บทที่ 4

ผลการวิจัย

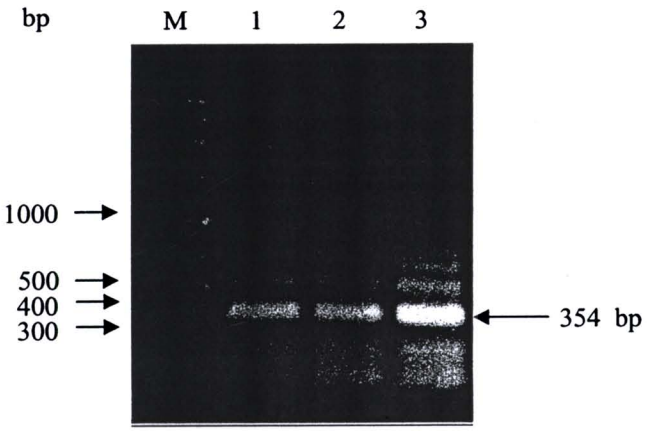
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิก

เมื่อนำแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์จากอะคริลาไมด์ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.1 มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานเดียว และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียร่วมกับการติดตามความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์จากปริมาณของกรดอะคริลิกและแอมโมเนียที่เกิดขึ้น และปริมาณของอะคริลาไมด์ที่ลดลงเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC พบว่า *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสลายอะคริลาไมด์ได้เป็นกรดอะคริลิก ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเจริญในอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสามารถเจริญได้ดีที่สุดแม้อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณอะคริลาไมด์สูงถึง 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) รองลงมาคือ *Kluyvera ascorbata* และ *Kluyvera intermedia* ที่สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้ที่เวลา 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเจริญ ตามมาด้วย *Klebsiella pneumoniae* และ *Enterococcus faecalis* ที่ใช้เวลาในการสลายอะคริลาไมด์คือ 24 ชั่วโมง ด้วยเหตุนี้จึงเลือก *E. aerogenes* มาใช้ในการทำการทดลองต่อไป

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes*

เมื่อใช้ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ จำนวน 4 สาย ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิโดไฮโดรเลสของ *Enterobacter* spp. มาหายีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* โดยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งจะแบ่งคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์เป็น 2 คู่ คือ EnAmi1 + EnAmi2 และ EnAmi3 + EnAmi4 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ตามวิธีที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 4.2.2 พบว่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่ตัดด้วย *Spe*I ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ EnAmi3+EnAmi4 สามารถให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 354 คู่เบส (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์อะมิเดสของแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae เช่น *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ที่ร้อยละความเหมือนมากกว่า 85% (ตารางที่ 3 และตารางที่ 4) ขณะที่การใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่ตัดด้วย *Aha*I, *Cla*I หรือ *Spe*I ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ EnAmi1+EnAmi2 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 297 คู่เบส (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) ที่มีความเหมือนของลำดับ

นิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ประมาณ 80% กับยีนอะมิเดสของแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6) และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือน (Alignment) กับยีนอะมิเดสของ *Enterobacter* spp. พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ EnAmi1 + EnAmi2 และ EnAmi3 + EnAmi4 มีบริเวณครอบคลุมช่วงปลายอะมิโน (N-terminal) และปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4; ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, ช่อง 1-3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคือโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I, *Pst*I และ *Spe*I ตามลำดับ

```
  1 TGGCGTGGCTGGCGTATCCTGCCGCTGGTGTGTTATGACCTGCGCTTCCCGGTATGGTCG  60
      W  R  G  W  R  I  L  P  L  V  C  Y  D  L  R  F  P  V  W  S

 61 CGTAACCACAACGATTACGACCTGGCGCTGTATGTCGCTAACTGGCCAGCCCCGCGTTCG 120
      R  N  H  N  D  Y  D  L  A  L  Y  V  A  N  W  P  A  P  R  S

121 CTGCACTGGCAATCGCTGCTGGTCGCCAGAGCAATTGAAAACCAGGCCTACGTCGCCGGC 180
      L  H  W  Q  S  L  L  V  A  R  A  I  E  N  Q  A  Y  V  A  G

181 TGCAACCGCGTCGGCACCGATGGTAACGGCCACCATTATCGGGGCGATAGCCGTATCATC 240
      C  N  R  V  G  T  D  G  N  G  H  H  Y  R  G  D  S  R  I  I

241 AGCCCACAGGGAGAGATTATCGCTACCGCCGAACCGCATCAGGCGACGCGGCTCGATGCC 300
      S  P  Q  G  E  I  I  A  T  A  E  P  H  Q  A  T  R  L  D  A

301 GATCTGTCGTTGGCCGCGCTGCAGGAGTATCGCGAAAAATTCCCGGCCTGGCAA       354
      D  L  S  L  A  A  L  Q  E  Y  R  E  K  F  P  A  W  Q
```

