การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

MOLECULAR CLONING OF CELLULASE GENE FROM RUMINAL BACTERIA

พรรณทิพา ธงทอง
PANTIPA THONGTONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

ISBN 974-9700-81-3

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

MOLECULAR CLONING OF CELLULASE GENE FROM RUMINAL BACTERIA

พรรณทิพา ธงทอง

PANTIPA THONGTONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9700-81-3

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 51514
วัน,เดือน,ปี 22 ก.ค. 2547

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

MOLECULAR CLONING OF CELLULASE GENE FROM RUMINAL BACTERIA

PANTIPA THONGTONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2004

ISBN 974-9700-81-3

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADGRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน
MOLECULAR CLONING OF CELLULASE GENE FROM RUMINAL BACTERIA

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรรณทิพา ธงทอง

รหัสประจำตัว 44066401

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.จินตนา บุนนาค

ดร.กฤษณา ภูเจริญ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ญาณิน	โอภาสพัฒนกิจ	
ผศ.ดร.จินตนา	บุนนาค	
ดร.กฤษณา	ภูเจริญ	
รศ.ดร.สุชีพ	สุขสุแพทย์	
รศ.ดร.รณชัย	สิทธิไกรพงษ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 29 มีนาคม 2547 เวลา 13.30-16.30 น.

สถานที่สอบ ณ ห้องโสตฯ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร (ตึก L ชั้น 3)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 **เดือน** เมษายน **พ.ศ.** 2547

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน
นักศึกษา	นางสาวพรรณทิพา ธงทอง
รหัสประจำตัว	44066401
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. จินตนา บุนนาค ดร. กฤษณา ภูเจริญ

บทคัดย่อ

เซลลูโลส เป็นโพลิแซกคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะβ - 1,4 link เป็นเยื่อใยที่พบได้มากในพืช เซลลูโลสถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเอนไซม์นี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยอาหารหยาบอยู่แล้ว แต่การเสริมเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารสัตว์ก็พบว่าช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ การแยกยีนที่แปรรหัสเป็นเอนไซม์เซลลูเลสชนิดใหม่จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ในขั้นต้นนำแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโคมาแยกและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) และ กระดาษกรอง เป็นสับสเตรท แบคทีเรียทั้งแบบกลุ่มและแบบโคโลนีเดี่ยวที่พบกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกคัดเลือกเพื่อแยกยีนเซลลูเลส โดยใช้เทคนิค PCR-based cloning technique ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ออกแบบมาจากลำดับอนุรักษ์จากกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ที่มีรายงานไว้แล้ว ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จะนำไปเชื่อมต่อกับ pGEM®T-Easy vector ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งจะนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในลำดับต่อไป ผลที่ได้พบว่าโคลนที่ 10.4 และ 11.3 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 800 เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีนเซลลูเลส ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันกับยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* โดยผลการทดลองสามารถบอกถึงความเป็นไปได้ในการที่จะได้ยีนเซลลูเลสชนิดใหม่จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน การหาลำดับของยีนทั้งหมดจากแบคทีเรียโดยเทคนิค Genome walking และการโคลนยีนนี้เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ต่อไปในอนาคต

Thesis Title	Molecular Cloning of Cellulase Gene from Ruminal Bacteria
Student	Miss Pantipa Thongtong
Student ID.	44066401
Degree	Master of Science
Programme	Animal Science
Year	2004
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Yanin Opatpatanakit
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Jintana Bunnak
	Dr. Krisana Phucharoen

ABSTRACT

Cellulose, a polysaccharide composed of β-1,4-link glucose units, is the most abundant fiber in plants. Cellulases which are involved in hydrolysis of cellulose have been found in several microorganisms. They are important for several industries, especially in animal feeds. Although ruminal bacteria exhibited multiple cellulase activities for digesting forage, supplementation of cellulases in the animal feeds will accelerate ruminant growth and production. This study aimed to isolate genes encoding novel cellulase enzymes from the ruminant bacteria. The bacteria from cattle rumen were isolated and screened for cellulolytic activities using Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) and filter paper as substrates. Both bacterial group and single isolates that exhibited cellulolytic activities were selected for amplification of cellulase genes by PCR-based cloning technique. The primers used in this study were designed from the conserved amino acid sequences of known cellulase enzymes. The resulting PCR products were cloned into pGEM®-T Easy vector and the DNA inserts in the obtained recombinant plasmids were subjected for nucleotide sequencing. Two clones, No.10.4 and 11.3 with 800 bp PCR fragment were shown to contained partial cellulase genes. Both had 81% identities to the *endB* gene from *Ruminococcus flavefaciens*. These results suggested the possibility to obtain novel cellulase enzymes from isolated ruminal bacteria. Further identification of full length cellulase genes from these bacteria can be done by Genome walking. Cloning of this full length gene will be useful for enzyme improvement and applications.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้อย่างดีด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.จินตนา บุนนาค จากคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม และ ดร. กฤษณา ภูเจริญ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ และ รองศาตราจารย์ ดร.สุชีพ สุขสุแพทย์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นักวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ห้องปฏิบัติการ Molecular and Enzyme Screening ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจอันสำคัญในการวิจัยในวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

พรรณทิพา ธงทอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....3

1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....3

1.5 ระยะเวลาในการวิจัย.....3

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 คาร์โบไฮเดรต.....3

2.1.1 ลักษณะโครงสร้างเซลลูโลส.....4

2.1.2 ระบบเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส.....6

2.2 ระบบการย่อยของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....7

2.2.1 การย่อยคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน.....8

2.2.2 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....12

2.2.3 แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะรูเมน.....14

2.3. พันธุวิศวกรรมของแบคทีเรีย.....22

2.3.1 องค์ประกอบที่สำคัญในการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม.....22

2.3.2 หลักการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมแบคทีเรีย.....23

2.3.3 พันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....32

3.1 สัตว์ทดลอง....32

3.2 อุปกรณ์....32

3.3 สารเคมี....32

3.4 วิธีการ....33

3.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส....33

3.4.1.1 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน....33

3.4.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย Whatman No.1 filter paperและ CMC agar....33

3.4.2 การตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์....35

3.4.2.1 การเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการโดยเทคนิคพีซีอาร์....35

3.4.2.2 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า....37

3.4.3 การถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและการตรวจสอบโคลนที่ได้....37

3.4.2.3 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส....37

3.4.3.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับดีเอ็นเอพาหะ....39

3.4.3.2 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E.coli*....40

3.4.3.3 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม....40

บทที่ 4 ผลการทดลอง....43

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส....43

4.2 ผลการตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์จากเซลลูเลสแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์....47

4.2.2 การตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้....47

4.2.3 การตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์....50

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและการตรวจสอบโคลนที่ได้.....52
4.3.1 การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด.....52
4.3.2 การตรวจสอบลำดับเบส.....58

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....65
5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้.....65
5.2 การตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์.....66
5.3 การถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและการตรวจสอบโคลนที่ได้.....67

บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ.....71

บรรณานุกรม.....72

ภาคผนวก ก.....78

ภาคผนวก ข.....84

ประวัติผู้เขียน.....94

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระเพาะรูเมน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างสปอร์ 15

2.2 เปรียบเทียบอัตราในการย่อย crystalline cellulose โดยจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ 18

2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน 19

2.4 แสดงยีนที่ถูกโคลนจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน 26

2.5 รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้จากการโคลนยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน 27

3.1 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการทาง PCR 32

3.2 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับดีเอ็นเอพาหะ 35

3.3 แสดงองค์ประกอบและอัตราส่วนที่ใช้ในปฏิกริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์*Eco*RI 38

4.1 แสดงระยะเวลาในการย่อย Whatman No.1 filter paper ในแต่ละตัวอย่าง 39

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างวงใสได้บนอาหาร CMC agar 42

4.3 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากตัวอย่างดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยและ ดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์ ที่เกิดกิจกรรมบนอาหาร CMC agar 44

4.4 แสดงโคลนที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 54

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงการเชื่อมต่อของกลูโคสในโครงสร้างของเซลลูโลส....5

2.2 แสดงการจัดเรียงทางโมเลกุลในโครงสร้างของเยื่อใย....5

2.3 แสดงแบบในการทำงานในองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จาก *Trichoderma reesei* 7

2.4 แสดงการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน....11

2.5 แสดงการหมักคาร์โบไฮเดรตของ *R.flavefaciens* ในการมีและไม่มีแบคทีเรียที่ผลิตมีเธน....12

2.6 แสดงการเข้าย่อยเซลลูโลสของจุลินทรีย์ที่มี cellulosome....17

2.7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ตัดเฉพาะ(restriction enzyme)....23

2.8 แสดงวิธีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในแบคทีเรีย....25

3.1 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานในขั้นตอนที่ 3.3.1....31

3.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์....35

4.1 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของโค....41

4.2 แสดงหลอดที่พบการย่อยของกระดาษกรองในอาหาร Mc Beth' Cellulose Ammonium Sulfate Solution....41

4.3 แสดงการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA....42

4.4 ลักษณะวงใส(clear zone)รอบโคโลนีของแบคทีเรียจากการทดสอบในอาหารแข็ง CMC....42

4.5 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยเป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC1 ในการตรวจสอบยีน....45

4.6 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยเป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC2 ในการตรวจสอบยีน....46

4.7 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้เชื้อบริสุทธิ์เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC1 ในการตรวจสอบยีน....47

4.8 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้เชื้อบริสุทธิ์เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC2ในการตรวจสอบยีน....48

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.9 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน 6-1 ,6-2 และ6-4 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I.....50

4.10 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน 10-4 ,10-10,11-1,11-3,12-2,12-3,12-4,12-5 และ 12-6 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I.....54

4.11 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน C1.3/1 ,C1.3/2, C1.3/6,C3.2/1,R14-2, R14-5, R14-7,R14-8 และ R14-9 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I.....55

4.12 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน R08-3 , R10-2, R10-4, R09-4, R09-6, R09-7 และ R09-8 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I.....57

4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน 10.4.....58

4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน 11.3.....59

4.15 ผลจากการ BLAST ของโคลน10.4 เพื่อเทียบความคล้ายคลึงกับยีนอื่น ที่มีในฐาน ข้อมูลGenBank.....60

4.16 ผลจากการ BLAST ของโคลน11.3 เพื่อเทียบความคล้ายคลึงกับยีนอื่น ที่มีในฐานข้อมูลGenBank.....60

4.17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ที่ได้จากโคลน 10.4 กับโคลน 11.3 ด้วยโปรแกรม ClustalW(ddbj),Identity 84 เปอร์เซ็นต์.....61

4.18 แสดงความสัมพันธ์ลำดับกรดอะมิโนจากโคลน 10.4 และ11.3 กับลำดับกรดอะมิโน ของยีนในกลุ่ม *CelB* โดย *endB* แสดง *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117)และ *celB* แสดง *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1(U08621).....62

4.19 แสดงไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117) และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621) 63

4.20 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ โดยโครโมโซม ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใย(C3-C4) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117) และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621) ในการ ตรวจสอบยีน.....64

5.1 แสดงการทำ Genome walking.....70

ก.1 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy.....82

ข.1 แสดงความสัมพันธ์ของยีนในกลุ่มเซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข.2 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 1.....86
ข.3 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 2.....87
ข.4 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 3.....88
ข.5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบ.....89
ข.6 แสดงบริเวณที่ใช้ออกแบบไพร์เมอร์เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีน.....93

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ได้รับการพัฒนามากขึ้นหลาย ๆ ด้าน ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ การจัดการฟาร์ม และที่สำคัญได้แก่ด้านอาหารสัตว์ ซึ่งต้องมีความเหมาะสมกับความต้องการทางร่างกายของสัตว์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่ดีได้ต่อไป วัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนมากได้มาจากพืชซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานและโปรตีนสำหรับสัตว์ ได้แก่เมล็ดธัญพืชและผลพลอยได้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพดเป็นต้น วัตถุดิบจะมีประโยชน์กับสัตว์มากน้อยประการใดขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยและการดูดซึมของสัตว์ วัตถุดิบที่ได้จากพืชมักมีองค์ประกอบที่ขัดขวางต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารของสัตว์ ที่เรียกว่าสารต้านโภชนะ (Antinutritional Factor, ANF) อันได้แก่ เซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่ได้จากผลพลอยได้ทางการเกษตร มักมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ (วิเชียร ลีสุข. 2532) การปรับปรุงคุณค่าของวัตถุดิบเหล่านี้ให้มีคุณค่าสูงขึ้นและให้ใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ในอาหารสัตว์สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ วิธีการทางกายภาพ เช่นการสับหรือการบดซึ่งพบว่าสัตว์สามารถกินได้มากขึ้น แต่ความสามารถในการย่อยได้อาจลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง การย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง หรือการย่อยสลายทางเคมีโดยการหมัก จะย่อยสลายทุกองค์ประกอบอย่างไม่จำเพาะซึ่งการย่อยสลายโดยวิธีนี้ใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรงเช่นใช้อุณหภูมิสูง ทำให้สูญเสียพลังงานมากแล้วน้ำตาลที่ได้อาจมีการทำปฏิกริยาต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้การหมักพืชประเภทอาหารหยาบถ้าเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง อาจทำให้จุลินทรีย์มีพิษบางชนิด เช่น *Clostridium* สามารถเจริญได้ทำให้มีกลิ่นไม่น่ากินมากขึ้น (ทองเลียน บัวจูม. 2541)

การปรับปรุงคุณค่าทางอาหารสัตว์สามารถทำได้อีกวิธีหนึ่ง คือ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme) การย่อยสลายเยื่อใยด้วยเอนไซม์เป็นการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีการทำปฏิกิริยาต่อไป ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นั้นก็คือ การทำงานของโปรตีนที่มีความสามารถย่อยโมเลกุลที่ซับซ้อนให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ในรูปที่สามารถดูดซึมได้ การใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์พบว่าสามารถลดสารต้านโภชนะที่มีอยู่ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ซึ่งจะเป็นตัวที่ขัดขวางการย่อยและการดูดซึมทำให้สัตว์ได้รับสารอาหารไม่เต็มที่ เป็นผลให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและนอกจากนั้นยังพบว่าการใช้เอนไซม์สามารถเพิ่มการใช้ประโยชน์ของแป้ง ลดความแปรปรวนของคุณค่าทางอาหารที่มีในพืช รวมทั้งยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ออกมากับมูลสัตว์ได้อีกด้วย (เล่าแจ้ง. 2546)

ปัจจุบันเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ส่วนมากได้มาจากจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย เช่น *Bacillus sp.* หรือเชื้อรา *Trichoderma sp.* และ *Aspergillus sp.* (Rode and Beauchemin. 1998) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายกลับไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพง การนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทำให้ต้นทุนสูงขึ้น ดังนั้นมีการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ใหม่ๆขึ้นภายในประเทศก่อให้เกิดประโยชน์ต่ออาหารสัตว์และเป็นแนวทางในการลดต้นทุนด้านอาหารสัตว์ได้ต่อไป

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้มากเป็นสิ่งที่ควรศึกษา จุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนมากอยู่ในกลุ่มเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบได้ตามแหล่งธรรมชาติต่างๆ ที่มีเซลลูโลส กระเพาะส่วนต้นของสัตว์เคี้ยวเอื้องก็มีความสามารถในการย่อยอาหารที่มีเยื่อใยหรือเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบได้ เนื่องจากมีจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้มากมาย อันได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Fibrobacter succinogenes* โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบมากที่สุดในกระเพาะสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก (เมธา วรรณพัฒน์. 2533) รุจิกาญจน์ นาสนิท (2546) สามารถแยกแบคทีเรียเพื่อนำมาพัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ และยังรายงานว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงและความเป็นกรดเป็นด่างได้ดีกว่าเชื้อรา นอกจากนี้ในปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) สามารถนำมาใช้ในการตัดต่อยีน (gene) ที่ทำหน้าผลิตเอนไซม์นี้ไปยังจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเพื่อผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นและมีกิจกรรมที่รวดเร็วขึ้นกว่าเดิม ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อตรวจสอบและค้นหาชิ้นของยีนเซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การค้นพบลำดับยีนที่สมบูรณ์ซึ่งสามารถนำไปตัดต่อและพัฒนาเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งย่อยสลายเซลลูโลสได้
2) เพื่อตรวจสอบยีนใหม่ ๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยวิธีพีซีอาร์
3) เพื่อศึกษาวิธีการและเทคนิคในการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสไปยัง *Escherichia coli*

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1) ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2) ห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3) ห้องปฏิบัติการ Molecular and Enzyme Screening หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสใหม่ ๆจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอนที่ 3 ถ่ายทอดยีนเซลลูเลสไปยัง *Escherichia coli* และตรวจสอบโคลนที่ได้

1.5 ระยะเวลาในการวิจัย

ใช้เวลาในการดำเนินงานวิจัยตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2544 ถึง มกราคม 2547

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้

2) สามารถได้ชิ้นส่วนของยีนใหม่ ๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3) สามารถทราบวิธีการและเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสไปยัง *Escherichia coli*

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

คาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช มีมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งในต้นพืชและอาจมากถึง 85 เปอร์เซ็นต์ในเมล็ดพืช คาร์โบไฮเดรตนับเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์พบว่าเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานที่ใช้ในการทำกิจกรรมต่างๆ เพื่อการดำรงชีวิตและการให้ผลผลิต ในการจัดจำแนกทางโภชนศาสตร์ คาร์โบไฮเดรตสามารถแบ่งได้เป็นได้เป็น 2 ประเภท (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

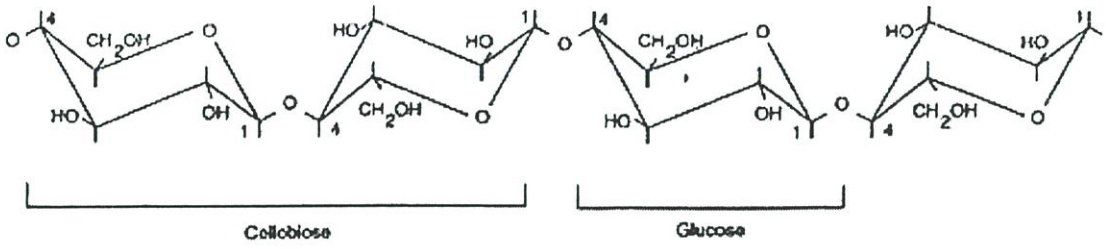
1) คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non – structural carbohydrate หรือ storage – polysaccharide) มีหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร โดยเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์พืชและสัตว์ ได้แก่ แป้ง และไกลโคเจน ซึ่งถูกย่อยสลายได้ง่ายจึงสามารถใช้ประโยชน์ได้ง่าย

2) คาร์โบไฮเดรตโครงสร้าง (Structural carbohydrate) มีหน้าที่เป็นโครงสร้างของพืช ที่ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน ลิกนิน โดยเซลลูโลสเป็นโพลิแซกคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีมากที่สุดในพืช ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ถูกย่อยสลายได้ยาก

2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

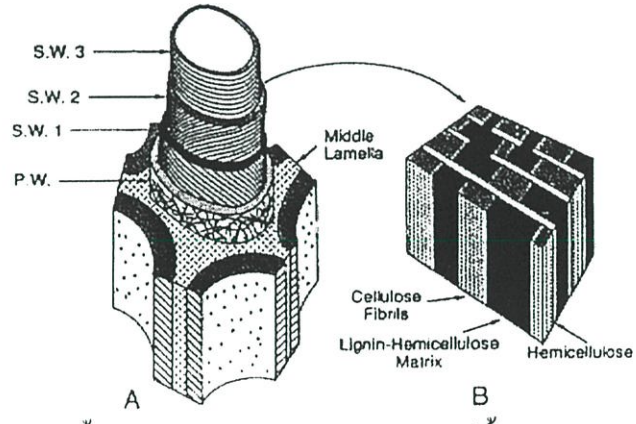
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลิแซกคาไรด์ ที่พบได้ทั่วไปในพืชโดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ (วิเชียร ลีสุข. 2532) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำและไม่ลายในกรดหรือด่างอ่อน เนื่องจากพันธะที่ยึดภายในโมเลกุลมีความแข็งแรงสูง ซึ่งลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β1,4 linkage หนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสจะประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสระหว่าง 100 ถึง 14,000 หน่วยย่อย (Beguin and Aubert. 2000) การจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะ chair form ดังแสดงในภาพที่ 2.1 แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง (พรเทพ ถนนแก้ว. 2538) ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ผนังเซลล์ชั้นที่สองของพืชมีเซลลูโลสอยู่มากจะมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มยาวเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งแต่ละสายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบเรียกว่า crystalline ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงไม่

เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกว่าบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline ซึ่งในบริเวณนี้จะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบ (Reese. 1976)



ภาพที่ 2.1 แสดงการเชื่อมต่อของกลูโคสในโครงสร้างของเซลลูโลส Beguin and Aubert (2000)

ในธรรมชาติเซลลูโลสมักอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส โดยเชื่อมต่อกับโพลิแซกคาไรด์อื่น ๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และฟีโนลิก จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่าในส่วนของ secondary cell wall เป็นส่วนที่พบเซลลูโลสอยู่มากที่สุดและจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะพบมากอยู่ในส่วนของ middle lamella (Beguin and Aubert. 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2.2



A = แสดงลักษณะชั้นของผนังเซลล์พืช; P.W, ผนังเซลล์ชั้นแรก; S.W.1-S.W.3, ผนังเซลล์ชั้นที่ 2

B = แสดงความสัมพันธ์ของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสที่อยู่ชั้นที่ 2 เซลล์ที่มีขนาดประมาณ 25 μm

ภาพที่ 2.2 แสดงการจัดเรียงทางโมเลกุลในโครงสร้างของเยื่อใย (ดัดแปลงจาก Beguin and Aubert. 2000)

2.1.2 ระบบเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสสามารถถูกเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพได้เป็นกลูโคสโดยกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า เซลลูเลส ซึ่งจะย่อยเซลลูโลสโดยตัดพันธะ glycosidic ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแบบ multicomponant enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน (ภาพที่ 2.3) คือ endo-β-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-β-glucanase (EC 3.2.1.91) และ β-glucosidase (EC 3.2.2.21) ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกันดังนี้ (Reese *et al.* 1950; Sternberg *et al.* 1977; Beguin and Aubert. 2000)

1) Endo-β-glucanase หรือ 1,4 -β-D-glucan glucanohydrolase หรือ CMCase ทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลเซลลูโลสทั้งในรูปแบบที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ โดยตัดพันธะ β 1,4-glycosidic ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิดคือกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

2) Exo-β-glucanase หรือ 1,4 -β-D-glucan cellobiohydrolase หรือ avicelase ทำหน้าที่ในการย่อยเซลลูโลสโดยตัดพันธะของ β 1,4-glycosidic จากด้านปลายของ non - reducing end ไปอย่างมีระเบียบ ทำให้ได้เซลโลไบโอสและกลูโคสในปริมาณที่น้อย น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของผลผลิตจาก β เป็น α- configuration (inversion)

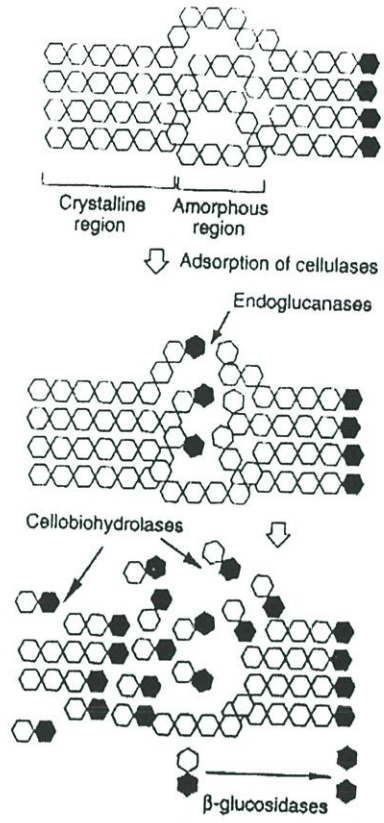
3) β-glucosidase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของ cellobiose และcellooligosaccharide ให้เป็นกลูโคส เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการทำงานร่วมกับเอนไซม์ endo และ exo - β-glucanase ที่จะย่อยเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสขึ้นอยู่กับลักษณะของเอนไซม์และลักษณะของเซลลูโลส โดย crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้สับสเตรทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันได้แก่ filter paper และ avicel ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase ส่วนเซลลูโลสที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียว ได้แก่

1) acid-swollen cellulose, carboxymethy-cellulose(CMC), carboxymethyl-cellulose cellulose azure, trinitrophenyl และ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Endoglucanase

2) methylumbelliferyl-β-D-cellobiose(MMC) และ p-nitrophenyl-β-D-cellobioside (pNPC) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Exoglucanase

3) MUG (methylumbelliferyl-β-D-glycopyranoside และ pNPG (p-nitrophynyl - β-D - glycopyranoside) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-glucosidase (Han *et al.* 1995)



ภาพที่ 2.3 แสดงแบบในการทำงานในองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จาก *Trichoderma reesei* (ดัดแปลงจาก Beguin and Aubert. 2000)

2.2 ระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

สัตว์เคี้ยวเอื้องมีกลไกในการย่อยอาหารที่แตกต่างจากสัตว์ประเภทอื่น โดยสัตว์เคี้ยวเอื้องมีระบบการย่อยที่ซับซ้อน มีความสามารถในการย่อยอาหารประเภทเยื่อใยที่ย่อยสลายได้ยากซึ่งเอนไซม์ในตัวสัตว์เองไม่สามารถจะย่อยได้ เนื่องจากสัตว์เคี้ยวเอื้องมีกระเพาะประกอบด้วย 4 ส่วน (เมธา วรรณพัฒน์. 2533)

1) กระเพาะหมักหรือกระเพาะรูเมน (Rumen) กระเพาะส่วนนี้มีความจุถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมด

2) กระเพาะรังผึ้งหรือเรติคูลัม (Reticulum) มีความจุประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ อาหารในรูปของแข็งและของเหลวสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้สะดวก

3) กระเพาะสามสิบกลีบหรือโอมาซัม (Omasum) มีความจุประมาณ 7 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นทางผ่านอาหารและดูดซึมของเหลวกลับทำให้อาหารมีลักษณะแห้งสะดวกในการเคลื่อนที่ลงสู่กระเพาะจริง

4) กระเพาะจริงหรืออะโบมาซัม (Abomasum) ทำหน้าที่ทุกอย่างคล้ายกับกระเพาะของสัตว์กระเพาะเดี่ยว เพราะภายในมีต่อมที่ทำหน้าผลิตน้ำย่อยกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อเมือก ส่วนปลายของกระเพาะเปิดเข้าสู่ส่วนลำไส้เล็ก

กระเพาะรูเมนเป็นส่วนของกระเพาะที่มีความสำคัญมากที่สุดสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพราะกระบวนการหมักย่อยอาหารทั้งหมดจะเกิดบริเวณนี้ประมาณ 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในกระเพาะรูเมนมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจุลินทรีย์ที่สำคัญ 3 ประเภทหลักได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว แบคทีเรียมีขนาดเล็กแต่มีจำนวนประมาณครึ่งหนึ่งของประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งมีความสามารถในการหมักย่อยอาหารได้แตกต่างกัน

การหมักย่อยอาหารที่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ จะถูกควบคุมโดยสมดุลของระบบนิเวศวิทยาภายในกระเพาะรูเมน ซึ่งเป็นสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobe condition) มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 39 – 40 องศาเซลเซียส สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายเล็กน้อย เนื่องจากเกิดความร้อนในกระบวนการหมักย่อย มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 6.5 – 7.0 ซึ่งจะเหมาะสมกับการย่อยและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งนี้สภาวะนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่ได้แก่ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาในการได้รับอาหารในหนึ่งวัน ชนิดสัตว์ สภาวะทางด้านร่างกายของสัตว์ เป็นต้น

จุลินทรีย์ทำหน้าที่เปลี่ยนอาหารที่กินเข้าไปให้เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เหมาะสมกับความต้องการเพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างเป็นผลผลิตได้แก่เนื้อและนม คาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยได้ผลผลิตสุดท้าย ได้แก่ กรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) และกรดแลคติก ส่วนโปรตีนจะถูกย่อยจนได้ผลผลิตสุดท้าย คือ แอมโมเนีย ไนโตรเจน(NH_3-N) รวมทั้งผลผลิตอื่น ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นจากการหมักย่อย ได้แก่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ก๊าซมีเธน (CH_4) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนยังสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนและวิตามินให้เป็นแหล่งอาหารของสัตว์ได้อีกด้วย ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกย่อยภายในระบบทางเดินอาหารเพื่อเป็นแหล่งโปรตีน (microbial protein) ได้ต่อไป ดังนั้นจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจึงมีความสำคัญมากต่อการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541; วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2541; ทวีพร พูนดุสิต. 2544)

2.2.1 การย่อยคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน

กระบวนการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เริ่มต้นจากอาหารเมื่อผ่านการบดย่อยที่ปากมาในระดับหนึ่งและจะถูกส่งผ่านมาตามส่วนต่าง ๆ ของทางเดินอาหาร เริ่มที่กระเพาะส่วนแรก คือ กระเพาะเรติคูลัมและกระเพาะรูเมน โดยลักษณะของอาหารที่อยู่ในช่วงนี้จะมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อนหรือที่เรียกว่า bolus หลังจากนั้นจะมีการขยอกมาที่ปากเพื่อทำการเคี้ยวเอื้องอีกครั้งให้ละเอียดยิ่งขึ้น และจะทำการกลืนลงไปลงสู่กระเพาะรูเมนอีกครั้ง ซึ่งอาหารจะอยู่ในกระเพาะรูเมนนานประมาณ 8 – 9 ชั่วโมง โดยระยะนี้จะมีขบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ โดยจุลินทรีย์ก็จะปลดปล่อยเอนไซม์ (extracellular microbial enzyme) ออกมาย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส เพคติน แป้ง ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ น้ำตาลเฮกโซส (hexose: C_6) หรือ น้ำตาลเพนโตส (pentose: C_5) (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกุล. 2541) โดยอาหารคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ต่างชนิดกันออกไปดังนี้

