



วิทยานิพนธ์

การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเนสจาก

Bacillus licheniformis KUB-K0006 ใน *Bacillus subtilis*

CLONING AND EXPRESSION OF KERATINASE GENE

FROM *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 IN *Bacillus subtilis*

นางสาววัญญุณิศร์ อินทรตระกูล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Bacillus subtilis*

Cloning and Expression of Keratinase Gene from *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 in *Bacillus subtilis*

นามผู้วิจัย นางสาววิญญูณิศร์ อินทรตระกูล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนัย นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน
Bacillus subtilis

Cloning and Expression of Keratinase Gene from *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 in
Bacillus subtilis

โดย

นางสาววัญฉนิษฐ์ อินทรตระกูล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)
พ.ศ. 2551

ขวัญกนิษฐ์ อินทรตระกูล 2551: การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Bacillus subtilis* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 87 หน้า

เอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ได้ จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการย่อยได้ของขนไก่ป่น เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ แต่เชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 มีการสร้างเมือกในระหว่างกระบวนการหมักทำให้ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้ลดลง ดังนั้นจึงได้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเอนจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 เพื่อผลิตเซลล์ลูกผสมที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอนสูง โดยโคลนยีนเคราตินเอนจาก Genomic library โดยตัดโครโมโซมของ *B. licheniformis* KUB-K0006 แบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 ถึง 6 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วย *Bam*HI และถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α พบว่าโคลน e101 มีกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเอน 5.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากพลาสมิดไม่เสถียรจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบขนาดของยีนเคราตินเอนได้ ส่วนการโคลนยีนเคราตินเอนโดยทำ PCR cloning พบยีนเคราตินเอนขนาด 1,140 คู่เบส ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีนเคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 และเปรียบเทียบกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK และ *B. licheniformis* PWD-1 โดยการสร้างโมเดลและการระบุตำแหน่งของบริเวณเร่งอ้างอิงจากเทมเพลต *lscE* และ *Ibh6A* ตามลำดับ พบว่ากรดอะมิโน Lue15, Arg249, Ala327 และ Ala376 ของเคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ต่างไปจากเอนไซม์เคราตินเอนอื่นไม่ได้ส่งผลให้มีโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ต่างกัน นอกจากนี้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ยังอยู่ที่ตำแหน่ง Asp137, His168 และ Ser325 เช่นเดียวกับเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล จึงทำนายได้ว่ายีนเคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนและเกิดการม้วนพับเป็นโปรตีนเพื่อสร้างเป็นเอนไซม์เคราตินเอนได้เช่นเดียวกับเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงได้ทำการแสดงออกของยีนเคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ใน *B. subtilis* 1A751 โดยใช้ pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และจากการคัดเลือกโคลนด้วยการทำพีซีอาร์พบว่าทุกโคลนมียีนเคราตินเอนอยู่ แต่โคลนไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเอนได้

Kwankanit Intaratrakul 2008: Cloning and Expression of Keratinase Gene from *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 in *Bacillus subtilis*. Master of Science (Genetic Engineering),
Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor :
Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 87 pages.

Keratinase enzyme from *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 was applied to increase the digestibility of feather meal. However, the yield of enzyme production was decreased because large amount of mucus was produced during bacterial growth. Cloning and expression of keratinase gene from *B. licheniformis* KUB-K0006 were done to construct a recombinant cell that can produce high level of keratinolytic enzyme. To clone the keratinase gene, genomic library was constructed by partial digestion of the chromosomal DNA from *B. licheniformis* KUB-K0006 with 0.1 U/μl of *Bsp*143I at 37 °C, 30 minutes. The cut DNA sized 2 to 6 Kb was ligated with *Bam*HI digested pHT43. Transformation of recombinant DNA into *Escherichia coli* DH5α was done and 5.73 U/ml of the keratinase activity was detected from clone named e101. However, the cloned keratinase gene could not be analyzed because of its plasmid instability. The 1,140 bp keratinase gene was successfully cloned by PCR. This gene was predicted the protein structure and compared with the model of keratinase gene from *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK and *B. licheniformis* PWD-1 by Homology modeling. Model construction and identification of active site were based on template 1cseE and 1bh6A, respectively. The results of homology modeling showed that the model of keratinase gene from *B. licheniformis* KUB-K0006 had the same structure with other models even there were differences of amino acid at Lue15, Arg249, Ala327 and Ala376. In addition, the amino acids in active site were also located in the same position; Asp137, His168 and Ser325, on the model. Based on the similarity of the model, the keratinase gene from *B. licheniformis* KUB-K0006 could be translated to mature protein and form the active keratinase same as reported *B. licheniformis* keratinase sequences in database. Expression of this keratinase gene was done in *B. subtilis* 1A751 using pHT43 as a vector. Keratinase gene was detected in all clones by PCR but keratinase activity was not detected in these clones.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ให้โอกาสในการทำงานวิจัย และช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย รวมทั้งการตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร. มังกร โรจน์ประภากร กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. เกียรติวิ ชวงศ์โกมล และคุณสุภา สกุลศิริรัตน์ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ในส่วน Homology modeling ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนและค้นคว้าวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ (พ.ศ. 2549) และทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ (พ.ศ. 2549)

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและอาจารย์สาขาพันธุ์วิศวกรรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆธุรการและนักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆน้องๆที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน สำหรับมิตรภาพ การให้ความช่วยเหลือและเป็นที่ปรึกษาในทุกๆเรื่อง

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณแม่และน้องชาย สำหรับความรัก กำลังใจและการสนับสนุนที่มีให้เสมอมา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ข้าพเจ้าสามารถผ่านพ้นปัญหาต่างๆไปได้ด้วยดี

ขวัญกนิษฐ์ อินทรตระกูล

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	36
สรุป	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	79
ภาคผนวก ข เทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีวิเคราะห์	84
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้	6
2 การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์โปรติเอสตามระบบของ IUBMB	9
3 คุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจากแบคทีเรียบางสายพันธุ์	10
4 การจัดหมวดหมู่ของ serine protease โดยใช้ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนโครงสร้างและลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์	11
5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในขนไก่ดิบ	19
6 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	23
7 กิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสจากโคลน e101	41
8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx	46
9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastn	47
10 เทมเพลตในการสร้างโมเดลของเอนไซม์เคราติเนสจาก <i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ต่างๆกับโดยใช้โปรแกรม Swiss-model	51
11 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เคราติเนสจาก <i>B. licheniformis</i> แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ subtilisin DY จาก <i>B. licheniformis</i> (PDB code: 1bh6A)	54

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของเคราติน	4
2 กลไกการทำงานของ serine protease	12
3 แสดงลักษณะของพลาสมิด pHT43	15
4 โครโมโซมจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	37
5 พลาสมิด pHT43	37
6 ลักษณะของโครโมโซมจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วย เอนไซม์ <i>Bsp</i> 143I แบบไม่สมบูรณ์	39
7 พลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	40
8 การตรวจสอบขนาดของยีนเคราตินเนสจากโคลน c101 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ	42
9 ผลิตภัณฑ์จากการทำฟิอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FK และ RK จาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	44
10 ลำดับเบสยีนและลำดับกรดอะมิโนของเคราตินเนสจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	45
11 Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 เทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ เคราตินเนสจาก <i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์อื่นที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล	48
12 โมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก <i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ต่างๆและ <i>B. pumilus</i> ที่ได้จากการจำลองโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม Swiss-model	52
13 Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006, <i>B. licheniformis</i> PWD-1, <i>B. licheniformis</i> MKU3 และ <i>B. licheniformis</i> RPK เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ เอนไซม์ subtilisin DY จาก <i>B. licheniformis</i> (PDB code: 1bh6A)	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ตำแหน่งกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งบนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006, <i>B. licheniformis</i> MKU3, <i>B. licheniformis</i> RPK, <i>B. licheniformis</i> PWD-1 และ <i>B. pumilus</i>	58
15	ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 กับ <i>B. licheniformis</i> MKU3	59
16	ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 กับ <i>B. licheniformis</i> RPK	59
17	ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 กับ <i>B. licheniformis</i> PWD-1	60
18	ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 กับ <i>B. pumilus</i>	60
19	ผลการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเอนจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK	63
20	ยีนเคราตินเอนและพลาสมิด pHT43 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Aat</i> II	63
21	ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อยีนเคราตินเอนจาก <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 เข้ากับพลาสมิด pHT43 โดยการทำให้ฟอสฟอไรต์ด้วยไพรเมอร์ (ก) NFK-ARK และ (ข) FSq-RSq	64
22	ผลการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Aat</i> II	65
23	ลำดับเบสของยีนเคราตินเอนเมื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHT43	66
24	ผลการตรวจคัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเอนโดยการทำให้ฟอสฟอไรต์ด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK	67
25	ผลการตรวจคัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเอนโดยการทำให้ฟอสฟอไรต์ด้วยไพรเมอร์ FSq และ RSq	68

การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006
ใน *Bacillus subtilis*

Cloning and Expression of Keratinase Gene from *Bacillus licheniformis*
KUB-K0006 in *Bacillus subtilis*

คำนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทยได้มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดทั้งผลพลอยได้และของเหลือทิ้งตามมามากมาย โดยเฉพาะขนไก่ซึ่งพบมากที่สุด คือ ประมาณ 4 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวไก่ (Baker *et al.*, 1981) เนื่องจากขนไก่มีโครงสร้างหลักเป็นเคราตินทำให้ไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วตามธรรมชาติ จึงก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัด และปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา ซึ่งเคราตินในขนไก่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ทำให้มีแนวคิดที่จะนำเอาขนไก่มาแปรรูปเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์เพื่อลดต้นทุนการผลิต และเนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์ของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cystein) ภายในโครงสร้างของเคราติน ทำให้ขนไก่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสทั่วไป ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยสลายขนไีก่อนที่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์