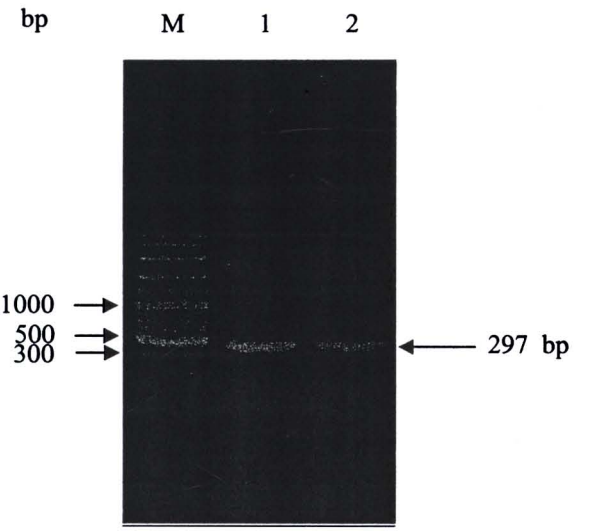
ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้

ตารางที่ 3 ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 เทียบกับฐานข้อมูลโลก

ยีนที่พบความเหมือน	แหล่งของยีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044	86	AP006725.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter cloacae* SCF1	85	CP002272.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578	85	CP000647.1
Hydrolase, C-N family	*Klebsiella pneumoniae* 342	85	CP000964.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Klebsiella variicola* At-22	84	CP001891.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	83	CP000653.1

ตารางที่ 4 ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 เทียบกับฐานข้อมูลโลก

โปรตีนที่พบความเหมือน	แหล่งของโปรตีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	80	CP000653.1
Predicted amidohydrolase	*Enterobacter cloacae subsp. cloacae* NCTC 9394	79	FP929040.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Klebsiella variicola* At-22	78	CP001891.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044	78	AP006725.1
Hydrolase, C-N family	*Klebsiella pneumoniae* 342	78	CP000964.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578	78	CP000647.1



ภาพที่ 4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2; ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, ช่อง 1-2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคือโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I และ *Spe*I ตามลำดับ

```
   1 TGGATGGACGGCCCGGCCAACCTGCGCCATTTCGATCGTCAGCTGGAAGAAGTGAGCGGG  60
     W  M  D  G  P  A  N  L  R  H  F  D  R  Q  L  E  E  V  S  G

  61 CGCGACATCATTGTGCTGCCTGAGATGTTTACTACCGGATTTGCCATGGAAGCGGCGAAG 120
     R  D  I  I  V  L  P  E  M  F  T  T  G  F  A  M  E  A  A  K

 121 CAGTCGATGCCGCAGGGAGAGGTCGTTGAGTGGATGCTGGCGAAAGCGGAGCAGACCAAC 180
     Q  S  M  P  Q  G  E  V  V  E  W  M  L  A  K  A  E  Q  T  N

 181 GCAATGATTGCCGGTAGCGCGGCCTTGCAGACCGAACGTGGCCCGGTGAACCGCTTTCTG 240
     A  M  I  A  G  S  A  A  L  Q  T  E  R  G  P  V  N  R  F  L

 241 CTGGTAGAGCCCGGCGGTAAAATGCACTTTTACGATAAACGTCACCTGTTCCGCATG    297
     L  V  E  P  G  G  K  M  H  F  Y  D  K  R  H  L  F  R  M
```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้

ตารางที่ 5 ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 เทียบกับฐานข้อมูลโลก

ยีนที่พบความเหมือน	แหล่งของยีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	80	CP000653.1
Predicted amidohydrolase	*Enterobacter cloacae subsp. cloacae* NCTC 9394	79	FP929040.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Klebsiella variicola* At-22	78	CP001891.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* NTUH-K2044	78	AP006725.1
Hydrolase, C-N family	*Klebsiella pneumoniae* 342	78	CP000964.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578	78	CP000647.1