1) เซลลูโลสจะถูกย่อยด้วย β – 1,4- glucosidase ให้เป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งจะถูกย่อยต่อไปจนได้กลูโคสและจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate โดยเอนไซม์ phosphorylase

2) แป้งและเดกซ์ทริน (dextrin) จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ได้เป็นมอลโทส (maltose) และไอโซมอลโทส (isomaltose) แล้วถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์มอลเทส (maltase) และมอลเทสฟอสฟอรีเลส (maltase phosphorylase) หรือ β-1,6-glucosidase ได้เป็น glucose - 1 - phosphate

3) คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของฟรุคแทน (fructans) (น้ำตาลฟรุกโตสที่จับกันเป็นสายยาว) จะถูกย่อยได้เป็นฟรุคโตส (fructose) นอกจากนี้ฟรุคโตสยังอาจเกิดจากการย่อยซูโครส (sucrose) ได้อีกด้วยเอนไซม์ซูเครส (sucrase)

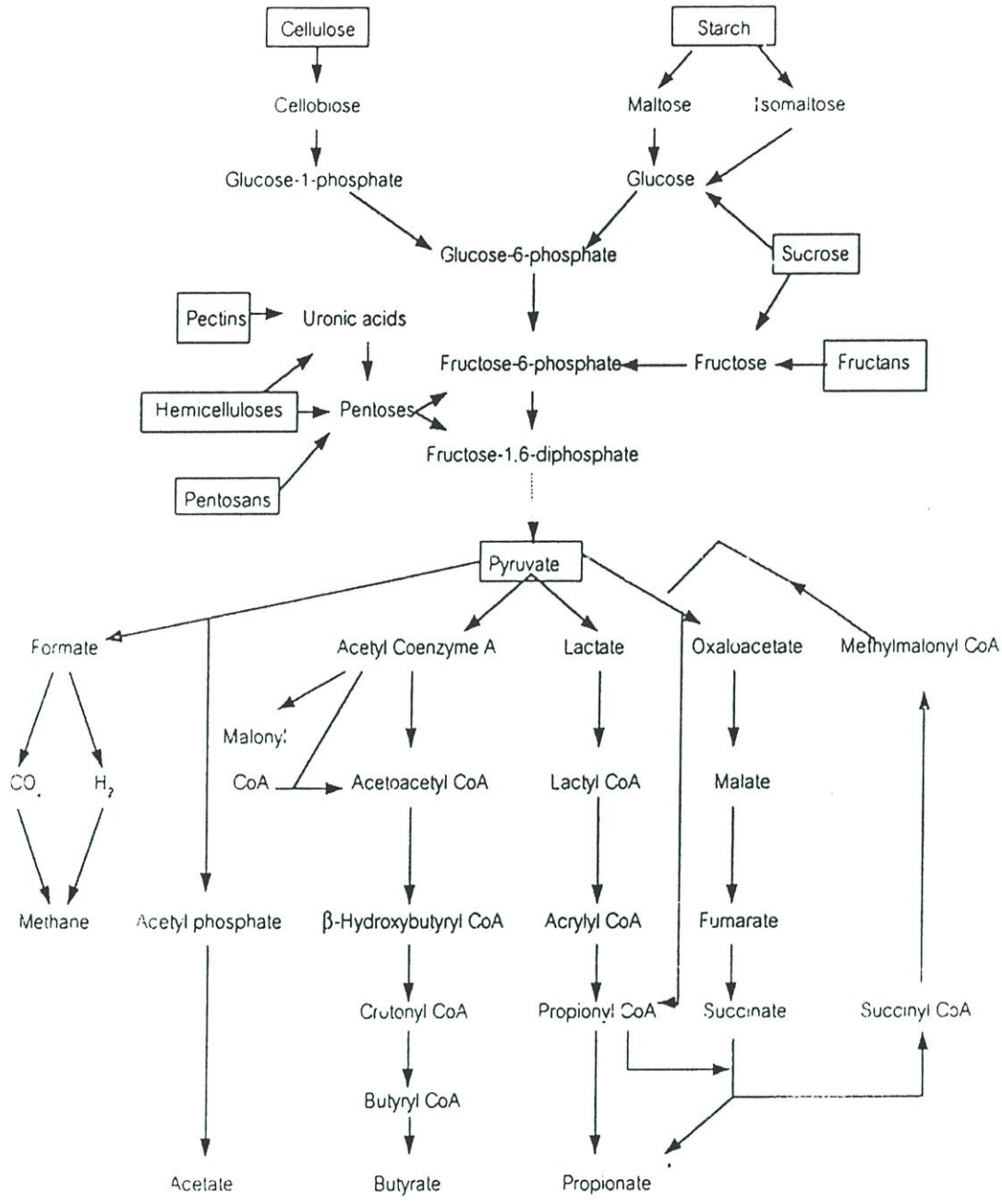
4) เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่ทำลาย β-1,4 xylosidic linkage ได้เป็นไซโลส (xylose) ซึ่งเป็นน้ำตาลเพนโตสและ กรดยูโรนิค (uronic acid) ซึ่งกรดยูโรนิค จะเปลี่ยนต่อไปเป็น ไซโลส ได้

5) เพคติน (pectin) จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ pectinesterase ได้เป็นกรดเพคติก (pectic acid) และเมทธานอล (methanol) ส่วนกรดเพคติก จะถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์ polygalacturonidase ได้เป็น galacturonic acid ซึ่งเป็นกรดยูโรนิคอีกตัวหนึ่ง ที่สามารถจะเปลี่ยนไปเป็นไซโลสได้ นอกจากนี้ไซโลสยังอาจเกิดจากการย่อย xylan ที่พบมากในหญ้า (ฉลอง วชิราภากร. 2541; บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

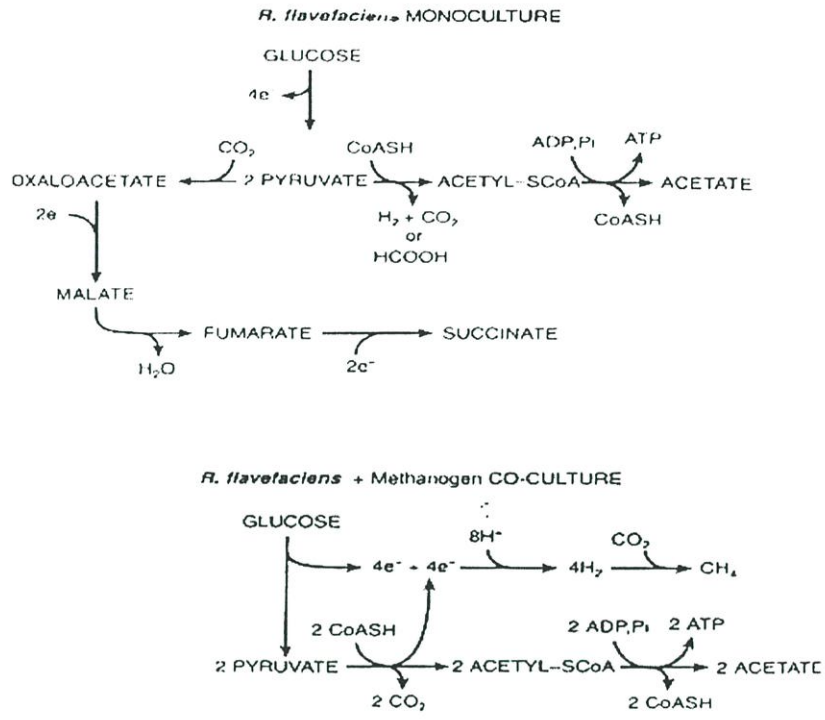
น้ำตาลเพนโตสที่ได้แก่ ไซโลส จะถูกเปลี่ยนเป็นเฮกโซส (hexose) และ ไตรโอสฟอสเฟต(triose phosphate) ในวิถีเพนโตส (pentose cycle) ซึ่งน้ำตาลเฮกโซสที่ได้ทั้งหมดจะถูกเมทาบอไลท์ เป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยขบวนการ Embden –Meyerhof glycolytic pathways ไพรูเวทที่เกิดขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้เป็นกรดไขมันระเหยได้ รวมทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และมีเธน (CH_4) ซึ่ง กรดไขมันระเหยได้ จะได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid: C_2) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid: C_3) และ กรดบิวทิริก (butyric acid: C_4) เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ส่วนกรดไขมันชนิดอื่น ๆ ที่ได้แก่ ไอโซบิวทิริก (isobutyric) เมทธิลบิวทิริก (methybutyric) และวาเลลิก (valeric) จะพบได้ปริมาณน้อย (ฉลอง วชิราภากร. 2541; บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2541)

การผลิตกรดไขมันระเหยนี้จะเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ โดยชนิดของผลผลิตที่ได้จากการหมัก pyruvate จะขึ้นอยู่กับ metabolic pathways ของจุลินทรีย์

แต่ละชนิดและสภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโต (Patterson. 1992) เช่น การผลิตกรดไขมันระเหยได้ของ *R. flavefaciens* พบว่าจะได้อะซิเตทและซักซิเนท แต่เมื่ออยู่ร่วมกับพวกแบคทีเรียที่ผลิตมีเธน(Methanogen) จะพบว่าสามารถผลิตอะซิเตทและมีเธน (Wolin *et al.* 1997) ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งสามารถให้เหตุผลได้ว่า การผลิตกรดไขมันระเหยได้จำเป็นต้องเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมของจุลินทรีย์หลายชนิดในกระเพาะเพื่อให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Russell and Wallace. 1997) ปริมาณกรดไขมันระเหยได้ที่ผลิตได้จะแสดงออกในรูปอัตราส่วน หรือ molar ratio โดยทั่วไปในอาหารปกติจะมีอัตราส่วนของอะซิเตท 65 เปอร์เซ็นต์ โพรพิโอเนท 20 เปอร์เซ็นต์ บิวทิเรท 15 เปอร์เซ็นต์ อาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เช่น ถ้าให้อาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตย่อยง่ายมากและมีปริมาณเยื่อใยน้อย จะทำให้อะซิเตทผลิตได้น้อยลงและโพรพิออเนทจะเพิ่มมากขึ้น กรดไขมันระเหยได้ที่ผลิตได้ในกระเพาะหมัก ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะรูเมน กรดไขมันระเหยได้ที่ถูกดูดซึมจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในระดับเนื้อเยื่อและถือว่ามีความสำคัญมากกว่ากลูโคสซึ่งต่างจากสัตว์กระเพาะเดี่ยวทั่วไป (วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546) หลังจากการย่อยสับสเตรทในกระเพาะอาหารของจุลินทรีย์แล้วพลังงานที่ได้จะถูกนำไปสร้างเป็นโปรตีนของตัวมันเอง (microbial protein) และมีการเพิ่มจำนวนขึ้น โปรตีนจุลินทรีย์นี้จะไม่ถูกย่อยในรูเมนและจะผ่านมาถึงอะโบมาซัมแล้วไปต่อยังส่วนลำไส้เล็ก ซึ่งบริเวณนี้โปรตีนทั้งหมดจะถูกย่อยโดยน้ำย่อยที่มีในลำไส้เล็กเหมือนกับสัตว์กระเพาะเดี่ยว ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ ซึ่งจะถูกดูดซึมได้ในส่วนลำไส้เล็ก (ฉลอง วชิราภากร. 2541)



ภาพที่ 2.4 แสดงการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)



ภาพที่ 2.5 แสดงการหมักคาร์โบไฮเดรตของ *R. flavefaciens* ในการมีและไม่มีแบคทีเรียที่ผลิตมีเธน (Methanogen) (Russell and Wallace. 1997)

2.2.2. แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

เนื่องจากสภาวะในกระเพาะรูเมนเป็นสภาวะที่ไร้ออกซิเจน จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Obligate anaerobe) แต่พบว่าอาจมีจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้ง 2 สภาพ คือมีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ร่วมอยู่ด้วย แต่มีปริมาณที่น้อย ทั้งนี้พบว่าอาจติดเข้ามากับน้ำและอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (Patterson. 1992)

แบคทีเรียสามารถจำแนกได้ตามประเภทอาหารที่ใช้และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สร้างขึ้น (เมธา วรรณพัฒน์. 2533; Hungate. 1966; Church.1988)

1) แบคทีเรียที่ใช้เซลลูโลส (Cellulolytic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตน้ำย่อยเซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งจะเข้าย่อยสลายเซลลูโลส แบคทีเรียกลุ่มนี้ที่พบว่ามีมากที่สุดในกระเพาะของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก ชนิดที่สำคัญ คือ *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens, R. albus*

2) แบคทีเรียที่ใช้เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose digesting bacteria)

แบคทีเรียที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ที่สำคัญมี *Butyvibrio fibrisolvens* และนอกจากนั้นยังมี *Lachnospira multiparus, Fibrobacter succinogenes, Bacteroid ruminicola* สามารถย่อยได้ทั้งเฮมิเซลลูโลสได้และเพคตินได้ดีอีกด้วย

3) แบคทีเรียที่ใช้อะไมโลส (Amylolytic digesting bacteria)

แบคทีเรียนี้มีเป็นจำนวนมากในกระเพาะสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นพลังงานสูงซึ่งแบคทีเรียประเภทนี้จะผลิตเอนไซม์ α – amylase ออกมาทำการย่อยแป้งได้เป็นน้ำตาลได้ ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Bacteroid amylophilus, Succinomonas amylophilus, Butyrivibrio fibrisolvens, Selenomonas ruminantium, Streptococcus bovis* และ *Bacteroid ruminicola*

4) แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาล (Sugar utilizing bacteria)

แบคทีเรียที่กล่าวมาแล้วใน 3 กลุ่มแรกมีความสามารถย่อยและใช้น้ำตาลได้ แต่แบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 จะไม่สามารถย่อยโพลิแซกคาร์ไรด์ (polysaccharide) ได้ ต้องมีการใช้น้ำตาลที่มีอยู่เล็กน้อยในพืชหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแบคทีเรียชนิดอื่น หรือจากเซลล์ของแบคทีเรียที่แตกหรือตายแล้ว แบคทีเรียที่สำคัญที่สามารถย่อยและใช้น้ำตาลได้แก่ *Eubacterium ruminantium* และ *Lactobacilli sp.*

5) แบคทีเรียที่ใช้กรด (Acid utilizing bacteria)

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถใช้กรดได้ เช่น กรดฟอร์มิก อะซิติก มาลิค ฟูมาลิค แลคติก และซักซินิค แบคทีเรียชนิดที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Veillonella gazagenes, V.alacalescens, Propionic bacterium, Selenomonas ruminantium, Peptostreptococcus elsdenii, Selenomonas lactilytia*

6) แบคทีเรียที่ใช้โปรตีน (Proteolytic bacteria)

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถใช้อะมิโนเป็นแหล่งพื้นฐาน แบคทีเรียที่สามารถใช้โปรตีนได้ดีที่สุดคือ *Bacteroid amylophilus* สำหรับแบคทีเรียที่ทำงานได้ดีที่สุดคือ *Bacteroid ruminicola* ซึ่งต้องการคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วย

7) แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย (Ammonia – producing bacteria)

แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนียชนิดที่สำคัญได้แก่ *Bacteroid ruminocola, Selenomanas ruminantium, Peptostreptococcus elsdenii* และบางสายพันธุ์ของ *Butyrivibrio*

8) แบคทีเรียที่ผลิตมีเธน (Methanogenic bacteria)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างมีเธนในกระเพาะรูเมนที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจน กับ คาร์บอนไดออกไซด์หรือ ฟอร์เมทได้ ซึ่งได้แก่ *Methanobacterium ruminotium* และ *M. Formicium*

9) แบคทีเรียที่ใช้ไขมัน (Lipolytic bacteria)

ในอาหารสัตว์พบว่ามักจะมีส่วนประกอบของไขมันที่เป็นสายยาว ๆ ซึ่งจะถูกไฮโดรไลด์อย่างรวดเร็วโดยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ แต่แบคทีเรียที่สำคัญมีเพียงชนิดเดียว คือ *Anaero vibrio lipolitica* ซึ่งกรดไขมันสายยาวๆ ที่ไม่อิ่มตัวจะถูกไฮโดรจิเนท (Hydrogenate) ให้เป็นกรดไขมันอิ่มตัวในกระเพาะรูเมน

10) แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (Vitamin – systhesizing bacteria)

แบคทีเรียหลายชนิดแต่ไม่ทราบชนิดที่แน่นอนสามารถสังเคราะห์ไวตามินบีรวมได้

แบคทีเรียในบางกลุ่มสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งความต้องการทางโภชนะของแบคทีเรียในการเจริญเติบโตแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป บางชนิดสามารถใช้ได้ทั้งแอมโมเนีย กรดอะมิโนและโปรตีนเป็นแหล่งของไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ส่วนแหล่งพลังงาน แบคทีเรียจะได้จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตต่างๆ ที่ย่อยได้ (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

2.2.3 แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะรูเมน

เนื่องจากเซลลูโลสมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำและนำผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส โดยลักษณะการเข้าย่อยสลายเซลลูโลสจะแตกต่างกันออกไป (พรเทพ ถนนแก้ว. 2538) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนพบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ชนิดที่สำคัญได้แก่ *Cellulomonas thermocellum* ซึ่งจะย่อยสลายเซลลูโลสในบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างที่มีระเบียบ (crystalline)ได้ดี เนื่องจากมี multienzyme cellulose หรือที่เรียกว่า cellulosome ที่มีมวลโมเลกุลสูง แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่มีลักษณะของเอนไซม์ที่คล้ายคลึงกันได้แก่ *Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens, Fibrobacter succinogenes, A. cellulolyticus* และ *C. cellulovorans* สามารถผลิต cellulosome ได้ (Bhat and Hazlewood. 1998) โดยมีหลายงานวิจัยที่ได้พยายามคัดเลือกและจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระเพาะรูเมนดังนี้

Bryant (1959) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนและสามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างสปอร์ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ spore forming rods, non-spore forming rods และ non- spore forming cocci ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งในกลุ่ม spore-forming rods มีแบคทีเรียชนิดที่สำคัญคือ *Clostridium lochheadi* แต่พบได้ในปริมาณน้อย แบคทีเรียชนิดที่สำคัญในกลุ่ม non- spore forming rods ได้แก่

Bacteroid succinogenes และ *Butyrivibrio fibrisolvens* ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มสุดท้าย non-spore forming cocci ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens* และ *Ruminococcus albus*

ตารางที่ 2.1 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระเพาะรูเมน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างสปอร์

Microorganism	Reference
Spore forming rod	
Clostridium cellobioparum	Hungate 1944
Microminospora propionic	Hungate 1946
Non- Spore forming rod	
Butyruivibrio fibrisolvens	Bryant *et al.* 1956
Eubacterium cellulosolvens	Bryant *et al.* 1958
Bacteroid ruminicola	Bryant *et al.* 1958
Succinomonas succinogenes	Bryant *et al.* 1958
Bacteroides succinogenes	Hungate 1950
Butyrivibrio alactacidigens	Hungate 1956
Non- Spore forming cocci	
Ruminobacter parum	Sijpesteijn 1948
Ruminococcus flavefaciens	Sijpesteijn 1951
Ruminococcus albus	Hungate 1957

ที่มา : Bryant (1959)

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ (2527) คัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะส่วนต้นของโคในประเทศไทยได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ และพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้คือ สายพันธุ์ CU1, CU3 และ CU4 ซึ่งมีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Rumen fluid cellulose agar (RFCA) ผลผลิตที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสแล้วจะได้ อะซิติก ซักซินิก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Van (1990) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะส่วนรูเมนของโคนมที่ได้รับหญ้าหมักเป็นอาหารพื้นฐาน โดยใช้สับสเตรทในการเพาะเลี้ยงเชื้อขั้นแรกเป็น glucose, strach, cellobiose และ xylan (GSCX medium) ซึ่งจะใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทุกชนิด หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ (cellulolytic bacteria)

โดยใช้สับสเตรทเป็น ball- milled และ Whatman No.1 fillter paper cellulose จากนั้นนำแบคทีเรีย 22 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส จำแนกตามสัญฐาณวิทยาและผลผลิตที่เกิดขึ้นได้ โดย 9 สายพันธุ์มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Eubacterium cellulosolvens* ส่วน 7 สายพันธุ์คล้ายคลึงกับ *Ruminococcus flavefaciens* แบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์ มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Ruminococcus albus* และอีก 4 สายพันธุ์ที่เหลือสามารถจำแนกได้เป็น *Butyrivibrio fibrisolvens*

สายสมร ลำยอง และคณะ (2533) ได้แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคพันธุ์พื้นเมืองด้วยอาหาร cellulose agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ได้เชื้อทั้งหมด 101 ไอโซเลท เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวัดค่าการทำงานของเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ในสภาพไร้ออกซิเจน และศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ filter paper assay พบว่า *Ruminococcus albus* 21Aa ผลิตเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มี Whatman No.1 filter paper pulp เป็นแหล่งคาร์บอนและมี Tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ pH 6.8 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0166 U/ml

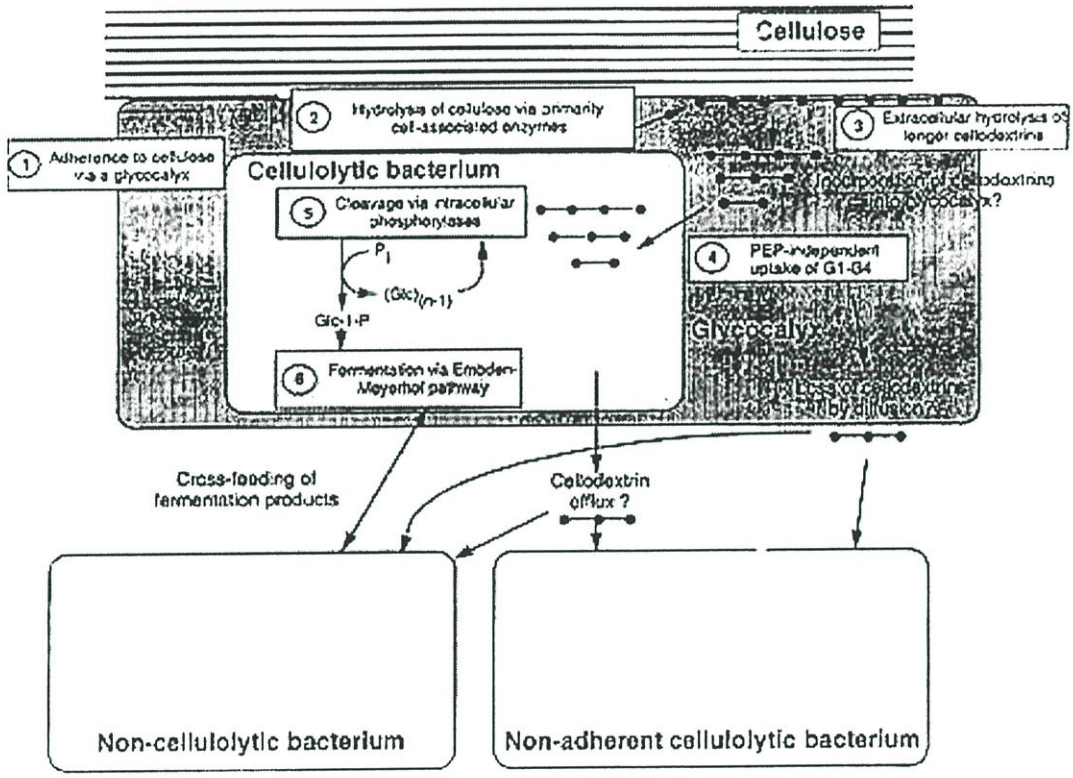
Vijayarani *et al.* (1994) สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะส่วนต้นของกระบือที่เลี้ยงด้วย lucerne และ paddy straw โดยจำแนกตามลักษณะทางสัญฐานวิทยาและการย่อยสับสเตรท พบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ มีลักษณะเป็นทรงกลม ทุกชนิดมีแคปซูล (capsule) ล้อมรอบเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และพบแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดียว เป็นสายสั้นๆ โคโลนีมีสีเหลืองรวมทั้งการย่อยสับสเตรทมีความคล้ายคลึงกับ *R. flavefaciens* ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์คู่ โคโลนีสีขาวและมีความสามารถในการหมักย่อยสับสเตรทคล้ายคลึงกับ *R. albus*

จากงานวิจัยดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะรูเมนมี 3 ชนิดหลัก คือ *Fibrobacter (Bacteroid) succinogenes, Ruminococcus flavefaciens* และ *Ruminococcus albus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวถึงความสำคัญของแบคทีเรีย 3 ชนิดนี้ (Yokayama and Johnson. 1988; Cheng *et al.* 1991; Patterson. 1992 ; Weimer. 1996)

กลไกในการเข้าย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีการสร้างลักษณะคล้ายอวัยวะที่ใช้ยึดเกาะกับผนังเซลล์ของพืช (Consortia) (Cheng *et al.* 1991) ซึ่งโดยมีลักษณะโครงสร้างเป็น glycocalyx ซึ่งทำให้แบคทีเรียเข้าเกาะยึดกับพืช สร้างโคโลนีบนผนังเซลล์ของพืช แล้วก็จะมีการปล่อย extracellular enzyme ออกมาย่อยเยื่อใยของพืช (Patterson. 1992) โดย Weimer (1996) รายงานว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้จะมี multienzyme complex อยู่ที่ผิวของเซลล์ หรือที่เรียกว่า cellulosome ที่จะมีหน้าที่ในการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียเองกับเซลลูโลส ซึ่ง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

cellulosome จะมีลักษณะโครงสร้างของ glycoprotein ที่เป็น glycocalyx ความสำคัญประการแรก คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสต่าง ๆ จะสามารถเข้าย่อยได้อย่างจำเพาะ และประการที่สอง คือ เป็นการป้องกันเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้น จากการทำลายของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดอื่น ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 แสดงการเข้าย่อยเซลลูโลสของจุลินทรีย์ที่มี cellulosome (Lynd *et al.* 2002)

Weimer (1996) ซึ่งได้มีการศึกษาการย่อยสับสเตรทแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่มีความสามารถย่อยเซลลูโลส 3 ชนิดหลักพบว่าสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

51514

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบอัตราในการย่อย crystalline cellulose โดยจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ[1]

Organism	Source	Substrate[2]	Rate constant (h^{-1})
Clostridium thermocellum	Nonrumen	AV	0.16
Ruminococcus flavefaciens	Rumen	SC	0.08
Fibrobacter succinogenes	Rumen	SC	0.02
Ruminococcus albus	Rumen	AV	0.05
Cellulomonas uda	Nonrumen	AV	0.027
Cellulomonas flavigena	Nonrumen	AV	0.06
White- rot fungi (5 species)	Nonrumen	Cot	<0.004
Brown – rot (8 species)	Nonrumen	Cot	<0.002

[1] ข้อมูลได้มาจากแหล่งที่แตกต่างกันรวบรวมโดย Weimer (1996)

[2] AV ย่อมาจาก microcrystalline cellulose PH101, SC ย่อมาจาก sigmacell 20 microcrytalline cellulose และ Cot ย่อมาจาก cotton cellulose

ที่มา : Weimer (1996)

เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและความสามารถในการทำงานแตกต่างกันดังแสดงใน ตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

Organism	Molecular weight	Activity optimum		pH and temperature stability	Apparent K_m[1/](mg/ml) (on indicate substrate[2/])	P_I[3/]	Reference
		pH	T (°C)				
Endoglucanase							
Fibrobacter succinogenes	>4000 Da สกัดจาก9-13% ของ endoglucanaseที่ไม่ได้ตกตะกอน และ45.0 kD จาก28-38 % ของ endoglucanase ที่ตกตะกอน	5.6-6.6 (partially purified endoglucanase)	50	การทำงานของเอนไซม์เหลือ 50%ที่ pH 5.1 และ15.1% ที่ pH7.7 ที่อุณหภูมิ 60°C นาน30 นาที	N.D	N.D	Grolean and Forsberg (1981)
F.succinogenes	65 kDa	6.4	39	การทำงานของเอนไซม์เหลือ 90%ที่ pH 5. และ25% ที่ pH7 ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 30 นาที	3.6(CMC)	4.8	McGavin and Forsbers (1988)
Ruminococcus Albus F-40	50 kDa	6.7	44	ไม่พบกิจกรรมที่อุณหภูมิ 70 °C 10 นาที	7.2(CMC,DS 0.6) 0.7(CMC,DS 0.95) 0.4(CMC,DS1.4)	N.D	Ohmiya *et al.* (1987)
R.albus sy-3	>1500 Da 30 kDa					 6.0-6.1	Wood *et al.* (1982)
R.flavefaciens 67	>3000 Da 89 kDa	6.4 6.4	45 45				Pettpher and Latham (1979)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Organism	Molecular weight	Activity optimum		pH and temperature stability	Apparent K_m [1/] (mg/ml) (on indicate substrate[2/])	P_I [3/]	Reference
		pH	T (°C)				
Exoglucanase							
F.succinogenes	75 kDa	6.2	39(with out Cl^- 45(with 0.2M Cl^-)	การทำงานของเอนไซม์เหลือ 30% หลังจาก 24 ชั่วโมง	0.1mM[pNP$(Glc)_2$]	6.7	Huang *et al.* (1988)
R.albus F-40	100.0 (SDS.PAGE) kDa	6.8	37	การทำงานของเอนไซม์เหลือ50%ที่อุณหภูมิ 40°C หลังจาก15ชั่วโมง	N.D	5.3	Ohmiya *et al.* (1982)
R.flavefaciens	>3000 Da	6.4 - 6.6	39		3.08mM[pNP$(Glc)_2$]		Pettipher and Latham
67	89 kDa	6.4 - 6.6	39		3.08mM[pNP$(Glc)_2$]		(1979)
R.flavefaciens	118(SDS-PAGE) kDa	5.0	39-45		2.2(pNPGlc)		Gardner *et al.* (1987)
FD-1	230(gel filter) kDa	5.0	39-45		26.0[$(Glc)_2$]		

