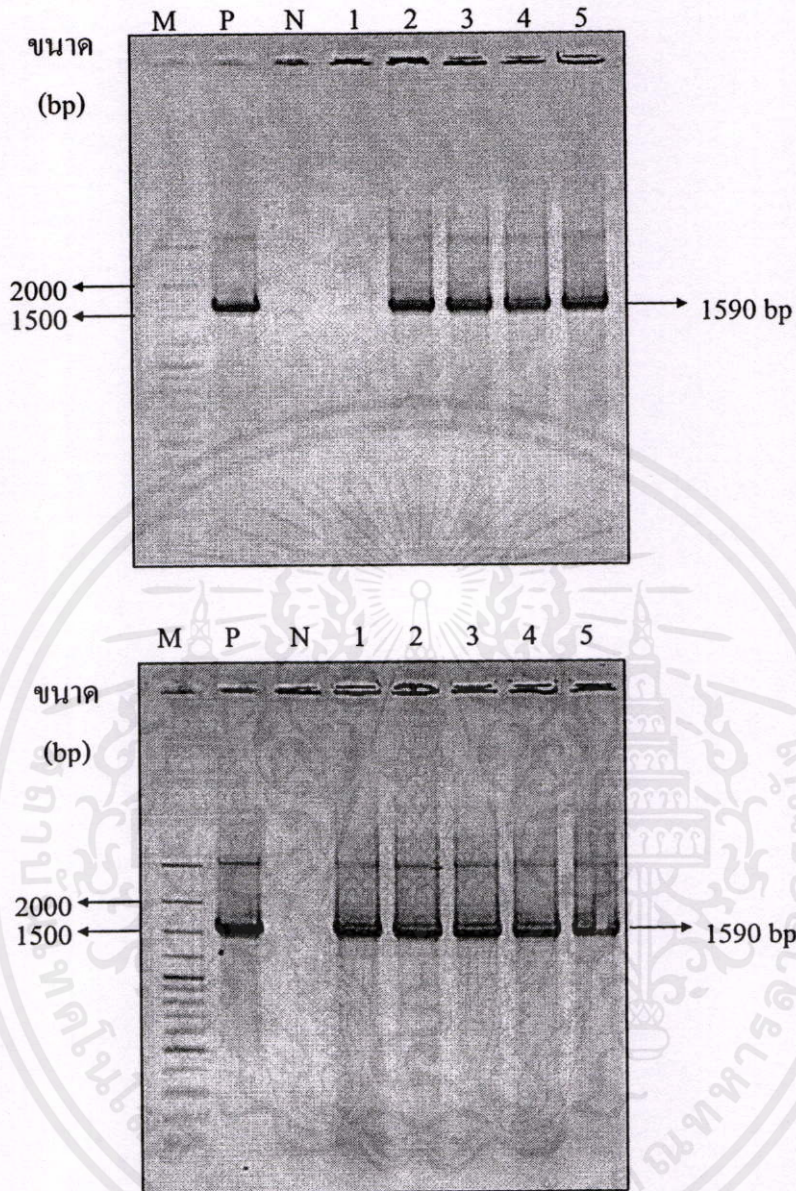
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.7 ผลการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

### 4.7.1 ผลการเตรียมยีนและการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม signalP 3.0 ของยีน Cel5\_A4 พบว่ามีบริเวณ signal sequence อยู่ ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนจึงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนของ full-length gene (F) และ mature gene (M) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้มีการใช้เวกเตอร์ในการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* 3 ชนิด คือ pET28a, pET32a และ pET43.1a โดยไพรเมอร์ pET\_Cel5\_F ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์ pET28a และ pET32a มีบริเวณที่เชื่อมต่อกับตำแหน่งของ restriction site ของเอนไซม์ *NcoI* ส่วนไพรเมอร์ pET\_Cel5\_R มีจุดตัดตำแหน่งของเอนไซม์ *HindIII* เพื่อใช้ในการโคลน นอกจากนี้การออกแบบยังตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น stop codon ออกไป เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตได้มีโปรตีน His\*Tag ของเวกเตอร์ต่อท้าย เพื่อสะดวกในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (ตารางผนวกที่ ค1) ส่วนการโคลนยีนเข้าในเวกเตอร์ pET43.1a นั้นมีความแตกต่างของจุดตัดของเอนไซม์ในเวกเตอร์ ซึ่งต้องจะใช้ตำแหน่ง restriction enzyme ใช้จุดตัดของเอนไซม์ *BamHI* ในการออกแบบไพรเมอร์ 43.1\_Cel5\_F เพิ่มขึ้นมา (ตารางผนวกที่ ค1) โดยยังสามารถใช้ไพรเมอร์ pET\_Cel5\_R ร่วมกับเวกเตอร์ pET28a และ pET32a ได้

หลังจากทำการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* กับ *HindIII* สำหรับการโคลนเข้าเวกเตอร์ pET28a กับ pET32a และเอนไซม์ *BamHI* กับ *HindIII* สำหรับการโคลนเข้าเวกเตอร์ pET43.1a แล้วถ่ายโอนดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นทำการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วยเทคนิค colony PCR (ภาพที่ 4.19) และจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนเป้าหมายเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบว่ายีนมีการเชื่อมต่อกับ His\*Tag ของเวกเตอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง



**ภาพที่ 4.19** ตัวอย่างขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยา colony PCR ของโคลน pET43.1/Cel5\_F (ก) และ pET43.1/Cel5\_M (ข) ตรวจสอบด้วย 0.8 % เจลอะกาโรส อิเล็กโทรโฟรีซิส โดย

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder 100 นาโนกรัม

Lane P คือ positive control (ปฏิกิริยาที่ใช้พลาสมิด pTZ57R/cel5\_A4

เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ) เท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีก Lane N คือ negative control (ปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) ไปใช้

Lane 1-5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของโคลนที่ 1 – 5 ตามลำดับ

#### 4.7.2 ผลการแสดงผลของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

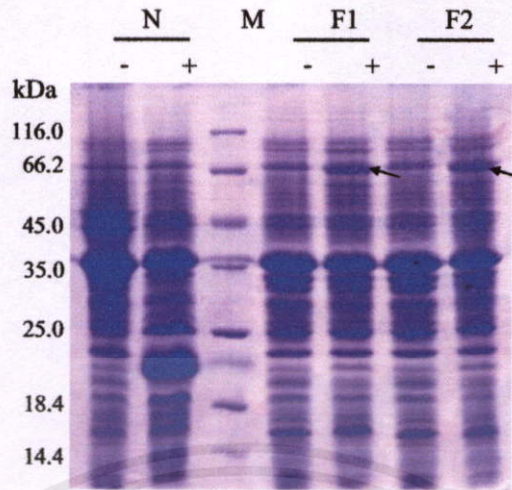
พลาสมิดลูกผสมที่ได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของยีน Cel5\_A4 ไม่พบความแตกต่าง จึงสุ่มเลือกพลาสมิดลูกผสม จากแต่ละเวกเตอร์ โดยขนาดของโปรตีนของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากพลาสมิดลูกผสม pET28a/Cel5\_F, pET32/Cel5\_F, pET28a/Cel5\_M และ pET32/Cel5\_M จะมีขนาดมีน้ำหนักประมาณ 60 kDa ส่วนขนาดของโปรตีนของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก pET43.1/Cel5\_F และ pET43.1/Cel5\_M จะมีน้ำหนักประมาณ 110 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักโปรตีนที่รวมส่วนของ His\*Tag แล้ว เพื่อทำการโคลนเข้าสู่แบคทีเรียพาหะโดยพลาสมิดลูกผสมจากเวกเตอร์ pET28a, pET32a และ pET43.1a จะโคลนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* Rosetta(DE3) และสำหรับพลาสมิดลูกผสมจากเวกเตอร์ pET32a จะโคลนเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-gami(DE3) ด้วย (ตารางที่ 4.3) จากนั้นสุ่มเลือกโคลนตัวอย่างละ 5 โคลนไปทดสอบการแสดงผลของโปรตีนโดยปรับสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ (18, 25, 30 และ 37°C), ความเข้มข้นของ IPTG (0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mM) และเวลาในการแสดงผลของโปรตีน (3, 5 และ 16 ชั่วโมง) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงผลของโปรตีน

ตารางที่ 4.3 การเลือกใช้แบคทีเรียพาหะกับพลาสมิดลูกผสมในการทดลอง

พลาสมิดลูกผสม	แบคทีเรียพาหะ		
	BL21 (DE3)	Rosetta (DE3)	Rosetta-gami (DE3)
pET28a/Cel5_F	/	/	-
pET28a/Cel5_M	/	/	-
pET32a/Cel5_F	/	/	/
pET32a/Cel5_M	/	/	/
pET43.1a/Cel5_F	/	/	-
pET43.1a/Cel5_M	/	/	-

จากนั้นนำโคลนที่มีการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนในสภาวะต่างๆ มาตรวจสอบการแสดงผลของโปรตีนด้วยเจล SDS-PAGE ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีน พบว่า มีการแสดงผลของโปรตีนจากของโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pET32a/Cel5\_F, pET43.1a/Cel5\_F และ pET43.1a/Cel5\_M เท่านั้น โดยโปรตีนจากโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pET32a/Cel5\_F มีขนาดประมาณ 60 kDa และมีการแสดงผลของโปรตีน เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 0.5 - 1 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีการแสดงผลของโปรตีนในระยะเวลา 3 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ (ภาพที่ 4.20) ด้านการค้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้



**ภาพที่ 4.20** แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากโคลน pET32a/Cel5\_F ด้วย 10% SDS-PAGE ซึ่งแถบโปรตีนที่มีลูกศรชี้คือตำแหน่งของขนาดโปรตีนที่เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG; เครื่องหมาย (-) หมายถึงโปรตีนที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำ, เครื่องหมาย (+) หมายถึงโปรตีนที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG โดย

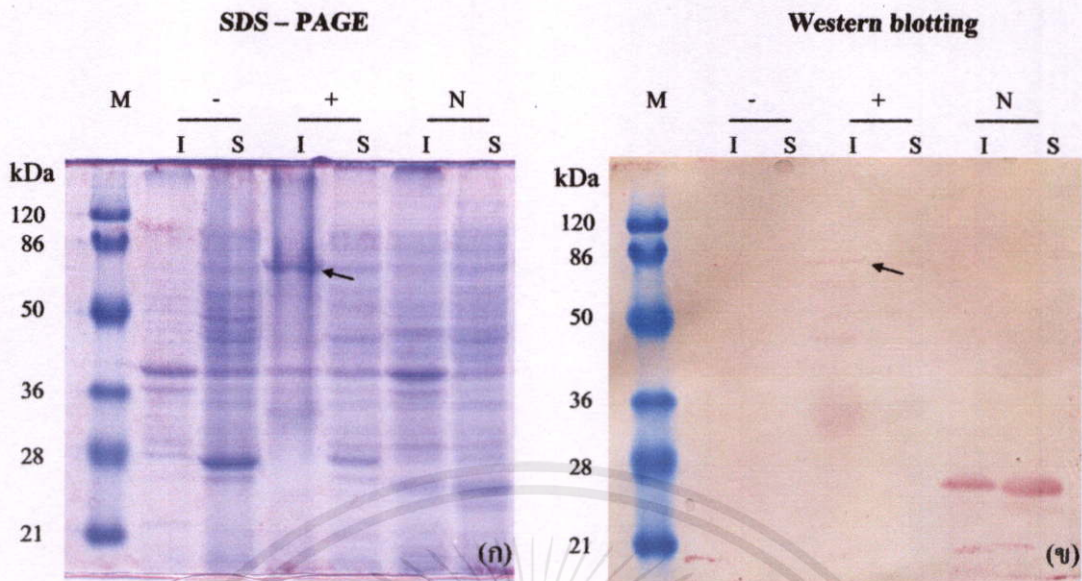
M คือ โปรตีนมาตรฐาน unstain protein marker

N คือ โปรตีนจากโคลนของ เวกเตอร์ pET32a

F1 - F2 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a/Cel5\_F1 และ pET32a/Cel5\_F2 ตามลำดับ

เมื่อนำเซลล์ไปทำให้แตกด้วยเครื่อง sonicator และปั่นแยกส่วนของ inclusion และ soluble protein แล้ว พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในส่วนของ inclusion protein (ภาพที่ 4.21ก) ซึ่งสามารถขึ้นชั้นโปรตีนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้ histidine antibody เป็นตัวตรวจจับ พบแถบสีน้ำเงินขนาดประมาณ 60 kDa ซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.21ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



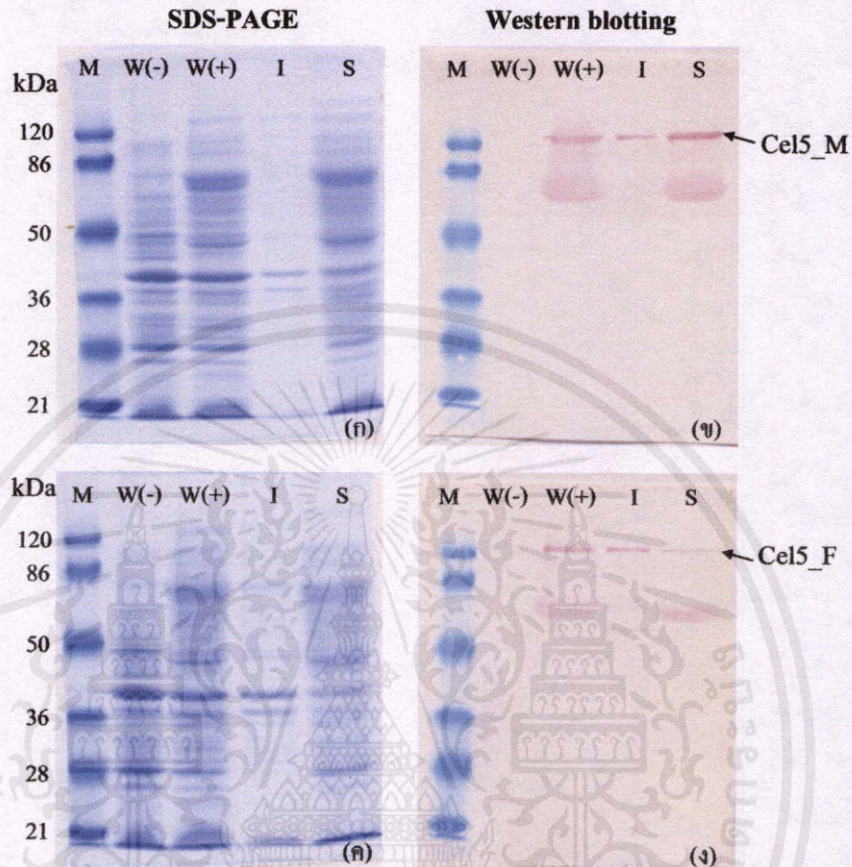
ภาพที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการปั่นแยกจากโคลน pET32a/Cel5\_F ด้วย 10% SDS-PAGE (ก) และการทำ Western blotting (ข) ซึ่งแถบโปรตีนที่มีลูกศรชี้คือตำแหน่งของโปรตีน Cel5\_A4 (F) เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG; เครื่องหมาย (-) หมายถึงโปรตีนที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำ, เครื่องหมาย (+) หมายถึงโปรตีนที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG โดย