ในการนำขนไก่มาแปรรูปเพื่อเป็นอาหารสัตว์ สามารถทำได้โดยนำขนไก่ไปผ่านกระบวนการอบด้วยไอน้ำภายใต้ความดันสูง (Baker *et al.*, 1981) แต่พบว่าวิธีการนี้ทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลงเพราะความร้อนมีผลต่อกรดอะมิโนบางชนิด จึงได้มีการนำเอาสารเคมีมาใช้ในการย่อยขนไก่ (Latschaw *et al.*, 1994) ซึ่งมีข้อเสียคือ สารเคมีราคาแพงและยากต่อการควบคุมในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการศึกษากระบวนการย่อยสลายขนไก่โดยวิธีทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ คือ เอนไซม์เคราตินเนส ซึ่งการทำงานของเอนไซม์เคราตินเนสไม่ต้องใช้ความร้อนสูงกรดอะมิโนจึงไม่ถูกทำลาย ทำให้ได้ขนไ่ป่นที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าวิธีอื่น นอกจากนี้ยังไม่จำเป็นต้องแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์หลังเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตเพราะเอนไซม์ถูกทำให้เสถียรสภาพได้ง่าย อีกทั้งยังปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

สุทธิพันธุ์ (2540) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากบริเวณฟาร์มไก่เนื้อในประเทศไทย พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus licheniformis* KUB-K0006

และ *Bacillus pumilus* KUB-K0082 โดย *B. licheniformis* KUB-K0006 มีความสามารถในการย่อยขนไก่ได้สูงถึง 91.85 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายขนไก่เพื่อให้ได้อาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจและช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมด้วย แต่ในกระบวนการผลิตเอนไซม์เคราตินเอสโดยใช้ *B. licheniformis* KUB-K0006 นั้นการเก็บเกี่ยวเอนไซม์เป็นไปได้อ่อนช้อยเนื่องจากมีการสร้างเมือกในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์เคราตินเอสที่ต้องการลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการโคลนยีนเคราตินเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็นเชื้อ *B. subtilis* 1A751 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่ผลิต neutral protease และ alkaline protease เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตและเก็บเกี่ยวเอนไซม์เคราตินเอสได้สูงขึ้น

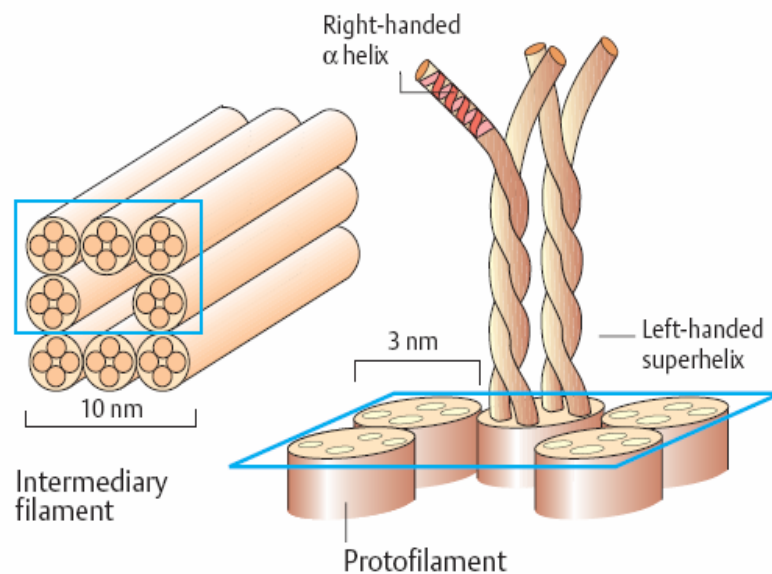
วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนยีนเคราตินเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006
2. เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมของเชื้อ *B. subtilis* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอส
3. ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เคราตินเอสที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม

การตรวจเอกสาร

1. เอนไซม์เคราตินเนส

เอนไซม์เคราตินเนส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสซึ่งสามารถย่อยโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนอย่างเคราตินได้ โดยเคราตินเป็นองค์ประกอบหลักในผม เล็บ ขนไก่ ขนและเขาสัตว์ต่างๆ เนื่องจากเคราตินประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างซิสเทอีน (cysteine) ทำให้เคราตินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Papadopoulos *et al.*, 1986) โดยภายในโครงสร้างของเคราตินจะมีลักษณะเป็นสายเปปไทด์สองสายจับกันหมุนเป็นเกลียวเวียนขวา แล้วเปปไทด์เกลียวคู่สองสายจะจับกันเป็นเกลียวเวียนซ้าย เรียกว่า ซูเปอร์เฮลิค (superhelix) และโคเมอร์ของซูเปอร์เฮลิคจะมาจับกันเป็นเตตระเมอร์ กลายเป็นโปรโตฟิลาเมนต์ (protofilament) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 นาโนเมตร และท้ายสุดโปรโตฟิลาเมนต์ 8 สาย จะมารวมตัวกันเป็น intermediate filament ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเคราติน

ที่มา: Koolman and Roehm (2005)

คุณสมบัติของเอนไซม์เคราตินเนสจะแตกต่างกันตามแหล่งของเอนไซม์ จากการศึกษา ลักษณะของเอนไซม์เคราตินเนสจากหลายๆแหล่งพบว่า ส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เคราตินเนสออกนอกเซลล์ โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางจนถึงด่างและที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส (Gupta and Ramnani, 2006) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราตินเนสก็มีหลากหลายเช่นกัน โดยขนาดเล็กที่สุดคือ 18 กิโลดาลตัน จาก *Streptomyces albidoflavus* SL1-02 และเอนไซม์เคราตินเนสขนาดใหญ่ที่สุดผลิตจาก *Kocuria rosea* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 240 กิโลดาลตัน (Bernal *et al.*, 2003)

ปัจจุบันความสามารถของเอนไซม์เคราตินเนสในการย่อยเคราตินถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็นด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และการแพทย์ นอกจากนี้เอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* PWD-1 ยังถูกนำไปผลิตเพื่อจำหน่ายเป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์โดยใช้ชื่อว่า Versazyme ซึ่งเป็นลิขสิทธิ์ของ BioResource International Inc (BRI) ของสหรัฐอเมริกา (Wang *et al.*, 2006)

2. แหล่งของเอนไซม์เคราตินเนส

เอนไซม์เคราตินเนสสามารถผลิตได้จากทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และรา (ตารางที่ 1) ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสมักพบในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะกลุ่มของ *Bacillus* นอกจากนั้นพบว่ากลุ่มของ *Lysobacter*, *Nesternokia*, *Kocuria* และ *Microbacterium* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เช่นกัน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสพบได้ในกลุ่ม *Vibrio*, *Xantomonas*, *Fervidobacterium* และ *Chryseobacterium* (Gupta and Ramnani, 2006)

แอคติโนมัยซิสที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* เช่น *S. fradiae*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. termoviolaceus* SD8 และ *S. graminogaciens* และกลุ่มของ *Thermoactonomyces* เช่น *T. candius* (Gupta and Ramnani, 2006)

ส่วนราที่ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสมีหลายกลุ่ม เช่น *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Urocladium* และ *Penicillium* เป็นต้น แต่ไม่นิยมใช้ราในการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสเนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง (Gradisar *et al.*, 2000)

ตารางที่ 1 แหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้

จุลินทรีย์	ที่มา
แบคทีเรีย :	
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Williams <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Macedo <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> and <i>Bacillus cereus</i>	Kim <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus psuedofirmus</i>	Gessesse <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus macroides</i> and <i>Bacillus cereus</i>	Lucas <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus licheniformis</i> KUB-K0006 and <i>Bacillus pumilus</i> KUB-K0082	สุทธิพันธุ์, 2540
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Friedrich and Antranikian, 1996
<i>Kocuria rosea</i>	Bernal <i>et al.</i> , 2006a
รา :	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Santo <i>et al.</i> , 1996
<i>Doratomyces microsporus</i>	Gardisar <i>et al.</i> , 2000
แอคติโนมัยซีส :	
<i>Terrabacter terrae</i>	Montero-Barrientos <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	Böckle <i>et al.</i> , 1995
<i>Streptomyces albidoflavus</i> K1-02	Bressolier <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Chitte <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermoactinomyces keratinolyticum</i>	Hussein and Swelim, 1995

3. การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์เคราติเนส

เอนไซม์เคราติเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้เช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นๆ โดยตามหลักของ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) สามารถแบ่งโปรติเอสหรือเปปติเดสออกเป็นทั้งหมด 13 sub-subclass ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งทั้ง 13 sub-subclass นี้ สามารถแบ่งตามกลไกการทำงานได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Exopeptidases และ Endopeptidases

3.1 Exopeptidases (EC 3.4.11.- ถึง EC 3.4.19.-)

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีน ซึ่งเมื่อแบ่งตามตำแหน่งการตัดสามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้

3.1.1 Aminopeptidases (EC 3.4.11.-) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากทางปลายอะมิโน N-terminal ของโปรตีนทีละหนึ่งหน่วย ถ้าตัดทีละสองหรือสามหน่วยจะเรียกเอนไซม์นี้ว่า dipeptidyl peptidase หรือ tripeptidyl peptidase (EC 3.4.14.-) ตามลำดับ

3.1.2 Carboxylpeptidases (EC 3.4.16.- ถึง EC 3.4.19.-) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ของโปรตีนทีละหนึ่งหน่วย ถ้าตัดทีละสองหน่วยจะเรียกเอนไซม์นี้ว่า peptidyl dipeptidases (EC 3.4.15.-) และเมื่อแบ่งตาม catalytic group ที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ สามารถแบ่งเอนไซม์กลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม serine-type carboxyl peptidases (EC 3.4.16.-) metallo-carboxypeptidases (EC 3.4.17.-) และ cysteine-type carboxypeptidases (EC 3.4.18.-)

3.1.3 Omega peptidases (EC 3.4.19.-) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้ทั้งปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลของโปรตีน

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ dipeptidases (EC 3.4.13.-) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของ exopeptidases โดย dipeptidases นี้เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ dipeptide substrate บริเวณปลายสายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน

3.2 Endopeptidases (EC 3.4.21.- ถึง EC 3.4.29.- และ EC 3.4. 99.-)

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในสายโพรตีน เมื่อแบ่งตามกลไกการทำงานและความจำเพาะของเอนไซม์ สามารถแบ่ง Endopeptidases ได้เป็น 4 กลุ่ม ได้ดังนี้

3.2.1 Serine endopeptidases (EC 3.4.21.-) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซีรีน (serine) อยู่ในตำแหน่งที่เป็นบริเวณเร่ง เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นประเภท alkaline protease โดยมีฟิเอนที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 7 ถึง 11 โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โดยสาร diisopropyl-phosphofluoridate (DFP) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของอนุมูลซีรีล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วย phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF), chymostatin, trypsin-like serine proteinases (TLCK) เป็นต้น

3.2.2 Cysteine endopeptidases (EC 3.4.22.-) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) อยู่ตรงบริเวณเร่ง จัดว่าเป็น neutral protease โดยฟิเอนที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 6-7.5 และกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulphydryl reagents เช่น β -mercaptoethanol, Iodoacetic acid (IAA) และ cystatin เป็นต้น โดยมีผลต่ออนุมูลของซัลไฟดริลที่บริเวณเร่ง ทำให้สูญเสียกิจกรรมในที่สุด

3.2.3 Aspartic endopeptidases (EC 3.4.23.-) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในฟิเอนระหว่าง 2 ถึง 4 จัดอยู่ในประเภท acid proteases สารที่มีผลยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pepstatin, densyl-pepstatin และ α_2 Macroglobulin

3.2.4 Metallo endopeptidases (EC 3.4.24.-) เป็นโปรติเอสที่ต้องการไอออนของโลหะในการทำงานของเอนไซม์ สามารถถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดย metal-chelating agents เช่น 1, 10-phenanthroline, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ phosphoramidon เป็นต้น

ตารางที่ 2 การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์โปรติเอสตามระบบของ IUBMB

Sub-subclass	Type of peptidase	Number of entries
3.4.11.-	Aminopeptidases	19
3.4.13.-	Dipeptidases	12
3.4.14.-	Dipeptidyl-peptidases	8
3.4.15.-	Peptidyl-peptidases	3
3.4.16.-	Serine-type carboxypeptidases	4
3.4.17.-	Metallo-carboxypeptidases	19
3.4.18.-	Cysteine-type carboxypeptidases	1
3.4.19.-	Omega peptidases	11
3.4.21.-	Serine endopeptidases	75
3.4.22.-	Cysteine endopeptidase	26
3.4.23.-	Aspartic endopeptidase	32
3.4.24.-	Metalloendopeptidase	69
3.4.99.-	Endopeptidases of unknown type	2
	Total	281

ที่มา: ดัดแปลงจาก Rao *et al.* (1998)

เอนไซม์เคราตินเนสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ serine protease (ตารางที่ 3) โดย serine protease จะมีการจัดกลุ่มเป็นแฟมิลี (family) และแฟมิลีจะถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็นแคลน (Clan) โดยใช้ความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างเอนไซม์และลำดับของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเป็นเกณฑ์ ในการจัดหมวดหมู่ โดย serine protease ประกอบด้วยแคลน SA, SB, SC, SE, SF, SH และ SK ซึ่งแต่ละแคลนจะมีลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์เคราตินเนสจากแบคทีเรียบางสายพันธุ์

Producer bacteria	Catalytic type	Molecular mass (kDa)	Optimum pH	reference
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Serine	33	7.5	Lin <i>et al.</i> , 1992
<i>B. subtilis</i> KS-1	Serine	25.4	7.5	Suh and Lee, 2001
<i>B. pseudofirmus</i> FA30-10	Serine	27.5	9-10	Kojima <i>et al.</i> , 2006
<i>S. pactum</i> DSM49530	Serine	30	7-10	Böckle <i>et al.</i> , 1995
<i>S. albidoflavus</i> K1-02	Serine	18	6-9.5	Bressolier <i>et al.</i> , 1999
<i>F. pennavorans</i>	Serine	130	10	Friedrich and Antranikian, 1996
<i>X. maltophilia</i> POA-1	Serine	36	8	De Toni <i>et al.</i> , 2002
<i>Vibrio</i> sp. kr2	Serine	30	8	Sangali and Brandelli, 2000a
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metallo	64	7.5	Riffel <i>et al.</i> , 2007
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metallo	42	7.5	Thys and Brandelli, 2006
<i>Kocuria rosea</i> LPB-3	Serine	240	10	Bernal <i>et al.</i> , 2006a

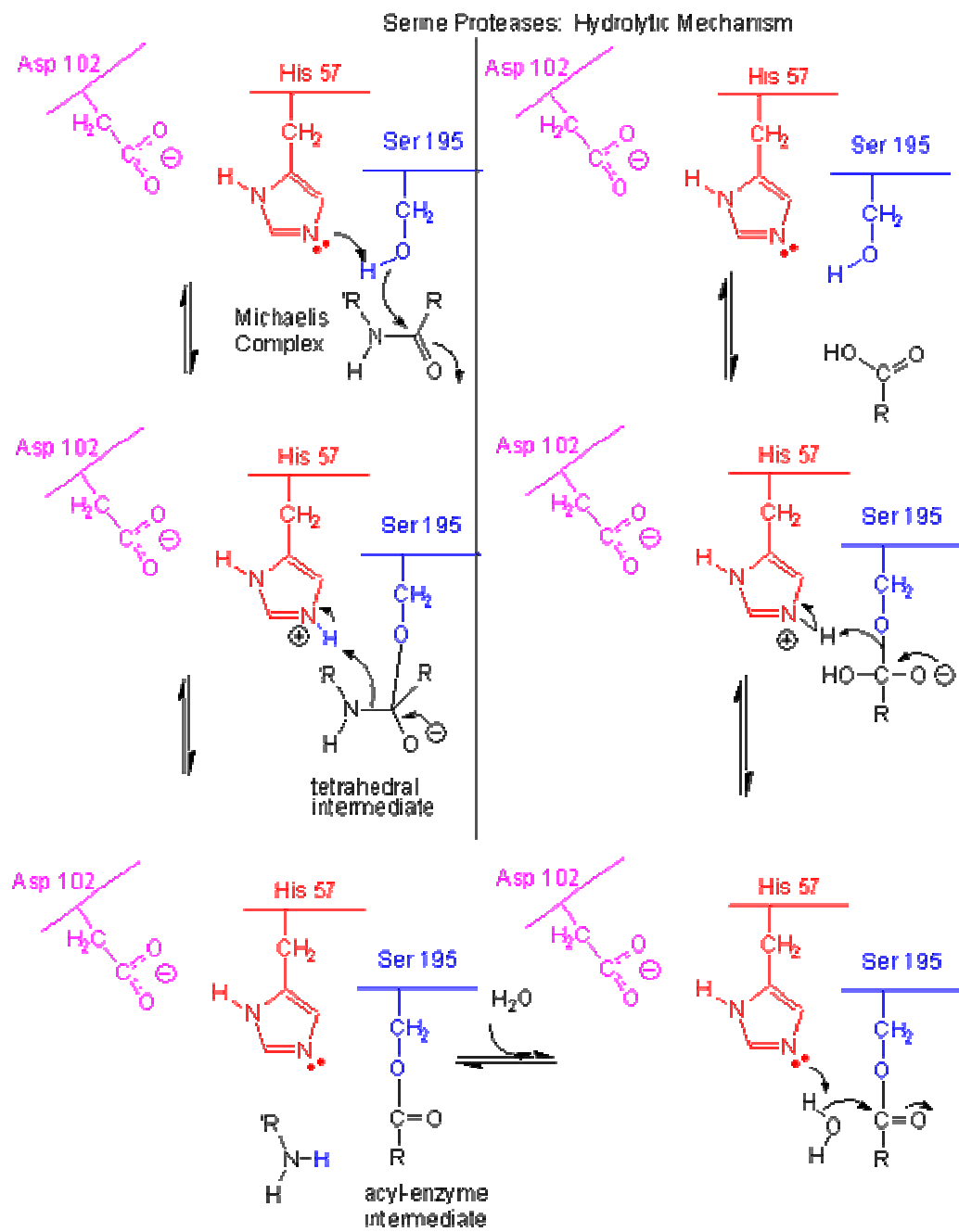
ที่มา: Brandelli (2007)

เอนไซม์เคราติเนสที่พบใน *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่จัดอยู่ในแคลน SB ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเป็น Asp-His-Ser (ตารางที่ 4) โดยซีรีน (serine) ทำหน้าที่เป็น nucleophile แอสพาเตท (aspartate) ทำหน้าที่เป็น electrophile และ ฮิสทีดีน (histidine) ทำหน้าที่เป็นเบส ซึ่งกลไกการทำงานของ serine protease ประกอบด้วยสองขั้นตอน คือ catalysis โดยเอนไซม์จับกับสับสเตรทที่ตำแหน่งของซีรีนในบริเวณเร่ง ทำให้เกิดประจุลบและอยู่ในสภาวะ tetrahedral transition state ทำให้พันธะเปปไทด์ถูกตัดออกได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอมีน ส่วนที่ยังจับอยู่กับเอนไซม์จะเกิด acyl-enzyme intermediate แล้วเข้าสู่ขั้นตอน deacylation ซึ่ง acyl-enzyme intermediate จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำทำให้พันธะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทถูกทำลาย ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 4 การจัดหมวดหมู่ของ serine protease โดยใช้ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน โครงสร้างและลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์

Sub-subclass	Clans	Families	Catalytic residues
Serine (EC 3.4.21.-)	SA	S1-S3, S6, S7, S29-S32, S35, S43	His-Asp-Ser
	SB	S8, S53	Asp-His-Ser
	SC	S9, S10, S15, S28, S33, S37	Ser-Asp-His
	SE	S11-S13	Ser-Lys(SXXX)
	SF	S24, S26, S41, S44	Ser-Lys-(His)
	SH	S21	His –Ser-His
	SK	S14	Ser-His

ที่มา: Rawlings (2008)



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของ serine protease

ที่มา: Jakubowski (2008)

4. การศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนจาก *Bacillus* sp.