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Organism	Molecular weight	Activity optimum		pH and temperature stability	Apparent K_m [1/] (mg/ml) (on indicate substrate [2/])	P_I [3/]	Reference
		pH	T (°C)				
β- Glucosidase							
R.albus F.40	82.0-116.0 kDa	6.5 (pNPGlc)	30-35	การทำงานของเอนไซม์เหลือ 80%ที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจาก 10 นาที	2.2 (pNPGlc) 26[$(Glc)_2$]		Ohmiya *et al.* (1982)
	85 (แสดงออกใน *E.coli*) kDa	6.0-6.5	37				Honda *et al.* (1988)
R.flafaciens		6.4 (oNPGlc)	40		Glc0.267 mg/ml (oNPGlc)		Pettpher and Latham (1979)

[1/] K_m คือ ค่าคงที่ของไมเคลิส (Michaelis constant) หรือความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรท

[2] สับสเตรท: CMC, carboxymethylcellulose; pNP(Glc), *p* –nitrophenyl-β- D-glucoside; oNPGlc, ;$(Glc)_2$, D-glucoside

N.D = ไม่สามารถตรวจสอบได้

[3/] P_I คือ Isoelectric point

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rapp and Beermann (1991)

2.2 พันธุวิศวกรรมของแบคทีเรีย

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หรือ รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี (Recombinant DNA technology) ในการเปลี่ยนแปลงยีนตามประสงค์ (Gene manipulation) หรือ การโคลนดีเอ็นเอ (DNA Cloning) หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอหรือยีนแล้วนำยีนที่เปลี่ยนแปลงเข้าไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ มียีนที่ใส่เข้าไปและยีนนั้นสามารถแสดงออกได้และถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ (ปรีชา ประเทพา. 2543; ศิริพร สิทธิประณีต. 2543)

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนหรือส่วนที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมในการผลิตเอนไซม์มายังสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากขึ้นกว่าเดิมเป็นวิธีการหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียเพื่อช่วยย่อยและเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ต่อไป

2.3.1 องค์ประกอบที่สำคัญของเทคนิคพันธุวิศวกรรม

เทคนิคพันธุวิศวกรรมสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสมกับขนาดของยีนและเซลล์เป้าหมายหรือเซลล์ผู้รับยีน โดยต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้(อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533; ศิริพร สิทธิประณีต. 2543; Russell.1998; Madigen *et al.* 2000)

2.3.1.1 ยีน (Gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการที่ได้มาจากเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดออกจากเซลล์ (Total DNA) จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ (restriction enzyme) เพื่อสร้างเป็นห้องสมุดยีน (gene library) หรือปัจจุบันวิธีที่นิยมได้แก่วิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction) โดยการใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (DNA primer) 1 คู่ขนาบข้าง (Flanking) บริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะใช้โคลนได้ง่ายไม่เจือปนกับดีเอ็นเออื่นที่ไม่ต้องการ แต่วิธีนี้ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการ

2.3.1.2 ดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ (Vector) เนื่องจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนของยีนที่เราต้องการไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นต้องมีการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ซึ่งในโมเลกุลของเวคเตอร์จะประกอบไปด้วย ส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเอง (origin of replication) ซึ่งชนิดของเวคเตอร์ที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับเซลล์ผู้รับหรือเซลล์เจ้าบ้าน และขนาดของยีน โดยเวคเตอร์ที่มีความเหมาะสมกับแบคทีเรียได้แก่ พลาสมิด ฝาจ และ คอสมิด

2.3.1.3 เซลล์ให้อาศัยหรือเซลล์ผู้รับ (Host) ในการเลือกเซลล์ให้อาศัยต้องมีการพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วไม่เป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดโรค ความ

ยากง่ายในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ และความคงสภาพในขณะที่มีการเพาะเลี้ยง ซึ่งในเซลล์ให้อาศัยต้องมีเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมกับการจำลองตัวของดีเอ็นเอพาหะ โดยมากจะใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และยีสต์ (*Saccharomyces cerivisiae*) โดยทั่วไป *Escherichia coli* มักถูกนำมาใช้เป็นเซลล์ผู้รับ เนื่องจากได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้เหมาะสมในการนำมาใช้ทางพันธุวิศวกรรมได้ดียิ่งขึ้น

2.3.2 หลักการของเทคนิคพันธุวิศวกรรมแบคทีเรีย

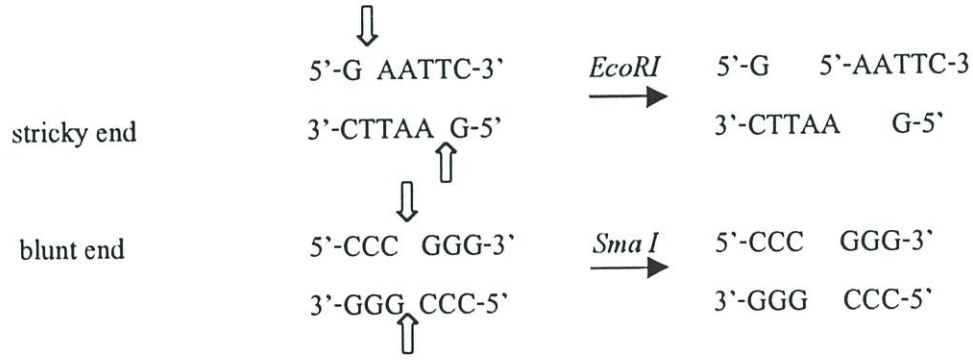
เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนสามารถทำได้ดังต่อไปนี้ (ศิริพร สิทธิประณีต. 2543 ; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543; สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545; Madigen *et al.* 2000)

2.3.2.1 การแยกชิ้นส่วนของยีนที่สนใจ

เมื่อได้ยีนที่ต้องการจากการสกัดดีเอ็นเอแล้ว อาจทำการเพิ่มปริมาณยีน เพื่อเหมาะสมกับการนำยีนไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3.2.2 การรวมกันของชิ้นส่วนยีนกับดีเอ็นเอพาหะ

การรวมกันของชิ้นส่วนของยีนกับเวคเตอร์ต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ (restriction enzyme) ที่จะทำหน้าที่ในการตัดดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสที่จำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ซึ่งปลายที่ได้จะสามารถมีได้ 2 แบบ คือปลายทู่ (blunt end) และปลายเหนียว (stricky end) (ภาพที่ 2.7) เมื่อใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะชนิดเดียวกันทำการตัดทั้งยีนและเวคเตอร์ทำให้ได้ปลายดีเอ็นเอที่เป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกัน เมื่อทำการบ่มเข้าด้วยกันและเติมเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) ลงไปทำการเชื่อมต่อกันเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester bond) ทำให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมออกมา



ภาพที่ 2.7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ตัดเฉพาะ (restriction enzyme) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543)

2.3.3.3 การถ่ายทอดดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (host)

การถ่ายทอดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสามารถทำได้ 3 วิธีหลัก

1) คอนจูเกชั่น (Conjugation)

กระบวนการคอนจูเกชั่นเป็นกระบวนการถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างเซลล์ผู้ให้ (Donor) และเซลล์ผู้รับ (Recipient) ที่สามารถถ่ายทอดดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้และมีความถี่สูงในการถ่ายทอดตามธรรมชาติ การถ่ายทอดโดยวิธีนี้มีความสำคัญในแบคทีเรียแกรมลบ เพราะอาศัยเซ็กพิไล (sex pili) เพื่อทำหน้าที่เป็นหลอดเชื่อมติดต่อระหว่างเซลล์ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกอาศัยการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์ แล้วถ่ายทอดพลาสมิดซึ่งมียีนสังเคราะห์สารที่ผนังเซลล์ผู้ให้เพื่อช่วยเชื่อมต่อกับเซลล์ผู้รับ

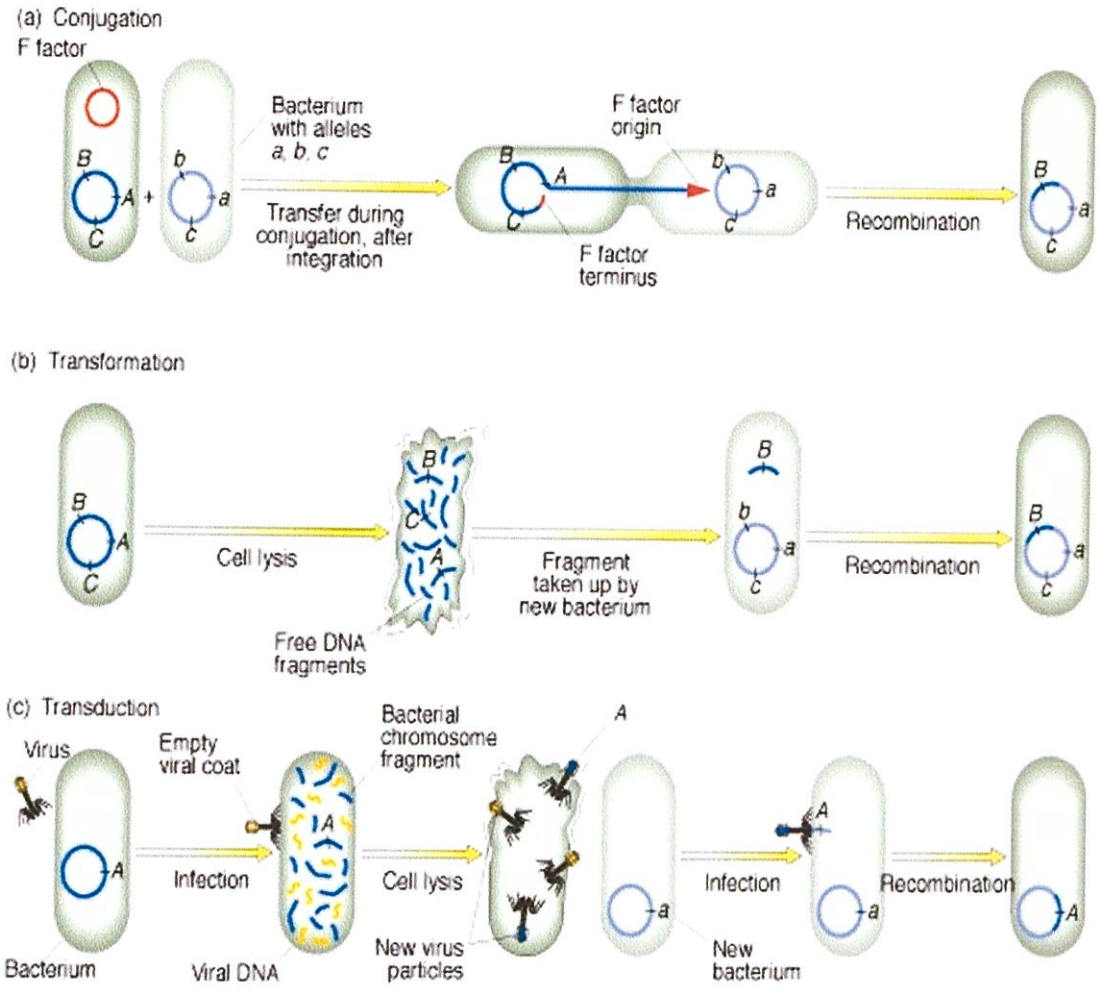
2) ทรานส์ฟอร์เมชั่น (Transformation)

กระบวนการทรานส์ฟอร์เมชั่นการใช้ดีเอ็นเอที่มีพลาสมิดเป็นพาหะนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยที่เป็นแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการในการทำให้เซลล์นั้นกลายเป็นคอมพิเทนต์เซลล์ (Competent cell) ที่ยอมให้ดีเอ็นเอผ่านได้ชั่วคราว โดยใช้อุณหภูมิ (Heat shock) หรือใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้นที่เรียกว่า อิเลคโตรโพเรชั่น (Electroporation)

3) ทรานสดักชั่น (Transduction)

กระบวนการทรานส์ดักชั่นเป็นการใช้ดีเอ็นเอพาหะที่เป็นดีเอ็นเออนุภาคของไวรัสหรือฝาจ (Phage) รวมไปถึงคอสมิด ในการถ่ายทอดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการบรรจุลงในโครโมโซมของฝาจแล้วทำให้แบคทีเรียที่ถูกบุกรุกรับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้าไป

การถ่ายทอดยีนของแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนสามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติเพื่อปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในการถ่ายทอดยีนตามธรรมชาติเกิดขึ้นเองได้ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ คอนจูเกชั่น (conjugation) ทรานสดักชั่น (transduction) ทรานสฟอร์เมชั่น(transformation) โดยสามารถเกิดขึ้นได้จากประชากรในรูเมนที่มีความหนาแน่นมากกว่า 10^{10} ต่อมิลลิลิตร การติดต่อสัมผัสกันของแบคทีเรียในอาหาร ทำให้เซลล์ต่อเซลล์มีการสัมผัสกัน เช่นวิธีการทรานส์ดักชั่นที่มีการติดเชื้อจากฝาจที่เป็นอนุภาคของไวรัส (phage particle) หรือส่วนของพลาสมิดที่สามารถพบได้ในบางสปีชีส์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนแต่อาจจะติดมากับส่วนของอาหารและน้ำในสภาวะที่เหมาะสมกับการเกิดทรานสดักชั่นหรือการติดเชื้อของฝาจเกิดขึ้น (Hobson and Stewart . 1997) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morrison (1996) ที่ว่าการถ่ายทอดสารพันธุกรรมทั้งสามวิธีที่กล่าวมาแล้วได้มาจากกระบวนการทางธรรมชาติและสามารถนำหลักที่ได้มาใช้ในการถ่ายทอดยีนที่ต้องการได้ดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 แสดงวิธีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในแบคทีเรีย (Thomous. 2003)

2.3.2.4 การคัดโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสม

หลังจากถ่ายทอดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยแล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องมีการคัดโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมออกจากโคลนอื่น ๆ ที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอใด ๆ หรือได้รับดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอลูกผสม วิธีการคัดจะทำโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม ตัวอย่างเช่นการเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะ การเปลี่ยนสีของโคโลนีเนื่องจากการมีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดได้ การตรวจสอบยีนที่โคลนเข้าไปได้ในกรณีที่ทราบลำดับเบสของยีนนั้น รวมทั้งการผลิตโปรตีนที่ได้จากยีนที่ต้องการ (ศิริพร สิทธิประณีต. 2543)

2.3.3 พันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนส่วนมากเป็นการเพิ่มประโยชน์การย่อยสลายเซลลูโลสได้ที่สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* ยีนที่ได้รับจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่สามารถแปรรหัสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใยพืชและส่วนที่เป็นผนังเซลล์ของพืชได้ โดยยีนนี้ได้จากแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใย ได้แก่ *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bacteroid ruminocola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงยีนที่ถูกโคลนจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

Organism	Cloned gene
Bacteroid rumincola	CMCase
	Xylanase
Butyruvibrio fibrisolvens	Endo-β- 1,4 glucanase
	CMCase
	Xylanase
Fibrobacter succinogenes	CMCase
	Xylanase
	Cellulodextrinase
	β- 1,3-1,4 glucanase
Ruminococcus albus	CMCase
	Endo-β- 1,4 glucanase
	β- Glucosidase
Ruminococcus flavefaciens	CMCase
	Endo-β- 1,4 glucanase
	Xylanase

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mackie and White (1996)

Barros and Thomson (1987) ถ่ายทอดยีน endoglucanase จาก *R. flavefaciens* FD-1 เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยการตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ *BamH*I และ *Bgl*II และเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pEcoR251 จากนั้นนำโคลนที่ได้ มาเลี้ยงบนอาหารที่มี carboxymethyl cellulose (CMC) นาน 24 ชั่วโมงแล้วราดทับด้วย congo red โคโลนีที่สร้างวงใสมากที่สุด จะถูกเลือกมาตรวจสอบกิจกรรม

ของเอนไซม์ในแต่ละส่วนของเซล (periplasmic, intracellular, extracellular) โดยการย่อยสับสเตรท CMC, filter paper และ Avicel และวัดจากปริมาณ glucose ที่ปลดปล่อยมาจากการบ่มเซลล์ pMEB200 มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถย่อย filter paper หรือ Avicel ได้ ส่วนมากกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ส่วน periplasmic (75 เปอร์เซ็นต์) ที่ส่วน intracellular 20 % และ 5% พบที่ extracellular ความสามารถของยีนในการย่อย CMC และขาดความสามารถในการย่อย Avicel และ filter paper เป็นการแสดงว่ามีเพียงเอนไซม์ endocellulase

Cunningham *et al.* (1991) ถ่ายทอดยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ruminococcus flavefaciencs* 17 โดยตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ *Sau*3A และเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pUC13 แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* DH5α จากนั้นนำโคโลนี CMCP2 ที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์บน CMC agar มาตรวจสอบการย่อย CMC, lichenan, cellopentaose, celltetraose และ Avicel กิจกรรมของเอาเไซม์ที่มีย่อยสับสเตรท เหลือน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที pH ที่เหมาะสมกับการทำงานอยู่ที่ 5-6 และพบการเรียงตัวของลำดับเบส 1,365 คู่เบสที่ ถอดรหัสได้เป็น 455 กรดอะมิโน ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน endoglucanase ที่ได้จาก *Ruminococcus albus* (56-61 เปอร์เซ็นต์)

Vercoe *et al.* (1995a) โคลนยีน β- glucanase (*celB*) จาก *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 จากโคลนย่อย pBAW101 ได้พลาสมิด pBAW104 หลังจากตรวจสอบลำดับเบสของ *celB* พบว่ามีขนาด 1,943 คู่เบส สามารถแปรรหัสเป็น 632 กรดอะมิโนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 69,414 ดาลตัน เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนเซลลูเลสอื่น พบว่ามีความคลึงกับยีนในกลุ่ม HCA cellulase family 44

Vercoe *et al.* (1995b) โคลนยีน β- glucanase (*celD*) จาก *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 จากโคลนย่อย λDASH โคลนที่ได้ชิ้นส่วนขนาด 1,215 ลำดับเบสแปรรหัสได้เป็น 405 กรดอะมิโนที่มีขนาดโมเลกุล 44,631 ดาลตัน เทียบลำดับกรดอะมิโนในกลุ่มเซลลูเลสพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ endoglucanase ที่จัดอยู่ใน family E

Howard and White (1988) ถ่ายทอดยีนเซลลูเลสจาก genomic DNA library ของ *Ruminococcua albus* 8 โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย *Sau*3A และแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 กิโลเบสด้วย sucrose 10-40 เปอร์เซ็นต์ นำดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับ λDASH และถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* P2392 จากนั้นนำโคลนที่ได้ไปตรวจสอบ กิจกรรมบนอาหาร CMC, MUC(4-methylumbelliferyl-β-D-cellobioside), OBR-HEC(Ostazin brillint red – hydroxyethl cellulose) และตรวจสอบการผลิต reducing sugar โคลนที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ถูกนำมาวิเคราะห์ restriction endonuclease mapping และความจำเพาะกับสับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลส โดยพบว่า

มี 3 โคลนที่มีแปรรหัสได้เป็นเอนไซม์ endoglucanase มี 3 โคลนมีแปรรหัสได้เป็น exoglucanase และ1 โคลนแปรรหัสได้เอนไซม์ผสมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase รวมอยู่ด้วย

Ohmiya *et al.* (1988) ถ่ายทอดเซลลูเลสยีนจาก *Ruminococcus albus* F-40 โดยใช้ genomic DNA libraries ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III เชื่อมต่อกับ plasmid pBR322 แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* HB101 และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์จากโคลนที่ได้บนอาหาร CMC' agar จากนั้นนำดีเอ็นเอจากที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RI, *Pvu*II และ *Hind*III นำไปเชื่อมต่อกับ pUC19 และถ่าย ทอดเข้าสู่ *E . coli* JM 103 จากการทดลองพบว่าโคลนลูกผสม pURA1 มีกิจกรรมของเอนไซม์บน CMC agar ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind* III การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการตรวจสอบ reducing sugar ของโคลนที่ได้พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ได้ถึง 170 ยูนิตต่อลิตรหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่ 80 mM ที่ pH 6.5

Attwood *et al.* (1996) ได้โคลนยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งการถอดรหัสของยีน *cel*A จาก *Ruminococcus albus* 8 และการสร้าง genomic DNA library ใน *E. coli* โดยการใช้ bacteriophage *Zap*II และคัดเลือกโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase มาวิเคราะห์ แล้วทำ restriction mapping และ deletion mapping และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *celA* มีขนาด 1,231 คู่เบส ซึ่งแปรรหัสได้เป็น 411 กรดอะมิโน และสามารถคาดการณ์น้ำหนักโมเลกุลได้ที่ประมาณ 45,747 ดาลตันลำดับกรดอะมิโนของ *celA* มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ endoglucanase family 5 จากตรวจสอบโดยทำ Northern analysis เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน พบว่าการแสดงออกของยีน *celA* จากเซลล์ ที่เลี้ยงในเซลลูโลสและเซลโลไบโอส มีบริเวณเริ่มต้นในการถอดรหัสของยีน *celA* แตกต่างกัน ซึ่งระยะระหว่างบริเวณทั้งสองห่างกัน 370 เบส

Ozcan *et al.* (1996) คัดเลือกยีนที่มีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลส (*end-1*) จาก DNA library ของ *Fibrobacter succinogenes* SD35 และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้ทราบว่ายีน *end-1* แปรรหัสให้เอนไซม์ที่มี 388 กรดอะมิโนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 50.2 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน *E. coli* พบว่าผลผลิตที่ได้จาก *end-1* มีผลต่อกิจกรรมการย่อย CMC อย่างมากแต่มีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมการย่อย lichenan, xylan, avicel

Cho *et al.* (2000) โคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนสชนิดใหม่ใน family A จาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ใน *E. coli* DH5 โดยใช้พลาสมิด pUC19 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pCMX1) ที่ได้จากการโคลนสามารถย่อย CMC และ xylan ได้ ดีเอ็นเอสอดแทรกมีขนาดเท่ากับ 2,043 คู่เบส และลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไม่มีความเหมือนกับยีนเอนโดกลูคาเนสอื่นๆ ๆจากเชื้อเดียวกัน การศึกษาเอนไซม์จาก *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนท์พลาสมิด pCMX1 พบว่าเอนไซม์ มีสภาวะเหมาะสมที่ อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส และ pH 5.5 โดยเอนไซม์จะคงสภาพได้ดีที่ pH 6

และไม่คงสภาพที่ pH ต่ำกว่า 4 จาก Km ของ CMC เท่ากับ 0.49 และ Vmax เท่ากับ 152 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Cavicchioli and Watson (1991) ศึกษายีน endoglucanase ที่ได้จาก genomic DNA ของ *Fibrobacter succinogenes* AR1 ที่ถูกตัดด้วย *Hind*III เชื่อมต่อกับ cosmid pHC79 และทำการถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH1 โคลนที่ได้ถูกตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์บน CMC agar แล้วคัดเลือกโคลนที่เกิดกิจกรรมสูงสุดมาทำการ subclone และ exonuclease deletion โดยพบว่าโคลน pRCEH ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Bam* HI ขนาด 2.1 กิโลเบส มีกิจกรรมบน CMC agar หลังนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มเติมพบว่าสามารถย่อย acid-swollen cellulose, ball-milled cellulose, carboxymethylcellulose ได้มากและ filter paper, Avicel lichenan และ xylan ได้ในระดับปานกลาง กิจกรรมส่วนมาก (80 เปอร์เซ็นต์) จะพบในส่วน periplasm ของ *E.coli* และ 16 เปอร์เซ็นต์ พบใน extracellular periplasm เอนไซม์endoglucanase นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,500 ดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานคือ 39 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้างและทำงานได้สูงสุดที่ pH 5.0

การถ่ายทอดยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ได้ จากการย่อยสับสเตรทพบว่า มีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้จากการโคลนยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

Organism	Gene[1/]	Protein[2/]	Substrates cleaved[3/]	Enzyme	Reference
B.fibrisolvens A46	celA[A2]	48863/4700(432).sp	BβG,CMC,L.pNPC	Glucanase	Hazlewood *et al.* (1990)
B.fibrisolvens H17c	endl	61000/-[4/] (547).sp	L,CMC,pNPC,G_4–G_6	Glucanase	Berger *et al.* (1989)
B.fibrisolvens H17*c*	bglA[A3]	94800/94000(830)	G_2–G_5	β- glucosidase	Lin *et al.* (1990)
F.succinogènes S85	cel-3[A3]	73432/118000(658).sp	CMC,L, BβG, pNPC	Glucanase	McGavin *et al.* (1989)
F.succinogenes S85	celD[9E]	71700/68000,sp	BβG ,CMC,ASC	Glucanase	Malburg *et al.* (1996)
F.succinogenes S85	celE[9E]	50700/-[4/] (467)	None	Glucanase	Malburg *et al.* (1996)
F.succinogenes S85	celG[5A]	-[4/] /55000(519).sp	BβG ,CMC	Glucanase	Iyo and Forsberg (1996)
F.succinogenes S85	endB[E9]	58000/-[4/] (555)	CMC,BBG,L	Glucanase	Broussolle *et al.* (1988)
F.succinogenes S85	endC[9E]	67656/67000(620)	BβG ,CMC,L	Glucanase	Bera *et al.* (1996)
F.succinogenes S85	endC[9E]	47000/46500(453)	CMC,ASC	Glucanase	Cavicchioli *et al.* (1991)
F.succinogenes S85	end-I	50201/-[4/]	CMC,L,XYN	Glucanase	Ozcan *et al.* (1996)
R.albus F-40	Egl[E9]	40848/50000(407).sp	CMC	Glucanase	Deguchi *et al.* (1991)
R.albus F-40	egIV	35766/35000(936)	CMC	Glucanase	Karita *et al.* (1993)
R.albus F-40	pRA201[A3]	1042/	pNPG, G_2–G_6	β- glucosidase	Takano *et al.* (1992)
					Ohmiya *et al.* (1985)
R.albus 8	celA[A5]	-[4/] /-[4/] (411)	CMC,ASC	Glucanase	Attwood *et al.* (1996)
R.albus AR67	celA[A5]	-[4/] /-[4/] (411)		Glucanase	Vercoe and Gregg(1995)

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

Organism	Gene[1/]	Protein[2/]	Substrates cleaved[3/]	Enzyme	Reference
R.albus SY3	celA[A4]	41223/44500(365)	CMC,XYN	Glucanase	Pool *et al.* (1990)
	celB[A4]	45529/-[4/] (409)			
R.flavefaciens 17	endA[A5]	-[4/] /-[4/] (605+)	ASC,CMC,L, G_5–G_6	Glucanase	Cunningham *et al.* (1991)
R.flavefaciens FD-1	celB	69414/-[4/] (632)-	CMC	Glucanase	Vercoe *et al.* (1995a)
R.flavefaciens FD-1	celD[E9]	44631/-[4/] (405)	CMC,XYN	Glucanase	Vercoe *et al.* (1995b)
R.flavefaciens FD-1	celE[-]	35900/3500(963).sp	CMC	Glucanase	Wang *et al.* (1993)

[1/] Glucosyl hydrolase family

[2/] มวลโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จาก DNA sequence(Da) มวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้จาก *E. coli* หรือจากแบคทีเรียดั่งเดิม(Da) ภายในวงเล็บเป็นจำนวนกรดอะมิโนเอซิด ในโปรตีน, sp. แสดงว่าโปรตีนที่พบมี signal peptide

[3/] สับสเตรทที่ใช้ : C,avicel; CMC,carboxymethylcellulose; ASC,acid-swollen cellulose; BβG, barley β-glucan; GMAN, galactomannan; L,lichenan; pNPC, *p*- nitrophenyl-β-D-cellobioside;MUC, 4-methylumbelliferyl-β-D-cellobioside;MUX, 4-methylumbelliferyl-β-D-xyloside;XYN, xylanase;AXYN, arabinoxylan;G_N,oligosaccharide (N, แสดงถึงจำนวนของหน่วยกลูโคส)

[4/] - ไม่มีการแสดงค่า

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chesson and Forsberg (1997)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

โคลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยนบราห์มันที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมนจำนวน 2 ตัว

3.2 อุปกรณ์

1) โถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
2) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
3) ไมโครปิเปต (Micropipette)
4) เครื่องชั่งอิเลกโทรนิก (Digital Balance, BP2215, BP3105)
5) เครื่องปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH Meter C831)
6) เตาให้ความร้อน (Hot plate, HS-101)
7) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและ -80 องศาเซลเซียส
8) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave, HICLAVE)
9) ตู้ดูดควัน (Fume Hood, MAJOR)
10) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
11) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, MIKRO 20)
12) เครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometry, Ultropec 1100 pro)
13) เครื่องพีซีอาร์ (PCR, PTC-100)
14) เครื่องอิเลกโตรโฟเรซีส (Electrophoresis)