- M คือ โปรตีนมาตรฐาน pre-stain protein marker
- N คือ โปรตีนจากโคลนของ เวกเตอร์ pET32a
- I คือ inclusion protein
- S คือ soluble protein

ส่วนโปรตีนจากโคลน pET43.1/Cel5\_F และ pET43.1/Cel5\_M เมื่อวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนซึ่งจะมีขนาดมีน้ำหนักประมาณ 110 kDa และมีการแสดงออกของโปรตีน เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 1 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีการแสดงออกของโปรตีนในระยะเวลา 3 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ เมื่อนำเซลล์ไปทำให้แตกด้วยเครื่อง sonicator และปั่นแยกส่วนของ inclusion และ soluble protein และตรวจสอบด้วยการทำ western blotting แล้ว พบว่า โคลน pET43.1a/Cel5\_M และ pET43.1a/Cel5\_F มีโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในส่วนของ soluble protein (ภาพที่ 4.22) ซึ่งอาจเป็นผลจาก Nus\*Tag ในเวกเตอร์ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยในการทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่เสถียร และสามารถละลายอยู่ในบริเวณ cytoplasmic ดังนั้นจึงได้เลือกโปรตีนจากโคลน pET43.1a/Cel5\_M ซึ่งผลจากการทำ western blotting แสดงให้เห็นว่า มีโปรตีนละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในรูปของ soluble protein มากกว่าเล็กน้อยมาทำการทดลองต่อ เนื่องจากง่ายต่อการทำโปรตีน ให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ purify column



ภาพที่ 4.22 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการปั่นแยกจากโคลน pET43.1a/Cel5\_M และ pET43.1a/Cel5\_F ด้วย 10% SDS-PAGE ;(ก) ผลการแสดงผลของโปรตีนจากโคลน pET43.1a/Cel5\_M, (ข) ผลการทำ western blot ของโคลน pET43.1a/Cel5\_M, (ค) ผลการแสดงผลของโปรตีนจากโคลน pET43.1a/Cel5\_F และ (ง) ผลการทำ western blot ของโคลน pET43.1a/Cel5\_F โดยตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ คือ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากโคลน Cel5\_F และ Cel5\_M ที่อยู่ในรูป soluble protein

- M คือ โปรตีนมาตรฐาน pre-stain protein marker  
W(-) คือ โปรตีนของโคลนที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำ (whole cell)  
W(+)  
คือ โปรตีนของโคลนที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย 1.0 mM IPTG (whole cell)  
I คือ inclusion protein  
S คือ soluble protein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพียงการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อห และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.8 ผลการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ *Pichia pastoris*

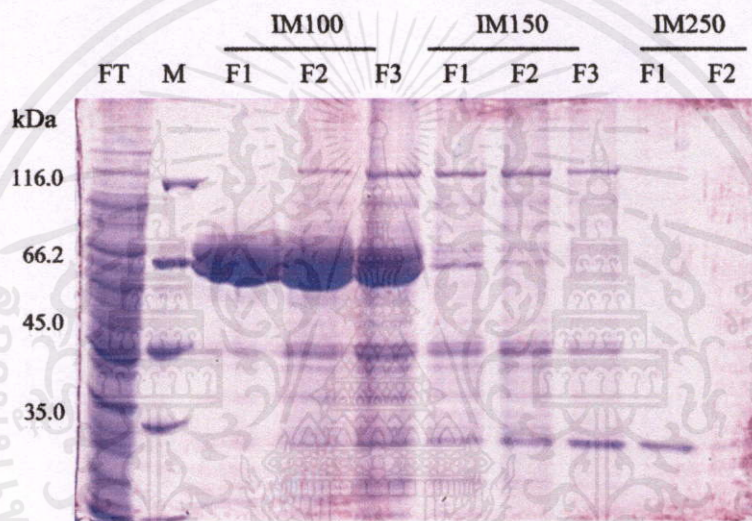
### 4.8.1 ผลการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนในยีสต์ *P. pastoris*

ในงานวิจัยนี้ ยังได้ทำการแสดงออกโปรตีนเป้าหมายในยีสต์เนื่องจากในระบบแสดงออกของโปรตีนในยีสต์ มีกลไกในการนำโปรตีนที่ผลิตได้ออกจากเซลล์ ที่เรียกว่า Kex2 cleavage site ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ออกมาในรูปของ soluble protein ที่ง่ายต่อขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแสดงออกของโปรตีน จึงออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัด signal sequence ของยีนออก และเพิ่มบริเวณตัดของเอนไซม์ *SaII* โดยในไพรเมอร์ pPIC\_Cel5\_F จะมีตำแหน่งของ restriction enzyme *SaII* และจุดตัดของเอนไซม์ *XbaI* ในไพรเมอร์ pPIC\_Cel5\_R จะมีตำแหน่งของ restriction enzyme *XbaI* (ตารางผนวกที่ ค1) โดยผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะถูกโคลนเข้า เวกเตอร์ pPICZαA จากนั้นทำการ transform พลาสมิดลูกผสมเข้าไปในยีสต์ *P. pastoris* โดยชิ้นส่วนยีนจะสอดแทรกเข้าไปในสายดีเอ็นเอของ *P. pastoris* จากนั้นคัดเลือกโคลนด้วยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์คู่เดิม จากนั้นจึงส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อเลือกโคลนที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วมาทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน โดยการเหนี่ยวนำด้วย 3% เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละวัน เพื่อตรวจสอบหาขนาดของโปรตีนเอนโดกลูคาเนสที่มีการแสดงออกทุกวัน แต่จากการทดลองเมื่อทำการเก็บตัวอย่างจนครบ 7 วันไม่พบการแสดงออกของโปรตีนในยีสต์ ซึ่งอาจเกิดจากกลไกในการแสดงออกของยีนนี้ในเชื้อแบคทีเรียและในยีสต์มีบางอย่างที่แตกต่างกัน หรือมีข้อจำกัดบางอย่างในการแปลรหัสแสดงออกของโปรตีน ดังนั้น จากผลการทดลองที่สามารถทำการแสดงออกของโปรตีนเอนโดกลูคาเนสในรูปของ soluble protein ใน *E. coli* ได้สำเร็จ จึงทำการศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จาก *E. coli* ต่อไป

#### 4.9 ผลการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย HisTrap™ HP Column

จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET43.1/Cel5\_M เพื่อเพิ่มจำนวนโปรตีนให้มีปริมาณมากพอแล้ว จึงนำโปรตีนจากเซลล์มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากโปรตีนนี้เชื่อมต่อกับโปรตีน His\*Tag จึงสามารถโดยใช้ HisTrap™ affinity column เพื่อดึงโปรตีน Cel5 ออกจากโปรตีนอื่นๆ ได้ โดยใช้ระดับความเข้มข้นของ imidazole ในระดับต่างๆ ซึ่งจากภาพที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่า โปรตีน Cel5\_M จะหลุดออกจากคอลัมน์ ใน elution buffer ที่ระดับความเข้มข้นของ imidazole 100 mM ตั้งแต่ fraction ที่ 2 เป็นต้นไป แต่โปรตีนที่ได้มายังไม่มีความบริสุทธิ์มากพอ เนื่องจากจะเห็นโปรตีนขนาดประมาณ 60 kDa ซึ่งเป็นโปรตีน His\*Tag ของพลาสมิดเวกเตอร์ปะปนอยู่มาก



ภาพที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์โปรตีนผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ HP column ที่ความเข้มข้นของ imidazole ต่างกัน โดย

- FT คือ flow through
- M คือ โปรตีนมาตรฐาน unstain protein marker
- IM 100 คือ โปรตีนในสารละลายฟอสเฟตที่มี imidazole 100 mM
- IM 150 คือ โปรตีนในสารละลายฟอสเฟตที่มี imidazole 150 mM
- IM 250 คือ โปรตีนในสารละลายฟอสเฟตที่มี imidazole 250 mM
- F1 – F3 คือ fraction ที่ 1 – 3 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คังนั้จึงเลือกใ้โปรตีน Cel5\_M ที่หลุดออกที่ระดับ elution buffer ที่ 150 mM imimidazole ใน fraction ที่ 2-3 มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยใช้ Amicon Ultrafiltration Unit ซึ่งจากการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าโปรตีนมีความเข้มข้นขึ้น (ภาพที่ 4.24) จะสังเกตเห็นได้ว่า โปรตีนมีความเข้มข้นขึ้นกว่าโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว เมื่อโหลดโปรตีนที่ปริมาณต่างกันเป็น 1: 5 เท่า และเมื่อนำมาวัดความเข้มข้น โปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ 0.19 mg/ml จึงนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 4.24 ผลการทำโปรตีนให้เข้มข้นด้วย affinity column โดย

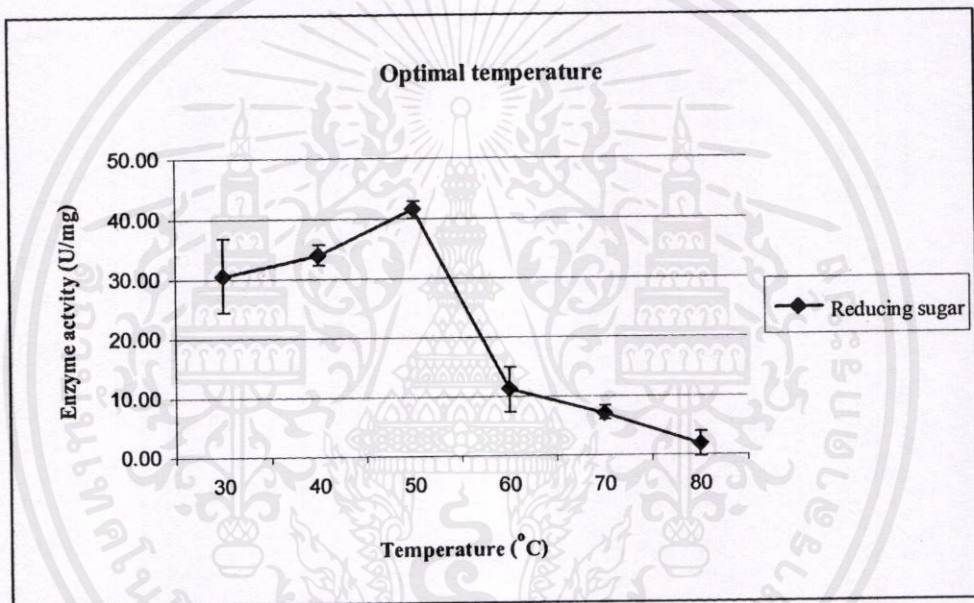
- M คือ โปรตีนมาตรฐาน unstain protein marker
- P คือ โปรตีน Cel5\_M หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ 50  $\mu$ l
- C คือ โปรตีน Cel5\_M หลังจากการทำให้เข้มข้น 10  $\mu$ l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.10 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

### 4.10.1 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำโปรตีน Cel5\_M มาทดสอบการทำงานโดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลาย 0.1M NaOAc pH 5.5 โดยใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยา 15 นาที โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 °C พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 50 °C (ภาพที่ 2.25) โดยเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อเทียบเป็นปริมาณมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์ เท่ากับ  $41.50 \pm 1.52$  Unit/mg เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงมากกว่า 60°C พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลง

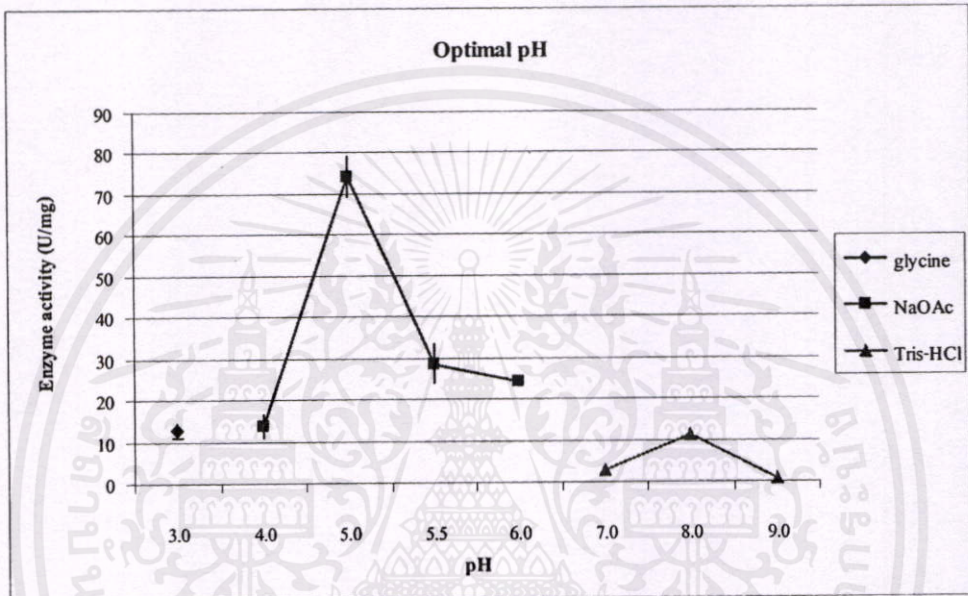


ภาพที่ 4.25 ผลการทำงานของเอนไซม์ Cel5\_M ที่อุณหภูมิ 30 – 80°C โดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลาย 0.1M NaOAc pH 5.5 ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 50°C โดยทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50°C และเริ่มทำงานลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.10.2 ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำโปรตีน Cel5\_M มาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วยซับสเตรต 1% CMC ในสารละลายที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3.0 – 9.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด จากผลการทดลองที่ 4.10.1 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อเทียบเป็นปริมาณมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์ เท่ากับ  $73.12 \pm 2.73$  Unit/mg



ภาพที่ 4.25 ผลการทำงานของเอนไซม์ Cel5\_M ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ pH 3.0 – 9.0 โดยใช้ซับสเตรต 1% CMC ในสารละลายชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ pH 5.0

ซึ่งจากผลการทดลองจะสรุปได้ว่า เอนไซม์ Cel5\_M สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0, 50°C ซึ่งอุณหภูมิและ pH ดังกล่าว มีความสอดคล้องกับค่าอุณหภูมิและ pH ภายในกระเพาะรูเมนของโค ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 39 – 50 °C และที่ค่าความเป็นกรด – ด่างที่ 5.6 – 6.7 (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 คุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