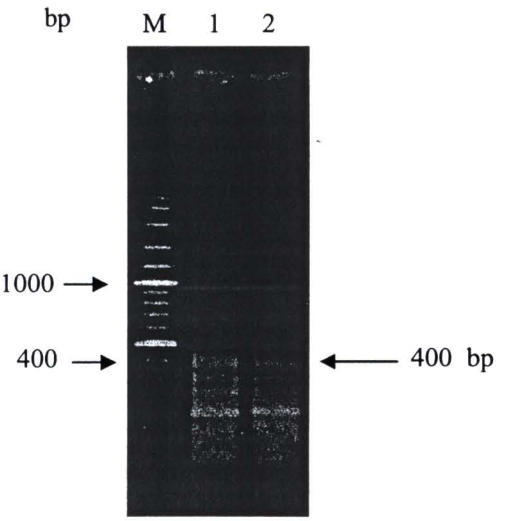
ตารางที่ 6 ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 เทียบกับฐานข้อมูลโลก

โปรตีนที่พบความเหมือน	แหล่งของโปรตีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	86	ABP59443.1
C-N hydrolase family	*Enterobacter cancerogenus*	87	EFC55728.1
Predicted amidohydrolase	*Enterobacter cloacae subsp. cloacae* NCTC 9394	86	CBK85994.1
C-N hydrolase family	*Citrobacter youngae* ATCC 292201	83	EFE08143.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Citrobacter* sp. 30_2	82	EEH91669.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter cloacae* SCF1	82	ADO49753.1

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


Ecancerogenus_ATCC35316          ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Enterobacter_CP000653            ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_NC_009436           ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_638                 ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Ecloacae_SCF1                    ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEGIQGRDIIVLPEMF
Known                            --------------------WMDGPANLRHFDRQLEEVSGRDIIVLPEMF
                                                     ***************** : ***:*******

Ecancerogenus_ATCC35316          TTGFAMEAAKQSMPQDDVVAWMHAKARQTNALIAGSAALQTERGAVNRFL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   TTGFAMEAAKQSMPQDEVVAWMHARAQETNALIAGSVALQTGRGPVNRFL
Enterobacter_CP000653            TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_NC_009436           TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_638                 TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Ecloacae_SCF1                    TTGFAMEAATQSLPENDVVMWMQSKARQTNALIAGSAALQVERGPVNRFL
Known                            TTGFAMEAAKQSMPQGEVVEWMLAKAEQTNAMIAGSAALQTERGPVNRFL
                                 *********.**:*:.:** ** ::*.:***::***.***. **.*****

Ecancerogenus_ATCC35316          LVEPEGNVHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   LVEPEGKVHFYDKRHLFRMADEHQHYEAGSERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_CP000653            LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_NC_009436           LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_638                 LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_SCF1                    LVEPDGRVHRYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Known                            LVEPGGKMHFYDKRHLFRM----------------WRGWRILPLVCYDL
                                 **** * :* *********                  ***************

Ecancerogenus_ATCC35316          RFPVWSRNRDDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVAGCNRV
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_CP000653            RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_NC_009436           RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_638                 RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Ecloacae_SCF1                    RFPVWSRNRGDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENLAYVAGCNRV
Known                            RFPVWSRNHNDYDLALYVANWPAPRSLHWQSLLVARAIENQAYVAGCNRV
                                 ********:.***************:****:**.****** ***.*****

Ecancerogenus_ATCC35316          GTDGNGHHYRGDSRVVNPQGEIIATAEPHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   GTDGNGHHYRGDSRVISPQGEIIATAEPHQATRIDAEISLTTLKEYREKF
Enterobacter_CP000653            GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_NC_009436           GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_638                 GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_SCF1                    GTDGNGHHYRGDSRVVSPQGEILATADPHQVTRIDAELSLTALKEYREKF
Known                            GTDGNGHHYRGDSRIISPQGEIIATAEPHQATRLDADLSLAALQEYREKF
                                 *:************:::.***:*:*::::.**..*::*::** :*:******