3.3 สารเคมี (ภาคผนวก ก)

1) สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA), McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution, Carboxymethylcellulose Agar, LB, 2xYT
2) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ก)
3) สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction) ของบริษัท Dynazyme®
4) ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction kit) ของบริษัท QIAGEN®
5) ชุดโคลนนิ่ง (Cloning kit) ของบริษัท Promega®
6) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม competent cell ตามวิธีการของ ชนันท์ อังศุธนะสมบัติ (2533)

7) สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลนตามวิธีการของวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ข)

8) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดจาก *E.coli* ตามวิธีการของ Anonymous (2003)

3.3 วิธีการ

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้

3.3.1.1 เก็บของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นหรือกระเพาะรูเมนของโค ในช่วงเวลา 6.30 น. ก่อนให้อาหาร ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น

3.3.1.2 นำตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดอาหารที่มี McBeth's cellulose ammonium sulfate solution 9 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอดเป็นหลอดควบคุมอีก 1 หลอด ให้อยู่ในสภาพที่ไม่มีอากาศโดยเททับผิวหน้าด้วยพาราฟินที่ฆ่าเชื้อแล้วให้หนาประมาณ 2 เซ็นติเมตรบ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิประมาณ 39-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในโถบ่มเชื้อไร้อากาศ (anaerobic jar) ตามวิธีการของบุญทา วรินทร์รักษ์ (ม.ป.ป.) ตรวจดูหลอดที่มีการย่อยของกระดาษกรอง แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

3.3.1.2.1 ส่วนแรกนำแบคทีเรียในหลอดที่มีการย่อยกระดาษกรองไปสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมตามวิธีการของ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ก) โดย

1) เลี้ยงเซลล์ แบคทีเรียที่ต้องการแยกโครโมโซมค้างคืนในอาหาร 2xYT 5 มิลลิลิตร

2) ปั่นเก็บเซลล์ 3 ครั้งในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์(3x1.5 ml) ที่ 10,000 rpm 30 วินาทีทิ้งน้ำและส่วนลอยออกให้หมด

3) กระจายเซลล์ในสารละลาย 50 mM Tris และ 5 mM EDTA pH 8.0 ด้วยปริมาตร 1/10ของปริมาตร Culture broth (450 ไมโครลิตร) กับ lysozyme 10 mg/ml 60 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 10-20 นาที

4) เติม 10 % SDS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 % (22.5 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันเซลล์จะแตก (สังเกตได้จากความหนืดใสของสารละลายในหลอด)

5) เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวประมาณเท่าตัว ผสมให้เข้ากันโดยพลิกฝาหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้งและปั่นเหวี่ยงนาน 3-5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและฟีนอล ส่วนใสชั้นบน (Aqueous phase) จะมีดีเอ็นเอละลายอยู่

6) ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่จากนั้นสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 24 :1

7) แยกส่วนใสชั้นบนที่ได้เติม Sodium acetate pH5.2 ด้วยปริมาตร 1/10 ของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้

8) ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทธานอล 95 % ด้วยปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ทิ้งไว้ ที่ –20 องศาเซลเซียส หรือ –70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที

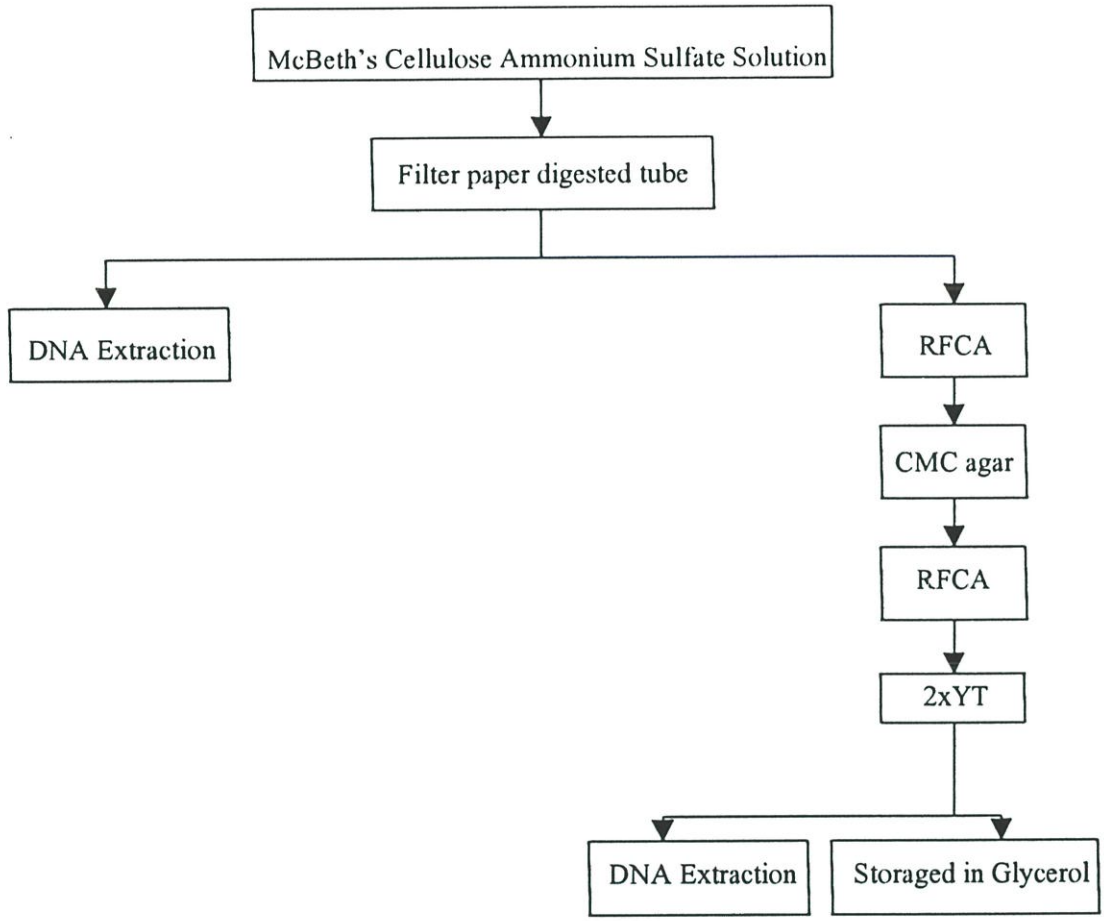
9) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 1- 2 ครั้งด้วย 500 ไมโครลิตร 70 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล

10) ทิ้งให้แห้งและละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร

3.3.1.2.2 ส่วนที่สองนำแบคทีเรียมาเลี้ยงต่อให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยการแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA ตามวิธีการของ Hungate (1950)

1) นำเชื้อที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวจากอาหาร RFCA มาทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงบนอาหารสูตร Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) ด้วยเทคนิค point inoculum บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ราดทับด้วย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วย 1M NaCl เลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างวงใส (clear zone) ตามวิธีการของ Hankin and Anagnostakis (1977) นำมาเลี้ยงให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นบนอาหาร RFCA

2) นำแบคทีเรียที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร 2xYT เป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ได้แบคทีเรียจำนวนมาก นำแบคทีเรียมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก นำไปสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมตามวิธีการวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ก) ส่วนที่2 เก็บเชื้อที่ได้ในกลีเซลรอล 30 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสและในกลีเซลรอล 50 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสดังแผนปฏิบัติการแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานในขั้นตอนที่ 3.3.1

3.3.2 การตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์

การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญคือดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ไพร์เมอร์ (primer) dNTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่จะเข้าไปต่อกับส่วนของไพร์เมอร์ให้เป็นสายของดีเอ็นเอ Taq polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอและบัพเฟอร์ที่ช่วยให้ปฏิกริยาสมบูรณ์

3.3.2.1 ดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้โครโมโซม ดีเอ็นเอ จากกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution และโครโมโซมจากเชื้อบริสุทธิ์ที่พบกิจกรรมบนอาหาร CMC agar

3.3.2.2 ไพร์เมอร์ ที่ใช้ออกแบบโดยนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Ruminal bacteria มาหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม ClustalW (ddbj) ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในกระเพาะรูเมน สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *EndA*, *CelB*, *EG-IV* ไพร์เมอร์แต่ละกลุ่ม (PC1, PC2 และPC3) ถูกออกแบบมาจาก บริเวณ

ลำดับอนุรักษ์ (conserve sequence) ของยีนดังกล่าว (ภาคผนวกข) ดังแสดงในภาพที่ 3.2 ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ขนาดประมาณ 405, 870 และ 397 คู่เบส ตามลำดับ

PC1 5'-(A/C)T(A/C) GG(A/C) TGG AA(T/C) CT(C/T) GG(A/C) AA-3'
5'-GGG TTC (A/G)TT (G/C)AG (G/T/A)CC CTC (A/G)AA-3'

PC2 5'-(T/C)(G/T) AC(G/A) GG(T/A) TAC AA(C/T) TGG GA-3'
5'-CCA (T/C)TG (A/G)(T/C)(T/C) (T/G)AT CCA GCT-3'

PC3 5'-TA(T/C) GT(C/A) AT(C/T) (A/G)T(T/C) GA(T/C) TGG CA-3'
5'-TG(C/T) GT(T/G) CC(T/G/A) GCA TA(A/G) AA(A/G) TG-3'

ภาพที่ 3.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.3.2.3 ส่วนประกอบและปฏิกริยาพีซีอาร์

การเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์จำเป็นจะต้องอาศัยสารละลายที่มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.1 ตลอดจนสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมดังนี้

1) Pre PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2) PCR ประกอบด้วย
   - Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
   - Annealing ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
   - Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Post PCR ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4) เก็บผลผลิตที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการทาง PCR

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10xPCR buffer	1.5	1x
2mM dNTP	1.5	200μM
5μM primer Forward	0.9	0.3μM
5μM primer Reverse	0.9	0.3μM
2U/μl DyNazyme II DNA polymerase	0.625	1.25U
50 mM $MgCl_2$	0.95	3.5 mM
25ng//μl template	1	25 ng
น้ำกลั่น	7.625	
รวม	15	

3.3.2.4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

เมื่อทำการเพิ่มขยายส่วนของดีเอ็นเอแล้ว นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลโดยกระแสไฟฟ้า ดัดแปลงจากวิธีการของเสาวนีย์ ธรรมสถิติ (2536) ทำการเตรียมเจลซึ่งจะใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x TBE นำดีเอ็นเอที่ได้ผสมกับ 6x loading buffer ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 โดยใช้ 100 bp ladder (Fermentus®) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตราฐาน เชื่อมกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยย้อมเจลด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำ 5 นาที หลังจากนั้นบันทึกผลการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนกล่อง UV ที่มีความยาวคลื่น 300 nm

3.3.3 ถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและตรวจสอบโคลนที่ได้

3.3.3.1 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส

เมื่อทำการตรวจสอบพบดีเอ็นเอที่มีผลผลิตตามขนาดที่ต้องการแล้วทำการตัดเจลแยกแถบดีเอ็นเอนั้นออกจากเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ทราบน้ำหนัก เพื่อนำไปหาน้ำหนักเจล จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดของบริษัท QIAGEN® โดยการเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เช่นน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม จะใช้บัฟเฟอร์ QG 300 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโปรปานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column ที่สวมทับด้วยหลอดเก็บปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ให้ของเหลวผ่านcolumn ไปอยู่ในหลอดแล้วเทของเหลวในหลอดทิ้ง ล้างดีเอ็นเอที่เกาะอยู่ที่ column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAquick spin columnไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำ 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับดีเอ็นเอพาหะ

นำดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 3.3.3.1 มาทำการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ pGEM® -T Easy ของบริษัท Promega® ซึ่งมีที่ส่วนปลาย 5' ที่มีการเติมเบส ไทมีน (Thymine) โดยดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายปริมาณยีนจากการทำงานของเอนไซม์ Taq polymerase จะมีการเติมเบสอะดีนีน (Adenine) ที่บริเวณปลายสาย 3' ของดีเอ็นเอ ซึ่งจะทำให้มีเบสคู่สมกับส่วนปลาย pGEM® -T Easy ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะสามารถเชื่อมต่อกันได้โดยการทำงานของเอนไซม์ T4 ligase ตามอัตราส่วนที่แสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 3.3

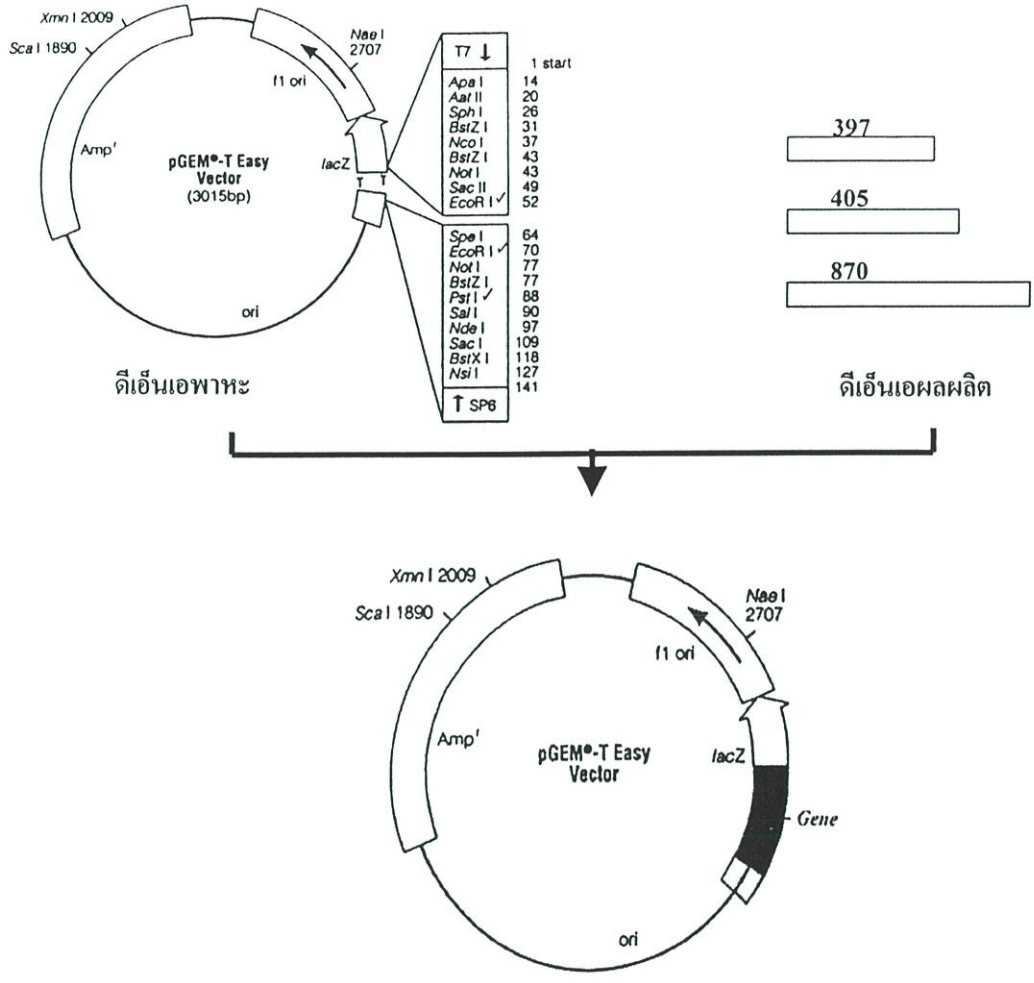
ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับดีเอ็นเอพาหะ

องค์ประกอบ	ขนาด/ปฏิกิริยา
pGEMTeasy	0.5 µl
2X buffer	2.5 µl
T4 DNA ligase	0.5 µl
Fragment	1.5 µl
Total Volume	5 µl

1) นำส่วนประกอบต่าง ๆมาทำให้ละลาย บนน้ำแข็ง

2) ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาด 0.5 ml บ่มข้ามคืน ที่ 4 –16 องศาเซลเซียส

3) นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วเข้าสู่ *E. coli* หรือ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้



ภาพที่ 3.3 แสดงการดำเนินงานในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลผลิตกับดีเอ็นเอพาหะ

3.3.3.3 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

1) การเตรียมเชื้อ *E. coli* DH5α ให้เป็นคอมพลีเทนต์เซล

การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E.coli* เริ่มจากการเตรียมเซลล์โดยการใช้สารเคมีได้แก่ $CaCl_2$ ทำให้เซลล์เกิดสภาพ permeability หรือ คอมพลีเทนต์เซล (competent cell) เพื่อยอมรับดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ได้โดยง่าย โดยใช้วิธีการเตรียมของชนันท์ อังศุธนะสมบัติ (2533) ในขั้นตอนแรกนำ *E.coli* DH5α มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ 0.5 มิลลิลิตรมาเพาะเลี้ยงต่อใน LB 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 3 - 6 ชั่วโมงจนถึง early log phase โดยวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.3- 0.4 จากนั้นนำเชื้อ

ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนของเซลล์ที่ได้มาเติม $CaCl_2$ solution 25 มิลลิลิตร (1/2 ของปริมาตรตั้งต้น) และทำให้เซลล์กระจายโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย $CaCl_2$ 3 มิลลิลิตร (1/15 ของปริมาตรตั้งต้น) แล้วทำให้เซลล์กระจายโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2) การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α

นำคอมพิเทนต์ที่เตรียมได้ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอสายผสมในข้อ3.3.3.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาทีเพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายผสมเกาะที่ permeable site ที่ผนังของเซล *E. coli* แล้วจึงทำการกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) โดยแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันที และทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไป spread ลงบนLB agar plate ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal (5- bromo - 4 - chloro - 3 indolyl - β - D - galactoside) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

3.3.3.4 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

3.3.3.4.1 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์

การใช้พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy สามารถทำการคัดเลือกโดยใช้การแสดงออกของยีนที่มีในพลาสมิดดังกล่าว ซึ่งได้แก่ยีนที่ต้านทานต่อยาแอมพิซิลลิน ซึ่ง *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายทอดดีเอ็นเอพาหะเข้าไปจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาแอมพิซิลลินนอกจากนี้ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy ยังสามารถตรวจสอบโดยใช้เทคนิค blue/white screening ได้จากการ spread X-Gal บนอาหารด้วย เนื่องมาจากบริเวณที่มีการแทรกดีเอ็นเอที่สนใจเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะเป็นบริเวณที่มีการผลิตเอนไซม์ β - galactosidase ซึ่งเอนไซม์นี้มีความสามารถในการย่อย X-Gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้าแต่เมื่อบริเวณนี้มีลักษณะยีนที่ผิดไปเนื่องจากได้รับดีเอ็นเอที่สอดแทรกเข้าไปจึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้จึงได้ตะกอนสีขาวทำให้มีลักษณะของโคโลนีเป็นสีขาว

3.3.3.4.2 การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด

1) การสกัดพลาสมิดด้วย CTAB

นำโคลนที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.3.3.4.1 มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลาข้ามคืน นำเซลล์ที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากเทส่วนอาหารเหลวทิ้ง เติมสารละลาย STET 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับเซลโดยใช้ vortex แล้วเติมไลโซไซม์ 5ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 – 10 นาที หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 45 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที แยกตะกอนเซลล์ออกจากหลอดโดยใช้ไม้จิ้มฟัน นำส่วนใสที่ได้มาเติม 5% CTAB 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 – 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด นำตะกอนที่ได้เติม 1.2M NaCl 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex และเติม Rnase A 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 – 30 นาที นำมาแยกโปรตีนออกด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมานาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใสข้างบนโดยพยายามไม่ให้ติดตะกอนสีขาวที่อยู่ระหว่างชั้น ใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทธานอลสัมบูรณ์ด้วยปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เทสารละลายออกแล้วล้างตะกอนด้วยเอทธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีก 5 นาที เทเอทธานอลทิ้งแล้วทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้งนานประมาณ10- 20 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ TE 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2) การตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 1) มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดแทรกโดยใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะส่วนที่สอดแทรก ซึ่งเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ที่ใช้จะมีบริเวณที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* 2 ตำแหน่ง คือบริเวณหัวและท้ายส่วนที่ชิ้นดีเอ็นเอจะสอดแทรกเข้าไป(ภาคผนวก ก) ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของยีนที่สอดแทรกเข้าไปได้

ผสมสารตามอัตราส่วนที่ใช้ในปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.3 หลังจากนั้นจึงใส่พลาสมิดที่สกัดได้ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้าโดย เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

ตารางที่ 3.3 แสดงองค์ประกอบและอัตราส่วนที่ใช้ในปฏิกริยาการตัดพลาสมิดการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*I

องค์ประกอบ	ขนาด/ปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอพลาสมิด	1
10xbuffer (900 mM Tris-HCl(pH7.5),500 mM NaCl, 100mM $MgCl_2$)	2
BSA(10 μg/μl)	0.2
DW	16.5
เอนไซม์ *EcoR*I (10U/μl)	0.3
Total Volume	20

3) การตรวจสอบหาลำดับเบส

นำพลาสมิดที่ตรวจสอบได้ว่ามีส่วนของยีนสอดแทรกซึ่งมีขนาดที่ถูกต้องตามต้องการไปทำการตรวจสอบหาลำดับเบส เพื่อนำผลที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank ว่ายีนที่สอดแทรกเป็นยีนอะไรจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีนเซลลูเลส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และทำการถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* ดังวิธีการในขั้นตอนที่ 3.3.2 และต่อไป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย Whatman No.1 filter paper ในอาหาร McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution โดยจะได้เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ และเป็นแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จากการแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA ที่มี cellulose powder เป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหาร CMC agar ซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แล้วทำการตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากโครโมโซม ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ดังนี้ คือ

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

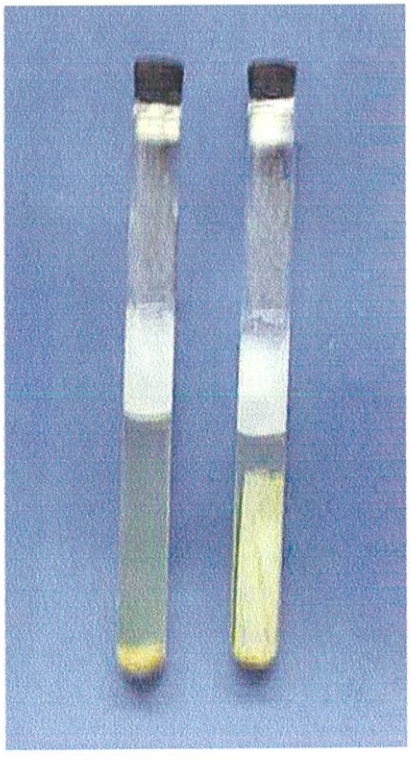
4.1.1 การเก็บตัวอย่างจากของเหลวกระเพาะรูเมนของโค (ภาพที่4.1) จำนวน 4 ครั้งที่ได้เป็น C1, C2, C3, C4 ตัวอย่างที่เก็บมาได้หลังจากนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้นพบว่า ตัวอย่างที่เก็บได้มีลักษณะเป็นของเหลวข้น ๆ สีเขียวอมเหลือง

4.1.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียอาหาร McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution จากหลอดที่มีการย่อยกระดาษกรอง พบว่าแต่ละตัวอย่างของแบคทีเรียในการย่อยกระดาษกรองใช้เวลาแตกต่างกันดังตารางที่ 4.1 นำหลอดที่มีการย่อยกระดาษกรองได้หมด (ภาพที่ 4.2) มาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ก) ตัวอย่างละ 2 หลอด และส่วนที่ 2 นำไปแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA (Rumen fluid cellulose agar) (ภาพที่ 4.3) ต่อไป

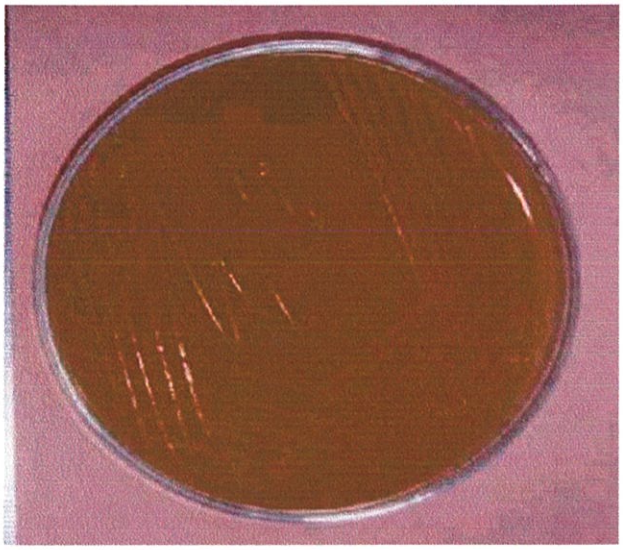
ตารางที่ 4.1 แสดงระยะเวลาในการย่อย Whatman No.1 filter paper ในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่าง	จำนวนวันที่ย่อย Whatman No.1 filter paper
C1	7
C2	10
C3	9
C4	9

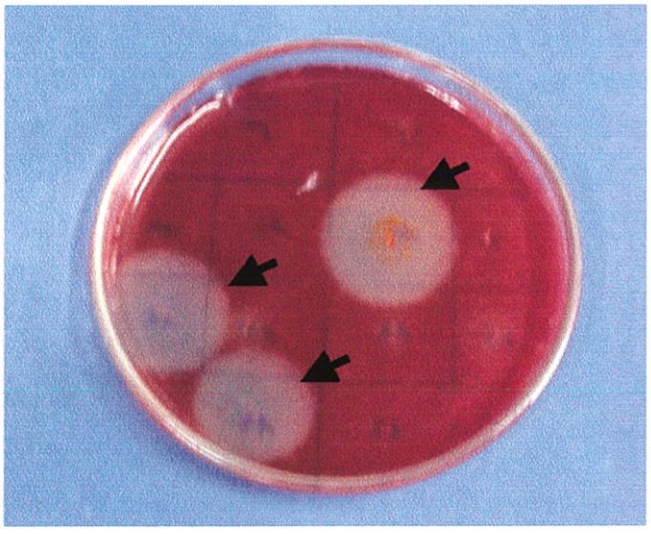
ภาพที่ 4.1 การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของโค



ภาพที่ 4.2 แสดงหลอดที่พบการย่อยของกระดาษกรองในอาหาร McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution



ภาพที่ 4.3 แสดงการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA



ภาพที่ 4.4 ลักษณะวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของแบคทีเรียจากการทดสอบในอาหารแข็ง CMC agar

นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกได้จำนวน 32 สายพันธุ์ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วราดทับด้วย congo red ดูการสร้างวงใส (ภาพที่ 4.4) พบว่าแบคทีเรียมีการสร้างวงใสได้แตกต่างกัน จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการคัดเลือกแบคทีเรีย 15 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างวงใสบนอาหารได้ดี เพื่อตรวจสอบยีนเซลลูเลสต่อไป

ตารางที่4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างวงใสได้บนอาหาร CMC agar

สายพันธุ์	ตัวอย่าง	สีโคโลนี	กิจกรรมของเอนไซม์บน CMC agar[1/]
R01	C1	ขาว	++
R02	C1	ขาว	+++
R03	C1	เหลืองเข้ม	++
R04	C3	น้ำตาล	++
R05	C3	เหลืองขุ่น	++
R06	C3	เหลืองขุ่น	++
R07	C3	น้ำตาล	++
R08	C3	เหลืองเข้ม	+++
R09	C3	เหลืองขุ่น	+++
R10	C3	เหลืองขุ่น	+++
R11	C3	เหลืองขุ่น	++
R14	C4	น้ำตาล	+++
R16	C4	เหลืองขุ่น	+++
R18	C4	เหลืองขุ่น	+++
R19	C4	เหลืองขุ่น	+++

[1/]+++, วงใสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 3 เซนติเมตรและ++, วงใสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-3 เซนติเมตร

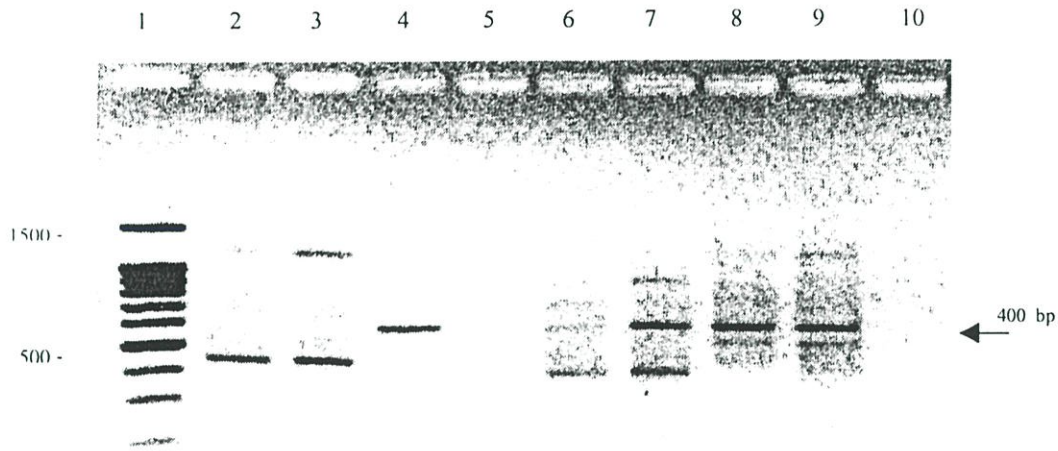
4.1.3 นำกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยและดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์ที่เกิดกิจกรรมสูงสุดบนอาหาร CMC agar (+++) จำนวน 8 สายพันธุ์ไปสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ โดยคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยและโครโมโซมดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์ที่เกิดกิจกรรม บนอาหารCMC agar