Organism	Activity optimum		Reference
	pH	Temp (°C)	
<i>F. succinogens</i>	5.6 – 6.6	50	Grolean and Forsberg (1981)
<i>F. succinogens</i>	6.4	39	McGavin and Forsbergs (1988)
<i>R. albus</i> F-40	6.7	44	Ohmiya <i>et. al.</i> (1987)
<i>R. albus</i> sy-3	6.4	45	Wood <i>et. al.</i> (1982)
<i>R. flavefaciens</i> 67	6.4	45	Pettpher and Latham (1979)

ที่มา: คัดแปลงจาก พรพนทิพา ธงทอง. (2547)

ซึ่งเอนไซม์ Cel5\_M ที่ได้จากการทดลองนี้อาจมีค่าความสามารถในการย่อยยับสเตรดไม่สูงมาก อาจเนื่องจากในยีนไม่มีบริเวณของ carbohydrate binding domain เมื่อเทียบกับการทดลองของ Ohara. (2000) ซึ่งโคลนยีนเซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรีย *R. albus* ด้วยวิธี function driven analysis ได้ยีนที่อยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 และพบว่าในยีนมีบริเวณของ dockerin domain และส่วนที่เป็น unknown function โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40°C และค่าความเป็นกรด – ด่าง ที่ 7.0 โดยมีค่า specific activity 197 Unit/mg

ซึ่งจากผลการทดลองทำให้สามารถสรุปได้ว่า เทคนิคการหาเอ็นโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยตรงจากเทคนิคเมทาจีโนมิก สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ และการค้นหาเอ็นใหม่ที่น่าสนใจได้ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น การศึกษาเอ็นเซลลูเลสจากแบคทีเรียจากดินด้วยเทคนิค function driven analysis (Voget *et. al.* 2006) ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่า specific activity ต่อ CMC 68 Unit/mg, ต่อ lichenan 401 Unit/mg และต่อ  $\beta$ -glucan 710 Unit/mg โดยทำงานได้ดีที่ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 45°C หรือการศึกษาเอ็นเซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ด้วยเทคนิค sequence driven analysis (Hong *et. al.* 2001) โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถย่อย CMC ได้ดีที่อุณหภูมิ 70°C และ pH 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากผลการคั่งชิ้นส่วนยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 พบว่ามีผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ขนาดประมาณ 850 bp เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วส่งตัวอย่างที่สุ่มเลือกจำนวน 8 โคลนเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLASTX แล้วจึงเลือกโคลนที่ A4 ซึ่งมีความเหมือนกับยีน endoglucanase A ของ *Prevotella copri* อยู่ 46% (ZP\_06250788) เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

สำหรับการแยกยีน Cel5\_A4 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ ด้วยวิธี genome walking ใช้วิธีทำปฏิกิริยาด้วย semi-random primer เพื่อหาส่วนต่อของยีนทางด้านปลาย 3' และการใช้ adapter เพื่อหาส่วนต่อของยีนส่วนทางด้านปลาย 5' จึงสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cel5\_A4 ที่สมบูรณ์ได้ โดยยีนที่ได้มีขนาด 1,590 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Cel5\_A4 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอีกครั้ง พบว่า มีความเหมือนกับยีน endoglucanase ของ *Prevotella copri*, glycoside hydrolase family 5 ของ *Flavobacterium johnsoniae* และ exo-xyloglucanase ของ uncultured bacterium 46%, 48% และ 47% ตามลำดับ

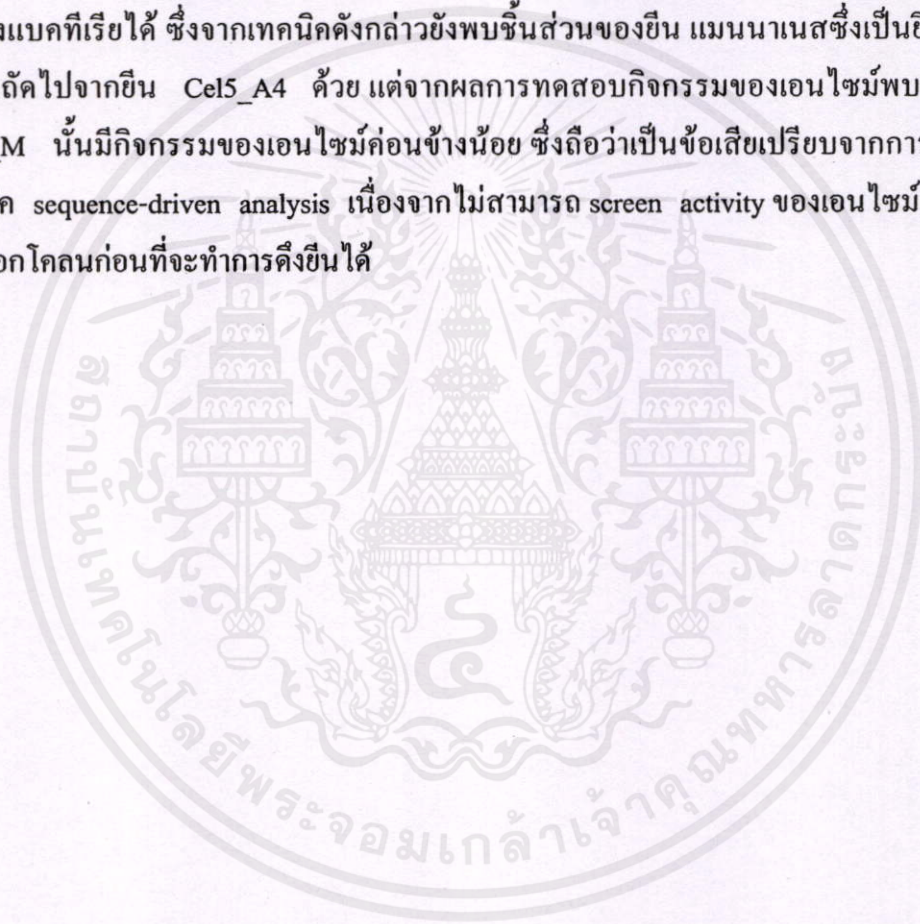
จากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน Cel5\_A4 ซึ่งมีขนาด 530 กรดอะมิโนพบว่ามี signal peptide ที่ตำแหน่งด้าน N-terminal ของยีน ดังนั้นในการทดลองการแสดงออกของยีนจึงได้ทำการศึกษาทั้งแบบ full-length gene (Cel5\_F) และ mature gene (Cel5\_M) เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาจัดกลุ่มในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม protein BLAST พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 และมี mutidomain ลักษณะเดียวกับ BglC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยยับสเตรคแบบ endoglucanase

เมื่อนำโคลนของยีนทั้งแบบ Cel5\_F และ Cel5\_M มาแสดงออกโดยใช้เวกเตอร์ pET28a, pET32a, pET43.1a และ pPICZαa พบว่า มีการแสดงออกของเอนไซม์ในเวกเตอร์ pET32a และ pET43.1a เท่านั้น แต่การแสดงออกของโปรตีนในเวกเตอร์ pET32a อยู่ในส่วนของ inclusion body ซึ่งยากต่อการนำมาทำให้บริสุทธิ์และการนำมาใช้ จึงเลือกโปรตีนที่แสดงออกในเวกเตอร์ pET43.1a โดยเลือกโปรตีนแบบ Cel5\_M มาใช้ เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่าแบบ Cel5\_F โดยดูจากผลการทำ western blot จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column

เมื่อทำโปรตีน Cel5\_M ให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทำให้เข้มข้นอีกครั้ง จะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.19 mg/ml เมื่อนำเอนไซม์นี้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยยับสเตรค 1%

CMC พบว่า เอนไซม์ Cel5\_M นั้นสามารถย่อยยับสเตรคไดคัสที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 50°C โดยสามารถย่อยยับสเตรคแล้วให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ  $73.12 \pm 2.73$  Unit/mg

จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้สรุปได้ว่าการดิ่งยพันเบต้าเอนโดกลูคาเนสจากกระเพาะรูเมนของโคด้วยเทคนิค sequence-driven analysis สามารถดิ่งยพันส่วนยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอนุรักษ์จากเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 5 จากฐานข้อมูล ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีข้อมูลของยีนเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนอยู่มาก มาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการดิ่งยพันส่วนยีน จากนั้นจึงทำการหาจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ ซึ่งจากเทคนิคดังกล่าวยังพบชิ้นส่วนของยีนแมนนาเนสซึ่งเป็นยีนที่อยู่เป็นลำดับถัดไปจากยีน Cel5\_A4 ด้วย แต่จากผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ Cel5\_M นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย ซึ่งถือว่าเป็นข้อเสียเปรียบจากการดิ่งยพันด้วยเทคนิค sequence-driven analysis เนื่องจากไม่สามารถ screen activity ของเอนไซม์เพื่อทำการคัดเลือกโคลนก่อนที่จะทำการดิ่งยพันได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรณธิพา ธงทอง. 2547. "การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัชรา วีระกะลีส. 2544. พลังงานและเมแทบอลิซึม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิโรจน์ จันทร์รัตน์. 2540. กายวิภาคและสรีรวิทยาสัตว์เลี้ยง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศรีสกุล วรจันทรา และ รณชัย สิริกรพงษ์. 2539. โภชนศาสตร์สัตว์. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้งเฮาส์.

ศุจิตรา รตนะมโน. ม.ป.ป. คาร์โบไฮเดรต. [Online] Available:

<http://coursewares.mju.ac.th/section2/pt331/pdf/4.pdf>

Ahsan, M.M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K. and Ohmiya, K. 1996. "Cloning, DNA sequencing, and Expression of the Gene Encoding *Clostridium thermocellum* Cellulase CelJ, the Largest Catalytic Component of the Cellulosome." **The Journal of Bacteriology**. 178: 5732-5740.

Akin, D.E. 1989. "Histological and Physical Factors Affecting Digestibility of Forages." **Agronomy Journal**. 81:17.

Barros, M.E.C. and Thomsom, J.A. 1987. "Cloning and Expression in *Escherichia coli* of a Cellulase Gene from *Ruminococcus flavefaciens*." **Journal of Biotechnology**. 169: 1760-1762.

Bayer, E., Morag, E., Barak, Y., Haimovitz, R., Karpol, A., Caspi, J., Noach, I., Gilary, H., Ouanounou, S. and Yoav, S. 2006. **Designer cellulosomes for Future Production of Biofuel and Biomaterials**. [online]. Available :

[www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Bayer/\\*BayerHome.html](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/*BayerHome.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น หากท่านมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทร. 02-261-6000

- Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y. and Lamed, R. 2004. "The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides." **Annual Reviews of Microbiology**. 58: 521-554.
- Berserker Ben. 2008. "Type of Cellulase2." [Online] Available:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Types\\_of\\_Cellulase2.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png)
- Busscher, H.J. and Weerkamp, A.H. 1987. "Specific and Non-specific Interactions in Bacterial Adhesion to Solid Substrata." **FEMS Microbiology**. 46: 165-173.
- Cheng, K.J., Fay, J.P., Howarth, R.E. and Costerton, J.W. 1980. "Sequence of Events in the Digestion of Fresh Legume Leaves by Rumen Bacteria" **Applied Environment Microbiology**. 40: 613-625.
- Chiba L.I. 2007. "Section 3: Rumen Microbiology and Fermentation," **Animal Nutrition Handbook**. Np.
- Clontech Laboratories. 2007. "GenomeWalker™ Universal Kit User Manual" [Online] Available:  
<http://www.clontech.com>
- Collins, T., De Vos, D., Hoyoux, A., Savvides, S.N., Gerday, C., Van Beeumen, J. and Feller, G. 2005. "Study of the Active Site Residues of a Glycoside Hydrolase Family 8 Xylanase." **Journal of Molecular Biology**. 354: 425-435.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T. and Cheng, K.J. 1981. "The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease." **Annual Review of Microbiology**. 35: 399-424.
- Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R. and Wittwer, P. 2005. "Metagenomic Gene Discovery: Past, Present and Future." **TRENDS in Biotechnology**. 23: 231-239.
- Craig, B.W., Garthwaite, S.M. and Holloszy, J.O. 1987. "Adipocyte Insulin Resistance: Effects of Aging, Obesity, Exercise, and Food Restriction." **Journal of Applied Physiology**. 62: 95-100.
- Cunningham, C., McPherson, C.A., Martin, J., Harris, W.J. and Flint, H.J. 1991. "Sequence of a Cellulase Gene from the Rumen Anaerobe *Ruminococcus flavefaciens* 17." **Molecular Genomics and Genetics**. 228: 320-323.

เอกสารนี้ Davies, G. and Henrissat, B. 1995. "Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolase." **Structure**. 3: 853-859. ไม่ว่าการนี้ใดๆทั้งนี้ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- DeBoy, R.T., Mongodin, E.F., Fouts, D.E., Tailford, L.E., Khouri, K., Emerson, J.B., Mohamoud, Y., Watkins, B., Henrissat, B., Gilbert, H.J. and Nelson, K.E. 2008. "Insights into Plant Cell Wall Degradation from the Genome Sequence of the Soil Bacterium *Cellvibrio japonicus*." **The Journal of Bacteriology**. 190: 5455-5463.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. and Dveksler, G.S. 1993. "General Concepts for PCR Primer Design." **Genome Research**. 3: S30-S37.
- Doerner, K. and White, B. 1990. "Assessment of the Endo-1,4-beta-Glucanase Components of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1." **Applied and Environmental Microbiology**. 56: 1844-1850.
- Dror, T.W., Rolider, A., Bayer, E.A., Lamed, R. and Shoham, Y. 2005. "Regulation of Major Cellulosomal Endoglucanases of *Clostridium thermocellum* Differ from that of a Prominent Cellulosomal Xylanase." **The Journal of Bacteriology**. 187: 2261-2266.
- Eveleigh, D.E., Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 2009. "Measurement of Saccharifying Cellulase." **Biotechnology for Biofuels**. 2: 21-28.
- Fierobe, H.P., Mechaly, A., Tardif, C., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y., Belaich, J.P. and Bayer, E.A. 2001. "Design and Production of Active Cellulosome Chimeras." **The Journal of Biological Chemistry**. 276(24): 21257-21261.
- Forano, E., Broussolle, V. and Durand, R. 1996. "Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Rumen Bacteria and Fungi." **Animal Reserch**. 45: 291-295.
- Fosberg, C.W. and Lam, K. 1977. "Use of Adenosine 5'- Triphosphate as an Indicator of Microbiota Biomass in the Rumen" **Applied Environment Microbiology**. 33: 528-537.
- Gal, L., Pages, S., Gaudin, C., Belaich, A., Leroy, C.R., TarDif, C. and Balaich, J.P. 1997. "Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) Produced by *Clostridium cellulyticum*." **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 903-909.
- Garder, E.J., Snustad, D.P. and Simmons, M.J. 1995. "Chapter 24: Genetic Engineering and the Future." **Principle of Genetics**. California: John Wiley and Sons.
- Ghazanfar, S. and Azim, A. 2009. "Metagenomics and its Application in Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects." **Pakistan Journal of Nutrition**. 8(8): 1309-1315.
- Ghose, T.K. 1987. "Measurement of Cellulase Activities." **Pure and Applied Chemistry**. 59: 257-268.