Ecancerogenus_ATCC35316          PAWQDADPFSIG
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   PAWQDADPFSIG
Enterobacter_CP000653            PAWQDADPFSIG
Enterobacter_NC_009436           PAWQDADPFSIG
Enterobacter_638                 PAWQDADPFSIG
Ecloacae_SCF1                    PAWQDADPFTLD
Known                            PAWQ--------
                                 ****
```

ภาพที่ 6 การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* ด้วยการใช้ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ กับลำดับกรดอะมิโนของย์นอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* ที่หาได้ในภาพที่ 6 มาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่เพื่อทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนส่วนที่เหลือตามวิธีที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2.3 และ 4.2.4 ผลการทดลองพบว่า การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมได้จากการเชื่อมกันเองของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I และ *Nde*I และใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi1 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ของการทำพีซีอาร์ย้อนหลังแบบจำเพาะตามลำดับ ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 400 คู่เบส (ภาพที่ 7 และภาพที่ 8) ขณะที่การใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi3 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi4 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมได้จากการเชื่อมกันเองของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 220 คู่เบส (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงกลางและช่วงปลายคาร์บอกซีของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ย้อนกลับแบบจำเพาะปฏิกิริยาที่ 2 ที่หาได้ เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 ทำปฏิกิริยา; ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, ช่อง 1-2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมได้จากการเชื่อมกันเองของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aha*I และ *Nde*I ตามลำดับ

```
  1 GAAGTGAGCGGGCGCGACATCATTGTGCTGCCTGAGATGTTTACTACCGGATTTGCCATG  60
      E  V  S  G  R  D  I  I  V  L  P  E  M  F  T  T  G  F  A  M

 61 GAAGCGGCGAAGCAGTCGATGCCGCAGGGAGAGGTCGTTGAGTGGATGCTGGCGAAAGCG 120
      E  A  A  K  Q  S  M  P  Q  G  E  V  V  E  W  M  A  K  A  E

121 GAGCAGACCAACGCAATGATTGCCGGTAGCGTGGCCTTGCAGACCGAACGTGGCCCGGTG 180
      Q  T  N  A  M  I  A  G  S  V  A  L  L  Q  T  E  R  G  P  V

181 AACCGCTTTCTGCTGGTAGAGCCCGGCGGTAAAATGCACTTTTACGATAAGCGTCACCTG 240
      N  R  F  L  L  V  E  P  G  G  K  M  H  F  Y  D  K  R  H  L

241 TTCCGCATGGTGGATGAGCATCACCATTATGAGGCAGGTACTGAGCGAGTGGTCTTTGAA 300
      F  R  M  V  D  E  H  H  H  Y  E  A  G  T  E  R  V  V  F  E