4.1 เซลล์เจ้าบ้าน

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่นิยมนำมาใช้ในการโคลนและศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนหลายชนิด เนื่องจากโตเร็ว เลี้ยงได้ง่าย อีกทั้งยังมีการศึกษากระบวนการต่างๆภายในเซลล์และมีการศึกษาแผนที่จีโนมทั้งหมดของ *E. coli* แล้ว อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่พบเมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน คือโปรตีนที่ผลิตได้มักจะสะสมอยู่ที่โปรโตพลาสต์ และช่องว่างภายในเซลล์ ซึ่งการสะสมของเอนไซม์ไว้ในเซลล์นี้ทำให้โปรตีนเกิดการจับกันอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เกิดการม้วนพับของโปรตีนที่ผิดปกติไป ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Schallmey *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงมีความสนใจในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดยใช้ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจาก *B. subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค ไม่มีปัญหาในเรื่อง codon bias และสามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่อาหารได้โดยตรงทำให้เก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย นอกจากนี้กระบวนการถอดรหัส (transcription) การแปลรหัส (translation) และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมใน *B. subtilis* ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางแล้ว (Wong, 1995) แต่เนื่องจาก *B. subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้หลายชนิด ซึ่งอาจส่งผลให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตได้จะถูกทำลายด้วยโปรติเอสจากเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของ *B. subtilis* ให้ผลิตโปรติเอสน้อยลง เช่น *B. subtilis* 1A751, *B. subtilis* WB600 และ *B. subtilis* DB104 เป็นต้น ทำให้ได้ผลผลิตของรีคอมบิแนนต์โปรตีนสูงขึ้น อีกทั้ง *B. subtilis* ยังสามารถเลี้ยงได้ง่าย โตเร็ว ซึ่งเป็นข้อดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น รา ยีสต์ และบาซิลลัสชนิดอื่นๆ ซึ่งยากแก่การควบคุมในการเจริญ ตลอดจนใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตในการหมักนานกว่าและผลิตโปรตีนที่สนใจได้น้อยกว่า

4.2 พลาสมิด

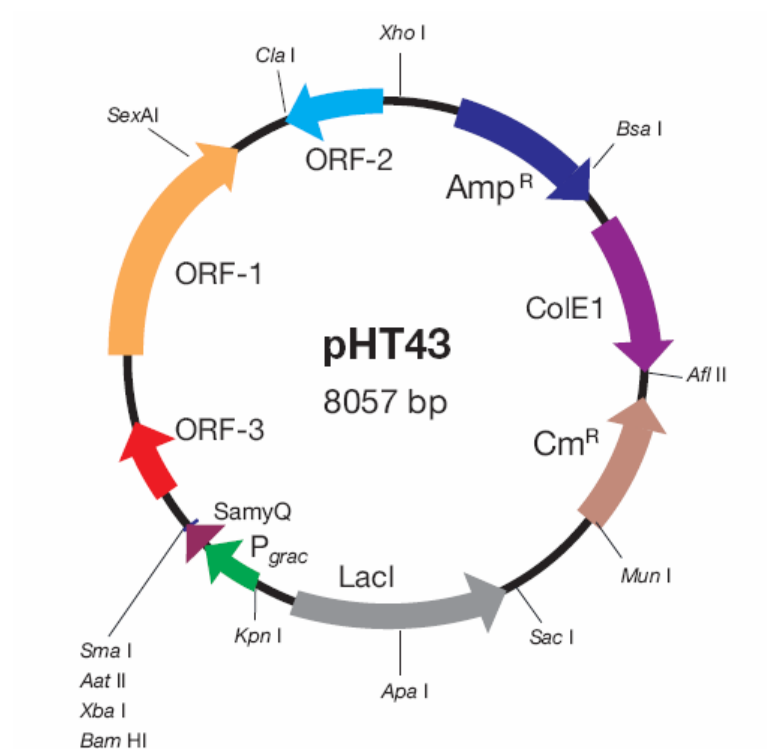
ดีเอ็นเอพาหะที่นำมาใช้กับ *B. subtilis* ได้มาจากหลายแหล่งด้วยกัน เช่น พลาสมิดที่ได้มาจาก *Staphylococcus aureus* ได้แก่ pUB110, pC194 และ pE194 พลาสมิดที่ได้จาก *Corynebacterium xerosis* ได้แก่ pTZ12 และ pGDV1 พลาสมิดขนาดเล็กที่ได้จาก *Lactococcus lactis* ได้แก่ pWVO1, pGK12 และ pSH71 นอกจากนี้ยังมีพลาสมิดที่ได้จาก *Bacillus* sp. ด้วย ได้แก่ pTA1060, pLS11 และ pBAA1 (Harwood and Cutting, 1990)

ปัจจุบันมีการสร้าง shuttle vector หลายชนิดเพื่อใช้ในการโคลนและผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนใน *B. subtilis* เช่น pSUGV4 ซึ่งเป็น *E.coli-B. subtilis* shuttle vector ที่มียีนต้านทานคานามัยซินและแอมพิซิลลิน โดยมีส่วนของ multiple cloning site จาก pUC18 ได้ถูกนำมาใช้ในการโคลนยีน *subtilisin DFE* เพื่อผลิต fibrinolytic enzyme ใน *B. subtilis* WB600 (Pang *et al.*, 2003)

pHY300PLK เป็น *E.coli- B. subtilis* shuttle vector ที่ผลิตโดยบริษัทยาคูลท์ (Yakult) ซึ่งสร้างจากพลาสมิด pACYC177 ของ *E. coli* และ pAMQ1 ของ *Streptococcus faecalis* โดยมียีนต้านทานต่อเตตระไซคลินและแอมพิซิลลินเป็นยีนที่ใช้ในการคัดเลือก โดยในปี 2003 Ogawa และคณะ ได้นำเอาพลาสมิด pHY300PLK มาใช้ในการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิต FT protease จาก alkaliphilic *Bacillus* และใช้ในการโคลนยีน *apr* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์ alkaline protease จาก *B. licheniformis* 2709 ด้วย (Tang *et al.*, 2004)

Nguyen *et al.* (2005) ได้สร้าง expression vector สำหรับ *B. subtilis* จาก pMTLBS72 ซึ่งเป็น *E. coli-B. subtilis* shuttle vector ที่มีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (origin of replication) จากพลาสมิด pBS72 และ pBR322 โดยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ด้วยการใช้ strong ribosome binding site ของยีน *gsiB* และใช้โปรโมเตอร์ที่เหนี่ยวนำได้ด้วยสารและสภาวะต่างๆ ได้แก่ pHCMC03 มีโปรโมเตอร์ *PgsiB* ซึ่งเหนี่ยวนำได้ด้วยความร้อน กรด และเอทานอล pHCMC04 มีโปรโมเตอร์ *PxylA* ที่สามารถเหนี่ยวนำได้ด้วยไซโลส และ pHCMC05 ซึ่งมีโปรโมเตอร์ *Pspac* ที่เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ได้ด้วยการเติม IPTG

Phan *et al.* (2006) ได้สร้าง pNDH37 ซึ่งเป็น expression vector ของ *B. subtilis* โดยการนำเอา pHCMC05 มีโครงสร้างโดยนำโปรโมเตอร์ของ *groE* operon มาแทนในตำแหน่งของโปรโมเตอร์ *Pspac* นอกจากนั้นยังมีการตัดต่อ signal peptide ของยีน *AmyQ* จาก *B. amyloliquefaciens* เพื่อให้สามารถผลิตโปรตีนออกสู่อาหารได้โดยตรง และเมื่อทำการโคลนยีน *celA* และ *celB* ซึ่งเป็นยีนเซลลูเลสจาก *clostridium thermocellum* เพื่อผลิตเอนไซม์ใน *B. subtilis* 1012 พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นเมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG และพบว่าเอนไซม์ไม่มีการผลิตลดลงถึงแม้จะผ่านการเหนี่ยวนำไปแล้วถึง 6 ชั่วโมง ปัจจุบันได้ถูกจำหน่ายโดยบริษัท Mo Bi Tec โดยใช้ชื่อว่า pHT43 (ภาพที่ 3)



GCGGATAACAATTcccaattaaaggaggaaggatca
lacO **RBS**
 atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcggttcagacttgtgcttatg
 M I Q K R K R T V S F R L V L M
 tgcacgctgttatttgtcagtttgccgattacaaaaacatcagccg
 C T L L F V S L P I T K T S A
taggatectctagagtcgaacgtccccggggcagcc
BamHI XbaI AatII SmaI

ภาพที่ 3 ลักษณะของพลาสมิด pHT43

ที่มา: MoBiTec.GmbH (2007)

4.3 การศึกษาการโคลนและการแสดงออกของเอนไซม์ในกลุ่มของเคราตินเนสจาก *Bacillus* sp.