เอกสารนี้ Ghose, T.K. 1987. "Measurement of Cellulase Activities." **Pure and Applied Chemistry**. 59: 257-268.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ข้าพเจ้ามิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Godana, B. "Production of Enzymes for Application on Animal Feeds." Master Degree of Technology (Biotechnology). Thesis of Durban University of Technology. 2007.
- Grolean, D. and C.W. Forsberg. 1981. "Cellulolytic Activity of the Rumen Bacterium *Bacteroides succinogens*." **Canadian Journal of Microbiology**. 29: 517-530.
- Guo, H. and Xiong, J. 2006. "A Specific and Versatile Genome Walking Technique." **Gene**. 381: 18-23.
- Hazlewood, G.P., Davidsom, K., Laurie, J.I., Huskisson, N.S. and Gilbert, H.J. 1993. "Gene Sequence and Properties of Cell, a Family E Endoglucanase from *Clostridium thermoticum*." **Journal of General Microbiology**. 139: 307-316.
- Heidome, F.O., Magalhaes, P.O., Ferraze, A.L. and Milagres, A.M.F. 2006. "Characterization of Hemicellulases Produced by *Cerporiopsis subvermispora* Grown on Wood Under Biopulping Conditions." **Enzyme and Microbial Technology**. 38: 436-442.
- Henrissat, B. 1991. "A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities." **Biochemical Journal**. 280: 309-316.
- Henrissat, B. and Davies, G. 1997. "Structural and Sequence-based Classification of Glycoside Hydrolases." **Current Opinion in Structural Biology**. 7: 637-644.
- Henrissat, B. and Rairoch, A. 1996. "Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases." **Biochemical Journal**. 316: 695-696.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Febrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P. and Davies, G. 1995. "Conserved Catalytic Machinery and the Prediction of a Common Fold for Several Families of Glycosyl Hydrolases." **Proceedings of the National Academy of Science**. 92: 7090-7094.
- Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K. and Kumagai, H. 2001. "Cloning of a Gene Encoding a Highly Stable Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase from *Aspergillus niger* and Its Expression in Yeast." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 92(5): 434-441.
- Hoskins, L. 1997. **Yeast Genomic DNA Prep**. [Online] Available: [http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/mol\\_bio\\_meth/yeast\\_genom\\_dna.html](http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/mol_bio_meth/yeast_genom_dna.html)
- Hou, Y., Wang, T., Long, H. and Zhu, H. 2007. "Cloning, Sequencing and Expression of the First Cellulase Gene Encoding Cellobiohydrolase 1 from a Cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010." **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 39(2): 101-107.

- Huang, C.M., Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Yu, P.L. 1989. "Molecular Cloning and Expression of Multiple Cellulase Gene of *Ruminococcus flavefaciens* Strain 186 in *Escherichia coli*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 31: 265-271.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. "High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." **Gene** 96: 23-28.
- Kamra, D.N. 2005. "Rumen Microbial Ecosystem." **Current Science**. 89:124-133.
- Kanokratana, P., Chantasingh, 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 and Expression Purification**. 58: 148-153.
- Kimura, N. 2006. "Metagenomics: Access to Uncultivable Microbes in the Environment." **Microbes and Environments**. 21(4): 201-215.
- Kobayashi, Y. 2006. "Inclusion of Novel Bacteria in Rumen Microbiology: Need for Basic and Applied Science." **Animal Science Journal**. 77: 375-385.
- Kopecny, J. and Wallace, R.J. 1982. "Cellular Location and Some Properties of Proteolytic Enzymes of Rumen Bacteria." **Applied and Environmental Microbiology**. 43: 1026-1033.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mankie, R.I., Morrison, M., Rea, A.L., Attwood, G.T. and McSweeney, C.S. 2003. "Opportunities to Improve Fiber Degradation in the Rumen: Microbiology, Ecology and Genomics." **FEMS Microbiology**. 27: 663-693.
- Lamed, R., Naimark, J., Morgenstern, E. and Bayer, E.A. 1987. "Specialized Surface Structure in Cellulolytic Bacteria." **The Journal of Bacteriology**. 169: 3792-3800.
- Lamed, R., Setter, E. and Bayer, E.A. 1983. "Characterization of a Cellulose Binding Cellulase Containing in *Clostridium thermocellum*." **The Journal of Bacteriology**. 156: 828-836.
- Lee, D.G., Jeon, J.H., Jang, M.K., Kim, N.Y., Lee, J.H., Kim, S.J., Kim, G.D. and Lee, S.H. 2007. "Screening and Characterization of a Novel Fibrinolytic Metalloprotease from a Metagenomic Library." **Biotechnology Letter**. 29: 465-472.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lejeune, A., Courtois, S. and Colson, C. 1988. "Characterization of an Endoglucanase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulosa* Produced in *Escherichia coli* and Regulation of the Expression of Its Cloned Gene." **Applied and Environmental Microbiology**. 54: 302-308.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J. van Zyl, W.H. and Pretorius, .S. 2002. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." **Microbiology and Molecular biology**. 66(3): 506-577.
- Maki, M., Leung, K.T. and Qin, W. 2009. "The Prospect of Cellulase-Producing Bacteria for the Bioconversion of Lignocellulosic Biomass." **International Journal of Biological Sciences**. 5(5): 500-516.
- Matsushita, O., Russell, J.B. and Wilson, D.B. 1990. "Cloning and Sequencing of a *Bacterioides ruminicola* B14 Endoglucanase Gene." **The Journal of Bacteriology**. 172: 3620-3630.
- Mazzia, M. and Walker, N. 2008. "Live Yeast Action on the Rumen: Unlocking Fiber Potential to Optimize Feed Value." [Online] Available: [http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/health/articles/live-yeast-action-rumen\\_1051.htm](http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/health/articles/live-yeast-action-rumen_1051.htm)
- McAllister, T.A., Moustafa, S.M.S., Cheng, K.J., Newbold, C.J., McKain, N. and Wallace, R.J. 1994. "Effect of Salinomycin on Fermentation and Nitrogen Metabolism in the Artificial Rumen." **Canadian Journal Animal Science**. 74:575.
- McGavin, M. and C.W. Forsberg. 1988. "Isolation and Characterization of Endoglucanase 1 and 2 from *Bacteroides succinogens* S85." **The Journal of Bacteriology**. 170: 2914-3315.
- Mechaly, A., Yaron, S., Lamed, R., Fierobe, H.P., Belich, A., Belich, J.P., Shoham, Y. and Bayer, E. 2000. "Cohesin-Dockerin Recognition in Cellulosome Assembly: Experiment Versus Hypothesis." **Protein: Structure, Function and Genetics**. 39: 170-177.
- Minato, K. 1993. "Moisture Adsorption Characteristics of Medium-Density Fiberboard and its Raw Wood Fiber Treated with Formaldehyde." **Journal of the Japan Wood Research Society**. 39: 1162-1168
- Minato, K., Yusuf, S.M., Imamura, Y. and Takahashi, M. 1993. "Hygroscopic Vibrational and Biodeterioration Characteristics of Medium-Density Fiberboard Treated with Formaldehyde." **Journal of the Japan Wood Research Society**. 39: 190-197.

- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Yokoyama, M.T. and Lamed, R. 1990. "Some Aspects of Cellobiose Effect on Cell Surface Structures Involved in Lucerne Cell Walls Utilization by Fresh Isolates of Rumen Bacteria." **Animal Feed Science Technology**. 30: 107-120.
- Miron, J., Ben-Ghedalia. And Morrison, M. 2001. "Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria." **Journal Dairy Science**. 84: 1294-1309.
- Miron, J., Yokoyama, M.T. and Lamed, R. 1989. "Bacterial Cell Surface Structures Involved in Lucerne Cell Wall Degradation by Pure Cultures of Cellulolytic Rumen Bacteria." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 32: 218-222.
- Mosoni, P. and Martinie, B.G. 2001. "Characterization of a Spontaneous Adhesion Defective Mutant of *Ruminococcus albus* Strain 20." **Achieves of Microbiology**. 176: 52-61.
- Nickle, R., Schummer, A. and Seiferle, E. 1973. **The Viscera of the Domestic Mammals**. Berlin: Verlag Paul Parey.
- Nordon, R.E., Craig, S.J. and Foong, F.C. 2009. "Molecular Engineering of the Cellulosome Complex for Affinity and Bioenergy Applications." **Biotechnology Letters**. 31: 465-476.
- Novagen. 2003. "pET Manual System." [Online] Available: [www.novagen.com](http://www.novagen.com).
- Ohara, H., Noguchi, J., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K. 2000. "Sequence of *egV* and Properties of *EgV*, a *Ruminococcus albus* Endoglucanase Containing a Dockerin Domain." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 64(1): 80-88.
- Ohmiya, K., Maeda, K. and Shimizu, S. 1987. "Isolation and Properties of Beta-Glucosidase from *Ruminococcus albus*." **Carbohydrate Research**. 166: 145-155.
- Orpin, C.G. and Joblin, K.N. 1997. edited by Hoson, P.N. and Stewart, C.S. "The Rumen Anaerobic Fungi." **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional Publishers.
- Oyeleke, S.B. and Okusanmi, T.A. 2008. "Isolation and Characterization of Cellulose Hydrolysis Microorganism from the Rumen of Ruminants." **African Journal of Biotechnology**. 7(10): 1503-1504.
- Pagoussis, J. and Olavesen, M.G. 1997. edited by Hanes, B.D. "Chromosome Walking." **The Practical Approach Series**. New York: Oxford University Press.
- Pell, A.N. and Schofield, P. 1993. "Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion *in vitro*." **Journal of Dairy Science**. 76: 1063-1073.

- Pettipher, G.L. and Latham, M.J. 1979. "Characteristics of Enzymes Produced by *Ruminococcus flavefaciens* which Degrade Plant Cell Wall." **Journal of General Microbiology**. 110: 21-27.
- Planas, A. 2000. "Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanase: Structure, Function and Protein Engineering." **Biochimica et Biophysica Acta**. 1543(2) 361-382.
- Rees, H.C., Grant, S., Jones, B., Grant, W.D. and Heaphy, S. 2003. "Detecting Cellulase and Esterase Enzyme Activities Encoded of Novel Genes Present in Environmental DNA Libraries." **Extremophiles**. 7: 415-421.
- Russell, J.B. and Rychlik, J.L. 2001. "Factors that Alter Rumen Microbial Ecology." **Science**. 292: 1119-1122.
- Russell, P.J. 1998. "Chapter 15: Recombinant DNA Technology and The Manipulation of DNA." **Genetics**. California: The Beginning/Cummings.
- Sakamoto, Y., Irie, T. and Sato, T. 2005. "Isolation and Characterization of a Fruiting Body-specific Exo-beta-1,3-glucanase Encoding Gene, *exg1*, from *Lentinula edodes*." **Current Genetics**. 47: 244-252.
- Sakumaran, R.K., Singhania, R.R. and Pandey, A. 2005. "Microbial Cellulases- Production, Application and Challenges." **Journal of Scientific and Industrial Research**. 64: 832-844.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring Harbor**. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Schwarz, W.H. 2001. "The Cellulosome and Cellulose Degradation by Anaerobic Bacteria." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56: 634-649.
- Shedova, E.N., Berezina, O.V., Lunina, N.A., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H. and Velikodvorskaya, G.A. 2009 "Cloning and Characterisation of a Large Metagenomic DNA Fragment Containing Glycosyl-Hydrolase Genes" **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**. 24: 12-16.
- Shimonaka, A., Baba, Y., Koga, J., Nakane, A., Kubota, H. and Kono, T. 2004. "Molecular Cloning of a Gene Encoding Endo-beta-D-1,4-Glucanase PCE1 from *Phycomyces nitens*." **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 68(11): 2299-2305.

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Singh, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M. and Singh, B. 2008. "Metagenomics in Animal Gastrointestinal Ecosystem: Potential Biotechnological Prospect." *Anaerobe*. 14: 138-144.
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Bali, V. and Batra, N. 2009. "Metagenomics: Concept, Methodology, Ecological Inference and Recent Advance." *Biotechnology Journal*. 4: 480-494.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G. and Russell, J.B. 1992. "A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: II. Carbohydrate and Protein Availability." *Journal of Animal Science*. 70:3562-3577.
- Sticklen, M.B. 2008. "Plant Genetic Engineering for Biofuel Production: Towards Affordable Cellulosic Ethanol." *Nature Review Genetics*. 9:433-443.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Mutsui, H. and Benno, Y. 1999. "Rumen Bacterial Diversity as Determined by Sequence Analysis of 16S rDNA Libraries." *FEM Microbiology Ecology*. 29: 159-169.
- Taylor, K.A., Crosby, B., McGavin, M., Forsberg, C.W. and Thomas, D. 1987. "Characteristics of the Endoglucanase Encoded by a *cel* Gene from *Bacteriodes succinogens* Expressed in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 41-46.
- Toyoda, A. and Minato, H. 2002. "Cloning, Nucleotide sequence and Expression of the Gene Encoding the cellulose-Binding Protein A (CBPA) of *Eubacterium cellulosolvens* 5." *FEMS Microbiology Letters*. 207: 141-146.
- U.S. Department of Energy Office of Science. 2005. **System Biology for Energy and Environment**. [Online] Available: <http://genomicscience.energy.gov/benefits/cellulosicethanol.shtml>
- Vercoe, P.E., Spight, D.H. and White, B.A. 1994. "Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis of the *celD* beta-glucanase Gene from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1." *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 27-34.
- Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R. 2006. "Characterization of a Metagenome-derived Halotolerant Cellulase." *Journal of Biotechnology*. 126: 26-36.
- Wang, W., Reid, S.J. and Thomson, J.A. 1993. "Transcriptional regulation of an Endoglucanase and a Cellodextrinase Gene in *Ruminococcus flavefaciens* FD-1." *Journal of General Microbiology*. 139: 1219-1226.