เชื้อ	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
C1.1	0.073	0.056	2.268	147.0
C1.2	0.077	0.060	2.231	152.6
C2.1	0.110	0.084	1.783	289.4
C2.2	0.130	0.101	1.735	344.0
C3.1	0.057	0.033	1.990	231.9
C3.2	0.067	0.044	1.853	254.5
C4.1	0.088	0.060	1.833	303.6
C4.2	0.098	0.068	1.900	316.9
R02	0.122	0.079	1.936	441.4
R08	0.038	0.022	1.927	114.4
R09	0.120	0.700	1.794	88.95
R10	0.062	0.035	1.967	165.3
R14	0.033	0.020	2.100	121.8
R16	0.055	0.029	2.100	247.4
R18	0.049	0.025	2.100	217.9
R19	0.065	0.034	1.900	309.7

4.2 ผลการตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์

4.2.1 ตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคการเพิ่มขยายส่วนของยีนใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใยได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลการทดลองพบว่าจากการใช้ไพร์เมอร์ คือ PC1, PC2 ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอผลผลิตตามขนาดที่ต้องการคือประมาณ 407 และ 870 คู่เบสตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6 ส่วนไพร์เมอร์ PC3 ไม่พบแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการ (380 คู่เบส) จึงไม่ได้นำมาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp ladder

ช่องที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C1.1

ช่องที่ 3 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C1.2

ช่องที่ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C2.1

ช่องที่ 5 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C2.2

ช่องที่ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1

ช่องที่ 7 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2

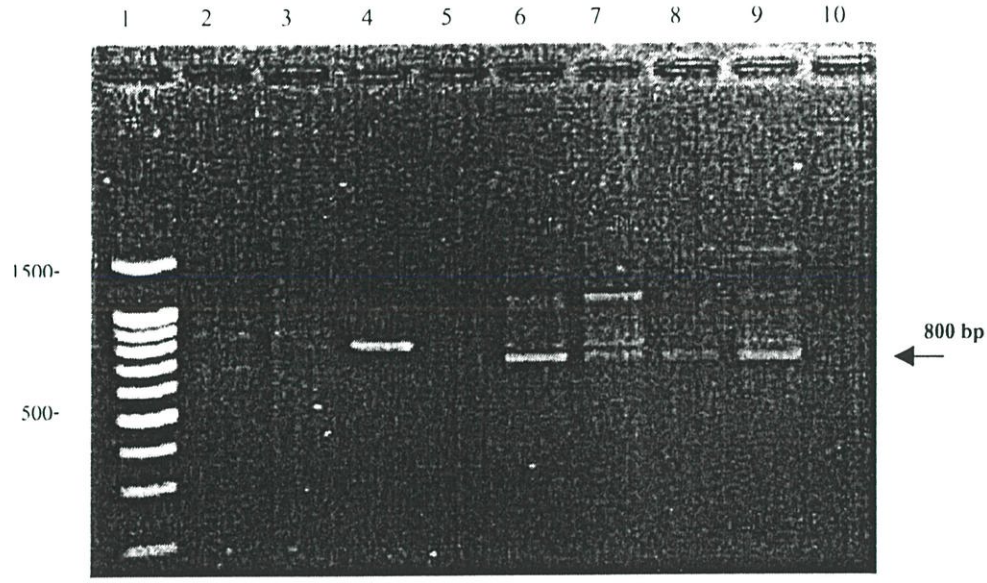
ช่องที่ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.1

ช่องที่ 9 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.2

ช่องที่ 10 Negative control โดยใช้น้ำแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

ภาพที่ 4.5 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใย (C1-C4) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC1 ในการตรวจสอบยีน

แยกแถบดีเอ็นเอผลผลิตจากการใช้ดีเอ็นเอมาแบบที่มีขนาดตามที่ต้องการ (ประมาณ 400 คู่เบส)ออกจากเจล ซึ่งได้แก่แถบดีเอ็นเอในช่องที่ 2, 3 และ 7 ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบ C1.1, C1.2 และ C3.2 ตามลำดับ เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®T - Easy แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ต่อไป



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp ladder

ช่องที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C1.1

ช่องที่ 3 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C1.2

ช่องที่ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C2.1

ช่องที่ 5 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C2.2

ช่องที่ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1

ช่องที่ 7 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2

ช่องที่ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.1

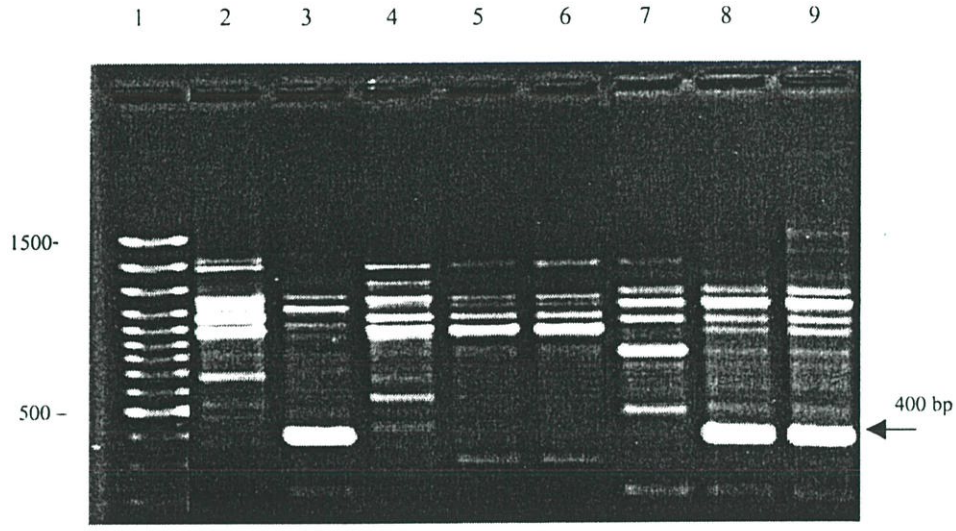
ช่องที่ 9 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.2

ช่องที่ 10 Negative control โดยใช้น้ำแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

ภาพที่4.6 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใย (C1-C4) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC2 ในการตรวจสอบยีน

แยกแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาดตามต้องการ (ประมาณ 800 คู่เบส) ออกจากเจล ซึ่งได้แก่แถบดีเอ็นเอในช่องที่ 4 และ 6 ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบ C2.1 และC3.1 ตามลำดับ เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®T –Easy แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ต่อไป

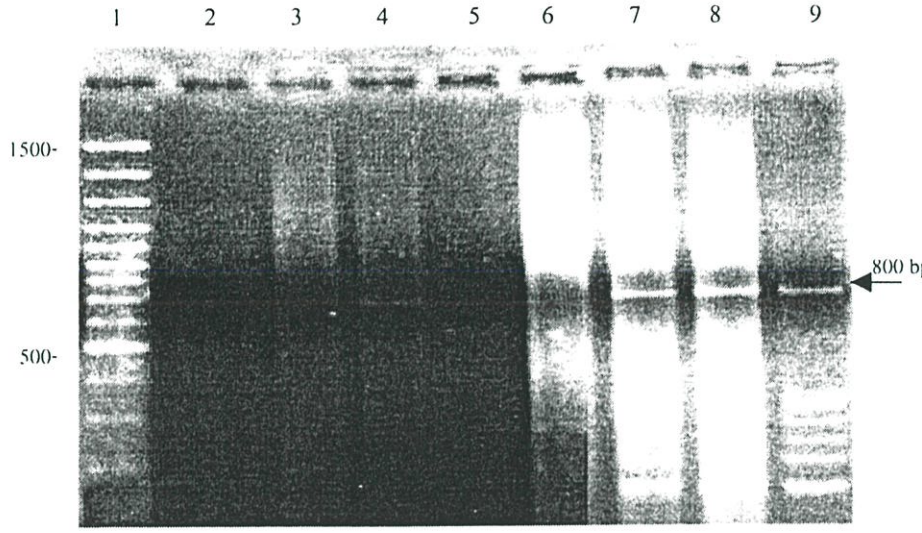
4.2.2 ตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียโดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพร์เมอร์ PC1, PC2 พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอผลผลิตเกิดขึ้นตามขนาดที่ต้องการ คือที่ประมาณ 405 คู่เบส และ 807 คู่เบสดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp ladder
ช่องที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R02
ช่องที่ 3 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R14
ช่องที่ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R16
ช่องที่ 5 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R18
ช่องที่ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R19
ช่องที่ 7 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R08
ช่องที่ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R09
ช่องที่ 9 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R10

ภาพที่ 4.7 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้เชื้อบริสุทธิ์เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC1 ในการตรวจสอบยีน

แยกแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาดตามต้องการ (ประมาณ 400 คู่เบส) ออกจากเจล ซึ่งได้แก่แถบดีเอ็นเอในช่องที่ 3, 7, 8 และ 9 จากดีเอ็นเอแม่แบบ R14, R08, R09 และR10 ตามลำดับ เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®T –Easy แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ต่อไป



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp ladder

ช่องที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R02

ช่องที่ 3 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R14

ช่องที่ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R16

ช่องที่ 5 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R18

ช่องที่ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R19

ช่องที่ 7 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R08

ช่องที่ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R09

ช่องที่ 9 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ R10

ภาพที่ 4.8 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้เชื้อบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพร์เมอร์ PC2 ในการตรวจสอบยีน

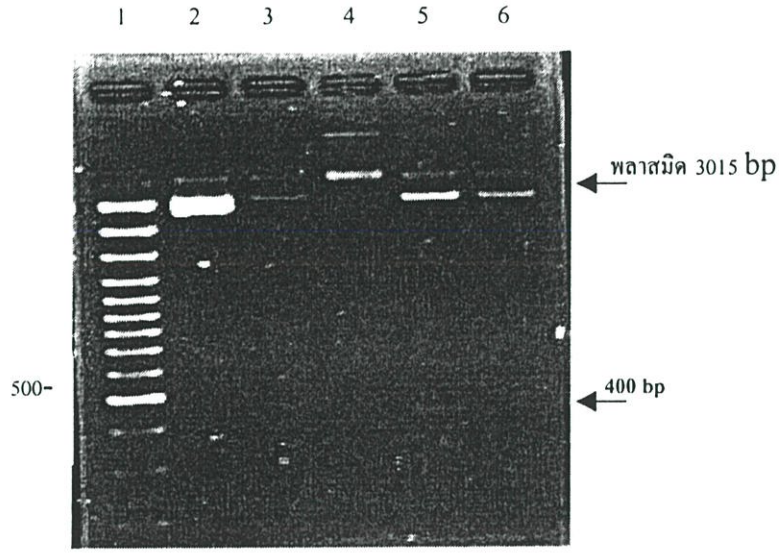
แยกแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาดตามต้องการ (ประมาณ 800 คู่เบส) ออกจากเจล ซึ่งได้แก่แถบดีเอ็นเอในช่องที่ 7, 8 และ 9 จากดีเอ็นเอแม่แบบ R08, R09 และR10 ตามลำดับ เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®T –Easy แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

4.3 การถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและการตรวจสอบโคลนที่ได้

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®T – Easy แล้วทำการถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* DH5α จากนั้นนำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกทางฟีโนไทป์นั่นคือโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ผสมด้วยแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรและมีสีขาวเมื่อมีการเติม X- Gal ในอาหาร มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการสอดแทรกเพื่อหาโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการจากตัวอย่างเชื้อต่าง ๆ

4.3.1 การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด

โคลนที่ได้ถูกนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Anonymous (2003) เพื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่สอดแทรกโดยใช้เอนไซม์ที่สามารถตัดได้เฉพาะส่วนที่สอดแทรก ซึ่งเวคเตอร์ pGEM®T - Easy ที่ใช้จะมีบริเวณที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I 2 ตำแหน่ง คือบริเวณหัวและท้ายส่วนที่สอดแทรกชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป (ภาพที่ 3.3 และภาคผนวก ก) ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของยีนที่สอดแทรกเข้าไปได้โดยการเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซึ่งสามารถเลือกโคลนที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (407 และ 870 คู่เบส) ดังแสดงในภาพที่ 4.9-4.12 โดยผลตั้งแต่การเพิ่มขยายยีนจากตัวอย่างต่าง ๆ จำนวนโคลนที่คัดเลือกและจำนวนโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกตามขนาดที่ต้องการได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.4



ช่องที่ 1 100 bp ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEM-T

ช่องที่ 3 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 6.1

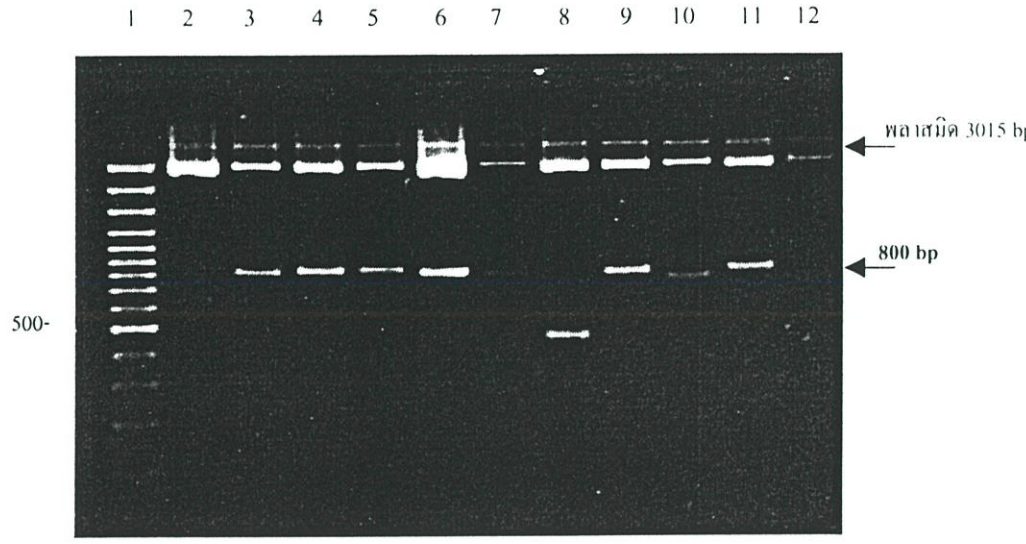
ช่องที่ 4 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 6.2

ช่องที่ 5 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 6.4

ช่องที่ 6 พลาสมิด pGEM-T

ภาพที่ 4.9 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน 6-1 , 6-2 และ 6-4 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I

โคลนที่ 6.4 มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกตามขนาดที่ต้องการ โดยจะนำไปทำการตรวจสอบลำดับเบสต่อไป



ช่องที่ 1 100 bp ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEM-T

ช่องที่ 3 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 10.4

ช่องที่ 4 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 10.10

ช่องที่ 5 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 11.1

ช่องที่ 6 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 11.3

ช่องที่ 7 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 12.2

ช่องที่ 8 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 12.3

ช่องที่ 9 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 12.4

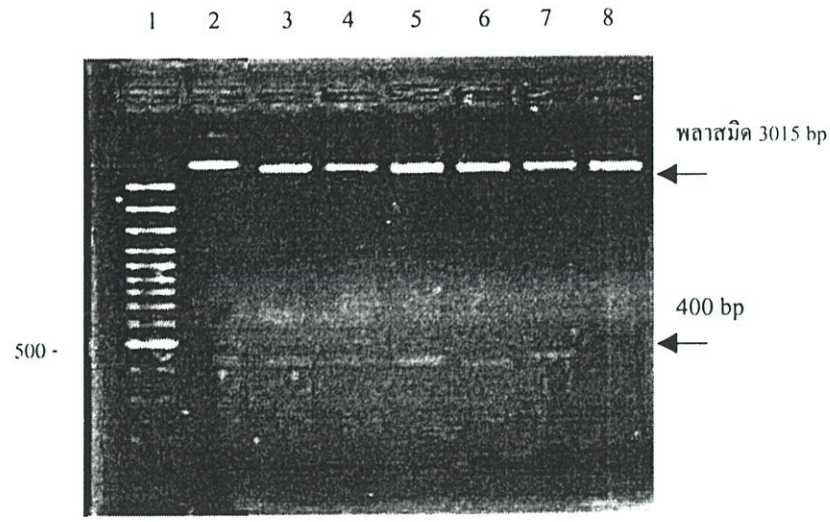
ช่องที่ 10 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 12.5

ช่องที่ 11 พลาสมิดที่ได้จากโคลน 12.6

ช่องที่ 12 พลาสมิด pGEM-T

ภาพที่ 4.10 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน 10-4 ,10-10,11-1,11-3, 12-2,12-4,12-5 และ 12-6 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I

โคลนที่ 10.4, 10.10, 11.1, 11.3, 12.2, 12.4, 12.5, 12.6 มีขนาดดีเอ็นเอสอดแทรกตามขนาดที่ต้องการ (800 คู่เบส)โดยโคลนที่ 10.4, 10.10, 11.1, 11.3, 12.4, 12.5 ถูกคัดเลือกไปหาลำดับเบสต่อไป



ช่องที่ 1 100 bp ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEM-T

ช่องที่ 3 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R14.2

ช่องที่ 4 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R14.5

ช่องที่ 5 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R14.7

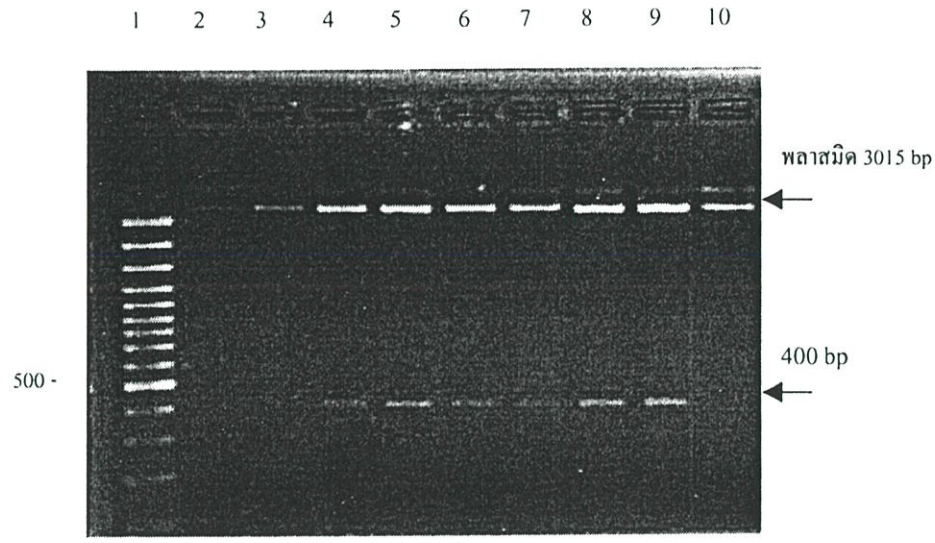
ช่องที่ 6 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R14.8

ช่องที่ 7 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R14.9

ช่องที่ 8 พลาสมิด pGEM-T

ภาพที่ 4.11 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน R14-2, R14-5, R14-7, R14-8 และ R14-9 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I

โคลนที่ R14.2, R14.5, R14.7, R14.8, R14.9 มีขนาดดีเอ็นเอสอดแทรกตามขนาดที่ต้องการ โดยโคลนที่R14.5, R14.8 (400 คู่เบส) ถูกคัดเลือกไปหาลำดับเบสต่อไป



ช่องที่ 1 100 bp ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEM-T

ช่องที่ 3 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R08.3

ช่องที่ 4 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R10.2

ช่องที่ 5 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R10.4

ช่องที่ 6 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R09.4

ช่องที่ 7 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R09.6

ช่องที่ 8 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R09.7

ช่องที่ 9 พลาสมิดที่ได้จากโคลน R09.8

ช่องที่10 พลาสมิด pGEM-T

ภาพที่ 4.12 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากโคลน R08-3 , R10-2, R10-4, R09-4, R09-6, R09-7 และ R09-8 ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I

โคลนที่ R10.2, R10.4, R09.4, R09.6, R09.7, R09.8 มีขนาดดีเอ็นเอสอดแทรกตามขนาดที่ต้องการ (400 คู่เบส)โดยโคลนที่ R09.4, R10.4 ถูกคัดเลือกไปหาลำดับเบสต่อไป

ตารางที่ 4.4 แสดงโคลนที่มีดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการ

ดีเอ็นเอแม่แบบ	ไพร์เมอร์	ตรวจสอบยีน	ขนาดดีเอ็นเอผลผลิต(คู่เบส)	จำนวนโคโลนีสีขาวที่ได้ (ชื่อโคลน)	จำนวนโคลนที่ดีเอ็นเอเสอดแทรกตามต้องการ
<u>กลุ่มจุลินทรีย์</u>					
C1.1	PC1	*EndA*	400	2 (1.1,1.2)	0
C1.2	PC1	*EndA*	400	3 (2.1,2.2)	0
C3.2	PC1	*EndA*	400	4 (6.1,6.2,6.3,6.4)	1 (6.4)*
C2.1	PC2	*CelB*	800	2 (8.1,8.2)	0
C3.1	PC2	*CelB*	800	10 (10.1,10.2,10.3,10.4,10.5,10.6,10.7,10.8,10.9,10.10)	2 (10.4*,10.10*)
C3.2	PC2	*CelB*	800	10 (11.1,11.2,11.3,11.4,11.5,11.6,11.7,11.8,11.9,11.10)	2 (11.1*,11.3*)
C4.1	PC2	*CelB*	800	8 (12.1,12.2,12.3,12.4,12.5,12.6,12.7,12.8)	5 (12.2,12.3,12.4*,12.5*,12.6)
<u>โคโลนีเดี่ยว</u>					
R14	PC1	*EndA*	400	9 (R14.1,R14.2,R14.3,R14.4,R14.5,R14.6,R14.7,R14.8,R14.9)	4 (R14.2,R14.5*,R14.7,R14.8*,R14.9)
R08	PC1	*EndA*	400	3 (R08.1,R08.2,R08.3)	0
R09	PC1	*EndA*	400	10 (R09.1,R09.2,R09.3,R09.4,R09.5,R09.6,R09.7,R09.8,R09.9,R09.10)	4 (R09.4*,R09.6,R09.7,R09.8)
R10	PC1	*EndA*	400	5 (R10.1,R10.2,R10.3,R10.4,R10.5)	2 (R10.2,R10.4*)
R08	PC2	*CelB*	800	0	0
R09	PC2	*CelB*	800	0	0
R10	PC2	*CelB*	800	0	0

*แสดงโคลนที่ถูกคัดเลือกไปทำการตรวจสอบ

4.3.2 ผลจากการตรวจสอบลำดับเบส

ผลที่ได้จากการตรวจสอบลำดับเบสพบว่า โคลน 10.4 ซึ่งมีลำดับเบสในภาพที่ 4.13 และโคลน 11.3 ซึ่งมีลำดับเบสในภาพที่ 4.14 มียีนสอดแทรกที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 ที่ 81 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.15 และ 4.16) โดยลำดับเบสของโคลน 10.4 และ 11.3 มีความคล้ายคลึงกัน 84 เปอร์เซ็นต์ดังภาพที่ 4.17 ส่วนโคลนอื่น ๆ ลำดับเบสที่ได้ไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน endoglucanase เลย

```
ACAAACGCTTCCAACGCAGGTTCTGACTGGAAGCACAGCTCGGACACA
T  N  A  S  N  A  G  S  D  W  K  H  S  S  D  T
AATCTCTCGGAGTCAGATGATCCCGCTGACTGCGTTCAGGTACTCTCA
N  L  S  E  S  D  D  P  A  D  C  V  Q  V  L  S
AAGGACGCAGCAAAGAACAATGTTGGCTACAAGCTCACAACATTGCAG
K  D  A  A  K  N  N  V  G  Y  K  L  T  T  L  Q
CTTGCAGGCTATGTTTCGGCAGACAAGGACGGTACGGTAACGGAGGAG
L  A  G  Y  V  S  A  D  D  G  T  V  T  V  E  E
GAGAAAGCTCCTTCAAAACGCTGGAACAAGGTAGTTCTCACGAAGGGA
E  K  A  P  S  K  R  W  N  K  V  V  L  T  K  G
AGTGATTTTGCCGATACTCCCGACCTTACAGACGGTGTAGTCTACATG
S  D  F  A  D  T  P  D  L  T  D  G  V  V  Y  M
GACGAGTATGTGAACTACATCATCAAGAAGCTTGGCAATTCAAAATCT
D  E  Y  V  N  Y  I  I  K  K  L  G  N  S  K  S
GAGACAGGTATCCAGGGCTACAGCCTTGACAATGAGCCTGTACTCTGG
E  T  G  I  Q  G  Y  S  L  D  N  E  P  V  L  W
AACGACACACACAGCAGAATGCACCCCGAGCCTGTAACTATCAAGGAG
N  D  T  H  S  R  M  H  P  E  P  V  T  I  K  E
CTTGGTGAAAAGTCCATAGAAATGGCAAGAAATGTAAAGAAGCTTGAT
L  G  E  K  S  I  E  M  A  R  N  V  K  K  L  D
CCCGATGCAGAGGTATTCGGACCTGCTCTCTACGGCTATACAGCTTTC
P  D  A  E  V  F  G  P  A  L  Y  G  Y  T  A  F
GACCACCTCGATGACGACGATGCACATACCGAGTGGGAGGAAGTAAAG
D  H  L  D  D  D  D  A  H  T  E  W  E  E  V  K
GCTGCAAATAACTATCACTGGTACCTTGACTGCTATCTCGACCAGATG
A  A  N  N  Y  H  W  Y  L  D  C  Y  L  D  Q  M
AAAAAGGCTTCCGAGGAGACAGGCACGAGACTCCTTGATGTACTTGAT
K  K  A  S  E  E  T  G  T  R  L  L  D  V  L  D
ATCCACTACTACTCAGAGTCTGCAAGAAACGGCATAGAGGACAGGCTC
I  H  Y  Y  S  E  S  A  R  N  G  I  E  D  R  L
CAGTCTGTACGTACGCTCTATGAGGAAGGCTTCTCCGAGAAC
Q  S  V  R  T  L  Y  E  E  G  F  S  E  N
```

ภาพที่ 4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน 10.4

```
ACAAACGCTTCCAATGCAGGCTCCGACTGGAAGCACAGCTCGGACACC
T  N  A  S  N  A  G  S  D  W  K  H  S  S  D  T
AACCTATCGGAGTCCGACGATCCCGCAGACTGCGTTCAGCAGCTCTCA
N  L  S  E  S  D  D  P  A  D  C  V  Q  Q  L  S
AAGGACGCAGTCAAGAACAATGTGGGATACAAACTGACAACTCTCCAG
K  D  A  V  K  N  N  V  G  Y  K  L  T  T  L  Q
CTTGCAGGCTATGTTTCCGCTGACAAGAACGGTCCCGTAAGCGAGGAG
L  A  G  Y  V  S  A  D  K  N  G  P  V  S  E  E
GAGACAGCTCCCTCAGACCGCTGGAACAAGGTAGTCCTCACAAAGGGC
E  T  A  P  S  D  R  W  N  K  V  V  L  T  K  G
TCTGACTTTGCAGATACTCCAGACCTGACAGACGGCGTAGTCTACATG
S  D  F  A  D  T  P  D  L  T  D  G  V  V  Y  M
GACGAGTACGTAAACTACATCATCAAGAAGCTGGGCGATTCCAAGTCC
D  E  Y  V  N  Y  I  I  K  K  L  G  D  S  K  S
GCAACAGGTATTCAGGGCTACAGCCTTGACAACGAGCCTGTTCTCTGG
A  T  G  I  Q  G  Y  S  L  D  N  E  P  V  L  W
AACGACACCCACAGCAGAATGCACCCCGAGCCTGTTACTATCGAGGAG
N  D  T  H  S  R  M  H  P  E  P  V  T  I  E  E
CTCAGCAAAAAGTCCATAGAAATGGCTAAGAACGTCAAGAAGCTTGAC
L  S  K  K  S  I  E  M  A  K  N  V  K  K  L  D
CCCAACGCAGAGGTATTCGGTCCTGCGCTGTACGGATACACTGCTTTC
P  N  A  E  V  F  G  P  A  L  Y  G  Y  T  A  F
GACCACCTCGATGACGACGATCAGCACACCGAATGGGAAACTGTAAAG
D  H  L  D  D  D  D  Q  H  T  E  W  E  T  V  K
GCTGCCAACAACTACCACTGGTACCTTGACAGCTACCTTGACGATATG
A  A  N  N  Y  H  W  Y  L  D  S  Y  L  D  D  M
CACAAGGCTTCCGAGGAGGCAGGCACAAGACTCCTTGATGTTCTGGAT
H  K  A  S  E  E  A  G  T  R  L  L  D  V  L  D
ATCCACTACTACTCAGAGTCAGCACGTAAGGGCGCTGAGGACAGAGTT
I  H  Y  Y  S  E  S  A  R  K  G  A  E  D  R  V
CAGTCAGTCCGCACACTTTATGAAAAGGGCTTCGTTGAGAAC
Q  S  V  R  T  L  Y  E  K  G  F  V  E  N
```