ปัจจุบันนักวิจัยได้ทำการศึกษาการโคลนยีนในกลุ่มของเคราตินเนสอย่างมากมาย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น Joop *et al.* (1991) ได้โคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ alkaline serine protease จาก *B. alcalophilus* pB92 ATCC 31408 โดยใช้ pUB110 เป็นเวกเตอร์ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *B. subtilis* 1A40 พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์ alkaline serine protease ได้ในปริมาณสูง แต่เนื่องจากพลาสมิดไม่เสถียร จึงได้ถ่ายโอนพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *B. alcalophilus* pB92 พบว่าโคลนมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและพลาสมิดก็มีความเสถียรมากขึ้นด้วย

Maciver *et al.* (1994) ศึกษา ยีนของ serine protease จาก *Bacillus* ssp. Ak1 โดยวิธี PCR เพื่อโคลนยีนและผลิตเอนไซม์ใน *E. coli* โดยใช้ pJLA602 เป็นเวกเตอร์ โดยสามารถผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์ได้ด้วยการใช้ signal peptide ของยีน *atpE* และเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีนตัวแรกเป็นกลูตามีน

Lin *et al.* (1995) ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *kerA* ซึ่งผลิตเป็นเอนไซม์เคราตินเนส จาก *B. licheniformis* PWD-1 พบว่ายีนนี้มีความเหมือนกับ Subtilisin Carlsberg ของ *B. licheniformis* NCIB 6816 ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้ทำการโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *kerA* ใน *B. subtilis* โดยพบว่าเมื่อใช้โปรโมเตอร์ P_{43} ช่วยในการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส โคลนจะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสโดยใช้ยีน *kerA* เพียงอย่างเดียว (Lin *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ก็ไม่เพียงพอต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งยังพบปัญหาความไม่เสถียรของพลาสมิด เนื่องจาก segregation instability ของพลาสมิดในระหว่างกระบวนการหมัก (Wang and Shih, 1999) นักวิจัยจึงได้โคลนยีน *kerA* เพื่อผลิตเอนไซม์เคราตินเนสใน *Pichia pastoris* โดยใช้พลาสมิด pPIC7 α ซึ่งควบคุมการผลิตเอนไซม์โดยใช้โปรโมเตอร์ AOX1 พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้สูงกว่า *B. licheniformis* PWD-1 โดยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ยกเว้นน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 31 กิโลดาลตัน เป็น 39 กิโลดาลตัน เนื่องจากใน *P. pastoris* มีกระบวนการไกลโคซิเลชันซึ่งเป็น posttranslation modification โดยการเติมหมู่น้ำตาลเข้าไปในสาย โปลิเปปไทด์ ทำให้โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น (Porres *et al.*, 2002) และเพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เคราตินเนสจึงได้ทำการอินตรอกเรทยีน *kerA* เข้าสู่โครโมโซมของ *B. licheniformis* T399D ด้วย

เวกเตอร์ pLAT10 นอกจากนี้ยังได้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เคราตินเอสด้วยการใช้โปรโมเตอร์ P_{43} เชื่อมต่อกับยีน *kerA* พบว่า โคลนมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอสได้สูง แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไม่ได้แปรผันตรงกับจำนวนของยีน *kerA* ที่อินทรีเกรทเข้าไป ซึ่งจำนวนยีนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอส คือ 3-5 copy number (Wang *et al.*, 2004)

Ogawa *et al.* (2003) ศึกษา ยีน *FT* protease ซึ่งผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม subtilisase ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 68.5 กิโลดาลตัน จาก *Bacillus* sp สายพันธุ์ KSM-KP43 โดยโคลนยีนเข้าสู่ *B. subtilis* KSM-9865 ใช้เวกเตอร์ pHY300PLK พบว่ายีนนี้มี open reading frame ขนาด 2,427 คู่เบส ที่ประกอบไปด้วย prepro-peptide ขนาด 152 อะมิโน และ mature protein 656 อะมิโน

Tang *et al.* (2004) โคลนยีน *apr* ของเอนไซม์ alkaline protease จากเชื้อ *B. licheniformis* 2709 โดยใช้โปรโมเตอร์ P_{43} เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ โดยเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHY300PLK เพื่อถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *B. subtilis* WB600 พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นถึง 65 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่ามีปัญหาในเรื่องความเสถียรของพลาสมิดในระหว่างกระบวนการหมักทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์ลดลง

Pan *et al.* (2004) โคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เคราตินเอส คือ ยีน *AP* จาก *B. pumillus* UN-31-C-42 โดยใช้ pET15b เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ใน *E. coli* XL1-blue แต่พบว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้เมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จึงได้ทำการผลิตเอนไซม์เคราตินเอสใน *B. subtilis* WB600 โดยได้นำโปรโมเตอร์ Bp53 ไปเชื่อมต่อกับยีน *AP* และใช้ pSUGV4 เป็นเวกเตอร์ พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเอสได้ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำเนื่องจากโปรโมเตอร์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ใน *B. subtilis*

Radha and Gunasekaran (2007) โคลนยีนเคราตินเอสจาก *B. licheniformis* MKU3 เพื่อผลิตเอนไซม์ใน *E. coli* BL21 และ *B. Megaterium* ATCC 14945 ด้วยพลาสมิด pET30b และ pWH1520 ตามลำดับ โดยพบว่า *E. coli* จะผลิตเอนไซม์เคราตินเอสและสะสมไว้ในเซลล์ ส่วน *B. megaterium* จะผลิตเอนไซม์เคราตินเอสออกสู่นอกเซลล์ได้และจะมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเติมไซโลสลงไปในการหมัก เนื่องจากในพลาสมิด pWH1520 มีโปรโมเตอร์ *P_{xyL}* ที่สามารถเหนี่ยวนำได้ด้วยไซโลส

กฤษณี (2545) ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนเคราตินเอสโดยการเตรียม ธาราการยีนจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยโคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบส เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pUB110 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิต เอนไซม์เคราตินเอสได้สูงสุดถึง 6.45 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมมา ตรวจสอบการหาอินเคราตินเอส พบว่าไม่สามารถตัดพลาสมิดลูกผสมได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BsIII*, *XbaI* และ *PvuII* ที่มีตำแหน่งอยู่บน pUB110 ซึ่งอาจเกิดจากความไม่คงตัวของพลาสมิดลูกผสม โดยดีเอ็นเอลูกผสมอาจเกิดการจับเรียงตัวใหม่ ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ตัดจำเพาะจึงไม่สามารถที่จะเข้าตัดได้ นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบชนิดของอินเคราตินเอส โดยการทำให้ Southern blot และไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบที่ออกแบบจาก pUB110, ยีน *suk A* และ *suk B* พบว่า pUB110 เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอลูกผสม แต่ไม่พบการสัญญาณการเข้าคู่กันเมื่อใช้ โพรบที่ออกแบบจาก *suk A* และ *suk B* เป็นไปได้ว่ายีนที่ได้แสดงออกถึงเคราตินเอสชนิดอื่นจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ซึ่งสามารถย่อยชนไก่ได้เช่นกัน นอกจากนี้ณัฐวดี (2546) ได้โคลน ยีนเคราตินเอสด้วยการเตรียมธาราการยีนจาก *B. pumillus* KUB-K0082 โดยใช้ *B. subtilis* 1A751 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และใช้ pUB110 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ เคราตินเอสเท่ากับ 2.51 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสมมีขนาด 22 กิโลเบส แต่ไม่ สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BamHI*, *PvuII* และ *XbaI* ซึ่งอาจเกิดจากขึ้นดีเอ็นเอซึ่ง ประกอบด้วยพลาสมิด pUB110 และอินเคราตินเอสเกิดการเรียงตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้นเมื่ออยู่ใน เซลล์ของ *B. subtilis* 1A751 จึงไม่สามารถตรวจสอบขนาดของอินเคราตินเอสได้

5. ประโยชน์ของเอนไซม์เคราตินเอส

5.1 การผลิตอาหารสัตว์

อุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่เพื่อใช้ในการบริโภคภายในประเทศและเพื่อพัฒนาเป็น สินค้าส่งออกได้พัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดทั้งผลพลอยได้และของเสียตามมาอย่างมากมาย โดยเฉพาะชนไก่ซึ่งเป็นของเสียที่เกิดขึ้นมากที่สุด เนื่องจากองค์ประกอบหลักในชนไก่คือเคราติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ดังตารางที่ 5 จึงได้มีการนำเอาชนไก่มา แปรรูปเป็นชนไก่ป่นเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ โดยใช้เอนไซม์เคราตินเอสในการย่อย ชนไก่ เนื่องจากสามารถผลิตชนไก่ป่นที่มีคุณภาพ ควบคุมการผลิตได้ง่าย มีต้นทุนการผลิตต่ำ อีกทั้งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

Lee *et al.* (1991) พบว่าเมื่อนำเอนไซม์เคราตินเอสที่ผลิตจาก *B. licheniformis* PWD-1 มาผสมในขนไก่หรือขนไก่ป่นจะช่วยให้สัตว์สามารถนำกรดอะมิโนไปใช้ในการเจริญเติบโตได้มากขึ้น อีกทั้งยังมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) วาลีน (valine) และ ทรีโอนีน (threonine) สูงกว่ากากถั่วเหลืองอีกด้วย นอกจากนี้การแปรรูปขนไก่ป่นโดยใช้เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเอสได้ยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับขนไก่ป่นได้ เนื่องจากในกระบวนการหมักจะพบเมทไธโอนีน (methionine) ไลซีน (lysine) และ อาร์จินีน (arginine) ในปริมาณสูง อีกทั้งชีวมวลจากเชื้อจุลินทรีย์ยังเป็นแหล่งของโปรตีนอีกด้วย (Williams *et al.*, 1991)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในขนไก่ดิบ

Essential amino acid (%)		Non-essential amino acid (%)	
Threonine	4.66	Aspartic	6.21
Cystine	6.87	Serine	11.13
Valine	7.38	Glutamic acid	9.32
Methionine	0.57	Proline	8.81
Isoleucine	4.90	Glycine	6.25
Leucine	7.41	Alanine	4.27
Tyrosine	2.79		
Phenylalanine	4.35		
Lysine	1.97	NH ₃	1.30
Histidine	0.60	Nitrogen	15.50
Arginine	6.45		

ที่มา: Papadopoulos *et al.* (1986)

5.2 การผลิตปุ๋ย

เนื่องจากในชนไก่ป่นที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เคราตินเนส มีไนโตรเจนประกอบอยู่ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นปุ๋ยในระบบการเกษตรแบบอินทรีย์ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต อีกทั้งยังช่วยเพิ่มกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน และปรับโครงสร้างของดินให้สามารถกักเก็บน้ำได้ดียิ่งขึ้นนอกจากนี้ยังผลิตได้ง่ายและราคาไม่แพงอีกด้วย (Gupta and Ramnani, 2006)