- Watson, B.J., Zhang, H., Longmire, A.G., Moon, Y.H. and Hutcheson, S.W. 2009. "Processive Endoglucanases Mediate Degradation of Cellulose by *Saccharophagus degradans*." **The Journal of Bacteriology**. 191: 5697-5705.
- Weimer, P.J. 1996. "Why Don't Ruminal Bacteria Digest Cellulose Faster?" **Journal of Dairy Science**. 79: 1496-1502.
- Wereszka, K., McIntosh, F.M., Michalowski, T., Jouany, J-P., Nsabimana, E., Macheboeuf, D., McEwan, N.R. And Newbold, C.J. 2004. "A Cellulase Produced by the Rumen Protozoan *Epidinium ecaudatum* is of Bacterial Origin and has an Unusual pH Optimum." **Endocytobiosis and Cell Research**. 15(2): 561-569.
- Williams, A.G. and Coleman, G.S. 1997. edited by Hoson, P.N. and Stewart, C.S. "The Rumen Protozoa" **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional Publishers.
- Williams, A.G. and Strachan, N.H. 1984. "Polysaccharide Degrading Enzymes in Microbial Populations from the Liquid and Solid Fractions of Bovine Rumen Digesta." **Canadian Journal Animal Science**. 64(Suppl.): 58.
- Williams, A.G., Withers, S.E. and Coleman, G.S. 1984. "Glycoside Hydrolase of Rumen Bacteria and Protozoa." **Current Microbiology**. 10: 287-294.
- Wilson, D.B. 2008. "Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation." **New York Academy of Science**. 1125: 289-297.
- Wood, T.M., Wolson, C.A. and Stewart, C.S. 1982. "Preparation of the Cellulase from *Ruminococcus albus* and its Release from the Bacterial Cell Wall." **Biochemistry Journal**. 205: 129-137.
- Xu, Q., Bayer, E.A., Goldman, M., Kenig, R., Shoham, Y. and Lamed, R. 2004. " Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* Cellulosome: Description of a Cell Surface-Anchoring Scaffoldin and a Family 48 Cellulase." **The Journal of Bacteriology**. 186: 968-977.
- Ye, X.Y., Ng, T.B. and Cheng, K.J. 2001. "Purification and Characterization of a Cellulase from the Ruminant Fungus *Orpinomyces joyonii* Cloned in *Escherichia coli*." **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 33: 87-94.
- Yokoyama, M.T. and Johnson, K.A. 1988 edited by Church, D.C. "Microbiology of The Rumen and Intestine." **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. New Jersey: Englewood Cliffs.

Yun, J. and Ryu, S. 2005. "Screening for Novel Enzyme from Metagenome and SIGEX, as a Way to Improve it." **Microbial Cell Factories**. 4: 8-13.

Zhang, Y.H.P., Himmel, M. and Mielenz, J.R. 2006. "Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Stragies." **Biotechnology Advances**. 24: 452-481.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

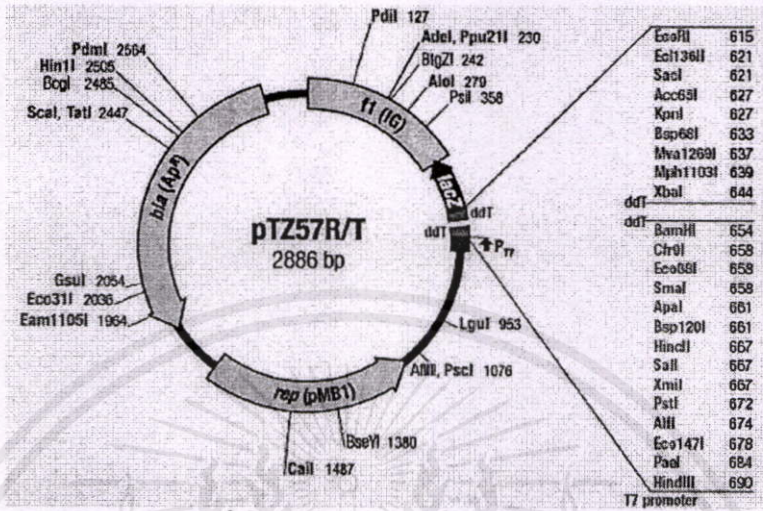


**ภาคผนวก ก**  
**แผนที่เวกเตอร์**

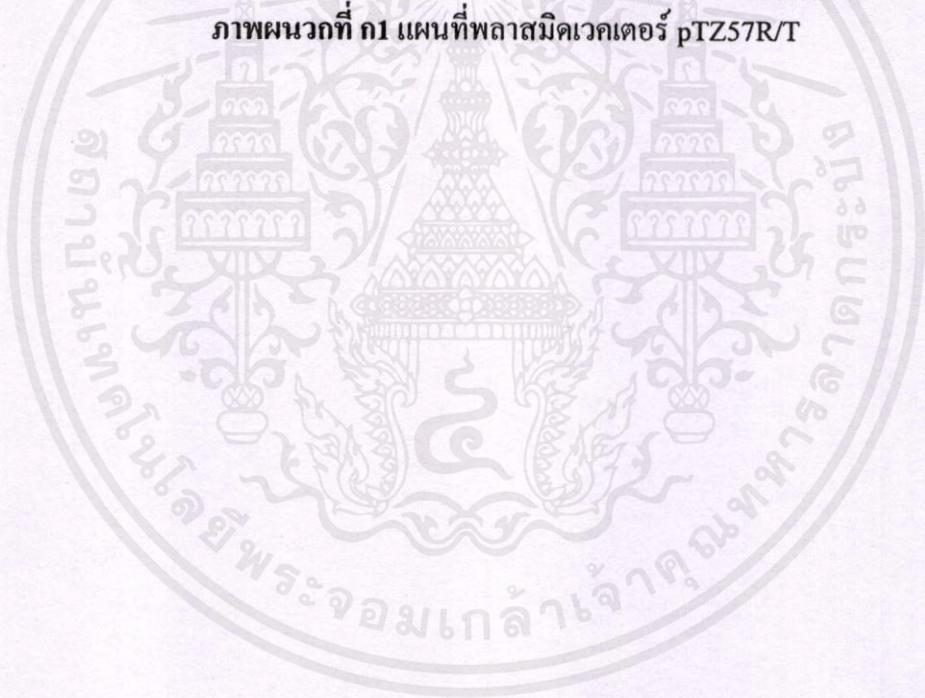
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# แผนที่เวกเตอร์

pTZ57R/T



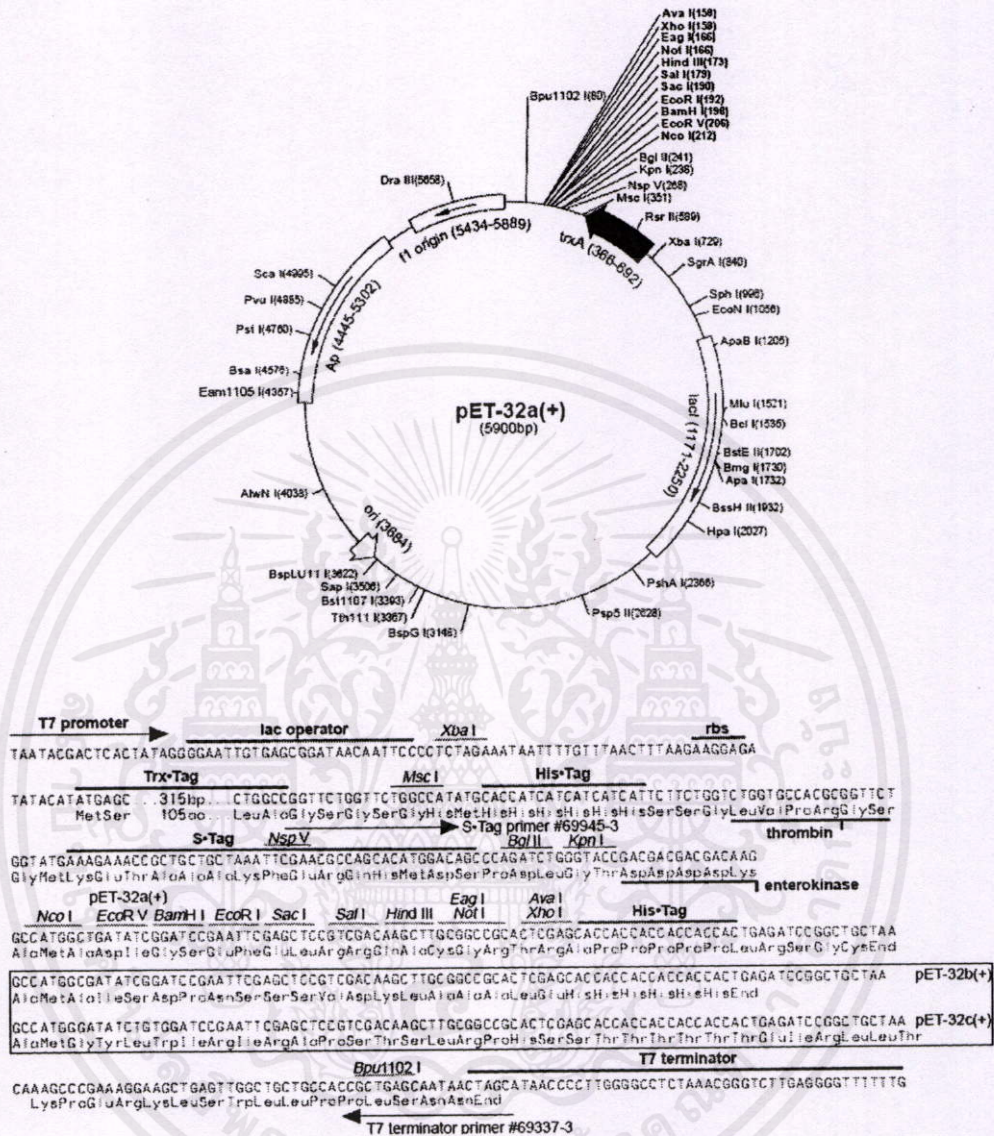
ภาพผนวกที่ ก1 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



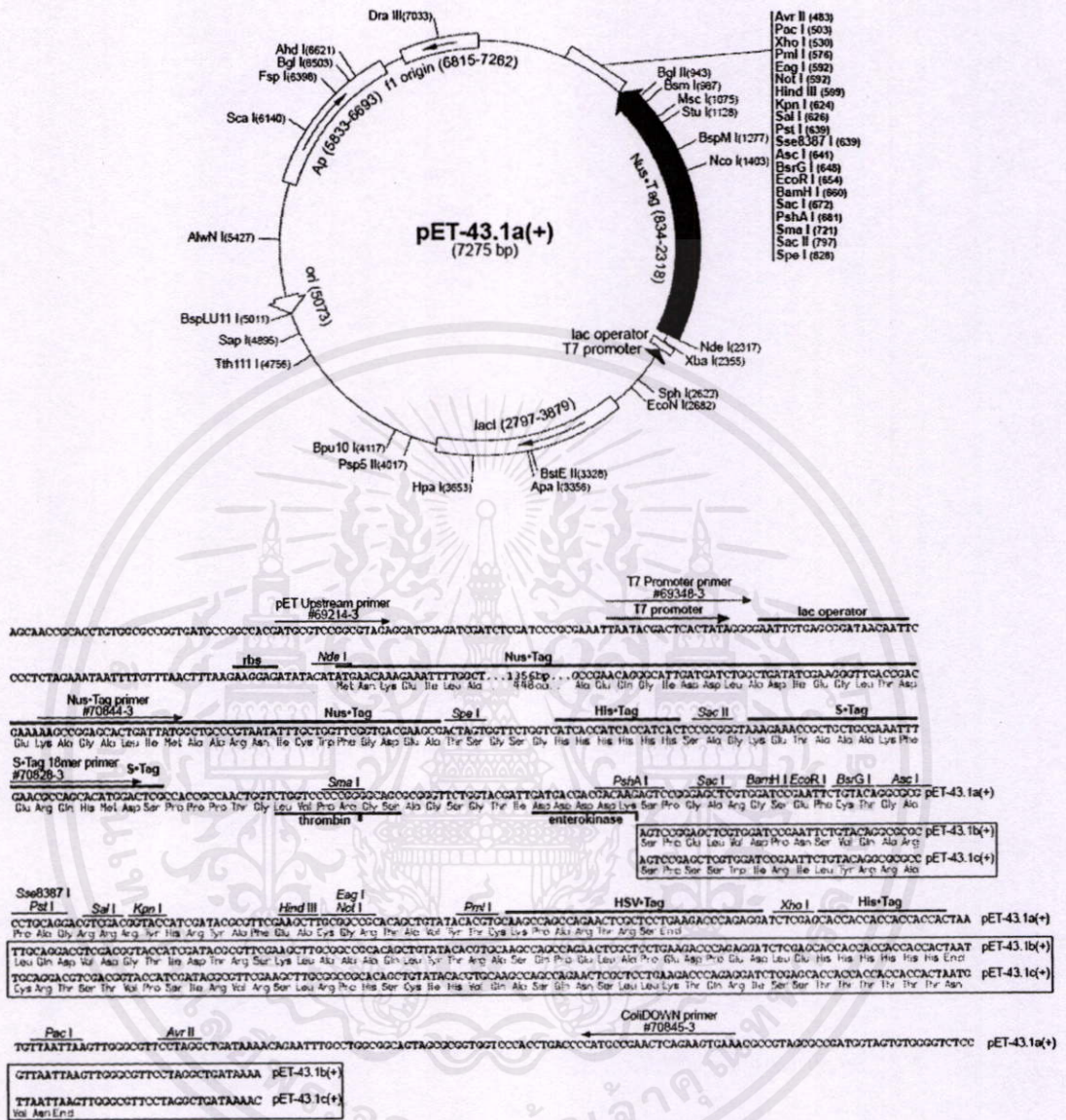
pET32a



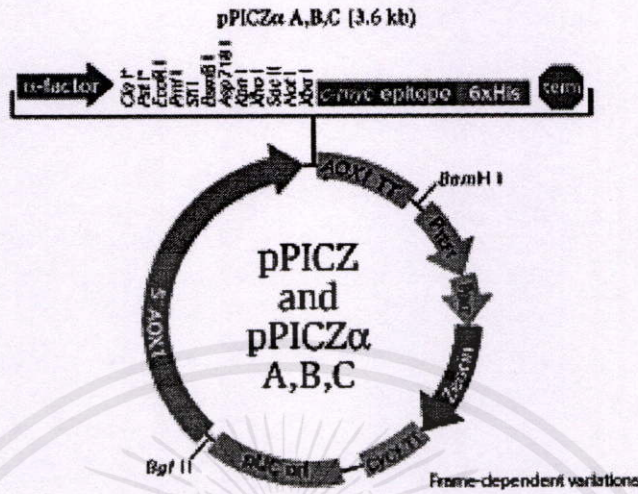
ภาพผนวกที่ 33 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pET32a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pET43.1a



pPICZαa



See polylinker sequences on the web.