ภาพที่ 4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนของโคลน 11.3

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	identities
AJ298117|AJ298117.1 Ruminococcus flavefaciens 17 endB gene for c...	266	407/498(81%)
U08621|U08621.1 Ruminococcus flavefaciens FD-1 CELB (celB) gene,...	145	151/175(85%)
AP005088|AP005088.1 Vibrio parahaemolyticus DNA, chromosome 2, c...	42	21/21(100%)
BX957222|BX957222.1 Methanococcus maripaludis strain S2, complet...	38	19/19(100%)
AE000579|AE000579.1 Helicobacter pylori 26695 section 57 of 134 ...	38	19/19(100%)
BX572602|BX572602.1 Rhodopseudomonas palustris CGA009 complete	36	18/18(100%)
BX321861|BX321861.1 Nitrosomonas europaea ATCC 19718, complete g...	36	18/18(100%)
AP005949|AP005949.1 Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, compl...	36	18/18(100%)
AF073793|AF073793.1 Nitrosomonas europaea ammonia monooxygenase ...	36	18/18(100%)
AE013230|AE013230.1 Methanosarcina mazei strain Goe1, section 12...	36	21/22(95%)

ภาพที่ 4.15 ผลจากการ BLAST (ddbj) ของโคลน10.4 เพื่อเทียบความคล้ายคลึงกับยีนอื่นที่มีในฐานข้อมูล GenBank

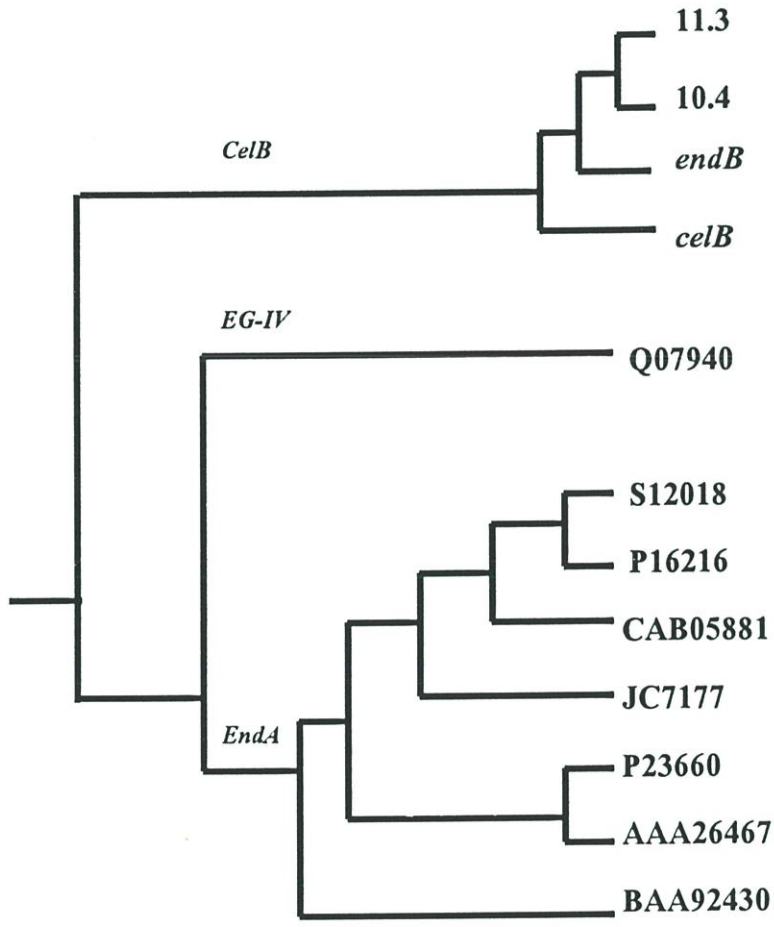
Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	identities
AJ298117|AJ298117.1 Ruminococcus flavefaciens 17 endB gene for c...	289	446/546(81%)
U08621|U08621.1 Ruminococcus flavefaciens FD-1 CELB (celB) gene,...	232	380/465 (81%)
M81087|M81087.1 Thiobacillus ferrooxidans F1F0-ATPase c subunit ...	38	19/19(100%)
BX321864|BX321864.1 Nitrosomonas europaea ATCC 19718, complete g..	38	19/19(100%)
AJ250472|AJ250472.1 Desulfobacter vibrioformis dissimilatory sul...	38	19/19(100%)
BX957222|BX957222.1 Methanococcus maripaludis strain S2, complet...	36	18/18(100%)
L02948|L02948.1 E. coli D-amino acid dehydrogenase and alanine r...	36	18/18(100%)
D90753|D90753.1 Escherichia coli genomic DNA. (26.5 - 26.8 min).	36	18/18(100%)
BX572602|BX572602.1 Rhodopseudomonas palustris CGA009 complete g..	36	18/18(100%)
BX572094|BX572094.1 Prochlorococcus marinus MED4 complete genome..	36	21/22(95%)

ภาพที่ 4.16 ผลจากการ BLAST (ddbj) ของโคลน11.3 เพื่อเทียบความคล้ายคลึงกับยีนอื่นที่มีในฐานข้อมูล GenBank

```
10-4: 1          GACAAACGCTTCCAACGCAGGTTCTGACTGGAAGCACAGCTCGGACACAAATCTCTCGGA 60
11-3: 1          GACAAACGCTTCCAATGCAGGCTCCGACTGGAAGCACAGCTCGGACACCAACCTATCGGA 60
                 ************** ***** ** ********************** ** ** *****

10-4: 61         GTCAGATGATCCCGCTGACTGCGTTCAGGTACTCTCAAAGGACGCAGCAAAGAACAATGT 120
11-3: 61         GTCCGACGATCCCGCAGACTGCGTTCAGCAGCTCTCAAAGGACGCAGTCAAGAACAATGT 120
                 *** ** ******** ***********   ***************  ***********

10-4: 121        TGGCTACAAGCTCACAACATTGCAGCTTGCAGGCTATGTTTCGGCAGACAAGGACGGTAC 180
11-3: 121        GGGATACAAACTGACAACTCTCCAGCTTGCAGGCTATGTTTCCGCTGACAAGAACGGTCC 180
                 ** ***** ** *****  * ******************** ** ****** ***** *

10-4: 181        GGTAACGGAGGAGGAGAAAGCTCCTTCAAAACGCTGGAACAAGGTAGTTCTCACGAAGGG 240
11-3: 181        CGTAAGCGAGGAGGAGACAGCTCCCTCAGACCGCTGGAACAAGGTAGTCCTCACAAAGGG 240
                 ****  ********** ****** *** * ***************** ***** *****

10-4: 241        AAGTGATTTTGCCGATACTCCCGACCTTACAGACGGTGTAGTCTACATGGACGAGTATGT 300
11-3: 241        CTCTGACTTTGCAGATACTCCAGACCTGACAGACGGCGTAGTCTACATGGACGAGTACGT 300
                    *** ***** ******** ***** ******** ******************** **

10-4: 301        GAACTACATCATCAAGAAGCTTGGCAATTCAAAATCTGAGACAGGTATCCAGGGCTACAG 360
11-3: 301        AAACTACATCATCAAGAAGCTGGGCGATTCCAAGTCCGCAACAGGTATTCAGGGCTACAG 360
                  ******************** *** **** ** ** *  ******** ***********

10-4: 361        CCTTGACAATGAGCCTGTACTCTGGAACGACACACACAGCAGAATGCACCCCGAGCCTGT 420
11-3: 361        CCTTGACAACGAGCCTGTTCTCTGGAACGACACCCACAGCAGAATGCACCCCGAGCCTGT 420
                 ********* ******** ************** **************************

10-4: 421        AACTATCAAGGAGCTTGGTGAAAAGTCCATAGAAATGGCAAGAAATGTAAAGAAGCTTGA 480
11-3: 421        TACTATCGAGGAGCTCAGCAAAAAGTCCATAGAAATGGCTAAGAACGTCAAGAAGCTTGA 480
                  ****** *******  *  ******************** *  ** ** ***********

10-4: 480        TCCCGATGCAGAGGTATTCGGACCTGCTCTCTACGGCTATACAGCTTTCGACCACCTCGA 540
11-3: 480        CCCCAACGCAGAGGTATTCGGTCCTGCGCTGTACGGATACACTGCTTTCGACCACCTCGA 540
                  *** * ************** ***** ** ***** ** ** *****************

10-4: 541        TGACGACGATGCACATACCGAGTGGGAGGAAGTAAAGGCTGCAAATAACTATCACTGGTA 600
11-3: 541        TGACGACGATCAGCACACCGAATGGGAAACTGTAAAGGCTGCCAACAACTACCACTGGTA 600
                 **********   ** ***** *****    *********** ** ***** ********

10-4: 600        CCTTGACTGCTATCTCGACCAGATGAAAAAGGCTTCCGAGGAGACAGGCACGAGACTCCT 660
11-3: 600        CCTTGACAGCTACCTTGACGATATGCACAAGGCTTCCGAGGAGGCAGGCACAAGACTCCT 660
                 ******* **** ** *** * *** * *************** ******* ********

10-4: 661        TGATGTACTTGATATCCACTACTACTCAGAGTCTGCAAGAAACGGCATAGAGGACAGGCT 720
11-3: 661        TGATGTTCTGGATATCCACTACTACTCAGAGTCAGCACGTAAGGGCGCTGAGGACAGAGT 720
                 ****** ** ********************** *** * ** ***   ********  *

10-4: 721        CCAGTCTGTACGTACGCTCTATGAGGAAGGCTTCTCCGAGAACA
11-3: 721        TCAGTCAGTCCGCACACTTTATGAAAAGGGCTTCGTTGAGAACA
                 ***** ** ** ** ** *****  * ******   *******
```

ภาพที่ 4.17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากโคลน 10.4 กับโคลน 11.3 ด้วยโปรแกรม ClustalW(ddbj), Identity 84 เปอร์เซ็นต์

กรดอะมิโนจากโคลน 10.4 และ11.3 สามารถนำไปหาความสัมพันธ์กับลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ClustalW(Genomenet) ของยีนในกลุ่ม *CelB* ที่ใช้ออกแบบไพร์เมอร์ได้ดังภาพที่ 4.18 โดยพบว่า ลำดับกรดอะมิโนจากโคลน 10.4 และ 11.3 มีความคล้ายคลึงกับ *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการ BLAST ที่ได้ (ในภาพ 14.5 และ 14.6)



ภาพที่ 4.18 แสดงความสัมพันธ์ลำดับกรดอะมิโนจากโคลน 10.4 และ11.3 กับลำดับกรดอะมิโนของยีนในกลุ่ม *CelB* โดย *endB* แสดง *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117) และ *celB* แสดง *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621)

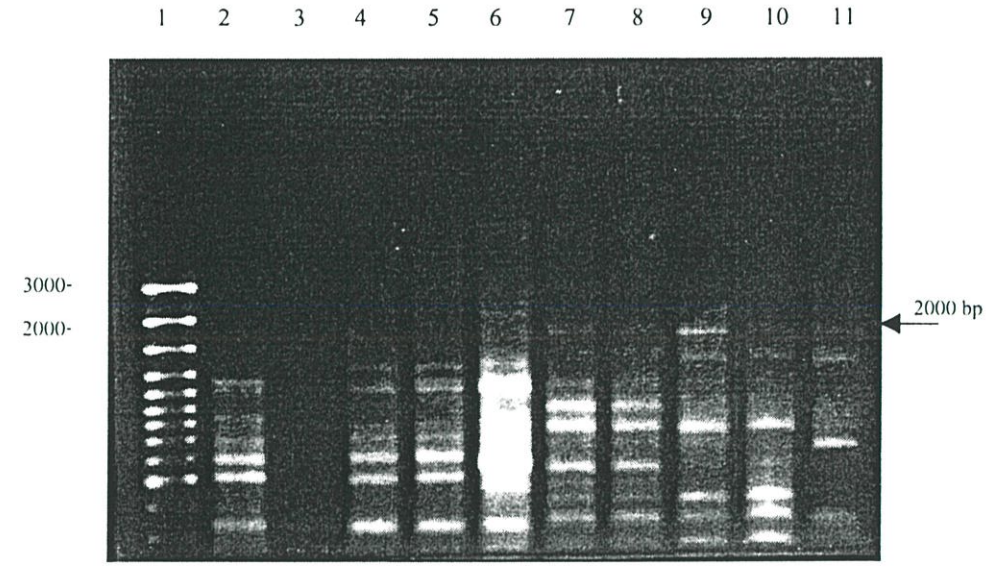
4.3.3 ผลจากการหาลำดับเบสสามารถนำมาออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ (ภาพที่ 4.19) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621) (ภาคผนวก ข) เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีนเพิ่มโดยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการใช้ไพร์เมอร์ P1 กับ P2 จะเท่ากับ 1,900 คู่เบส และเกิดจากการใช้ไพร์เมอร์ P1 กับ P3 จะเท่ากับ 2,400 คู่เบส ผลจากการทำพีซีอาร์ที่ได้แสดงในภาพที่ 4.20

P1 5' -ATg A(A/G)A AAA (A/T)CA (G/A)C(G/A) GCA TT-3'

P2 5'-TCA AAC TT(G/T) ACG (G/A)T(T/A) GCG GA-3'

P3 5'-TTA TTC GGG AAG CTT GTC TA-3'

ภาพที่ 4.19 แสดงไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117) และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621)



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp Plus ladder

ช่องที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1 และใช้ไพรเมอร์ P1+P2

ช่องที่ 3 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1 ,,

ช่องที่ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2 ,,

ช่องที่ 5 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2 ,,

ช่องที่ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.1 ,,

ช่องที่ 7 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1 และใช้ไพรเมอร์ P1+P3

ช่องที่ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.1 ,,

ช่องที่ 9 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2 ,,

ช่องที่ 10 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C3.2 ,,

ช่องที่ 11 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ C4.1 ,,

ภาพที่ 4.20 แสดงดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยพีซีอาร์ ใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใย (C3-C4) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens*(AJ298117) และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621)

4.3.4 นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ใหม่ที่ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบสจากช่องที่ 7, 8, 10ไปทำการโคลนและหาลำดับเบสพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 (AJ298117) และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621)

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

สัตว์เคี้ยวเอื้องมีความสามารถในการย่อยอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบได้สูง เนื่องจากภายในกระเพาะรูเมนมีแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยเซลลูเลสได้สูง การคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านี้จึงมีความสำคัญสำหรับการพัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ต่อไป แต่เนื่องจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน การนำมาเพาะเลี้ยงทำได้ยาก ดังนั้นการนำเฉพาะส่วนของยีนที่ผลิตเอนไซม์มาถ่ายทอดเข้าสู่แบคทีเรียชนิดใหม่ที่เจริญเติบโตได้ดีและเพาะเลี้ยงได้ง่ายซึ่งจะให้ผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากกระเพาะรูเมนของโคโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์รวมทั้งการถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* หรือเป็นการใช้เทคนิคที่เรียกว่า PCR – based Cloning ซึ่งการใช้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยจะทำให้ได้ส่วนของยีนที่ไม่เจือปนกับดีเอ็นเออื่น ๆ ที่ไม่ต้องการและลดปริมาณงาน ขั้นตอนในการตรวจสอบได้และเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบยีนที่ต้องการได้สูงขึ้น

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้

เมื่อนำแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโค มาทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงในอาหาร McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution โดยการใช้ Whatman No.1 filter paper เป็นสับสเตรท พบจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยกระดาษกรองในหลอดทดลองได้ โดยกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ได้และผลจากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยกระดาษกรองได้แตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง เนื่องมาจากการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนเป็นไปโดยสุ่ม ซึ่งอาจมีปัจจัยที่ได้แก่ ปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวัน ชนิดอาหาร ชนิดสัตว์ และสภาวะภายในกระเพาะรูเมน ที่ไม่ได้มีการกำหนดให้เป็นปัจจัยที่ต้องควบคุม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลให้เกิดความแปรปรวนของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน (เมธา วรรณพัฒน์. 2533; France and Sidden. 1991; Dehority and Oripin. 1997) ซึ่งจุลินทรีย์ที่ได้นำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อไว้ตรวจสอบยีนเซลลูเลส อีกส่วนหนึ่งนำไปแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร RFCA ซึ่งใช้ cellulose powder เป็นสับสเตรทเพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ โดยคัดเลือกลักษณะของโคโลนีที่สมบูรณ์ ดังรายงานของพิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ (2527) ที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์โดยสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง

เอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดมี 3 สายพันธุ์ ส่วนการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบได้ทั้งสิ้น 32 สายพันธุ์ จากนั้นนำ 32 สายพันธุ์มาตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เบื้องต้น (primary screening) โดยวิธีการสร้างวงใสบนอาหาร CMC agar หลังจากย้อมทับด้วย congo red ซึ่ง Teather and Wood (1982) กล่าวว่าวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้สะดวกและรวดเร็ว โดยการตรวจสอบพบว่ามีแบคทีเรียสามารถสร้างวงใสได้ทั้งสิ้น 15 สายพันธุ์ ซึ่งมี 8 สายพันธุ์สร้างวงใสสูงสุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสตั้งแต่ 3 ถึง 4 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำ 8 สายพันธุ์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตราฐาน 2xYT เพื่อสกัดดีเอ็นเอไว้ตรวจสอบยีนเซลลูเลสและเก็บเชื้อในกลีเซลรอลต่อไป

ขั้นตอนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดต้องกระทำในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนเพื่อสร้างสภาวะภายในกระเพาะรูเมนของโค โดยการถ่ายเชื้อมาเพาะเลี้ยงในแต่ละขั้นตอนต้องกระทำอย่างรวดเร็วเพื่อให้เชื้อสัมผัสกับออกซิเจนน้อยที่สุดเพราะเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงนั้นไม่สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้นานจึงควรกระทำด้วยความระมัดระวังและรวดเร็ว ส่วนขั้นตอนสุดท้ายเนื่องจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากกระเพาะรูเมนมีการเจริญเติบโตช้าต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร 2xYT จึงต้องเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและสำหรับการเก็บเชื้อต่อไป เนื่องจากอาหาร 2xYT เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ดีดังนั้นในการเตรียมอาหารและการถ่ายเชื้อต้องกระทำด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการและควรมีการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อีกครั้งหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อใน 2xYT

5.2 การตรวจสอบยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจสอบยีนเซลลูเลสได้อย่างรวดเร็วซึ่งได้ยีนที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ไม่มีการเจือปนกับดีเอ็นเออื่นที่ไม่ต้องการ แต่การใช้วิธีนี้จำเป็นต้องมีการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจเพื่อนำมาออกแบบเป็นไพร์เมอร์ เนื่องจากยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมีจำนวนมากและมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จึงจำเป็นต้องนำลำดับอะมิโนจากยีนเอนโดกลูคาเนส มาหาความสัมพันธ์เพื่อแบ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ ซึ่งจากการหาความสัมพันธ์ทำให้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ *EndA, CelB, EG-IV* จากนั้นเปรียบเทียบกรดอะมิโนภายในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งได้มีการนำลำดับกรดอะมิโนจากแบคทีเรียชนิดอื่นมาเปรียบเทียบเพื่อหาความคล้ายคลึงเพิ่ม สามารถออกแบบเป็นไพร์เมอร์ได้เป็น PC1, PC2, PC3 ซึ่งเป็น degenerate primer เพราะกรดอะมิโนมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์มากกว่าหนึ่งแบบจึงจำเป็นต้องออกแบบเพื่อให้ไพร์เมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้มากที่สุด จากนั้นจึงนำไพร์เมอร์ที่ได้ไป

ใช้ในการตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสและแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่เกิดกิจกรรมบนอาหาร CMC agar

ผลการทดลองจากการตรวจสอบยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าการใช้ไพร์เมอร์ PC1 และ PC2 กับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสเกิดดีเอ็นเอผลผลิตตามขนาดที่ต้องการ แต่การใช้ไพร์เมอร์ PC3 ไม่พบอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไม่มียีนในกลุ่ม *EG-IV* หรืออาจจะมี แต่เป็นจำนวนน้อย แม้ว่าจะมีการปรับสภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์แล้วก็ไม่พบดีเอ็นเอผลผลิตตามขนาดที่ต้องการ ดังนั้นจึงนำไพร์เมอร์ PC1 และ PC2 ไปใช้ในการตรวจสอบยีนเซลลูเลสกับแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่เกิดกิจกรรมบน CMC agar เท่านั้น ในการทำพีซีอาร์จะพบว่าไพร์เมอร์เป็น degenerate จึงมีดีเอ็นเอผลผลิตขนาดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นด้วย ดังนั้นจึงต้องปรับสภาวะเพื่อให้แถบดีเอ็นเอผลผลิตมีความชัดเจนมากที่สุดโดยการลดอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) (เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545) รวมทั้งเพิ่มเวลาการสังเคราะห์ในขั้นตอนสุดท้าย (post – extention) ทำให้เกิดการเติมเบส A ที่ด้านปลายของดีเอ็นเอผลผลิตเพื่อการโคลน อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้จะทำการแยกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่ต้องการโดยจะคัดเลือกเฉพาะดีเอ็นเอผลผลิตที่มีความเข้มข้นมากเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการโคลนต่อไป

5.3 การถ่ายทอดยีนเซลลูเลสและการตรวจสอบโคลนที่ได้

การแยกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากดีเอ็นเอผลผลิต ได้จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ PC1 และ PC2 สามารถทำได้ โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลของบริษัท QIAGEN® ซึ่งสามารถใช้แยกดีเอ็นเอจากเจลทั่วไปได้โดยไม่ต้องเป็น low - melting agarose ซึ่งการแยกโดยวิธีนี้จะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ เนื่องจากใน column จะมี silica gel membrane ที่มีความสามารถในการจับเฉพาะดีเอ็นเอในสภาพบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (QG) จึงเป็นการแยกสิ่งต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกที่ได้แก่ loading dye, ethidium bromide และ เจลอะกาโรส โดยสารเหล่านี้ไม่มีความสามารถในการจับกับ silica gel membrane ก็จะถูกชะล้างออกไปโดยเอทธานอลที่มีในบัฟเฟอร์ PE และในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการชะล้างดีเอ็นเอออกมาโดยใช้ TE หรือใช้น้ำที่มี pH 7.0 ถึง 8.5 เนื่องจากดีเอ็นเออาจถูกทำลายได้ที่สภาวะเป็นกรด

หลังจากได้ดีเอ็นเอผลผลิตบริสุทธิ์ที่มีด้านปลายมีการเติม A จากการทำงานของ Taq polymerase ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดีเอ็นเอผลผลิตนี้สามารถเชื่อมต่อกับปลาย T ของดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ คือพลาสมิด pGEM®T –Easy ของบริษัท Promega® ได้อย่างจำเพาะ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ T_4 ligase การโคลนโดยใช้วิธี A-T เชื่อมต่อกันนี้จะทำให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายผสมอย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องนำทั้งดีเอ็นเอผลผลิตและดีเอ็นเอพาหะมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะเพื่อให้ปลายของดีเอ็นเอมี

ลักษณะเป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกันเป็นการลดขั้นตอนในการทำงานลง ขั้นตอนในการเชื่อมต่อนี้ต้องกระทำด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันการสูญเสียปลาย A ของดีเอ็นเอผลผลิตที่จะมีผลต่อการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ เพื่อการเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ควรทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสนานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้มาถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* ที่มีสภาพเป็น competent cell ซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ DH5α ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก DHα ที่บริเวณ lac operon โดยส่วน repression มีการตัดออกไปทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ β - galactosidase โดยไม่ต้องใช้ IPTG เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิต β - galactosidase ทำให้ลดจำนวนสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน ในพลาสมิดปกติจะมีการผลิตเอนไซม์ β - galactosidase ซึ่งเอนไซม์นี้มีความสามารถในการย่อย X-gal ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ใส่เข้าไปเพื่อตรวจสอบโคลนได้เป็นสีฟ้าแต่ในพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมแทรกเข้าไป เอนไซม์ β - galactosidase จะมีลำดับโปรตีนที่ผิดปกติไปทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้าทำให้เห็นเป็นโคโลนีสีขาว ในขั้นตอนการถ่ายทอดต้องกระทำด้วยความระมัดระวังโดยการผสมอย่างเบาๆ ระหว่างดีเอ็นเอสายผสมและเซลล์ *E.coli* เนื่องจากเซลล์อยู่ในสภาพที่อ่อนแอง่ายต่อการถูกทำลาย โคลนที่ได้เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสกัดพลาสมิดหรือเก็บไว้เป็นสต็อกควรเติมแอมพิซิลลินเสมอเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการสูญเสียของดีเอ็นเอผลผลิตที่ทำการถ่ายทอดเข้าไป

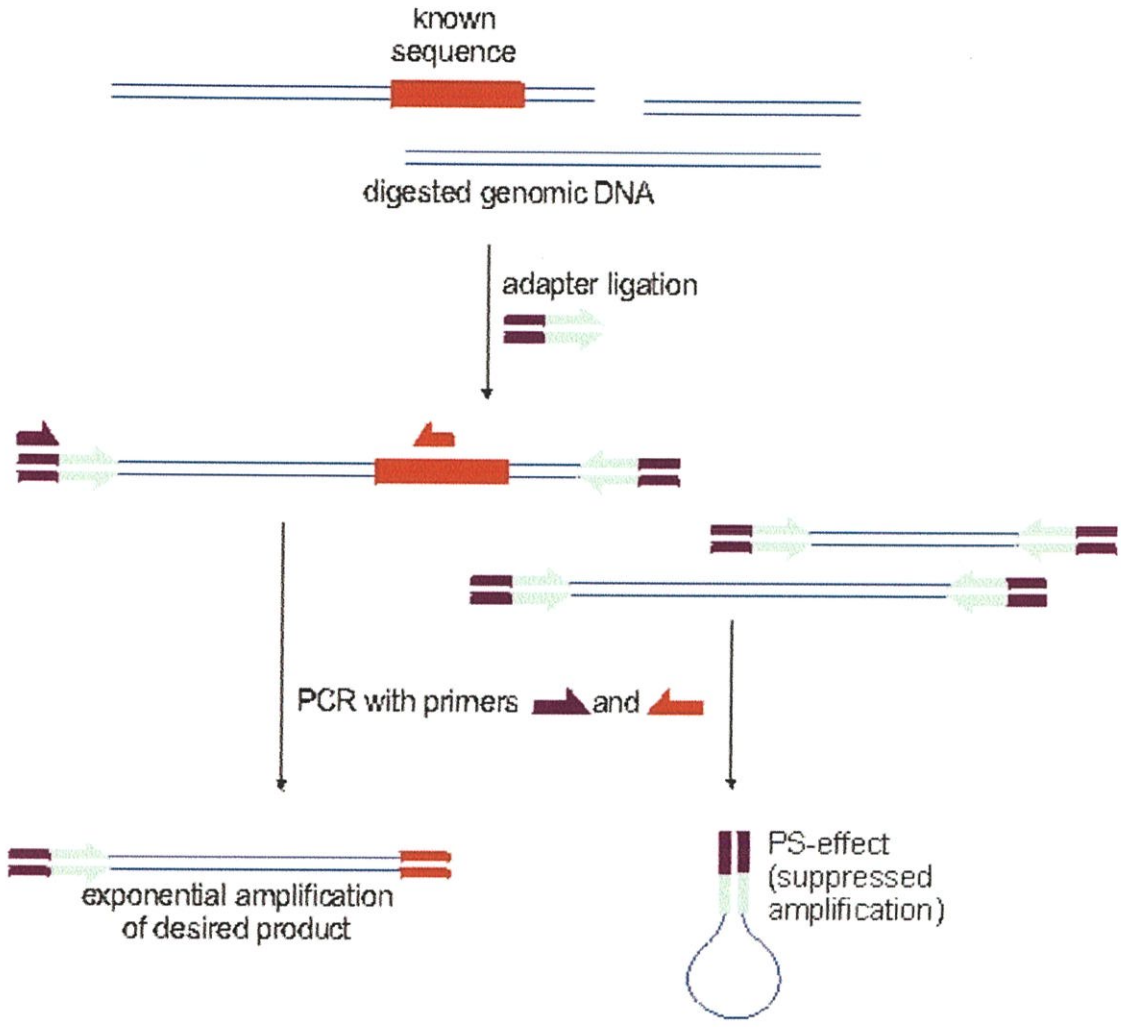
ผลจากการถ่ายทอดยีนและการคัดเลือกโคลนที่มีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการนำโคลนทั้งหมดที่คัดเลือกได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank พบว่าโคลนที่ 10.4 และ11.3 มีความคล้ายคลึงกับบางส่วนของยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งโคลนทั้งสองเป็นโคลนที่ได้รับชิ้นส่วนของยีนที่เกิดจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ C3 และใช้ไพร์เมอร์ PC2 โดยโคลนทั้งสองมีความคล้ายคลึงถึง 81 เปอร์เซ็นต์ กับยีนเซลลูเลส *endB* ของ *Ruminoccocus flavefaciens* 17 (AJ 298117) ซึ่ง Rincon *et al.* (2001) ได้รายงานว่า *Ruminoccocus flavefaciens* 17 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในกระเพาะรูเมน ซึ่งมีเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 5 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 60 ถึง 125 กิโลดาลตัน เมื่อได้ทำการแยกยีน *endB* จากแบคทีเรียชนิดนี้ถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* BL21 พบว่ามีจำนวน 808 กรดอะมิโน ซึ่งมีขนาด 87 กิโลดาลตัน โปรตีนนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากการสร้างวงใสบนอาหาร CMC agar หรือ lichenan (β1-3:1-4 glucan) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหาร mamnan, phosphoric acid-swollen cellulose และ Avicel จากนั้นทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นโดยใช้ CMC เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์มี Specific activity มี 2.5×10^{-3} μmol/min/mg ในขณะที่ใช้ lichenan เป็นสับสเตรท พบว่ามี