5.3 อุตสาหกรรมผงซักฟอก

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ซึ่ง 89 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้จัดอยู่ในกลุ่มของ alkaline protease เอนไซม์เคราตินเนสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกเนื่องจากเอนไซม์มีความสามารถในการจับและย่อยสลายโปรตีนที่เป็นของแข็งได้ดี ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนี้เพราะเอนไซม์ต้องไปจับและย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของเสื้อผ้า (Gassesse *et al.*, 2004) นอกจากนี้เอนไซม์เคราตินเนสยังช่วยย่อยเศษผมที่ติดอยู่ตามท่อระบายน้ำได้อีกด้วย (Frag and Hansan, 2004)

5.4 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุดคือขั้นตอนการกำจัดขนสัตว์ออกจากแผ่นหนัง เนื่องจากต้องใช้สารเคมีหลายชนิด ซึ่งทำให้ค่า biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD) และ total dissolved solid (TDS) มีค่าสูงขึ้น (Thanikaivelan *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงมีการนำเอาเอนไซม์โปรติเอสมาใช้โดยผสมกับเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น ไลเปสและคาร์โบไฮเดรส นอกจากนี้เอนไซม์เคราตินเนสจะไม่ทำลายคอลลาเจนในแผ่นหนังทำให้หนังยังคงคุณภาพดี อีกทั้งเคราตินยังมี elastolytic activity เล็กน้อย ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดขนสัตว์บนแผ่นหนังได้ดีขึ้นด้วย (Macedo *et al.*, 2005)

5.5 การรักษาโรค

ไพรอน (prion) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค transmissible spongiform encephalopathies (TSE) ซึ่งเป็นการเสื่อมของระบบประสาทที่พบในคนและสัตว์ซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้ เช่น โรควัวบ้า โดยไพรอนจะไปเปลี่ยนโปรตีน PrP^c ให้อยู่ในรูป PrP^{sc} ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเบต้าชีท (β -sheet) ซึ่งจากการศึกษาของ PrP^{sc} ในเชื้อหุ้มสมองของหนูทดลองด้วยการใช้เอนไซม์เคราตินเอสที่ผลิตจาก *B. licheniformis* PWD-1 ร่วมกับผงซักฟอกและความร้อนจะทำให้สามารถย่อย PrP^{sc} ได้ (Langeveld *et al.*, 2003) นอกจากนี้เอนไซม์เคราตินเอสได้ถูกนำไปใช้ในการนำส่งยาเพื่อรักษาโรคที่เกิดบริเวณเส้น เนื่องจากปัญหาที่พบในการรักษาโรคที่เส้นคือยาซึมผ่านเส้นได้ช้าทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคลดลง โดยพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เคราตินเอสร่วมกับยาจะช่วยให้ยาสามารถซึมผ่านเส้นได้ดียิ่งขึ้น (Mohorcic *et al.*, 2007)

5.6 การผลิตก๊าซชีวภาพ

Bálint *et al.* (2005) อธิบายกระบวนการหมักสองขั้นตอนในการเปลี่ยนเคราตินให้เป็นก๊าซชีวภาพ โดยขั้นแรกหมักด้วย *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเอสได้ เพื่อใช้เอนไซม์เคราตินเอสเปลี่ยนเคราตินในสับสเตรทให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปเป็นอาหารสำหรับ *Thermococcus litoralis* เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

1.1. แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใช้เป็นแหล่งของโครโมโซมเพื่อใช้ในการโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราตินเนส

1.2. แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนเคราตินเนส

1.3. แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 1A751 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนเคราตินเนส

2. พลาสมิด

2.1 pGEM-T easy vector (Promega, USA) เป็นดีเอ็นเอพาหะซึ่งมียีนต้านทานแอมพิซิลลินเป็น selective marker และมียีนควบคุมการผลิตเอนไซม์กาแลคโตซิเดส เป็น reporter gene ใช้สำหรับโคลนยีนจากการเพิ่มปริมาณด้วยการทำพีซีอาร์เข้าสู่ *E. coli* DH5 α

2.2 pHT43 expression vector (Mo Bi Tec, Germany) เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มียีนต้านทานแอมพิซิลลินและคลอแรมฟินิคอลเป็น selective marker โดยควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยโปรโมเตอร์ *PgsiB* และ *lac* operator

3. ไพรเมอร์

ตารางที่ 6 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<u>ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีนเคราตินเนส</u>	
FK	5' GAG TGA GTA ATG ATG AGG 3'
RK	5' AAT ATG TTA TTG AGC GGC 3'
<u>ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนใน <i>B. subtilis</i> 1A751</u>	
NFK	5' TGG <u>GAT CCT</u> CTG CTG CTC AG 3'
ARK	5' TGG <u>ACG TCA</u> TAT GTT ATT GAG CGG 3'
หมายเหตุ : บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Aat</i> II ตามลำดับ	
<u>ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเคราตินเนสและตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งการแปลรหัสกรดอะมิโน</u>	
FSq	5' TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC 3'
RSq	5' AAG CCG ATA TTA GCC TCG TAT TG 3'

4. สารเคมีและเอนไซม์

- 4.1 *Bam*HI (Fermentas, USA)
- 4.2 *Bsp*143I (Fermentas, USA)
- 4.3 *Xba*I (Fermentas, USA)
- 4.4 *Aat*II (Fermentas, USA)
- 4.5 T4 DNA ligase (Promega, USA)
- 4.6 DynazymeII *Taq* DNA Polymerase (Finzyme, Finland)
- 4.7 QIAprep[®] Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA)
- 4.8 NucleoSpin extract II[®] (Machere-Nagel, USA)
- 4.9 Agarose (Research organics, USA)

- 4.10 RNase (Fermentas, USA)
- 4.11 6X loading dye (Fermentas, USA)
- 4.12 1 Kb DNA marker (Fermentas, USA)
- 4.13 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA)
- 4.14 λ DNA marker (Fermentas, USA)
- 4.15 Phenol (Amresco, USA)
- 4.16 Choroform (Merks, Germany)

วิธีการ

1. การสกัดโครโมโซมและพลาสมิด

1.1 การสกัดโครโมโซมจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

วิธีการสกัดโครโมโซมดัดแปลงจากวิธีการของ Harwood and Cutting (1990) โดยเลี้ยง *B. licheniformis* KUB-K0006 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 มิลลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 1.2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติม lysozyme จำนวน 0.002 กรัม ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 20% sarkosyl ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับปามา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ แล้วเติม phenol:chloroform (1:1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับปามา แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3M sodium acetate pH 5.2 0.1 เท่าของปริมาตรและ absolute ethanol 2.5 เท่าของปริมาตร พลิกหลอดกลับปามาช้าๆ แช่ใน -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร เติม RNase ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติม phenol จนถึงขั้นตอนการละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดพลาสมิดจาก *E.coli* DH5 α

วิธีการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* DH5 α ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep[®] Spin miniprep kit (Qiagen, USA) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 มิลลิลิตรทันที นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 750 มิลลิลิตรใส่ลงในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำบัฟเฟอร์ NE ปริมาตร 750 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ไหลผ่านลงคอลัมน์ด้านล่างทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจากเมมเบรนโดยใช้บัฟเฟอร์ EB หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การสกัดพลาสมิดจาก *B. subtilis* 1A751

การสกัดพลาสมิดดัดแปลงจากวิธีการของ Birnboim and Doly (1979) โดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* 1A751 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง นำเซลล์ 2 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ TSE ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม solution A (10 mM Tris-HCl pH8.0 , 10 mM EDTA , 50 mM NaCl , 20%(W/V) Sucrose) ที่มี lysozyme ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนเซลล์แตก ประมาณ 30 นาทีหรือสารละลายขุ่น แล้ววางบนน้ำแข็ง เติมน้ำ solution B (0.2 M NaOH, 1% (W/V) SDS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 4 นาที แล้วเติม solution C (5 M Potassium acetate, Glacial acetic acid) ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ปิเปตสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติมน้ำ phenol:chloroform (1:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ปิเปตสารละลายใสส่วนบนใส่

หลอด microtube หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่าของ ปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที ปิเปตสารละลายใส่ส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol ผสมให้เข้ากันและแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การโคลนยีนเคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

2.1 การโคลนยีนเคราตินจาก genomic library

2.1.1 การเตรียมธนาคารยีน

2.1.1.1 การตัดโครโมโซมของ *B. licheniformis* KUB-K0006 ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

ตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I โดยการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 ยูนิตต่อไมโครลิตร และแปรผันเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาทีตามลำดับ เพื่อคัดเลือกรูปภาพที่ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 ถึง 6 กิโลเบส มากที่สุด และตรวจสอบผลการตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1.1.2 การตัดพลาสมิด pHT43 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ (complete digestion) ตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยใช้พลาสมิดเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลการตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1.1.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

นำส่วนของดีเอ็นเอจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่มีขนาด 2-6 กิโลเบส จากข้อ 2.1.1.1 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHT43 จากข้อ 2.1.12 ในอัตราส่วนของพลาสมิดต่อโครโมโซมดีเอ็นเอเป็น 1:3 โดยใช้ T_4 DNA ligase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X T_4 ligase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.1.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α

2.1.2.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell)

เจือเชื้อ *E. coli* DH5 α 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ข้ามคืน จากนั้นปั่นสารละลายเชื้อ 1 เปอร์เซนต์ มาใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์เจริญถึงช่วง log phase โดยจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.3 ถึง 0.4 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,272 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด ปริมาตร 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 เทลงไปแล้วเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 20 นาที แยกคอมพิเทนต์เซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,272 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด ปริมาตร 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 เทเข้าจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แบ่งคอมพิเทนต์เซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 210 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด ปริมาตร 15 เปอร์เซนต์ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.1.2.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมโดยวิธี heat shock

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมทำตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) โดยใช้พลาสมิดความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อ