301 TGGCGTGGCTGGCGTATCCTA                                         321
      W  R  G  W  R  I  L
```

<u>ภาพที่ 8</u> ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi1 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ของการทำพีซีอาร์ย้อนหลังแบบจำเพาะ และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้

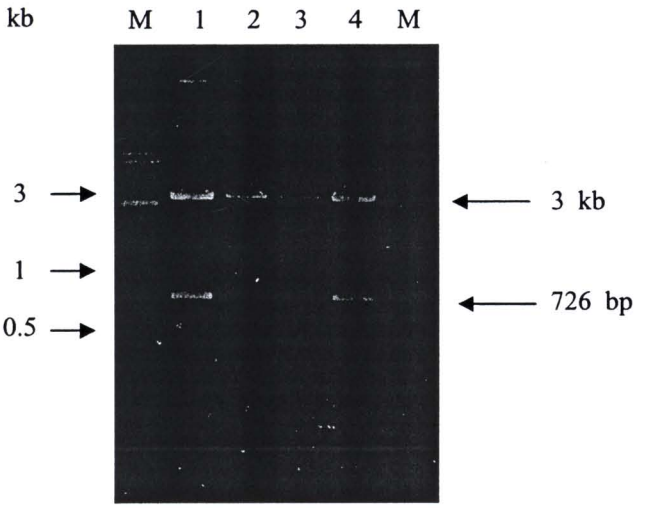
```
  1  CAGGAGTATCGCGAAAAATTCCCGGCCTGGCAGGATGCCGATCCCTTCACAATCGGCTAA    60
       Q  E  Y  R  E  K  F  P  A  W  Q  D  A  D  P  F  T  I  G  Stop
```

<u>ภาพที่ 9</u> ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi3 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi4 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ของการทำพีซีอาร์ย้อนหลังแบบจำเพาะ และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


Ecancerogenus_ATCC35316          ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Enterobacter_CP000653            ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_NC_009436           ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_638                 ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Ecloacae_SCF1                    ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEGIQGRDIIVLPEMF
Known                            ------------------------------------EVSGRDIIVLPEMF
                                                                     : ***:*******

Ecancerogenus_ATCC35316          TTGFAMEAAKQSMPQDDVVAWMHAKARQTNALIAGSAALQTERGAVNRFL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   TTGFAMEAAKQSMPQDEVVAWMHARAQETNALIAGSVALQTGRGPVNRFL
Enterobacter_CP000653            TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_NC_009436           TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_638                 TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Ecloacae_SCF1                    TTGFAMEAATQSLPENDVVMWMQSKARQTNALIAGSAALQVERGPVNRFL
Known                            TTGFAMEAAKQSMPQGEVVEWMLAKAEQTNAMIAGSVALQTERGPVNRFL
                                 *********.**:*:.:** ** ::*.:***::***.***. **.*****

Ecancerogenus_ATCC35316          LVEPEGNVHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   LVEPEGKVHFYDKRHLFRMADEHQHYEAGSERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_CP000653            LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_NC_009436           LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_638                 LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_SCF1                    LVEPDGRVHRYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Known                            LVEPGGKMHFYDKRHLFRMVDEHHHYEAGTERVVFEWRGWRIL-------
                                 **** * :* *********.***:***** ***:*********

Ecancerogenus_ATCC35316          RFPVWSRNRDDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVAGCNRV
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_CP000653            RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_NC_009436           RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_638                 RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Ecloacae_SCF1                    RFPVWSRNRGDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENLAYVAGCNRV
Known                            --------------------------------------------------

Ecancerogenus_ATCC35316          GTDGNGHHYRGDSRVVNPQGEIIATAEPHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   GTDGNGHHYRGDSRVISPQGEIIATAEPHQATRIDAEISLTTLKEYREKF
Enterobacter_CP000653            GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_NC_009436           GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_638                 GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_SCF1                    GTDGNGHHYRGDSRVVSPQGEILATADPHQVTRIDAELSLTALKEYREKF
Known                            ------------------------------------------QEYREKF
                                                                          :******

Ecancerogenus_ATCC35316          PAWQDADPFSIG
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939   PAWQDADPFSIG
Enterobacter_CP000653            PAWQDADPFSIG
Enterobacter_NC_009436           PAWQDADPFSIG
Enterobacter_638                 PAWQDADPFSIG
Ecloacae_SCF1                    PAWQDADPFTLD
Known                            PAWQDADPFTIG
                                 *********:*
```