Specific activity 0.97 x10^{-3} μmol/min/mg โดยเอนไซม์จาก *end B* ที่ได้ แสดงการทำงานได้สูงสุดที่ระดับ pH 5.8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ข้อมูลที่ได้การเปรียบเทียบลำดับเบสพบว่า ยีนที่ได้จากโคลน 10.4 และ 11.3 มีความคล้ายคลึงแต่ไม่เหมือนกับส่วนของยีน *endB* จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากจึงควรที่จะทำการหาส่วนทั้งหมดของยีนเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์และพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยการนำยีนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันนี้ ซึ่งรวมไปถึงยีน *celB* ที่อยู่ในกลุ่มของยีนเดียวกันมาทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ให้ครอบคลุมส่วนของยีนทั้งหมดได้เป็นไพร์เมอร์ P1, P2, P3 ซึ่งดีเอ็นเอผลผลิตที่คาดว่าจะได้จากการใช้ไพร์เมอร์ P1+P2 จะเท่ากับ 1,900 เบสแพร์ และ P1+P3 จะเท่ากับ 2,400 เบสแพร์ ผลจากการทำพีซีอาร์ที่ได้พบว่าได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ขนาดประมาณ 2,000 เบสแพร์จากการใช้ไพร์เมอร์ P1+P3 ซึ่งน้อยกว่าขนาดที่กำหนดไว้ เมื่อนำไปโคลนและทำการตรวจสอบลำดับเบสพบว่าไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนเซลลูเลสใดๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีนจากจุลินทรีย์นี้เป็นยีนชนิดใหม่ ไพร์เมอร์ที่ทำการออกแบบจึงไม่มีความจำเพาะกับยีนที่มีอยู่ จึงต้องมีการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการหาส่วนทั้งหมดของยีนใหม่ อาทิเช่น วิธี Genome walking น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการหาส่วนของยีนเพิ่มจากส่วนของยีนที่มีอยู่จนครบทั้งหมดได้

หลักการหาชิ้นส่วนของยีนโดยวิธี Genome walking คือ การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ส่วนของยีนเพิ่มเติมจากส่วนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วส่วนหนึ่ง (ภาพที่ 5.1) ซึ่งทำได้โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตที่ต้องการหาส่วนทั้งหมดของยีนนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ ทำให้ได้ดีเอ็นเอหลายชิ้นส่วน จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับ adaptor หรือส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วทำให้ได้ปลายที่มีลักษณะเป็นปลายทู่ (blunt – end) หลังจากนั้นทำการเพิ่มขยายส่วนของยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับ adaptor และ ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนภายในสายของยีนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง adaptor และส่วนของยีนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นแล้ว ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอใดที่ไม่มียีนนั้นอยู่จะมีการสร้างเป็นรูปแบบที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (suppressed PCR)ขึ้น ส่วนที่มียีนอยู่ก็จะเกิดการสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนขึ้น จากนั้นจึงนำไปโคลนและทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมจากยีนที่มีถ้ายังไม่พบจุดเริ่มต้นและจุดสุดท้ายของยีนนั้นก็จำเป็นต้องเปลี่ยนเอนไซม์ตัดเฉพาะ แล้วนำไปทำพีซีอาร์อีกโดยเปลี่ยนไพร์เมอร์ใหม่จากส่วนของยีนที่ทราบเพิ่มเติม จนพบจุดเริ่มต้น (start codon) และจุดสิ้นสุด (stop codon) ของยีน จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ เพื่อสังเคราะห์ส่วนทั้งหมดของยีน และนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ต่อไป ซึ่งการใช้วิธี Genome walking นี้ทำให้สามารถหาส่วนของยีนได้อย่างรวดเร็วและครบถ้วนรวมไปถึงกรณีที่ยีนบางชนิดจำเป็นต้องมีส่วนที่ควบคุม

การทำงานเฉพาะของยีนนั้น ๆ ซึ่งสามารถนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนนั้น ๆได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย (Anonymous. 2004)



ภาพที่ 5.1 แสดงการทำ Genome Walking (Anonymous. 2004)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่อาศัยอยู่ในส่วนของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) โดยเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง คือ C1, C2, C3 และ C4 และนำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ Whatman No.1 filter paper เป็นสับสเตรท พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายแตกต่างกัน หลังจากทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์แล้วทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการสร้างวงใสบนอาหาร CMC agar พบแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด (วงใสมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1.5 เซนติเมตรขึ้นไป) มีจำนวน 8 สายพันธุ์ จากนั้นทำการตรวจสอบยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสอนุรักษ์ของยีนเซลลูเลส *EndA*, *CelB* และ*EG-IV* ที่ได้จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ซึ่งจะได้ไพร์เมอร์ PC1 , PC2, PC3 ตามลำดับ พบว่าดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ PC1 เกิดดีเอ็นเอผลผลิตตามขนาดที่ต้องการคือ 407 เบสจากแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใยได้คือ C1 และ C3 และแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ คือ R09, R10, R14 และจากการใช้ไพร์เมอร์ PC2 เกิดดีเอ็นเอผลผลิตขนาดที่ต้องการตามขนาดที่ต้องการคือ 870 เบสจากแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใยได้ คือ C2, C3 และ C4 และในแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ คือ R09, R10 ส่วนการใช้ไพร์เมอร์ PC3 ไม่พบดีเอ็นเอผลผลิตตามขนาดที่ต้องการ จากนั้นได้แยกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector และถ่ายทอดเข้าสู่ *E. coli* DH5α พบว่าโคลนที่ 10.4 และ11.3 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากดีเอ็นเอผลผลิตของ C3 และการใช้ไพร์เมอร์ PC2 (จากยีนเซลลูเลสกลุ่ม *CelB*) มีลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกับยีน *endB* จาก *Ruminococcus flavefaciens* 17 ถึง 81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนพบว่าอยู่ในกลุ่ม *CelB* จากนั้นทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จากกลุ่ม *CelB* เพื่อให้ครอบคลุมส่วนทั้งหมดของยีนจากยีนในกลุ่มนี้ พบว่าได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ขนาด 2,000 เบส เมื่อนำไปโคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนที่ต้องการ จึงควรเสนอวิธีการที่เหมาะสมในการหาส่วนของยีนที่สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิค Genome walking เพื่อหาส่วนของยีนเพิ่มเติมต่อไป

บรรณานุกรม

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

ชนันท์ อังศุธนะสมบัติ. 2533. "การนำพลาสมิดเข้าสู่บักเตรี." หน้า 51-68. ใน สุมาลี ตั้งปะดับกุล. **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม**. กรุงเทพฯ : โครงการอณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ทวีพร พูนดุสิต. 2544. "การเปรียบเทียบนิเวศน์วิทยาในกระเพาะหมักและสมรรถภาพการขุนของโคนม โคเนื้อ และกระบือเพศผู้." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทองเลียน บัวจูม. 2541. "การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพพืชอาหารสัตว์หมัก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ)บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เล่าแจ้ง. (นามแฝง). 2546. "คุยเฟื่องเรื่องเอนไซม์." **โลกสุกร**. 21(2): 27-28.

บุญทา วรินทร์รักษ์. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. **ปฏิบัติการบักเตรีขั้นสูง**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

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

ปรีชา ประเทพา. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ:การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม**. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. "ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ Agave sisalana Perrine." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. 2527. "การผลิตชีวก๊าซจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อคู่." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. "เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)." หน้า 4 – 25. ใน เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. **โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

รุจิกาญจน์ นาสนิท. 2546. " การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกียวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวุฒิ จุฬาลักษณากุล. 2541. จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. วารสารโคนม. 17(4): 60-62.

วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546. **โคนม.** พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิเชียร ลีสุข. 2532. "การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536ก. "การแยกโครโมโซมจากแบคทีเรีย." หน้า11.15-11.17. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. **เทคนิคทางอนูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม หนังสือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536ข. "การนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน." หน้า14.1-14.5. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. **เทคนิคทางอนูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม หนังสือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2543. "การสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม." หน้า 1-20. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการจีเอ็มโอ:สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์.** กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สายสมร ลำยอง และคณะ. 2533. "แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส." หน้า 308-317. ใน **รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการการใช้วัสดุในท้องถิ่นเป็นอาหารสัตว์ โครงการอาหารสัตว์ไทย-เยอรมัน.** เชียงราย : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคธนากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. **วิทยาแบคทีเรีย.** สุรินทร์ : สถาบันราชภัฏสุรินทร์.

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2536. "การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า." หน้า 18.2-18.16. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. **เทคนิคทางอนูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม หนังสือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533. "ดีเอ็นเอพาหะ." หน้า 3-5.ใน สุมาลี ตั้งประดับกุล. **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 โครงการอณูพันธุศาสตร์ – พันธุวิศวกรรมศาสตร์.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

Anonymous. 2003. **Plasmid prep – CTAB method.** [Online]. Available: http//www. uark. edu/campus – resource/mivey/CTAB.htm.

Anonymous. 2004. **Genome walking.** [Online]. Available: http//www. evrogen. Com/t9.shtml.

Attwood, G.T. *et al.* 1996. "An endo- β-1-4-glucanase gene (*celA*) from the rumen anaerobe *Ruminococcus albus8*: cloning, sequenceing and transcriptional analysis." **Can. J. Microbiol.** 42:267-278.

Barros, M.E.C and J.A.Thomson. 1987. "Cloning and expression in *Escherichia coli* of a cellulase from *Ruminococcus flavefaciens*." **J. Bacteriol.** 169:1760-1762.

Beguin, P. and J.P. Aubert. 2000. "Cellulase." 744-758. in Lederberg, J. **Encyclopedia of microbiology.** San Diego : Acedemic Press.

Bhat, M.K and G.P. Hazlewood. 1998. "Enzymalytic characteristic of cellulase and xylanase." 11-60. in Bedford, M.R. and H. Schulze. **Enzyme in Farm Animal Nutrition.** London : CABI Publishing.

Bryant, M.P. 1959. "Bacterial species of the rumen." **Bacteriol.Rev.** 23:125-153.

Caviccholi, R. and Watson, K. 1991. "Molecular cloning expression and characterization of endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* AR1." **Appl. Environ. Microbiol.** 57:359 –365.

Cheng *et al.* 1991. "Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen." 595-624. in **Physiology aspect of digestion and metabolism in Ruminant.** Sandiego : Academic Press.

Chesson, A and C.W.Forsberg. 1997. "Polysaccharide degradation by rumen microorganism." 329-381. in Hobson, P.N. and C.S.Stewart. **The Rumen Microbial Ecosystem.** London: Blackie Academic & Profeessional.

Cho, K.K. *et al.* 2000. "Molecular cloning and expression from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*." **Enz. Microbe. Technol.** 27:475-481.

Church, D.C. 1988. **The Ruminant Animal : Digestive Physiology and Nutrition.** New Jessey : Prentice Hall.

Cunningham, C. *et al.* 1991. "Sequence of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Ruminococcos flavefaciens*17." **Mol. Gen. Genet.** 228:320-323.

Dehority, B.A. and C.G. Oripin. 1997. "Development of, and natural fluctuation in, rumen microbial populations." 196-235. in Hobson, P.N. and C.S. Stewart. **The Rumen Microbial Ecosystem.** London: Blackie Academic & Profeessional.

Han, S.K. *et al.* 1995. "Characterization of a bifunction cellulose and it structural gene: the *cel* gene of *Bacillus sp.*DO4 has exo-and endoglucanase activity." **J. Biol. Chem.** 270: 26012-26019

Hankin, L. and Anagnostakis. S.L. 1977. "Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulose activity of microorganism." **J. Gen. Microbiol.** 98:109-115.

Hobson, P.N. and C.S. Stewart. 1997. **The Rumen Microbial Ecosystem**. New York : Blackies Academic & Professtional.

Howard, G.T. and B.A.White. 1988. "Molecular cloning and expression of cellulase gene from *Ruminococcus albus*8 in Escherichia coli bacteriophageλ." **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1752-1755.

Hungate, R.E. 1950. "The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria." **Bacteriol. Revs.** 14:1-49.

Hungate, R.E. 1966. **The Rumen and It microbe.** New York : Acedemic Press.

Lynd, L.R. *et al.* 2002. "Microbial Cellulase Utilization funduamentals and Biotechnology." **Micro. Mol. Bio. Revs.** 60:506-577.

Madigan, M.T. *et al.* 2000. **Brock biology of microorganism.** New Jersey : Prentice Hall.

Mackie, R.I and B.A.White. 1990. "Ruminal microbial ecology and nutrition." **J.Dairy Sci.** 73:2971- 2995.

Morrison, M. 1996. "Do ruminal bacteria exchage genetic material ?" **J. Dairy Sci.** 79:1467-1475.

Ohmiya, K. *et al.* 1988. "Cloning of the cellulase gene from *Ruminococcus albus* and its expression in *Escherichai coli.*" **Appl. Environ. Microbiol.** 54:1511-1515.

Ozcan, N. *et al.* 1996. "Cloning of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Fibrobacter sussinogenes*SD35 and partial characterization of the gene product." **Lett. Appl. Microbiol.** 22: 85-89.

Patterson, J. A. 1992. "Ruminal microbiology." 623-692. in **Encyclopedia of Microbiology vol.4.** Sandiego : Acedamic press.

Rapp. P and A. Beerman. 1991. "Bacterial cellulase." 535-597. in Haigler *et al.* **Biosynthesis and Biodegradation of cellulase** . New York : Marcell Pakker.

Reese, E.T. 1976. "History of the cellulose program at the U.S.army natick development center." **Biotech. Bioeng. Symp**. 6:9-20.

Reese, E.T. *et al.* 1950. "The biological degradation of soluble cellulose derivative and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis." **J. Bacteriol**. 59:485-497.

Rincon, M.T. *et al.* 2001. "EndB, a multidomain family 44 cellulase from *Ruminococcus flavefaciens* 17, binds to cellulose via a novel cellulose-binding module and to another *R. flavefaciens* protein via a dockerin domain." **Appl. Environ. Microbiol**.67: 4426-4431.

Rode, L.M. and Beachemin, K.A. 1998. **Enzyme to enhance utilization of feed in dairy cow**. [Online]. Available : http:wcds.afus.ualberta.ca/Proceedings/1998/ch15.htm.

Russell, J.P. 1998. **Genetic**. Menlo Park :The Benjamin/Cumming publishing Company.Inc.

Russell, J.B. and R.J. Wallace.1997. "Energy-yieding and energy consuming reaction." 247-281. in Hobbon,D.N. and C.S. Stewart. **The Rumen Microbial Ecosystem**. New york : Blokies Academic &Professional.

Sternberg, D. *et al.* 1977. "β-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose." **Can. J. Microbiol**. 23: 139-147.

Teather, R.M. and D.J.Wood. 1982. "Use of congo-Red polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bivine rumen." **Appl. Environ. Microbiol**. 43:777-780.

Thomous, M.T. 2003. **Gene transfer**. [Online].Available: http://www.sp.uconn.edu.

Van, G. 1990. "Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cow fed grass silage-based diets." **FEM. Microbiol. Ecol**.75:243-254.

Vercoe, P.E. *et al.* 1995a. "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *celD* β-glucanase gene from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1." **Can. J. Microbiol**. 41:27-34.

Vercoe, P.E. *et al.* 1995b. "DNA sequence and transcriptional characteruzation of a β-glucanase gene (*celB*) from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. " **Can. J. Microbiol**. 41:869-876.

Vijayarani, K *et al.* 1994. "Isolation and characterization of cellulolytic cocci from bovine rumen." **Indian J. Anim. Sci**. 64 :654-658.

Weimer, D.J. 1996. "Ruminal cellulolytic bacteria." **Information Conference with Dairy and Forage Industries 1996**. US Dairy Forage Research Center.

Wolin, *et al.* 1997. "Microbe-microbe interaction." 467-491. in Hobbon, D.N. and C.S. Stewart. **The Rumen Microbial Ecosystem**. New york : Blackies Academic &Professional.

Yokayama, M.T. and K.A. Johnson. 1988. "Microbiology of the rumen and intestine." 125-144. in Church, D.C. **The Ruminal Digestive Physiology and Nutrition**. New jersey : Practice Hall.

ภาคผนวก ก

1.สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

1) Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA)

Inorganic Salt Solution	200 มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% Solution)	0.5 มิลลิลิตร
Rumen fluid	75 มิลลิลิตร
Cellulose	7 กรัม
Cystein hydrochloride	0.05 กรัม
Bacto agar	7.5 กรัม
Distilled water	224.5 มิลลิลิตร
Final pH 7.0	

โดย Inorganic Salt Solution ประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.25 กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	44.09 กรัม
KH_4PO_4	11.18 กรัม
$CaCl_2$	0.125 กรัม
NaCl	2.5 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ใส่ส่วนประกอบต่าง ๆ ลงไปตามอัตราส่วน ยกเว้น Cystein hydrochloride คนให้ส่วนประกอบเข้ากันแล้วนำไปต้มให้เดือดระหว่างการต้มให้ใส่ Cystein hydrochloride ต้มให้ส่วนประกอบต่าง ๆละลายให้หมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากเตรียมอาหารใส่ plate แล้วควรเก็บไว้ในที่ไม่มีแสง

2) McBeth's Cellulose Ammonium Sulfate Solution

K_2HPO_4	1.0 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0 กรัม
Sodium carbonate	1.0 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 กรัม
Calcium carbonate	2.0 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

กระดาษกรอง Whatman No.1 filterpaper ตัดเป็นชิ้นขนาด 1.5 เซนติเมตร

นำส่วนผสมแต่ละอย่างละลายในน้ำกลั่น แล้วเทใส่หลอดที่ใส่กระดาษกรองไว้แล้ว ขณะที่เทแบ่งให้เขย่าส่วนผสมก่อนเพื่อไม่ให้ Calcium carbonate ตกตะกอน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3) Carboxymethyl cellulose agar

Carboxymethyl cellulose	5.0 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Agar	10. 0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลาย Carboxymethyl cellulose (CMC) ในน้ำอุ่น 500 มิลลิลิตร โดยใส่ CMC ทีละน้อย ๆพร้อมกับคนตลอดเวลา จนกระทั่ง CMC ละลายหมด ละลายส่วนผสมที่เหลือ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4) Lueria Bertani broth (LB)

Peptone	10.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5) LB agar

Peptone	10.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นAgar จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม Agar แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536ก)

1) 50mM Tris, 5 mM EDTA pH 8.0

2) Lysozyme 10 mg/ml

3) 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4) สารละลายฟีนอลอิ่มตัว ใน 0.1M Tris buffer pH 8.0

5) สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ 24:1

ผสม คลอโรฟอร์ม และไอโซเอมีล ใช้อัตราส่วน 24 :1 แล้วเติม 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 เขย่าๆแรง ให้ผสมกัน ปล่อยให้แยกชั้น ดูดชั้นบนออกทิ้งไปสกัดซ้ำด้วย 0.1M Tris-HCl pH 7.6 อีก 2-3 ครั้ง เติม Tris-HCl pH 7.6 ให้ท่วมผิวสารละลาย เก็บในขวดสีเข้มที่ 4 องศาเซลเซียส

6) 3M Sodium acetate pH 5.2

ชั่ง Sodium acetate.$3H_2O$ 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

7) เอทธานอลสัมบูรณ์

8) 70 % เอทธานอล

9) TE (10 mM Tris, 1mM EDTA pH8.0)

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ของบริษัท Finnzyme

1) 10xbuffer

2) 2mM dNTP mix

3) 2.0 U/μl Dynazyme

4) 50mM $MgCl_2$

4. สารละลายที่ใช้การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

1) สารละลาย 5 เท่า TBE (Tris-borate)

ผสม Tris base 54 กรัม Boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อใช้ให้งานปรับความเข้มข้นสารเป็น 1 เท่า ด้วยน้ำ

2) สารละลาย loading buffer

ผสม 0.25 % Bromophenol blue และ 30 % Glycerol ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3) ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp ของบริษัท Fermentas®

4) ดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp Plus ของบริษัท Fermentas®

5. ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล ของบริษัท QIAGEN®

1) บัฟเฟอร์ QG (solubilization buffer)

2) บัฟเฟอร์ PE(wash buffer)

3) บัฟเฟอร์ EB(elution buffer)

4) Isopropanal

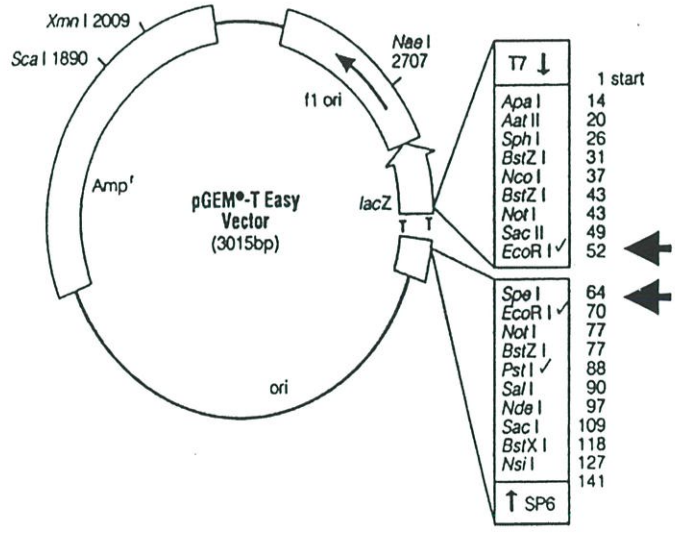
5) QIAquick spin column

6. ชุดโคลนนิ่งของบริษัท Promega®

1) 2x Rapid Ligation Buffer

2) T_4 DNA ligase(3Weiss)

3) pGEM-T Easy Vector (50 ng/ml) (ภาพที่ 7.1)



ภาพที่ ก.1 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy
ลูกศรชี้ตำแหน่งของลำดับเบสที่จำเพาะต่อเอนไซม์ *EcoR*I

7. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมคอมพิเทนต์ เซล ตามวิธีการของ ชนันท์ อังศุธนะสมบัติ (2533)

1) CaCl solution

ละลาย $CaCl_2 . 2H_2O$ 7.35 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2) 10 mM Tris pH 8

ละลาย Tris base 1.211 ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนได้ pH ตามที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรแลวนำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน

1) ยาปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลิน เตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 μg/ml กรองด้วย 0.22 μfilter เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ก่อนเติมยาปฏิชีวนะ

2) Isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG)

เตรียม stockที่ความเข้มข้น 1M โดยละลาย 2 กรัมต่อน้ำ 8 มิลลิลิตร จะละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วย 0.22 μfilter ก่อนเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3) Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

ละลาย 20 มิลลิกรัมใน Dimethylformamide 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในหลอดที่กันแสงที่ -20 องศาเซลเซียส

9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดด้วย CTAB

1) STET (8%Sucrose, 5%(v/v)triton x-100, 50mM Tris, 50mM EDTA) pH8.0
2) 5% CTAB (CTAB 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
3) 1.2 M NaCl (Nacl กรัมในน้ำกลั่น)
4) คลอโรฟอร์ม
5) เอทธานอลสัมบูรณ์

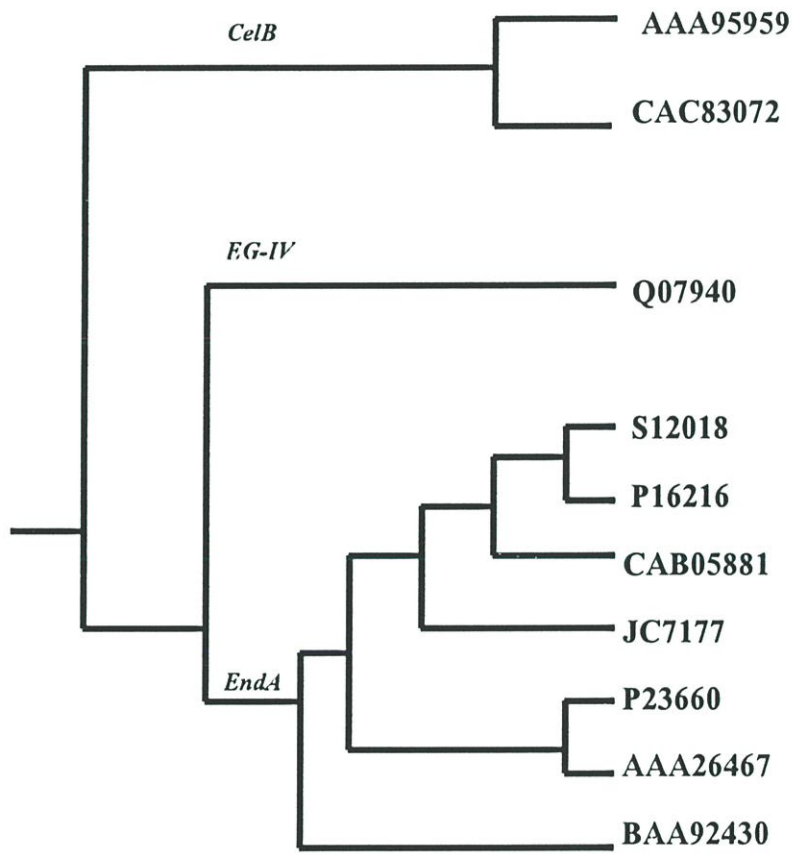
10. เอนไซม์ตัดเฉพาะ *EcoR*I ของบริษัท Promega®

1) 10xbuffer (900mM Tris-HCl(pH7.5), 500mM Nacl, 100mM $MgCl_2$)
2) BSA (10μl)
3) *EcoR*I enzyme (12U/μl)

ภาคผนวก ข

1. การออกแบบไพร์เมอร์

การหาความสัมพันธ์ของยีนด้วยโปรแกรม ClustalW (Genomenet) ในกลุ่มเซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียกระเพาะรูเมนโดยแสดงเป็นแผนที่ความสัมพันธ์ของยีนได้ดังนี้



ภาพที่ ข.1 แสดงความสัมพันธ์ของยีนในกลุ่มเซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

จากแผนที่ความสัมพันธ์สามารถแบ่งกลุ่มของกรดอะมิโนได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ *EndA, CelB, EG-IV* ตามลำดับและทำการออกแบบไพร์เมอร์โดยนำแต่ละกลุ่มมาหาลำดับอนุรักษ์ดังนี้

1) นำกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 1 (*EndA*)มาหาลำดับอนุรักษ์โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อหาความสัมพันธ์กับภายในกลุ่ม

```
P23660          --------------------------------------------------MRKPDKDADRL
AAA26467        MDKIKLVTLITVLAMASSGLVSCGPGNGKDSSQAEKKDTSSAAESTADSDAQPAGDTTLL
S12018          ---MKLKRIAALLTAAVMSVGVMASCGGSKSDDKSKADTKSAAETSGA--EGDSSESEEI
P16216          ---MNSKKIGAMIAAAVLSLIVMTPAATRKIVQRQTRNSSTAVENS----AADESETENV
JC7177          ------------------------------------------MKAYFKKILSLVTAGIITASA
CAB05881        -----------------------------------MFINSKTVKRFVSISAAAVCLFSF
BAA92430        -----------------------------------MKTKSKSALTLSMVCAMALSCM

P23660          TTLDLARSGEVRDISAMELVGEMKTGWNLGNS LDATGAPG---------------NASEV
AAA26467        SNEELARSGEVRDISAMELVAEMKTGWNLGNS LDATGAAG---------------NASEV
S12018          PVSQTHTNDPMTVTSAKDLVAKMSNGWNLGNT MDATGEG----------------LESEI
P16216          PVSQTHTNDTMTVTSAKDLVAKMTNGWNLGNT MDATAQG----------------LGSEV
JC7177          LPFVSAQAKDVSSMTAVEIAKDMGLGWNLGNT LEAHDGTNHKK----------MGLESET
CAB05881        APLDDTADAADNIMTAFQITENMKVGWNLGNT LDAYAQKANPKDPSKPIPLDSAGLETET
BAA92430        PFVEPTRAEAAFDKDAKQTVADMGLGWNLGNS LDSYSGTTIGGN--------RGSTSSET
                              * : . .*  ******::::                      :*

P23660          NWG--NPKTTKEMIDAVYNKGFDVIRIPVTWGGHVGDAPDYKIDDEWIARVQEVVNYAYD
AAA26467        NWG--NPKTTKEMIDAVYNKGFDVIRIPVTWGGHVGDGPDYKIDENWLARVQEVVNYAYD
S12018          SWLPTKVYTNKFMIDMLPEAGFNVLRIPVSWGNHLIDN-NYTIDPAWMDRVQEIVNYGID
P16216          SWLPLKVTTNKYMIDMLPEAGFNVLRIPVSWGNHIIDD-KYTSDPAWMDRVQEIVNYGID
JC7177          FWG--NPKASKALFDAVKAKGFRTIRIPVTWYPHADAN--YNIDTAWMNRVKQVVDWAVD
CAB05881        CWG--CPEASQELFDAIKAKGFNTVRIPTTWFQHLDEN--DNIDPAWMARVHQVVDYAYN
BAA92430        AWG--NPATTKAMIDMVKESGVKTVRVPVTWYEHMDPY-TYKIDDVWMNRVEEVVNYVLE
                 *      :.: ::* :   *. .:*:*.:*  *       . *  *: **.::*::  :

P23660          DGAYVIINSHH EEDWR--IPDNEHIDAV-DEKTAAIWKQVAERFKDYGDHLIFEGLNEPR
AAA26467        DGAYVIINSHH EEELR--IPDNEHIDAV-DEKTAAIWKQVAERFKDYGDHLIFEGLNEPR
S12018          DGMYVILNTHH EEWY---MPKPSEKDGD-IEELKAIWSQIADRFKGYDEHLIFEGLNEPR
P16216          NGLYVILNTHH EEWY---MPKPSEKDGD-IEEIKAVWAQIADRFKGYDEHLIFEGLNEPR
JC7177          ENTYVILNIHH EEWN---TPTNANYAAA-SKELKAFWKQIATEFRDYDRHLIFEGMNEPR
CAB05881        IGLYVIINLHH EQNWINRADLATAYDDI-NPRLMKLWTQIATEFKDYDQHLIFECMNEPR
BAA92430        DDMYCILNVHH DTGEKGWLKANSKDLQKKEAMFRSIWEQVSENFEDYGDKLVFEGFNEIL
                 . * *:* **:                       .* *:: .*..*. :*:** :**
```