คอมพิเทนต์เซลล์ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติม SOC ลงไป 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เคลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.3 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน ถ่ายไปยังอาหาร skim milk ที่มีแอมพิซิลลิน และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารทดสอบโดยพิจารณาจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone)

2.1.4 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราติเนส

2.1.4.1 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่

นำโคโลนีเดี่ยวของเซลล์ลูกผสมที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนบนอาหาร skim milk ได้ มาเลี้ยงในอาหาร mineral salt 5 มิลลิลิตร ที่มีขนไก่ โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เติมน้ำ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์เคราติเนส และเลี้ยงต่อจนครบ 7 วัน แล้วเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสต่อไป

2.1.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Lin *et al.* (1992) โดยใช้ขนไก่เป็นสับสเตรท ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย ขนไก่บดขนาด 0.5 มิลลิเมตร 5 มิลลิกรัม สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์เคราติเนสที่ได้จากข้อ 2.1.4.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายไทรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 0.2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสไปหาปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมาเทียบ

กับชุดควบคุม โดยวิธี Ninhydrin (Rosen, 1975) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสเตรทจนทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 60 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.5 การตรวจสอบขนาดของยีนเคราตินเนสโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้ในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน เพื่อสกัดพลาสมิดจากตามวิธีการในข้อ 1.2 แล้วตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยการทำการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I ตามวิธีการในข้อ 2.1.1.2 แล้วตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง

2.2 การโคลนยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยการทำพีซีอาร์ (polymerase chain reaction : PCR)

2.2.1 การเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

เพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ FK และ RK (ตารางที่ 6) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และเครื่อง Thermal cycle (T-gradient, Biometra) โดยเติมบัฟเฟอร์สำหรับการทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม dNTPs mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร และใส่ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร สารละลายโครโมโซมจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycle โดยมีสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นที่ 1 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55.5 องศาเซลเซียส 5 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 3 extension ที่

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.2.2 การหาลำดับเบสของยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลิเมอร์ที่ได้จากการทำ PCR ในข้อ 2.2.1 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Nucleospin Extract II[®] แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับ pGEM-T easy vector เพื่อถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α เลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มีแอมพิซิลลิน x-gal และ IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำโคลนที่ได้มากัดเลือกด้วยการทำพีซีอาร์ จากนั้นส่งโคลนที่ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

นำลำดับเบสที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ด้วยโปรแกรม blastx และ blastn เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้จากการโคลนมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีนและโปรตีนใดในฐานข้อมูล

3. การทำ Homology modeling เพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนส

3.1 การสร้างโมเดลโดยใช้ Swiss-model

นำลำดับเบสของยีนเคราตินเนสไปตรวจสอบเฟรมในการแปลรหัสเป็นเอนไซม์เคราตินเนสที่ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม translate tool ที่เว็บไซต์ <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปสร้างโมเดลโดยใช้โปรแกรม Swiss-model ที่เว็บไซต์ <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> โดยใช้ชุดคำสั่ง First Approach Mode และเลือกใช้เทมเพลตที่ดีที่สุด (best template) สำหรับอ้างอิงในการสร้างโมเดลของยีนเคราตินเนส

3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติเพื่อหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนส

3.2.1 การคัดเลือกเทมเพลต

ในการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสนั้น จำเป็นต้องใช้เทมเพลตจากฐานข้อมูลของโปรตีน (Protein Data Bank, PDB) ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสมาใช้ในการอ้างอิง โดยเทมเพลตที่เหมาะสมจะต้องมีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนสูง อีกทั้งค่า resolution ของโครงสร้างสามมิติต้องมีค่าต่ำ นอกจากนี้เทมเพลตที่สามารถนำมาอ้างอิงเพื่อหากรดอะมิโนที่บริเวณเร่งได้นั้น จะต้องเป็นโครงสร้างสามมิติที่แสดงข้อมูลของเรซิดิวที่เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทหรือสารยับยั้งด้วย

3.2.2 การหาบริเวณเร่ง

การหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนสนั้นจะใช้โปรแกรม DSViewerPro (Accelrys, USA) โดยอ้างอิงบริเวณเร่งจากเทมเพลตที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB)

3.3 การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติโดยการทำ model fit

การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ทำโดยใช้โปรแกรม SPDBV เวอร์ชัน 3.7 โดยโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) บริเวณที่เหมือนกันจะซ้อนทับกัน ส่วนบริเวณที่แตกต่างกันก็จะไม่เกิดการซ้อนทับกัน ทำให้สามารถเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสแต่ละชนิดได้ รวมทั้งสามารถบอกตำแหน่งของกรดอะมิโนแต่ละตัวที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนสจากแต่ละแหล่งว่าอยู่ตำแหน่งเดียวกันหรือไม่

4. การแสดงออกของยีนเคราตินเนสใน *B. subtilis* 1A751

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม

4.1.1 การเตรียมยีนเคราตินเนสที่ไม่มีส่วนของ signal peptide

เพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NFK และ ARK (ตารางที่ 6) และใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามวิธีการในข้อ 2.2.1 แต่ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 55 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยการทำ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II[®] แล้วเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสเข้ากับ pGEM-T easy vector จากนั้นโคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ตามขั้นตอนในข้อ 2.1.2.2 และคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK (ตารางที่ 6)

4.1.2 การตัดดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Aat*II

นำพลาสมิดที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 4.1 ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II พร้อมกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวมของการทำปฏิกิริยาเป็น 20 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ส่วนการตัดพลาสมิด pHT43 ทำโดยใช้พลาสมิดเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ *Aat*II ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยปริมาตรรวมของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 20 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ตรวจสอบขนาดของยีนและพลาสมิดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II[®]

4.1.3 การเชื่อมต่อยีนเคราตินเนสเข้ากับ pHT43

เชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสและพลาสมิด pHT43 ที่ผ่านการตัดด้วย เอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ T_4 DNA ligase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X T_4 ligase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อ เพื่อให้ปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วโคลนเข้าสู่ *E.coli* DH5 α โดยวิธี heat shock ตามขั้นตอนในข้อ 2.1.2.2

4.1.4 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

คัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเนสด้วยการนำพลาสมิดจากแต่ละโคลนมาทำพีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรมอร์ NFK กับ ARK และ FSq และ RSq (ตารางที่ 6) ตามวิธีการและสถานะในข้อ 4.1 และตรวจสอบขนาดของยีนโดยการตัดพลาสมิดจากแต่ละโคลนด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II ตามวิธีการในข้อ 4.2

4.1.5 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและเฟรม (frame)

นำพลาสมิดของโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.4 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเคราตินเนสและตรวจสอบความถูกต้องของเฟรมในการแปลรหัสเป็นโปรตีนโดยใช้ไพรมอร์ FSq และ RSq ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

4.2 การเตรียมคอมพิเทนดเซลล์

เตรียมคอมพิเทนดเซลล์ตามวิธีของ Spizizen *et al.* (1958) โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *B. subtilis* 1A751 มาเลี้ยงในอาหาร minimal growth medium 10 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน แล้วถ่ายเซลล์ 1.4 มิลลิลิตร ลงในอาหาร minimal growth medium 10 มิลลิลิตร บ่มที่สถานะเดิมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม starvation medium ปริมาตร 11 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แบ่งคอมพิเทนดเซลล์ใส่ใน

หลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร แล้วเติมกลีเซอรอลลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *B. subtilis* 1A751

เคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 ตามวิธีของ Spizizen *et al.* (1958) โดยใช้คอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร และพลาสติกความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 25 นาที จากนั้นเติม LB broth 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ถึง 1.5 ชั่วโมง แล้วเปิดสารละลายเชื้อไปเกลี่ยบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร จากนั้นคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่มีขึ้นเคราตินเอสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ NFK และ ARK และ FSq กับ RSq เช่นเดียวกับข้อ 4.4

4.4 การตรวจสอบความสามารถของเซลล์ลูกผสมในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอส

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเอสของเซลล์ลูกผสมตามวิธีการในข้อ 3.1.4

ผลและวิจารณ์

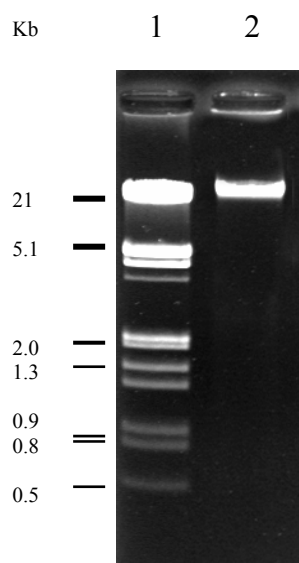
1. การสกัดโครโมโซมและพลาสมิด

1.1 การสกัดโครโมโซมจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

สกัดโครโมโซมของ *B. licheniformis* KUB-K0006 เพื่อใช้ในการสร้าง genomic library จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 2.22 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.827 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่มีโปรตีนเจือปน และเมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่เพียงแถบเดียว โดยไม่มีแถบอาร์เอ็นเอและโปรตีนปนเปื้อน แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ไม่ถูกทำลายและฉีกขาดในระหว่างการสกัด ดังแสดงในภาพที่ 4

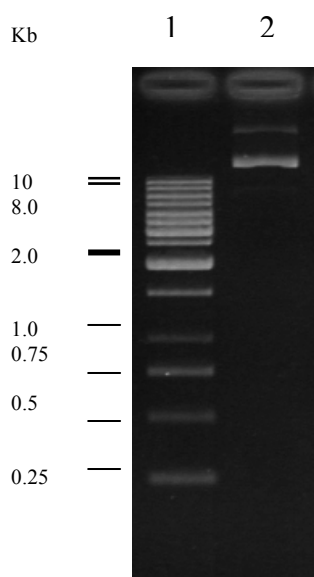
1.2 การสกัดพลาสมิด pHT43 จาก *E. coli* DH5 α