ภาพที่ 10 การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคพีซีอาร์ย้อนหลังแบบจำเพาะกับลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมาหาบริเวณซ้อนทับ (Overlap region) และเพิ่มปริมาณยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน E. aerogenes โดยเทคนิคพีซีอาร์และโคลนเข้า pTG19-T (ภาพที่ 11) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสอีกครั้ง พบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดทั้งสิ้น 726 คู่เบส ที่สามารถคาดเดาเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด 242 ตัว (ภาพที่ 12) โดยมีความเหมือนกับเอนไซม์อะมิเดสของแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae ที่ร้อยละความเหมือนมากกว่า 95% (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) การเทียบความเหมือนกับยีนอะมิเดสของ *Enterobacter* spp. แสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 11 ผลการตัดพลาสมิดสายผสม pTG19-T ที่บรรจุยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI; ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder, ช่อง 1-4 = พลาสมิดสายผสม pTG19-T ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

```
  1 ATGGACGGCCCGGCCAACCTGCGCCATTTCGATCGTCAGCTGGAAGAAGTGAGCGGGCGC  60
      M  D  G  P  A  N  L  R  H  F  D  R  Q  L  E  E  V  S  G  R

 61 GACATCATTGTGCTGCCTGAGATGTTTACTACCGGATTTGCCATGGAAGCGGCGAAGCAG 120
      D  I  I  V  L  P  E  M  F  T  T  G  F  A  M  E  A  A  K  Q

121 TCGATGCCGCAGGGAGAGGTCGTTGAGTGGATGCTGGCGAAAGCGGAGCAGACCAACGCA 180
      S  M  P  Q  G  E  V  V  E  W  M  L  A  K  A  E  Q  T  N  A

181 ATGATTGCCGGTAGCGCGGCCTTGCAGACCGAACGTGGCCCGGTGAACCGCTTTCTGCTG 240
      M  I  A  G  S  A  A  L  Q  T  E  R  G  P  V  N  R  F  L  L

241 GTAGAGCCCGGCGGTAAAATGCACTTTTACGATAAGCGTCACCTGTTCCGCATGGCGGAT 300
      V  E  P  G  G  K  M  H  F  Y  D  K  R  H  L  F  R  M  A  D

301 GAGCATCACCATTATGAGGCAGGTACTGAGCGAGTGGTCTTTGAATGGCGCGGCTGGCGA 360
      E  H  H  H  Y  E  A  G  T  E  R  V  V  F  E  W  R  G  W  R

361 ATTCTGCCGCTGGTATGTTATGACCTGCGCTTCCCGGTATGGTCGCGTAACCACAACGAT 420
      I  L  P  L  V  C  Y  D  L  R  F  P  V  W  S  R  N  H  N  D

421 TACGACCTGGCGCTGTATGTCGCTAACTGGCCAGCCCCGCGTTCGCTGCACTGGCAATCG 480
      Y  D  L  A  L  Y  V  A  N  W  P  A  P  R  S  L  H  W  Q  S

481 CTGCTGGTCGCCAGAGCAATTGAAAACCAGGCCTACGTCGCCGGCTGCAACCGCGTCGGC 540
      L  L  V  A  R  A  I  E  N  Q  A  Y  V  A  G  C  N  R  V  G

541 ACCGATGGTAACGGCCACCATTATCGGGGCGATAGCCGTATCATCAGCCCACAGGGAGAG 600
      T  D  G  N  G  H  H  Y  R  G  D  S  R  I  I  S  P  Q  G  E

601 ATTATCGCTACCGCCGAACCGCATCAGGCGACGCGGCTCGATGCCGATCTGTCGTTGGCC 660
      I  I  A  T  A  E  P  H  Q  A  T  R  L  D  A  D  L  S  L  A

661 GCGCTGCAGGAGTATCGCGAAAAATTCCCGGCCTGGCAGGATGCCGATCCCTTCACAATC 720
      A  L  Q  E  Y  R  E  K  F  P  A  W  Q  D  A  D  P  F  T  I

721 GGCTAA                                                        726
      G  *
```

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 7 ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้เทียบกับฐานข้อมูลโลก

ยีนที่พบความเหมือน	แหล่งของยีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
C-N hydrolase family amidase	*Enterobacter aerogenes* KCTC 2190	97	CP002824.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* NTUH-K2044	81	AP006725.1
Putative amidase-type enzyme	*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578	81	CP000647.1
Hydrolase, C-N family	*Klebsiella pneumoniae* 342	81	CP00964.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	81	CP000653.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Klebsiella variicola* At-22	81	CP001891.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter cloacae* SCF1	80	CP002272.1

ตารางที่ 8 ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้เทียบกับฐานข้อมูลโลก

โปรตีนที่พบความเหมือน	แหล่งของโปรตีน	ความเหมือน (%)	Accession no.
C-N hydrolase family amidase	*Enterobacter aerogenes* KCTC 2190	99	AEG97287.1
C-N hydrolase family amidase	*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316	89	EFC55728.1
Nitrilase/cyanide hydratase	*Enterobacter* sp. 638	88	ABP59443.1
Predicted amidohydrolase	*Enterobacter cloacae subsp. cloacae* NCTC 9394	88	CBK85994.1
C-N hydrolase	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162	89	EGK61946.1
C-N hydrolase	*Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* ATCC 13884	88	ZP_06017127.1

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment


Ecancerogenus_ATCC35316             ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      ----------------------MDGPANLRHFDRQLEEITGRDVIVLPEMF
Enterobacter_CP000653               ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_NC_009436              ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Enterobacter_638                    ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEEISGRDVIVLPEMF
Ecloacae_SCF1                       ------MPGLKITLLQQPLVWMDGPANLRHFDRQLEGIQGRDIIVLPEMF
Known                               --------------------WMDGPANLRHFDRQLEEVSGRDIIVLPEMF
                                                        *************** : ***:*******