5' end of AOX1 mRNA 5' AOX1 priming site

811 AACCTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTG ATTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA  
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA  
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α-factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC  
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT  
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

Xho I

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC  
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Kex2 signal cleavage EcoRI PmlI SfiI BspBI Asp718I

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT  
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Ste13 signal cleavage

KpnI XhoI SacII NotI XbaI c-myc epitope

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC  
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His \*\*\*

1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

3' AOX1 priming site

1411 TTCTAATCAA GAGGATGCA GAATGCCATT TGCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTGTAT

3' polyadenylation site

1471 ACITTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสามารถนำมาใช้ได้เฉพาะในกรณีที่มีการนำออกไปใช้เท่านั้น

ไม่ทำการฉีกใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ถ่ายภาพที่ 65 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pPICZαa ครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาคผนวก ข**

**สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และยาปฏิชีวนะ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารเคมี

**Extraction buffer**

100 mM	Tris-HCL (pH8.0)
100 mM	Sodium EDTA (pH 8.0)
100 mM	Sodium phosphate (pH 8.0)
1.5 M	NaCl
1%	CTAB

**6X loading dye**

1 mM	EDTA
10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
4%	Sucrose
0.25%	Bromophenol blue

**10X TBE (1L)**

40 ml	EDTA (0.5 M, pH8.0)
55 g	Boric acid
108 g	Tris base

**TB buffer**

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

**Lysis buffer**

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆไปยังผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Separating gel 10% (10ml)**

Distilled water	4,000 $\mu$ l
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2,500 $\mu$ l
30% Acrylamide – Bis	3,400 $\mu$ l
10% SDS	100 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l

**Stacking gel 4% (5 ml)**

Distilled water	3,000 $\mu$ l
Tris 0.5 M (pH 6.8)	1,250 $\mu$ l
30% Acrylamide – Bis	670 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l

**5X SDS dye loading buffer (10 ml)**

Distilled water	4,800 $\mu$ l
Tris-HCl 0.5M (pH 6.8)	1,200 $\mu$ l
Glycerol	1,000 $\mu$ l
10% SDS	2,000 $\mu$ l
Bromophenol blue	500 $\mu$ l
DTT	1 mM

**5X Running buffer (1L)**

Glycine	144 g
Tris	30 g
SDS	5 g
Distilled water	700 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Coomassie blue staining buffer (2L)**

Distilled water	1,560 ml
Methanol	400 ml
Glacial acid	40 ml
Coomassie blue	2 g

**Destaining buffer (2L)**

Distilled water	1,600 ml
Methanol	200 ml
Glacial acid	200 ml

**Transfer buffer (1L)**

Distilled water	800 ml
Glycine	14.4 g
Tris	3.03 g
Methanol	200 ml

**Blocking buffer**

0.05 M	Tris
0.138 M	NaCl
0.0027 M	KCl
3% (w/v)	Skim milk

**8X Phosphate buffer (100 ml)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.42 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.11 g
NaCl	23.38 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1x แสดงอัตราส่วนการผสมสารละลาย 1X phosphate buffer ที่ความเข้มข้น  
imidazole 40 – 500 mM

Immidazole concentration	Volume (ml)		
	8X phosphate	1M Immidazole	Distilled water
40 mM	6.25	4	89.75
60 mM	6.25	6	87.75
100 mM	6.25	10	83.75
200 mM	6.25	20	73.75
300 mM	6.25	30	63.75
400 mM	6.25	40	53.75
500 mM	6.25	50	43.75

**PBST**

0.05 M	Tris
0.138 M	NaCl
0.0027 M	KCl
0.05%	Tween20

**PBS (1L)**

0.05 M	Tris
0.138 M	NaCl
0.0027 M	KCl

**DNS solution**

Distilled water	1,416	ml
3,5-dinitrosalicylic acid	10.6	g
NaOH	19.8	g

ผสมส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม

Rochelle salt (Na-K tartrate)	306	g
Phenol	7.6	ml
Na metabisulfide	8.3	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**อาหารเลี้ยงเชื้อ****SOB**

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

**LB-Broth**

1%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
1%	NaCl

**LB-Agar**

1%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
1%	NaCl
1.5%	Agar

**YPD**

1%	Yeast extract
2%	Peptone
2%	Dextrose

**YPD-Agar**

1%	Yeast extract
2%	Peptone
2%	Dextrose
1.5%	Agar

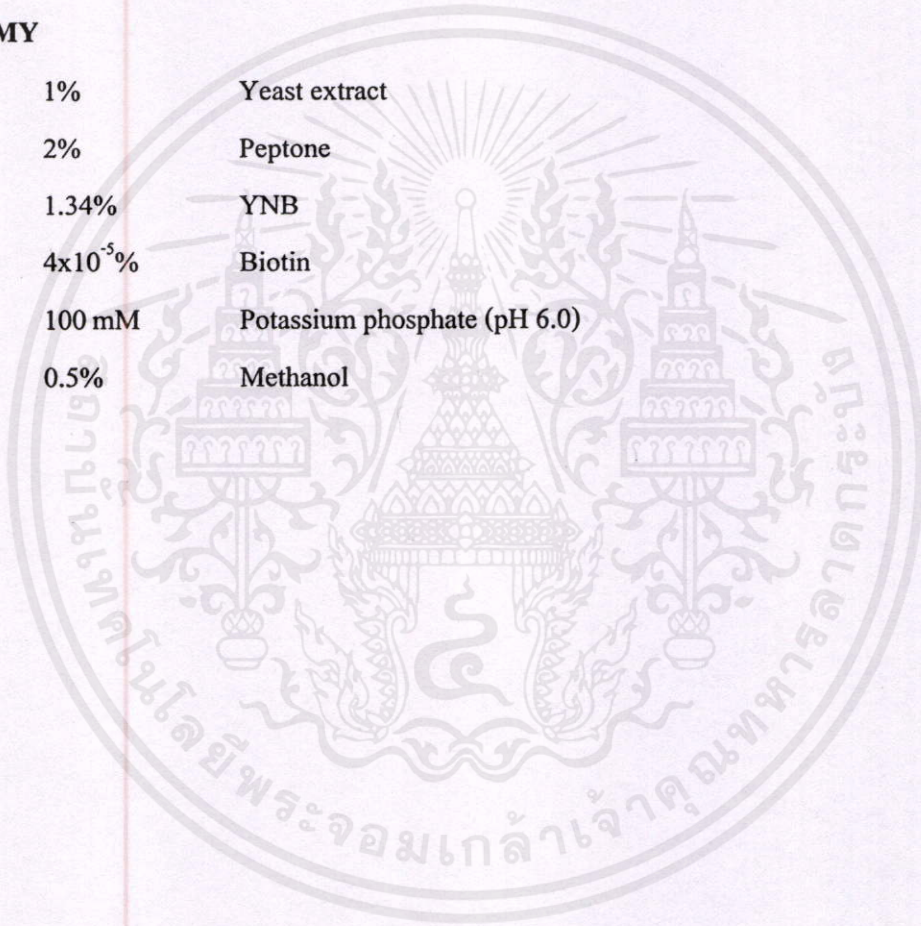
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในช่วงเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**BMGY**

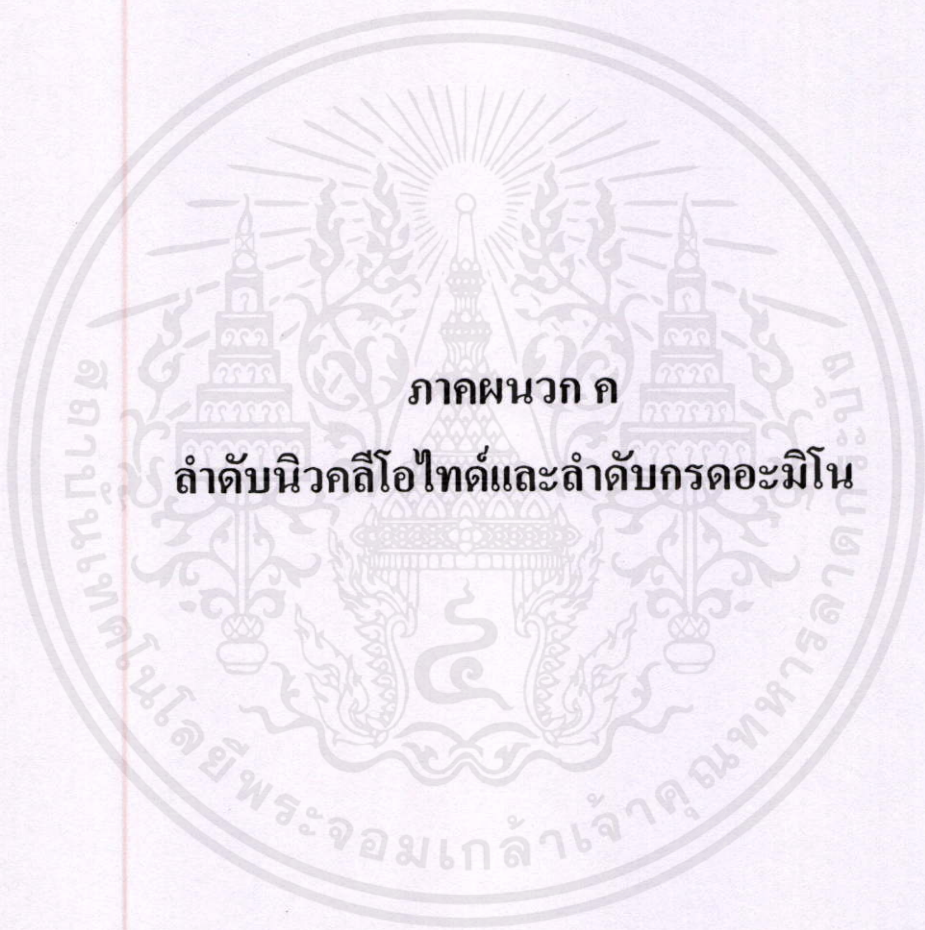
1%	Yeast extract
2%	Peptone
1.34%	YNB
$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin
100 mM	Potassium phosphate (pH 6.0)
1%	Glycerol

**BMMY**

1%	Yeast extract
2%	Peptone
1.34%	YNB
$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin
100 mM	Potassium phosphate (pH 6.0)
0.5%	Methanol



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาคผนวก ค**  
**ลำดับนิวคลีไอโทด์และลำดับกรดอะมิโน**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



cacagaacctggggaaattcgttggacgcaacaggcaagaacggcctcggcaacgagact  
H R T W G N S L D A T G K N G L G N E T  
gcctggcagccggtcaggaccaccaagggcgttttcgatctgctcacaaggacgggttc  
A W Q P V R T T K G V F D L L T K D G F  
aacctggcgcgtatccccgtgacctggggcgaccatattggacgagagctacaagatcgat  
N L A R I P V T W G D H M D E S Y K I D  
cccgagtggatggcaagagtcacagagatcgttgactacgctatcgacgacgggatgttc  
P E W M A R V H E I V D Y A I D D G M F  
gtgatcctcaacaccaccacgaggaatggtacttccccaccgaggagaacaaggagcag  
V I L N T H H E E W Y F P T E E N K E Q  
gacaaggaacagctcaaggctctgtgggagcaggtcgccgaggaattcaagaactatgac  
D K E Q L K A L W E Q V A E E F K N Y D  
gagcacctgatctttgagggactcaacgagccgaggtcctcgccgacccgccaaggagtg  
E H L I F E G L N E P R L R G T A K E W  
aacggcggcgacaagtcttcgagagatagtcgcccgaatacagaaaagtcttctacgac  
N G G D K S S R E I V A E Y E K V F Y D  
actgtaagagcatctggcgggaacaacgcaaagcgcctcttatgatgacaggctatgcg  
T V R A S G G N N A K R I L M M T G Y A  
gcatcaacaaatcagaactgtctgaaggcgtatctgcccggaggagacgacaagatc  
A S T N Q N C L K A V Y L P E G D D K I  
atcgatcggtacacgcctatctgccctactcctttgcgctggacaccaagggcacatcg  
I V S V H A Y L P Y S F A L D T K G T S  
aagtacgatccaaacaactccgatataaagaacctgttcgggagcctgaacacgactttc  
K Y D P N N S D I K N L F R S L N T T F  
atctogaagaacatacctgttatcgtaggcgaatacggcagatgaacaagactcatgag  
I S K N I P V I V G E Y G S M N K T H E  
aacggcgaacagaatatagcagacaggtacagtggtgaccgattatctgacggccgcg  
N G E Q N I A D R V Q C V T D Y L T A A  
aaggagcttagcatccccgtgaatttaatgggaa  
K E L S I P - I - W E

**ภาพผนวกที่ ค2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5\_A3**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gacttgggaacctggctggaggctggtaagtcatgggagggcgtcacaacattcagcaat  
 D L G T W L E A G K S W E G V T T F S N  
 aagggcgggactcggctccgagacagcttggcaacagactaagaccacgcaggctgtgatc  
 K G G L G S E T A W Q Q T K T T Q A V I  
 gactatgtcaagtcacagggcttccgctctgtacgcataccctgcgcttgggtatgggga  
 D Y V K S Q G F R S V R I P C A W V W G  
 catatggctgatgccaaactacaccatcgacgccacatggatggctcgagttaaggaa  
 H M A D A N N Y T I D A T W M A R V K E  
 atcgttgactattgcatcaaagatgatctttacgtattattaacgaccactgggacggc  
 I V D Y C I K D D L Y V L L N D H W D G  
 ggggtggcttgatgacaacctgacggccacagggcgcacagaaaagaaaagaacaaagcggta  
 G W L D D N L T A T G A Q K E K N K A V  
 ctgcagccatttggacacaaatagccaatgaattcctcgcactatgatgacctctcgtc  
 L A A I W T Q I A N E F L D Y D D H L V  
 tttgccgggcagacgagccgcccattgagaagcaatcggatatacgcctcactggtagaa  
 F A G Q N E P P I E K Q S D I A S L V E  
 tatcagcaaaccttcatcgatgctgtacgagccactggcgggaacaacgagaagcgtctg  
 Y Q Q T F I D A V R A T G G N N E K R L  
 ctgggtggtagacgggaccaagtacggacgtggagaagacatgcaactggctggccgataag  
 L V V Q G P S T D V E K T C N W L A D K  
 atgcctacagatcccagtggaactggctgtggagatacacttctattatccctggaac  
 M P T D P S G K L A V E I H F Y Y P W N  
 ttctggggcatgacagaggatgctaattggggcaacatgcttctattactgggggaaagat  
 F W G M T E D A N W G N M F Y Y W G K D  
 aaccacttcagcggatcaaacacaccccaactggggcgaagaagaacagatgactagt  
 N H F S G S K H N P N W G E E E Q M T S  
 ttggcagacctgttgaagaccaagttcatagataaaggcattcactgagtatgatgggaa  
 L A D L L K T K F I D K G I H - V - W E