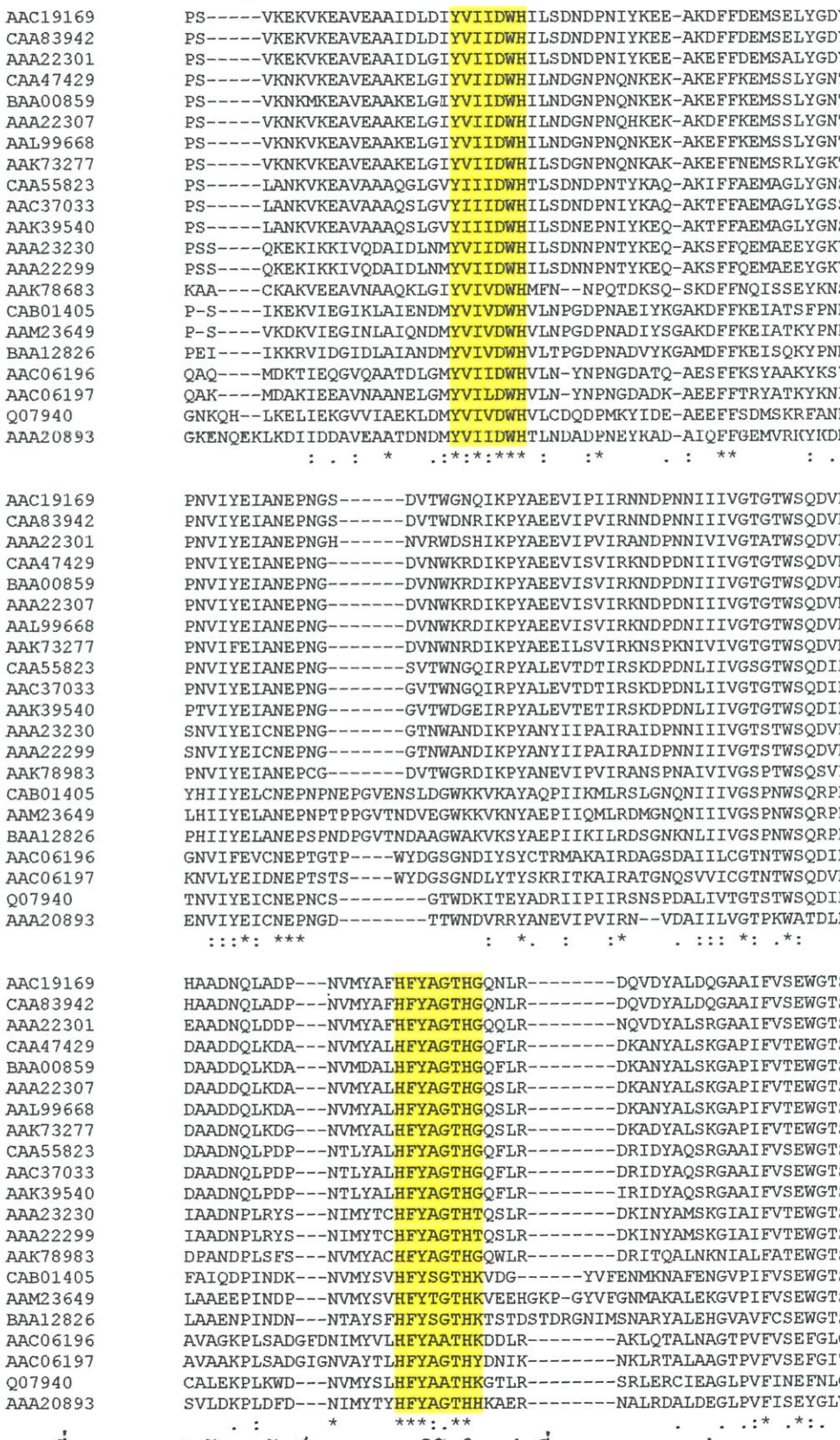
ภาพที่ ข.2 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 1, ส่วนแรเงาแสดงบริเวณที่นำไปออกแบบไพร์เมอร์ PC1 โดยผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์ จะมีขนาดประมาณ 405 คู่เบส

2) นำกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 2 (*CelB*) มาหาลำดับอนุรักษ์โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อหาความสัมพันธ์กับเซลลูเลสอื่น

```
CAA01933        LSGT--ENWSSRRLGGNRLTGYNWENNASSAGRDWLHYSDDFLCGNGGVPDTDCDKPGAV
AAA22302        LSGT--ENWSSRRLGGNRLTGYNWENNASSAGRDWLHYSDDFLCGNGGVPDTDCDKPGAV
BAA12070        LD----ATVTAKRFGGNRTTGYNWENNFSNAGSDWLHYSDTYLLEDGGVPKGFWSTPASV
AAK78887        FSN---AKVTARRIGGNRSTGYNWENNDSNAGTDWKNESDNYWLTLYDVPKEKYNEPASV
AAK06394        IQG---VVHPARRLGGNRLTGYNWENNMSNAGSDWYHSSDDYMCYIMGITGNDKNVPAAV
AAA71887        IEG---VVHSARRLGGNRLTGYNWENNFSNAGNDWYHSSDDYLCWSMGISGEDAKVPAAV
AAA95959        TTDLKSVKTTAVRQGGNRMTAYNWENNASNAGSDWKHSSDNNLS--------DSNPPAEV
CAC83072        TTDLRDVKTTAVRQGGNRMTAYNWETNASNAGSDWKHSSDNNLS--------DSDDPADC
                         .: * **** *.****.* *.** ** : **           . . *.

CAA01933        VTAFHDKSLEN-GAYSIVTLQMAGYVSRDKNGPVDESETAPSPRWDKVEFAKNAPFSLQP
AAA22302        VTAFHDKSLEN-GAYSIVTLQMAGYVSRDKNGPVDESETAPSPRWDKVEFAKNAPFSLQP
BAA12070        VTTFHDKALSKNVPYTLITLQAAGYVSADGNGPVSQEETAPSSRWKEVKFEKGAPFSLTP
AAK78887        YTAFHDKSLAMGVPYSLVTLQAGGYVAADQSGPLANTDVAPSSKWKKVEFNKNGPLSLTP
AAK06394        VSKFHEQSIKQ-NAYSAITLQMVGYVAKDGNGTVSESETAPSPRWAEVKFKKDGALSLQP
AAA71887        VSKFHEYSLKN-NAYSAVTLQMAGYVSKDNYGTVSENETAPSNRWAEVKFKKDAPLSLNP
AAA95959        VQRLSKEAAKYGVDYKMTTLQMAGYVSADKDGTVKEDEVAPSKRWNEVKFTKGAPFADEP
CAC83072        VQVLSKQAAKYNVNYKLTTLQLAGYVSADKNGPVSEAEKAPSDRWNKVVLTKNAPFADTP
                   : . :      *.  ***  ***: *  *.: : : *** :* :* : *...::  *

CAA01933        DLNDGQVYMDEEVNFLVNRYGNASTSTGIKAYSLDNEPALWSETHPRIHPEQLQAAELVA
AAA22302        HLNDGQVYMDEEVNFLVNRYGNASTSTGIKAYSLDNEPALWSETHPRIHPEQLQAAELVA
BAA12070        DTEDDYVYMDEFVNYLVNKYGNASTPTGIKGYSIDNEPALWSHTHPRIHPDNVTAKELIE
AAK78887        DTTDGSVYMDEFVNYLVNKYGSASGSKGIKGYSLDNEPSLWPSTHPLIHPDKTKCSEVLD
AAK06394        DVNDNYVYMDEFINYLINKYGRSSSATGIKGYILDNEPDLWFTTHPRIHPQKVTCSELIN
AAA71887        DLNDNFVYMDEFINYLINKYGMASSPTGIKGYILDNEPDLWASTHPRIHPNKVTCKELIE
AAA95959        DLTDGVVYMDEYVNYIINKLGDSQSPTGIQGYSLDNEPVLWNDTHPRVHPEPVTIEELGN
CAC83072        DLTDGVVYMDEYVNYIINKLGDSQSAEGIQGYSLDNEPVLWNDTHSRMHPDPVTIEELGS
                .  *. ***** :*:::*: * :. . **:.* :**** **  **. :**:     *:

CAA01933        KSIDLSKAVKNVDPHAEIFGPALYGFGAYLSLQDAPDWP-----SLQGNYSWFIDYYLDQ
AAA22302        KSIDLSKAVKNVDPHAEIFGPALYGFGAYLSLQDAPGWP-----SLQGNYSWFIDYYLDQ
BAA12070        KSVALSKAVKKVDPYAEIFGPALYGFAAYETLQSAPDWG-----TEGEGYRWFIDYYLDK
AAK78887        KDTQLAQVVKKIDPAAETFGPALFGFSAFNDFNSSPDWS-----SVKGNYQWFIDYYLDN
AAK06394        KSVELAKVIKTLDPDAEIFGPASYGFVGYLTLQDAPDWN-----QVKGNHRWFLSWYLEQ
AAA71887        KSVELAKVIKTLDPSAEVFGYASYGFMGYYSLQDAPDWN-----QVKGEHRWFISWYLEQ
AAA95959        KSIELAKAVKKLDPKAEIFGPALYGYTAFDHLDDDEQHTESGDVKSKNNYHWYLDCYLDQ
CAC83072        KSVEMAKAVKKLDPKAEVFGPALYGYTAFDHLDDDDAHTEWEEIKKANNYHWYLDCYLDH
                *.  :::.:*.:** ** ** * :*: .:  ::.               : *::. **::

CAA01933        MKNAHTQNGKRLLDVLDVHWYPEAQGGGQRIVF--GGAGNIDTQKARVQAPRSLWDPAYQ
AAA22302        MKNAHTQNGKRLLDVLDVHWYPEAQGGGQRIVF--GGAGNIDTQKARVQAPRSLWDPAYQ
BAA12070        MKKASDEEGKRLLDVLDVHWYPEARGGGERICFG-ADPRNIETNKARLQAPRTLWDPTYI
AAK78887        MKKNSDAAGKRLLDALDLHWYPEAKGGGQRVTT--SDTSNVDCNKARMQAPRSLWDSTYT
AAK06394        MKKASDSFGKRLLDVLDIHWYPEAQVGGVRICFDGENSTSRDVAIARMQAPRTLWDPTYK
AAA71887        MKKASDSFGKRLLDVLDLHWYPEARGGNIRVCFDGENDTSKEVVIARMQAPRTLWDPTYK
AAA95959        MKKASEEEGTRLLDVLDIHYYSES---------------ARTGAEDRVQSVRTLYEEGFS
CAC83072        MHKASEENGARLLDVLDIHYYSES---------------ARKGIEDRLQSVRTLYEPGFS
                *::     * ****.**:*:*.*:                      *:*: *:*::  :

CAA01933        ----------EDSWIGTWFSSYLPLIPKLQSSIQTYYPGTKLAITEFSYGGDNHISGGIA
AAA22302        ----------EDSWIGTWFSSYLPLIPKLQSSIQTYYPGTKLAITESSYGGDNHISGGIA
BAA12070        ----------EDSWIGQWKKDFLPILPNLLDSIEKYYPGTKLAITEYDYGGGNHITGGIA
AAK78887        ----------EDSWIGQWCKWGLPLIPKVKSSIDKYYPGTKLSFSEYNYGGEDHISGGIA
AAK06394        TTQKGQITAGENSWINQWFPEYLPLLPNIKADIDKYYPGTKLAITEFDYGGKDHISGGIA
AAA71887        TSVKGQITAGENSWINQWFSDYLPIIPNVKADIEKYYPGTKLAISEFDYGGRNHISGGIA
AAA95959        ----------ENSWIGQWCMQNVPILPTIKKSIDTYYPGTKLAISEYNFKGGEDTSGTIA
CAC83072        ----------ENSWIGQWCMENVPILPTIQKSIDTYYPGTKLGISEYNFGGGDDASGTIA
                          *:***. *    :*::*.:  .*:.*******.::* .: * :. :* **
```

ภาพที่ ข.3 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 2 (*CelB*), ส่วนแรเงาแสดงบริเวณที่นำไปออกแบบไพร์เมอร์ PC2 โดยผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์จะมีขนาดประมาณ 870 คู่เบส

3) นำกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 3 (*EG-IV*) มาหาลำดับอนุรักษ์โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อหาความสัมพันธ์กับเซลลูเลสอื่น ดังแสดงในภาพที่ 7.5



ภาพที่ ข.4 แสดงลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ 3 (EG-IV), ส่วนแรเงาแสดงบริเวณที่นำไปออกแบบไพร์เมอร์ PC3 โดยผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์จะมีขนาดประมาณ 397 คู่เบส

เมื่อหาลำดับอนุรักษ์ของอะมิโนนำมาเทียบเป็นลำดับนิวคลีไทด์ได้ไพร์เมอร์จำนวน 3 คู่ คือ PC1, PC2, PC3 ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ขนาดประมาณ 405, 870 และ 397 คู่เบสตามลำดับ

PC1 5'-(A/C)T(A/C) GG(A/C) TGG AA(T/C) CT(C/T) GG(A/C) AA-3'
5'-GGG TTC (A/G)TT (G/C)AG (G/T/A)CC CTC (A/G)AA-3'

PC2 5'-(T/C)(G/T) AC(G/A) GG(T/A) TAC AA(C/T) TGG GA-3'
5'-CCA (T/C)TG (A/G)(T/C)(T/C) (T/G)AT CCA GCT-3'

PC3 5'-TA(T/C) GT(C/A) AT(C/T) (A/G)T(T/C) GA(T/C) TGG CA-3'
5'-TG(C/T) GT(T/G) CC(T/G/A) GCA TA(A/G) AA(A/G) TG-3'

ภาพที่ ข.5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบ

2. การออกแบบไพร์เมอร์เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีน

ผลจากการหาลำดับเบสสามารถนำมาออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* 17 และ *celB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (U08621) (ภาคผนวก ข) เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีนเพิ่มโดยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งดีเอ็นเอผลผลิตที่เกิดจากการใช้ไพร์เมอร์ P1 กับ P2 จะเท่ากับ 1,900 เบสแพร์ และเกิดจากการใช้ไพร์เมอร์ P1 กับ P3 จะเท่ากับ 2,400 เบสแพร์ ดังแสดงในบริเวณที่แรเงาในภาพที่ 7.7

```
10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    ATGAAAAAAACAGCGGCATTCATTGCAGCCTGCGTAGTATCGGGCTGCACAATGACAGCG
celB    ATGAGAAAATCAACAGCATTTCTGACAGCACTTGCTATGGCAGGTTGTACACTGTCTGCA
                  P1
10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    CCCGTCAACGGTCTGCCAAGGGCTACCGTTAATGCGGCGGGAGGCTACGACATGAACGTG
celB    CCATTAGGCGTGTTGCCCGAAACAAAGGTGAATGCAGCAGGAGGTTTTGATATGAATATC

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    ACCGTAGACCTCAAAGGTGAGAAAAAGGCTATCTCTCCTCTTATCTACGGCGTGAACCAG
celB    AAGGTAGACCTCAAGGGCGAGCGCAAGGAGATAAGCCCTCTTATCTACGGCGTTAACCAG

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    TATACCACCGACCTCAGGGACGTTAAGACTACGGCTGTGCGTCAGGGCGGTAACCGCATG
celB    TATACCACAGACCTCAAGAGCGTCAAGACTACTGCTGTACGTCAGGGCGGTAACCGTATG
```

```
10.4    ----------------GACAAACGCTTCCAACGCAGGTTCTGACTGGAAGCACAGCTCG
11.3    ----------------GACAAACGCTTCCAATGCAGGCTCCGACTGGAAGCACAGCTCG
endB    ACTGCCTACAATTGGGAGACAAATGCTTCAAATGCGGGTTCCGACTGGAAGCACAGCTCG
celB    ACTGCTTACAACTGGGAGAACAATGCTTCAAACGCAGGTTCGGACTGGAAACACAGTTCC
                        **  ** ***** ** ** ** ** ******** ***** **

10.4    GACACAAATCTCTCGGAGTCAGATGATCCCGCTGACTGCGTTCAGGTACTCTCAAAGGAC
11.3    GACACCAACCTATCGGAGTCCGACGATCCCGCAGACTGCGTTCAGCAGCTCTCAAAGGAC
endB    GACAACAACCTGTCGGATTCCGATGATCCTGCGGACTGCGTTCAGGTGCTCTCAAAGCAG
celB    GATAACAACCTCTCGGATTCAAATCCTCCTGCTGAGGTAGTTCAGAGACTTTCCAAGGAA
        ** *  ** ** ***** **  *   *** ** **    ******   ** ** *** *

10.4    GCAGCAAAGAACAATGTTGGCTACAAGCTCACAACATTGCAGCTTGCAGGCTATGTTTCG
11.3    GCAGTCAAGAACAATGTGGGATACAAACTGACAACTCTCCAGCTTGCAGGCTATGTTTCC
endB    GCGGCTAAGTACAATGTAAACTACAAGCTCACTACCCTCCAGCTTGCAGGCTATGTTTCA
celB    GCTGCAAAGTACGGCGTTGATTACAAAATGACAACTCTCCAGATGGCAGGCTACGTTTCA
        ** *  *** **   **    *****  * ** **  * *** * ******** *****

10.4    GCAGACAAGGACGGTACGGTAACGGAGGAGGAGAAAGCTCCTTCAAAACGCTGGAACAAG
11.3    GCTGACAAGAACGGTCCCGTAAGCGAGGAGGAGACAGCTCCCTCAGACCGCTGGAACAAG
endB    GCTGATAAGAACGGCCCTGTTTCCGAGGCGGAAAAGGCTCCCTCTGACCGCTGGAACAAG
celB    GCTGATAAGGACGGCACTGTCAAGGAAGATGAAGTCGCTCCTTCAAAGCGCTGGAACGAG
        ** ** *** ****  * **    ** *  **    ***** **  * ********* **

10.4    GTAGTTCTCACGAAGGGAAGTGATTTTGCCGATACTCCCGACCTTACAGACGGTGTAGTC
11.3    GTAGTCCTCACAAAGGGCTCTGACTTTGCAGATACTCCAGACCTGACAGACGGCGTAGTC
endB    GTGGTGCTTACAAAGAATGCTCCCTTTGCGGATACTCCCGACCTCACAGACGGAGTTGTC
celB    GTAAAGTTCACAAAGGGCGCACCTTTTGCTGATGAGCCTGATCTGACAGACGGCGTTGTT
        **     * ** ***         ***** ***   ** ** ** ******** ** **

10.4    TACATGGACGAGTATGTGAACTACATCATCAAGAAGCTTGGCAATTCAAAATCTGAGACA
11.3    TACATGGACGAGTACGTAAACTACATCATCAAGAAGCTGGGCGATTCCAAGTCCGCAACA
endB    TACATGGACGAGTACGTGAACTACATTATAAATAAGCTGGGCGATTCACAGTCGGCTGAG
celB    TATATGGATGAGTACGTAAACTACATCATCAATAAGCTGGGCGATTCACAGTCACCTACA
        ** ***** ***** ** ******** ** ** ***** *** ****  * **

10.4    GGTATCCAGGGCTACAGCCTTGACAATGAGCCTGTACTCTGGAACGACACACACAGCAGA
11.3    GGTATTCAGGGCTACAGCCTTGACAACGAGCCTGTTCTCTGGAACGACACCCACAGCAGA
endB    GGTATCCAGGGCTACAGCCTTGACAATGAGCCCGTGCTCTGGAACGATACACACAGCAGG
celB    GGTATCCAGGGCTACAGCCTTGATAACGAGCCTGTTCTCTGGAACGATACTCACCCGAGA
        ***** ***************** ** ***** ** ********** ** ***   **

10.4    ATGCACCCCGAGCCTGTAACTATCAAGGAGCTTGGTGAAAAGTCCATAGAAATGGCAAGA
11.3    ATGCACCCCGAGCCTGTTACTATCGAGGAGCTCAGCAAAAAGTCCATAGAAATGGCTAAG
endB    ATGCACCCTGATCCGGTTACTATCGAGGAGCTGGGCAGCAAGTCCGTTGAAATGGCAAAG
celB    GTTCATCCCGAGCCTGTAACTATCGAAGAGCTTGGAAACAAGTCCATCGAACTTGCTAAG
         * ** ** ** ** ** ****** * *****  *    ****** * *** * ** *


10.4    AATGTAAAGAAGCTTGATCCCGATGCAGAGGTATTCGGACCTGCTCTCTACGGCTATACA
11.3    AACGTCAAGAAGCTTGACCCCAACGCAGAGGTATTCGGTCCTGCGCTGTACGGATACACT
endB    GCTGTAAAGAAGCTGGATCCTAAGGCTGAGGTGTTCGGCCCCGCTCTCTACGGCTACACC
celB    GCTGTCAAGAAGCTTGATCCTAAGGCTGAGATCTTCGGACCTGCACTCTATGGCTACACT
           ** ******** ** **  * ** *** * ***** ** ** ** ** ** ** **

10.4    GCTTTCGACCACCTCGATGACGACGATGCACATACCGAGTGGGAGGAAGTAAAGGCTGCA
11.3    GCTTTCGACCACCTCGATGACGACGATCAGCACACCGAATGGGAAACTGTAAAGGCTGCC
endB    GCCTTCGATCACCTTGACGACGATGACGCTCATACCGAGTGGGAGGAGATAAAGAAGGCC
celB    GCTTTCGATCACCTCGACGATGACGAGCAGCATACAGAATCGGGAGACGTAAAGTCCAAG
        ** ***** ***** ** ** ** **    ** ** ** * **      *****

10.4    AATAACTATCACTGGTACCTTGACTGCTATCTCGACCAGATGAAAAAGGCTTCCGAGGAG
11.3    AACAACTACCACTGGTACCTTGACAGCTACCTTGACGATATGCACAAGGCTTCCGAGGAG
endB    AATAATTACCATTGGTATCTGGACTGCTACCTCGATCATATGCACAAGGCCTCCGAGGAG
celB    AACAACTATCACTGGTATCTGGACTGCTATCTCGACCAGATGAAGAAGGCTTCTGAAGAA
        ** ** ** ** ***** ** *** **** ** **  * *** * ***** ** ** **

10.4    ACAGGCACGAGACTCCTTGATGTACTTGATATCCACTACTACTCAGAGTCTGCAAGAAAC
11.3    GCAGGCACAAGACTCCTTGATGTTCTGGATATCCACTACTACTCAGAGTCAGCACGTAAG
endB    AACGGCGCAAGACTTCTTGACGTTCTGGATATACATTATTATTCGGAGTCAGCAAGAAAG
celB    GAAGGCACCCGTCTCCTCGATGTACTTGACATCCACTACTACTCGGAATCTGCAAGAACA
           *** *  * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *** * *
```

```
10.4    GGCATAGAGGACAGGCTCCAGTCTGTACGTACGCTCTATGAGGAAGGCTTCTCCGAGAAC
11.3    GGCGCTGAGGACAGAGTTCAGTCAGTCCGCACACTTTATGAAAAGGGCTTCGTTGAGAAC
endB    GGCATCGAGGACAGGCTCCAGTCTGTGCGCACACTCTATGAGCCCGGCTTCTCAGAAAAC
celB    GGCGCTGAGGACAGAGTTCAGTCAGTTCGTACTCTCTATGAGGAAGGCTTCTCCGAGAAC
        ***   ********  * ***** ** ** ** ** *****    ******   ** ***

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    AGCTGGATAGGTCAGTGGTGCATGGAGAACGTGCCGATACTTCCTACCATACAGAAGTCC
celB    AGCTGGATCGGTCAGTGGTGTATGCAGAATGTGCCTATCCTTCCGACTATAAAGAAGTCC

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    ATCGATACTTACTATCCTGGCACAAAGCTGGGCATATCCGAGTACAACTTCGGCGGCGGC
celB    ATAGATACATACTATCCCGGCACAAAGCTGGCTATCTCAGAGTATAACTTCAAGGGCGGC

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    GACGATGCTTCGGGCACTATCGCTCAGGCTGAGGCTCTGGGCTGCTATGCGGATCAGGGC
celB    GAGGATACTTCCGGTACTATCGCTCAGGCAGAGGCACTGGGATGCTTCGCTGATCAGGGC

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    GTGTACTTTGCTTCCCTCTGGGGCGGCGAGCCCTTTATTCTCTCGGGTATCCAGCTCTAT
celB    GTATATCTCGCAACTCTCTGGGGCGGTGAGCCATTCATCATCTCAGGTATCAACCTCTAC

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    ACCAACTATGACGGCAAGGGCGGCTGCTTCGGCGATACCCTTATCCCTGCATCTACCGGG
celB    ACTAACTACGACGGCAAGGGCGGATGCTTCGGTGATACTCTCATCCCTGCTTCTACTGAA

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    GATGTTTCCAAGTCCAGCACCTATGCGGCTGTAAACGCAAAGGACGATTCAAAGGTCACT
celB    GATGTATCAAAGTCCAGCACATACGCTGCTGTTAACGACGGCGATGAGTCAAAGGTAACT

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    GTTATGGTCACAAACAAGGACCTCAAGGAAAACGAGAACGCTGTCATAGACCTCAGGAAT
celB    GTCATGATCACCAACAAGAATATGACAGAAGCTGAGAACGCTGTTATCGACCTTGAGAAT

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    GCGGACAAGTCCTATAAGTCGGCAGCAGTTTACGCTGTTTTCGGCGACAGCGAGGAGATC
celB    GCTTCAAAGGACTACAAGTCAGCTGCTGTTTACGCTGTATACGGCGACAACGATCAGGTA

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    AGACTCATCGACATCATCAAGGACGTAAAGGACAACAAGGTAAAGACAGAGCTGCCTGCC
celB    AGACTTCTCGACATCGTAAAGGATGTCAAGGATAACAAGGTAAATGTTGAGCTTCCTGCT

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    TTCTCTGCTGCAATGGTGGTAGTTTCCGATCAGGCAGACGCCTTCGACGGTCTCAAGACC
celB    TTCTCAGCTGCAATGGTAGTTGTATCCGATGACGCCGCTGCTTTCGACGGTGAGAAGATA

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    TATGAGGAGACAAAAACAGAGACAAAGACAGTGGAATTCACTGATATAGAGTCAATGACC
celB    TACGAGGAAAAGAAGGTAACCGAGAAGACTGAGGAATTCAAGGATCCTTCTTCAATGATA

10.4    ------------------------------------------------------------
11.3    ------------------------------------------------------------
endB    AATGACAAGGGCTTTGTGGTTGTTCCCATCGAGGACGCAGAGCATCTTTCCAAGATAATC
celB    AATAAGAACGGCTATGTTGAAATTCCGATAACAGATCCTGAGCAGGTCTCAAAGATCGTT
```

```
10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  ATCAACGGTGGGGTAACTTCAAGCGCAGGTTCAAGCTGGGCTACGGC-AGGCTGTGCGGT
celB  ATCAACGGCGATGTTACATCAAGTGCAGGTTCAGGCTGGGCAACAGCCAGGCTGTGCAGT

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CTGCATGAACGTTACTGCCAAGGACGGCAGCGGCTTCTGGACTTACAAGAGCTATAATCT
celB  ATGCATCAACGCAAAGGACAAGGCCGGCAAGGATTTCTGGACATACAAGAGCTACAGTCT

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CCCGCTGGGCAGCAAATCTTCCGCAACCGTCAAGTTCGACGGCATCTTCACCAAGGAGAC
celB  CCCGCTGGGCAAGGGTCAGTCCGCTATCGTAAAGTTTGA----------------------
                                  P2

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  GGGCGAGGGCGCTGACAAGGTCAAGGAGGATCTTGAGGCTACTGTTGCCGAGGGCAAGGT
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  AGAGCTCCAGAAGTGGTGGGACGCTTCGGAAAAGAGCGAGGAGTCTTCGGAAGACAAGAT
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CGAGGTAAAGTATTCCAGCATACAGGTAGTATATGAGTACGCTCAGGGAGAGGCTCCGAA
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  GGTAACTACTACCACGACTTCTTCGGCTGTCACAACTACCACTACATCTGTTGCCACGAC
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  TACTTCTTCCACAACTGCTCCCGATAAGGATGTAGTCTACGGCGATGCCAACTGTGACGG
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CAATGTGGATCTTGCAGACGCCATACTTATCATGCAGTCTCTGGCTAATCCCAATAAATT
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CGGACTTAACGGCAGCGCAGAGAAGCACCTTACAGAAAAGGGCAAGCGCAATGCGGACTG
celB  ------------------------------------------------------------

10.4  ------------------------------------------------------------
11.3  ------------------------------------------------------------
endB  CTGCGATCCCGGAAGCGGACTTACCAACGATGATGCACTGTCTATACAGAGGCTCCTGCT
celB  ------------------------------------------------------------
```

```
10.4    ----------------------------
11.3    ----------------------------
endB    TCATCTCATAGACAAGCTTCCCGAATAA
celB    ----------------------------
                    P3
```

ภาพที่ ข.6 แสดงบริเวณที่ใช้ออกแบบไพร์เมอร์เพื่อหาส่วนทั้งหมดของยีน

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรรณทิพา ธงทอง เกิดเมื่อวันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2519 จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนบุญวัฒนา จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2541 เคยทำงานในตำแหน่งสัตวบาลโรงฟัก ที่ฟาร์มปากช่อง บริษัทแหลมทองสหการ จำกัด