Ecancerogenus_ATCC35316             TTGFAMEAAKQSMPQDDVVAWMHAKARQTNALIAGSAALQTERGAVNRFL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      TTGFAMEAAKQSMPQDEVVAWMHARAQETNALIAGSVALQTGRGPVNRFL
Enterobacter_CP000653               TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_NC_009436              TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Enterobacter_638                    TTGFAMEAAKQSLPQDDVVAWMHTKAQQTNALVAGSAALQTERGPVNRFL
Ecloacae_SCF1                       TTGFAMEAATQSLPENDVVMWMQSKARQTNALIAGSAALQVERGPVNRFL
Known                               TTGFAMEAAKQSMPQGEVVEWMLAKAEQTNAMIAGSAALQTERGPVNRFL
                                    *********.**:*:.:** ** ::*.:***::***.***. **.*****

Ecancerogenus_ATCC35316             LVEPEGNVHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      LVEPEGKVHFYDKRHLFRMADEHQHYEAGSERVVFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_CP000653               LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_NC_009436              LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Enterobacter_638                    LVEPDGTLHFYDKRHLFRMADEHHHYEAGHERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Ecloacae_SCF1                       LVEPDGRVHRYDKRHLFRMADEHHHYEAGNERVIFEWRGWRILPLVCYDL
Known                               LVEPGGKMHFYDKRHLFRMVDEHHHYEAGTERVVFEWRGWRILPLVCYDL
                                    **** * :* *********.***:***** ***:*****************

Ecancerogenus_ATCC35316             RFPVWSRNRDDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVAGCNRV
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLTARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_CP000653               RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_NC_009436              RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Enterobacter_638                    RFPVWSRNRNDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENQAYVVGCNRV
Ecloacae_SCF1                       RFPVWSRNRGDYDLALYVANWPAPRSLHWQALLVARAIENLAYVAGCNRV
Known                               RFPVWSRNHNDYDLALYVANWPAPRSLHWQSLLVARAIENQAYVAGCNRV
                                    ********:.***************:****:**.****** ***.*****

Ecancerogenus_ATCC35316             GTDGNGHHYRGDSRVVNPQGEIIATAEPHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      GTDGNGHHYRGDSRVISPQGEIIATAEPHQATRIDAEISLTTLKEYREKF
Enterobacter_CP000653               GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_NC_009436              GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Enterobacter_638                    GTDGNGHHYRGDSRVVTPQGEILATAEAHQATRIDAELSLTALKEYREKF
Ecloacae_SCF1                       GTDGNGHHYRGDSRVVSPQGEILATADPHQVTRIDAELSLTALKEYREKF
Known                               GTDGNGHHYRGDSRIISPQGEIIATAEPHQATRLDADLSLAALQEYREKF
                                    *:************:::.***:*:*::::.**..*::*::** :*:******

Ecancerogenus_ATCC35316             PAWQDADPFSIG
Ecloacae_subsp.cloacae_NCTC939      PAWQDADPFSIG
Enterobacter_CP000653               PAWQDADPFSIG
Enterobacter_NC_009436              PAWQDADPFSIG
Enterobacter_638                    PAWQDADPFSIG
Ecloacae_SCF1                       PAWQDADPFTLD
Known                               PAWQDADPFTIG
                                    *********:*
```

ภาพที่ 13 การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้ กับลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W

4.3 การคาดเดาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes*

เมื่อใช้โปรแกรมสำเร็จ PDB คาดเดาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* โดยอาศัยหลักการสร้างแบบจำลองความเหมือน พบว่าเอนไซม์อะมิเดสที่ได้มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมแบบ α/β ที่ประกอบด้วย แอลฟา-ฮีลิกซ์ (α-helix) จำนวน 6 เกลียวและบีตา-ชีท (β-sheet) 6 สายที่จับกันเป็นแผ่นเรียบ 2 แผ่น แสดงดังภาพที่ 14 เมื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างสามมิติที่คาดเดาได้ พบว่า เอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* มีความคล้ายคลึงร้อยละ 45 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนตราเลส (Nitrilase) จาก *Xanthomonas camprestis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ (Chin et al., 2007)

ภาพที่ 14 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* ที่หาได้จากการสร้างแบบจำลองความเหมือนด้วยโปรแกรม PDB