### ภาพผนวกที่ ๓ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5\_A4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tggaaacttgtaaactggatggaggccaccaactattccctgaccagagtggacaagccc  
 W N L - N W M E A T N Y S L T R V D K P  
 tggaaagtttgagacggcctggggcaaccctgttaccaccagagctcatcgacctggtg  
 W K F E T A W G N P V T T Q E L I D L V  
 atggaccagggcttcaatgccatccgcatccctgtgacctgggagcagcacatggatggc  
 M D Q G F N A I R I P V T W E Q H M D G  
 gacggaaacatcaatgaagcctggatggaccggtacagactgttggatgatgggtgat  
 D G N I N E A W M D R V Q T V V D M V Y  
 agcaagggcgatcgtgatcctcaactgccatcacgagacctggaactatccttactat  
 S K G G Y V I L N C H H E T W N Y P Y Y  
 gacaatcaggaagcagcctgcgagaaggagcgtgtcctctggaccagatctgagaccgc  
 D N Q E A A C E K E R V L W T Q I C D R  
 ttccaggactatgatcagcatctgatcttcgagagccagaacgagcccagaaaggtgggc  
 F Q D Y D Q H L I F E S Q N E P R K V G  
 accaacattgagtggaccggcgatcaggaaggctgggatgtgatcaatgccgtgaat  
 T N I E W T G G D Q E G W D V I N A V N  
 gctaccttctggagaccgtccgagcggcgagtaacctatcgtgtggtctac  
 A T F L E T V R S A G G S N P Y R V V Y  
 atgccctgctatgoggcaagctctgatgagaagtcacatcagccatttcagatccccgag  
 M P C Y A A S S D E K S I S H F Q I P E  
 ggagatgacctgtgatcttcagcattcacatgtacacccttacaacttcgccctgaat  
 G D D R V I F S I H M Y T P Y N F A L N  
 gcagcaggaaccgcatactgggacgagagcaaccaggatctactggatcctgcagaac  
 A A G T A Y W D E S N Q D I Y W I L Q N  
 gtgaagaagtacatcctggacaagggatgccccgcatgggtgggtgagttcgggcgcctg  
 V K K Y I L D K G C P A M V G E F G A V  
 gacaagaacaacctggagaccagagttgcctgggcagagtatttcgtaaagactgoggat  
 D K N N L E T R V A W A E Y F V K T A D  
 gaactgggcatcccttgcattgtgggtggaa  
 E L G I P C M W W E

ภาพผนวกที่ ค4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5\_A6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tggaaatctgggcaattgggatggacgcaacgggcgagggacttgattcggaaacttgctgg  
 W N L G N W M D A T G E G L D S E T C W  
 ctgccccgtaaaggtaaagaccaacgaatacatgatagatgtgggtccagcagggcgggcatg  
 L P V K V K T N E Y M I D V V Q Q A G M  
 aacgtgctgagagttcccgtgacctggggcaatcatcttatcgacgacaactacaccatt  
 N V L R V P V T W G N H L I D D N Y T I  
 gacccccgctggatggacaggggtgcaggagatagtcaactacggctatgaggacgggatg  
 D P A W M D R V Q E I V N Y G Y E D G M  
 tatgttatactgaatactcaccacgaggaatgggtatgtgcctacggagagcgacaaagct  
 Y V I L N T H H E E W Y M P T E S D K A  
 gaggatcgcagggatcaaagcgatggggcgagatcgctgaccgcttcaagggctac  
 E D I E E I K A I W A Q I A D R F K G Y  
 gacgagcatctgatatttgagggtcttaacgaaccagacttcgcgacaggggtgctgaa  
 D E H L I F E G L N E P R L R G Q G A E  
 tggacagggcaactgaggaatctaggaacgtcatcaacgagtagcgaaaaagcctttgtgaag  
 W T G T E E S R N V I N E Y E K A F V K  
 acagttcgtgcttcgggcgaaacaatgccgacagatgcctgatgatcacaggctatgct  
 T V R A S G G N N A D R C L M I T G Y A  
 gcattctccatgtactcaaatctgtcagcgatacagctgccggaagagagcgacaagctg  
 A S S M Y S N L S A I Q L P E E S D K L  
 ataatctcggtagacgcataatcttcctattccttcgccccttgacaagaaaggcaccgac  
 I I S V H A Y L P Y S F A L D K K G T D  
 aaatcgcacccccgaggacacagctatatccgaccttttcgacaccctcgaccagctgttc  
 K Y D P E D T A I S D L F D T L D Q L F  
 atatctcagagcattcctgaatttagtggga  
 I S Q S I P - I - W

**ภาพผนวกที่ ค5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5\_A8**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ggaacctgtgaaacttgatggaggctggtaagtcatgggagggcgtcacaacattcagcaat  
 N L - N L M E A G K S W E G V T T F S N  
 aagggcgactcggctccgagacagcttggcaacagactaagaccacgcaggctgtgatc  
 K G G L G S E T A W Q Q T K T T Q A V I  
 gactatgtcaagtcacagggcttccgctctgtacgcataccctgcgcttgggtatgggga  
 D Y V K S Q G F R S V R I P C A W V W G  
 catatggctgatgccaacaactacaccatcgacgccacatggctcgagttaaggaa  
 H M A D A N N Y T I D A T W M A R V K E  
 atcgttgactattgcatcaaagatgatctttacgtattattaaacgaccactgggacggc  
 I V D Y C I K D D L Y V L L N D H W D G  
 ggggtggcttgatgacaacctgacggccacagcgcacagaaaagaaaagaacaaaagcggta  
 G W L D D N L T A T G A Q K E K N K A V  
 ctgcagccatttggacacaaatagccaatgaattcctcgactatgatgaccatctcgtc  
 L A A I W T Q I A N E F L D Y D D H L V  
 tttgccggacagaacgagccgcccattgagaagcaatcggatcgcctcactggtagaa  
 F A G Q N E P P I E K Q S D I A S L V E  
 taccgcaaaccttcatcgatgctgtacgagccactggcgggaacaacgagaagcgtctg  
 Y Q Q T F I D A V R A T G G N N E K R L  
 ctgggtgtacagggaccaagtacggacgtggagaggacatgcaactggctggccgataag  
 L V V Q G P S T D V E R T C N W L A D K  
 atgcctacagatcccagtggaactggctgtggagatacacttctattatccctggaac  
 M P T D P S G K L A V E I H F Y Y P W N  
 ttctggggcatgacagaggatgctaattggggcaacatgttctattactgggggaaagat  
 F W G M T E D A N W G N M F Y Y W G K D  
 aaccacttcagcggatcaaaacacaaccccaactggggcgaagaagaacagatgactagt  
 N H F S G S K H N P N W G E E E Q M T S  
 ttggcagacctgttgaagaccaagttcatagataaaggcattccatgcatgtgatgggaa  
 L A D L L K T K F I D K G I P C M - W E

**ภาพผนวกที่ ๑๖ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน Cel5\_A12**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

Cel5_A3 : HRTWGNL DATGK 100
Cel5_A4 : DLGTWLEAGKSEGVTFESNKG GL 16
Cel5_A6 : NNLWVEATNYSLTRVDKFW GL 24
Cel5_A8 : NNLGNW DATG EGI 20
Cel5_A12 : NLNMEAGKSEGVTFESNKG GL 23
P23661 : ---MKLRIAALLTRAVMSVGNASCGGSKSDDKSKADTKSAETSAGEGDSESEIIPVSOQHTNDPNTVTSAKDLVAKMSNGNLGNWMDATG EGL 95
P16216 : ---MNSKRIGAMIAAAVLSLIVMTPAATRKIVQRTRNSSTAVENS--AADESEFENVEVSQHTNDTMTVTSAKDLVAKMNTGNNLGNWMDATA QGI 93
P23660 : ---MKPKDADRALTTLDLARSQEVRSAMELVGEMKTKGNLGNWMDATG APGN 52
P54937 : ---MKRSLKTCISLAGATIIFFSLSISRNELEVQAASHRSASEIVQEMGVGNLGNWMDAKITNLSYNTSEI 70
AAA26467 : MDRIKLVITVLAMASGLVSCGPGNGKSSCAEKKDTSSAAESTADSDAQPAGDTLILSNEELARSSEVRDISAMELVAKMNTGNLGNWMDATG ---AAGN 101
BAA92430 : ---MKTKSKSALITLSMVCAMALSCMPFVEFTRAEAAFDKDAKQTVADMGLGNLGNWMDASYSCTTIGGNRST 70

```

```

Cel5_A3 : GNETAWQP--VPTTKGFIITKDCENLAKRIVVWGDHDES--KIDPEWMAVREIVLVAIDIGMVFILNTHREE--YFPTTEENKEQDKQ---LKRIMEDVARE 114
Cel5_A4 : GSETAWQQ--TKTQPMIDYKSCQERSVRIICAVVWGHMADANNITPATWMAVREIVLVAIDIGMVFILNTHREE--YFPTTEENKEQDKQ---LKRIMEDVARE 114
Cel5_A6 : RFTAWGN--PVTQEMDLMQENARIRIVWQENDCD--GNNEAWPDRVQTVIMVYKGGVILNCHIEET--NYPYDNCQEAACQK---ERVIMTQICD 118
Cel5_A8 : DSETOMLPVAVFNEVAVVQQAENVVAVVAVVGNHIDDN--TTPAAMDRCQEVANVIGYEGLMTHLTHREE--YMPETESDKAEDI E---IKRIMAD 115
Cel5_A12 : GSETAWQQ--TKTQPMIDYKSCQERSVRIICAVVWGHMADANNITPATWMAVREIVLVAIDIGMVFILNTHREE--YFPTTEENKEQDKQ---LKRIMEDVARE 114
P23661 : ESISMLPLKVTNKNYDMLPERENVIRIVSVGNHIDDK--TTPAAMDRCQEVANVIGYEGLMTHLTHREE--YMPKPSERKDCDIEE---LKRIMAD 119
P16216 : GSNVSMPLKVTNKNYDMLPERENVIRIVSVGNHIDDK--TTPAAMDRCQEVANVIGYEGLMTHLTHREE--YMPKPSERKDCDIEE---LKRIMAD 119
P23660 : ASBVNAGN--PPTTKEMDVAYNKGDVIRIVWGGHGDAPD--KIDPEWMAVREIVLVAIDIGMVFILNTHREE--YFPTTEENKEQDKQ---LKRIMEDVARE 153
P54937 : SETIGAGN--PVTTKMIRIKNREKTRIVTGEHDCGN--NKKEEAVKVKVWVDCIAFDIILNTHREGNVIPTYAKESVTPK---LKTIMTISE 169
AAA26467 : ASBVNAGN--PPTTKEMDVAYNKGDVIRIVWGGHGDGPD--KIDPEWMAVREIVLVAIDIGMVFILNTHREE--YFPTTEENKEQDKQ---LKRIMEDVARE 153
BAA92430 : SSETAWGN--PPTTKMIRIKNREKTRIVTGEHDCGN--NKKEEAVKVKVWVDCIAFDIILNTHREGNVIPTYAKESVTPK---LKTIMTISE 169
E W T 6ID 6 Gf R6P W h y 1 W6 RV a6Vly 5v66N Hh w e 6W Q6

```

ภาพผนวกที่ ๓7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างที่สุ่มเลือก กับลำดับกรดอะมิโนของungskุ่มตัวอย่างที่นำมาออกแบบ Cel5 degenerate primer ในกรอบสี่แดง แสดงบริเวณของไพรเมอร์

```

220 * 240 * 260 * 280 * 300 * 320
Cel5_A3 : F K M D E H L I F E G I N E R P R G T A K E I N G G D K S S R E I A E Y E A V Y D T V A S G A N A K I I I M I T G A A S T N Q -- N C R A V Y L P E G G D K I V S P A I P I S A L D T K G -- : 218
Cel5_A4 : F L I V D B L V F A C N E P P E E -- -- K Q S D I A S V E Y O O T I D A V A R G A N E R I I I A V I C G P S T D V E R T C N W A D K M P T D P S C K I A V E R F Y Y P M N W G M T E D -- : 227
Cel5_A6 : F Q D P C H L I F E G I N E R P K V G T N I E T G G D Q E G V D V N A V N A T F E T V S A G S S P H R V V Y P C P A A S S E D -- K S S H F Q I P E G D D R V I F S E R M T P P N A L N R A G -- : 222
Cel1_A8 : F P K G D E H L I F E G I N E R P R G O G A E I T G T E E S -- R N V N E Y E K A K T V S A G S S A L R C I M I T G C A A S S M Y -- S M S A I Q L P E E S D F I I I S P A I P I S A L D K K G -- : 218
Cel1_A12 : F L I D D H L V F A C N E P P E E -- -- K Q S D I A S V E Y O O T I D A V A R G A N E R I I I A V I C G P S T D V E R T C N W A D K M P T D P S C K I A V E R F Y Y P M N W G M T E D -- : 226
P23661 : F P K G D E H L I F E G I N E R P R G E G A E I T G T S E A R E I N E Y E K A E T V S A G S S C I R C I M I T G C A A S S G Y -- N N S A I E L P E D S D K I I I S P A I P I S A L D T K G -- : 299
P16216 : F P K G D E H L I F E G I N E R P R G E G A E I T G T S E A R E I N E Y E K A E T V S A G S S G I R C I M I T G C A A S S A Y -- N N S A I E L P E D S D K I I I S P A I P I S A L D T K G -- : 297
P23660 : F P K G D E H L I F E G I N E R P R K G S P Q E I N G G T E E G R C D R L N A T I D V A T G A N E R I I I A V I C G P S T D V E R T C N W A D K M P T D P S C K I A V E R F Y Y P M N W G M T E D -- : 258
P54937 : F P K I D D H L I F E G I N E R P R E R E G T P Y E I T G T S E S D V D K N N A A L E S P K I G S S R A V A N N P T A A S S W S -- N V K D T A I P E D D H -- I G F S E R M T P P N A N A D W : 274
AAR26467 : F P K D M C D H L I F E G I N E R P R K G S P E E I N G G T E E G R C E R I N Q T I D V A T G A N E R I I I A V I C G P S T D V E R T C N W A D K M P T D P S C K I A V E R F Y Y P M N W G M T E D -- : 307
BAR92430 : F E D G D K L V F E G I N E R P I L D E S S N Q M N -- P S S E A C P I S N E L N Q I D V A G S G A G A A K A N N C N T C A G A N N E I T S Q F V L P K D T V S N R I V E R F Y Y P M N W G M T E D -- : 278
F Y hL6Feg NEP w F 6R Ggn R 6 Y H Y P5 F

```

```

* 340 * 360 * 380 * 400 * 420 *
Cel5_A3 : -- T S K Y D P -- N N S D K N I F R S L N T T F T S N I I V V G E Y G S M N K T H E N G E Q N I A D R V Q C V T D Y T A A K E L S -- P P -- E E -- : 289
Cel5_A4 : -- A N W G N -- -- M F Y -- Y M G K D N H F S G S H N I -- -- N W G E E -- -- E Q M T S L A D L I K T K F I D K G H -- E E -- : 278
Cel5_A6 : -- T A Y W D E -- S N O D I Y W I L Q N V K K Y I I L D G C P A V G E F G A V D K N N -- -- L E T R V A W A E Y F K T A D E L G -- P C W M E I -- : 289
Cel1_A8 : -- T D R K Y D P -- E D T A S D I F T I D Q L F I S C S I I -- W -- -- -- -- -- : 248
Cel1_A12 : -- A N W G N -- -- M F Y -- Y M G K D N H F S G S H N I -- -- N W G E E -- -- E Q M T S L A D L I K T K F I D K G H -- P O M -- E E -- : 278
P23661 : -- T D R K Y D P -- E D T A P T I F E S I N E L F I S D I P I V V G E F G S M N K D N -- -- I D D R V K C L D D Y G N A A K Y D -- P C W M D N Y A R I G N -- G E N F G L N R Q E Y D W Y F P K L M D V F : 396
P16216 : -- T D R K Y D P -- E D T A P E L F E H L N E L F I S G I R V V G E F G T M N K E N -- -- T E D R V K C L E D Y A A A A K Y D -- P C W M D N Y A R I G N -- G E N F G L N R A D L E W Y F P D L I E F : 394
P23660 : E L F H W D S -- H D G E I V S L M N L K E N Y I L D I P A I T E Y G A V N K D N -- -- N D E D R A K W V S S Y E Y A E L L G G P C W M D N G Y S S G -- N E L F G I F D R N T C T W F T D T V T D A I : 359
P54937 : V N T W G S S Y -- D K Y S D V E L D S Y L N T E A S G V A V I G E F G S I N K N N -- -- -- T S S R A E L A E Y Y T A A Q K R G -- P C W M D N N Y A E T N K G E T F G L L N R S T L N W Y F S D I K D A L : 374
AAR26467 : E L F E W N T P A T A E I T L M S N L K E N Y I L D I P A I T E Y G A V C K N N -- -- N D E D R A K W V S A Y E Y A E M I G G P C W M D N G Y S S G -- N E L F G I F D R N T C T W F T D T V T D R I L : 409
BAR92430 : E I T T W T S S -- -- P D M V L N N L N S T E A C G I F V I G E F G C A N N N -- -- N D E I T S W A K Y V E K C T G Y G A G C W M D N -- -- G S Q Y K I I N R R T L K V S Q P E L L N A M : 368

```

ภาพผนวกที่ 7 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ส่งเลือก กับลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาออกแบบ Cel5 degenerate primer ในกรอบสีแดง แสดงบริเวณของไพรเมอร์

atgaaacgattcttcttattttctgatcttgtcggcctgtaatctgttcgcaactgacccag  
M K R F F L F L I L S A C N L F A L T Q  
atatatgcacaaaagaacatggaactaacagcctcgggaagtgcacacaacgtatgatgcct  
I Y A Q K N M E L T A S E V T Q R M M P  
ggatggaatctgggaaacactttggaggctggtaagtcatgggagggcgtcacaacattc  
G W N L G N T L E A G K S W E G V T T F  
agcaataagggcggactcggctccgagacagcttggcaacagactaagaccacgcaggct  
S N K G G L G S E T A W Q Q T K T T Q A  
gtgatcgactatgtcaagtcacagggcttccgctctgtacgcataacctgagcttgggta  
V I D Y V K S Q G F R S V R I F C A W V  
tggggacatatggctgatgccaacaactacaccatcgacgccacatggatggctcgagtt  
W G H M A D A N N Y T I D A T W M A R V  
aaggaaatcgttgactattgcatcaaagatgatctttacgtattattaacgaccactgg  
K E I V D Y C I K D D L Y V L L N D H W  
gacggcgggtggcttgatgacaacctgacggccacagggcgacagaaagaaaagaacaaa  
D G G W L D D N L T A T G A Q K E K N K  
gcggtactcgcagccatttggacacaaatagccaatgaattcctcgactatgatgaccat  
A V L A A I W T Q I A N E F L D Y D D H  
ctcgtctttgcgggcagaacgagccgccattgagaagcaatcggatctgcctcactg  
L V F A G Q N E P P I E K Q S D I A S L  
gtagaatatcagcaaaccttcatcgatgctgtacgagccactggcgggaacaacgagaag  
V E Y Q Q T F I D A V R A T G G N N E K  
cgtctgctggtgtacagggaccaagtcaggacgtggagaagacatgcaactggctggcc  
R L L V V Q G P S T D V E K T C N W L A  
gataagatgcctacagatcccagtggaactggctgtggagatacacttctattatccc  
D K M P T D P S G K L A V E I H F Y Y P  
tggaacttctggggcatgacagaggatgctaattggggcaacatgttcttactggggg  
W N F W G M T E D A N W G N M F Y Y W G  
aaagataaccacttcagcggatcaaaacacaccccaactggggcgaagaagaacagatg  
K D N H F S G S K H N P N W G E E E Q M  
actagtttggcagacctgtgaagaccaagttcatagataaaggcatccctgtgattaat  
T S L A D L L K T K F I D K G I P V I N  
ggcgaatatggtgttatctggcgcaccgtcactggcgtcaacgagagtcaggaaaaacac  
G E Y G V I W R T V T G V N E S Q E K H  
aatgcctctatcaagtaactattataagttcatgaatcagttgtgtatggagcgtggtatc  
N A S I K Y Y Y K F M N Q L C M E R G I  
gtgccggtggcctgggacaccaatagcactggcaccaaccagatgaccatcatcaatcgt  
V P M A W D T N S T G T N Q M T I I N R  
cagaacctgaccatctataattccttcatgtaggtatccacgaggcagatggaagcc  
Q N L T I Y N S F M M D G I H E A M E A  
gtgggaatccccatcacctccatttcttctgtagaaaaactcgaggctgaaagtgcaacc  
V G I P I T S I S S V E K L E A E S A T  
tatgccaaactgcaaaactgatcgacgacggcaagtattccggtggtcaggcattggaactc  
Y A N C K L I D D G K Y S G G Q A L E L  
tcggataccaaagccaaaatcaccttcacctacaacgcagcaaatgccggcaagtacacc  
S D T K A K I T F T Y N A A N A G K Y T  
atctacgtctgctacgacggctctctatggtgccaaagtggtcaatcttgaagtcaacggc  
I Y V C Y D G L Y G A K V V N L E V N G  
aatacgcagcggctggtcagggactggtcagctggaggaactgaatgtcggcaattttatc  
N T T A V Q G T G Q L E E L N V G N F I  
ctgaatgcaggtgacaacaccattaccattacacctaaactggacttgggtccgcacgac  
L N A G D N T I T I T P N W T W F R I D  
tatatccgcattgcaagtaccaccgaatga  
Y I R I A S T T E -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นโดยอัตโนมัติจากข้อมูลที่ได้มาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ภาพผนวกที่ ค8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของยีน Cel5\_A4 นำไปใช้



### RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence:

```
atg aaa CGA ttc ttc tta ttt ttt atc ttg tgg gcc tgt aat ctg ttc gca ctg acc cag ATA tat gca caa aag aac atg gaa CTA aca gcc tcg gaa gtg aca caa cgt atg
atg cct gga tgg aat ctg gga aac act ttg gag gct ttg tgg gca act ttg gca cag ggc ttc gga cct ggc aca gct tgg gaa gtg aca caa cgt atg
acc atg cag gct ttg atc gac tat gtc aeg gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca
aca tgg atg gct CGA gtt aeg gaa atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca atc gtc aag gca
ggc gca cag aaa gaa aag aac aaa gcg gta gcc att tgg aca ATA gcc aat gta tta aac gac tgg gga cat atg gct gat gcc aac tac acc atc gac gcc
att gcg aag caa tog gat atc gcc tca ctg gta gaa tat cag cea acc ttc atc gat gta CGA gcc act ggc ggg aac aac gag aag cgt ctg ctg gta cag gga cca
agt gcg gat gct aat tgg ggc aca tgc aac tgg gcc gat aag atg cct aca gat CCC agt ggc aaa ctg gct gtg gag ATA aac tgg ggc gaa caa cag atg
gac ctg ttg aag acc aag ttc ATA gat aaa ggc atc tac tgg gga aaa gat aac caa ccc gtc acc tgg ggc tca aaa gac aac CCC aag tgg ggc gaa caa cag atg
tct atc aag tab tat atc aag ttc ATA gat aaa ggc atc tac tgg gga aaa gat aac caa ccc gtc acc tgg ggc tca aaa gac aac CCC aag tgg ggc gaa caa cag atg
cag aac ctg acc atc tac aat ttc atg atc atg atc gac gac ggc aag tat tcc ggt ggt cag gca tlg gaa ctc tgg gca atc CCC atc acc tcc att tct tct gta gaa aca ctc gag gct gaa ggt
gca acc tat gcc aac tgg aaa ctg atc gac gac ggc aag tat tcc ggt ggt cag gca tlg gaa ctc tgg gca atc CCC atc acc tcc att tct tct gta gaa aca ctc gag gct gaa ggt
ggc aag tac acc tac gtc tgc tac gac ggt ctc tat ggt gcc aag gtc aac ggc aat acg acg gct gtt cag gct act ggt cag ctg gag gaa ctg
aat gtc ggc aat ttt atc ctg aat gca ggt gac aac acc att acc att aca cct aac tgg aat tgg ttc cgc atc gac tat atc gca agt acc acc gaa tga
```

The length is: 1590 nucleotides

Number of total single rare Arg codons: 3  
occurring at codons:  
3, 119, 212

Number of tandem rare Arg codon double repeats: 0  
Number of tandem rare Arg codon triple repeats: 0

ภาพหน้าที่ 10 แสดงผลการหา Rare codon ของชิ้น Cel5\_A4 ด้วยโปรแกรม Rare Codon Calculator (RaCC)

ตารางภาคผนวกที่ ค1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<b>Degenerate primer</b>	
Cel5_F	5'-TGGAAYYTIGNAA YWSIHTIGA-3'
Cel5_R	5'-TCCCACCANAYRCANGDATICC-3'
<b>Genome walking (specific primer)</b>	
Up_SP1	5'-CTTTGATGCAATAGTCAACGATTTCCCTTAAC TC-3'
Up_SP2	5'-ATCACAGCCTGCGTGGTCTTAGTCTGTTG-3'
Dw_SP1	5'-GCCGATAAGATGCCTAGAGATCCCAGTGG-3'
Dw_SP2	5'-TGGGGAAAGATAACCACCTTCAGAGGAT-3'
<b>Genome walking (semi-random primer)</b>	
BMP1	5'-GGCCACGGTCGACTAGTACNNNNNNNNNCAGAG-3'
BMP2	5'-GGCCACGGTCGACTAGTACNNNNNNNNNTACAC-3'
ST1	5'-GGCCACGGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT-3'
ST2	5'-GGCCACGGTCGACTAGTAC-3'
<b>Full length gene primer</b>	
Cel5_A4F	5'-ATGAAACGATTCTTCTTATTTCTGATC-3'
Cel5_A4R	5'-TCATTCGGTGGTACTTGCCAATG-3'

ตารางภาคผนวกที่ 11 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<b>Expression primer</b>	
43.1_Cel5F_F	5'-CGTGGGATCCATGAAACGATTCTTCTTATTTCTG-3'
43.1_Cel5M_F	5'-CGTGGGATCCAAAAGAACATGGAACCTAACAGCC-3'
pET_Cel5F_F	5'-CATGCCATGGAACGATTCTTCTTATTTCTGATC-3'
pET_Cel5F_R	5'-CCCAAGCTTTTCGGTGGTACTTGC AATGC-3'
pPIC_Cel5_F	5'-ACGCGTCGACAAAAGACAACCGAACATGGAACCTAACAGC-3'
pPIC_Cel5_R	5'-CTAGCTAGATCAATTCGGTGGTACTTGCAATG-3'
<b>Sequencing primer</b>	
M13	5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
5'AOX	5'-GACTGGTTCCCAATTGACAAAG-3'
3'AOX	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

ตารางภาคผนวกที่ ๓2 ตารางแปลรหัสพันธุกรรม (genetic code)

		2nd base			
		U	C	A	G
1st base	U	UUU (Phe/F)Phenylalanine UUC (Phe/F)Phenylalanine UUA (Leu/L)Leucine UUG (Leu/L)Leucine	UCU (Ser/S)Serine UCC (Ser/S)Serine UCA (Ser/S)Serine UCG (Ser/S)Serine	UAU (Tyr/Y)Tyrosine UAC (Tyr/Y)Tyrosine UAA Ochre (Stop) UAG Amber (Stop)	UGU (Cys/C)Cysteine UGC (Cys/C)Cysteine UGA Opal (Stop) UGG (Trp/W)Tryptophan
	C	CUU (Leu/L)Leucine CUC (Leu/L)Leucine CUA (Leu/L)Leucine CUG (Leu/L)Leucine	CCU (Pro/P)Proline CCC (Pro/P)Proline CCA (Pro/P)Proline CCG (Pro/P)Proline	CAU (His/H)Histidine CAC (His/H)Histidine CAA (Gln/Q)Glutamine CAG (Gln/Q)Glutamine	CGU (Arg/R)Arginine CGC (Arg/R)Arginine CGA (Arg/R)Arginine CGG (Arg/R)Arginine
	A	AUU (Ile/I)Isoleucine AUC (Ile/I)Isoleucine AUA (Ile/I)Isoleucine AUG (Met/M)Methionine, Start <sup>(1)</sup>	ACU (Thr/T)Threonine ACC (Thr/T)Threonine ACA (Thr/T)Threonine ACG (Thr/T)Threonine	AAU (Asn/N)Asparagine AAC (Asn/N)Asparagine AAA (Lys/K)Lysine AAG (Lys/K)Lysine	AGU (Ser/S)Serine AGC (Ser/S)Serine AGA (Arg/R)Arginine AGG (Arg/R)Arginine
	G	GUU (Val/V)Valine GUC (Val/V)Valine GUA (Val/V)Valine GUG (Val/V)Valine	GCU (Ala/A)Alanine GCC (Ala/A)Alanine GCA (Ala/A)Alanine GCG (Ala/A)Alanine	GAU (Asp/D)Aspartic acid GAC (Asp/D)Aspartic acid GAA (Glu/E)Glutamic acid GAG (Glu/E)Glutamic acid	GGU (Gly/G)Glycine GGC (Gly/G)Glycine GGA (Gly/G)Glycine GGG (Gly/G)Glycine

ตารางภาคผนวกที่ ๓ รหัส IUB code

IUB	TGCA	Meaning	Origin of destination
a	0001	A	Adenine
c	0010	C	Cytosine
m	0011	C, A	aMino
g	0100	G	Guanine
r	0101	G, A	puRine
s	0110	G, C	Strong interaction (3H bonds)
v	0111	G, C, A	not-T (not-U), V follow U
t	1000	T	Thymine
w	1001	T, A	Weak interaction (2H bonds)
y	1010	T, C	pYrimidine
h	1011	T, C, A	not-G, H follow G in the alphabet
k	1100	T, G	Keto
d	1101	T, G, A	not-C, D follow C
b	1110	T, G, C	not-A, B follow A
n	1111	T, G, C, A	aNy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวพุทธชาติ โภคาธิกรณ์ เกิดเมื่อวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ จาก ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2544 จากนั้นจึงเข้าทำงานที่บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ในตำแหน่งสัตวบาลประจำโรงฟักไข่สีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา และโรงฟักไข่กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ถึงปี 2547 จากนั้นจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและการประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 และสำเร็จการศึกษาในปี 2552



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้