สกัดพลาสมิด pHT43 โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep[®] Spin miniprep kit (Qiagen, USA) โดยความเข้มข้นของพลาสมิดที่คำนวณได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีค่าเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.91 แสดงว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีโปรตีนปนอยู่เล็กน้อย และเมื่อตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 10 กิโลเบส ของดีเอ็นเอมาตรฐาน เนื่องจากพลาสมิดที่ได้อยู่ในรูปของ circular form แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ไม่ได้ฉีกขาดไปในระหว่างกระบวนการสกัดพลาสมิด อีกทั้งพลาสมิดที่สกัดได้มีความสุทธินี้เนื่องจากไม่มีแถบของอาร์เอ็นเอและโปรตีนปนเปื้อนอยู่ด้วยดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 4 โครโมโซมจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

ช่องที่ 1 Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI
 ช่องที่ 2 โครโมโซมของเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006



ภาพที่ 5 พลาสมิด pHT43

ช่องที่ 1 1 Kb DNA marker
 ช่องที่ 2 พลาสมิด pHT43

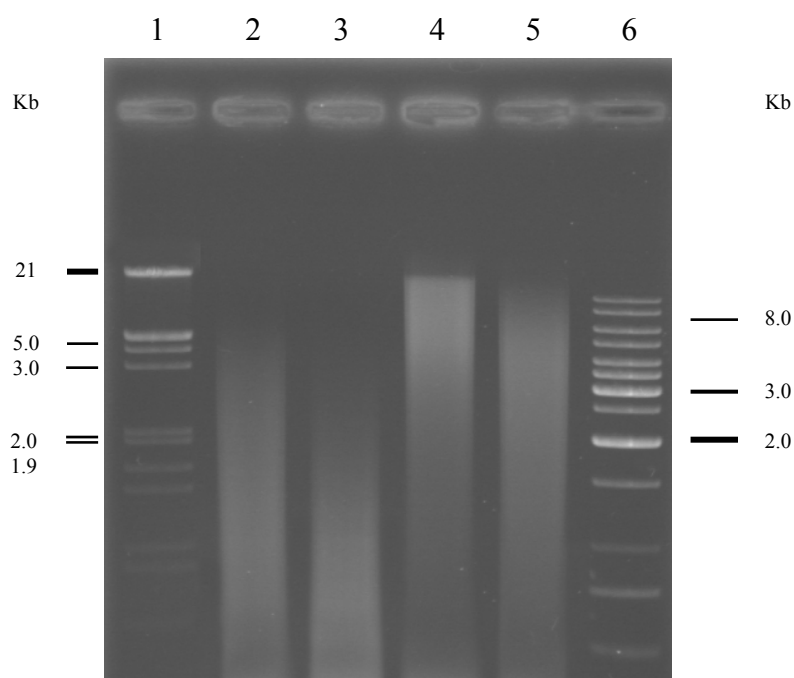
2. การโคลนยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

2.1 การโคลนยีนเคราตินเนสจาก genomic library

2.1.1 การเตรียมธนาคารยีน

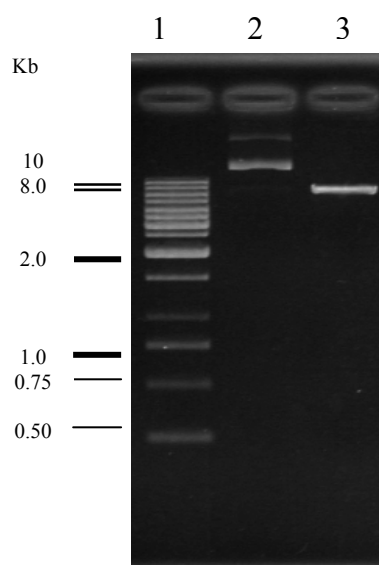
เนื่องจากเอนไซม์เคราตินเนส SUK A และ SUK B ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 มีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน (สุทธิพันธุ์, 2540) ซึ่งเมื่อคำนวณกลับเป็นจำนวนเบสพบว่าจะมีขนาดประมาณ 1,909 คู่เบส ดังนั้นเพื่อทำการเตรียมโครโมโซมในการโคลนยีนเคราตินเนส จึงได้ตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ให้ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 2 ถึง 6 กิโลเบส เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ครอบคลุมขนาดของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสทั้งสองชนิด จากการการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม ด้วยการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bsp*143I เป็น 0.1 และ 0.25 ยูนิตต่อไมโครลิตร และแปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มเป็น 15 และ 30 นาที พบว่าเมื่อทำการตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้เวลาในการบ่ม 30 นาที จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 ถึง 6 กิโลเบสมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 6 จึงเลือกสภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมสำหรับการทำ genomic library ต่อไป จากนั้นเมื่อทำการตัดโครโมโซมด้วยสภาวะที่เหมาะสมแล้วเลือกตัดเฉพาะส่วนของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 ถึง 6 กิโลเบส แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin extract II[®] (Macherey-Nagel, USA)

พลาสมิด pHT43 มีขนาด 8,057 คู่เบส ประกอบด้วย multiple cloning site 4 ตำแหน่ง คือ *Bam*HI, *Xba*I, *Aat*II และ *Sma*I สำหรับในการทดลองนี้ได้ตัดพลาสมิดแบบสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อให้เกิดให้ปลายคู่สมที่สามารถจับกับปลายของโครโมโซมที่เตรียมไว้ เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ *Bam*HI สามารถตัดพลาสมิด pHT43 ได้อย่างสมบูรณ์ ได้พลาสมิดในลักษณะเส้น (linear form) ขนาด 8,057 คู่เบส ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 6 โครโมโซมจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* แบบไม่สมบูรณ์

- | | |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> และ <i>EcoRI</i> |
| ช่องที่ 2 | โครโมโซมของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> ความเข้มข้น 0.25 U/ μ l เป็นเวลา 15 นาที |
| ช่องที่ 3 | โครโมโซมของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> ความเข้มข้น 0.25 U/ μ l เป็นเวลา 30 นาที |
| ช่องที่ 4 | โครโมโซมของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> ความเข้มข้น 0.1 U/ μ l เป็นเวลา 15 นาที |
| ช่องที่ 5 | โครโมโซมของ <i>B. licheniformis</i> KUB-K0006 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> ความเข้มข้น 0.1 U/ μ l เป็นเวลา 30 นาที |
| ช่องที่ 6 | 1 Kb DNA marker |



ภาพที่ 7 พลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 1	1 Kb DNA marker
ช่องที่ 2	พลาสมิด pHT43 ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI
ช่องที่ 3	พลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI

เมื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับพลาสมิด pHT43 แล้วเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock พบว่ามีเซลล์ลูกผสมเกิดขึ้นทั้งหมด 1,020 โคโลนี โดยมีค่า Transformation frequency เท่ากับ 4.08×10^4 cfu ต่อไมโครกรัม ดีเอ็นเอและเมื่อนำเซลล์ลูกผสมทั้งหมดมาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยพิจารณาจากการสร้างวงใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร skim milk พบว่ามีโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ทั้งหมด 4 โคโลนี คือ โคโลนี e97, e101, e419 และ e428

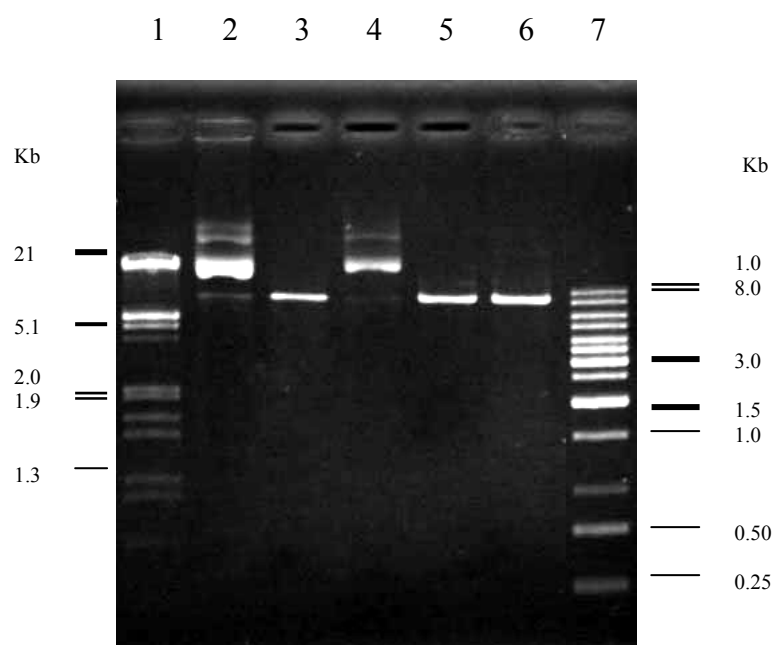
นำโคโลนี e97, e101, e419 และ e428 ไปเลี้ยงในอาหาร mineral salt ที่มีขุ่นไก้เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสพบว่าโคโลนี e97, e419 และ e428 ไม่สามารถย่อยขุ่นไก้ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโคโลนีเหล่านี้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์เคราตินเนส ส่วนโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสเพื่อย่อยขุ่นไก้ได้มีเพียงโคโลนีเดียวคือ e101 เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสพบว่าโคโลนี e101 มีกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส เท่ากับ 5.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์

B. licheniformis KUB-K0006 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสเท่ากับ 6.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อของ *E.coli* DH5 α , *E.coli* DH5 α ที่มี pHT43 และ อาหาร mineral salt ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส ดังแสดงในตารางที่ 7

นำโคลน e101 ไปเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลินเพื่อสกัดพลาสมิด แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xba*I เพื่อตรวจสอบขนาดของยีนเคราตินเนสภายในพลาสมิดลูกผสม โดยเมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบเพียงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 8,057 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pHT43 ที่อยู่ในลักษณะเส้น (linear) ดังแสดงในภาพที่ 8 และเมื่อทำการเลี้ยงโคลน e101 เพื่อนำสารละลายเอนไซม์ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสอีกครั้ง แต่พบว่าโคลนไม่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส นอกจากนี้ได้ถ่ายโอนพลาสมิดจากโคลน e101 เข้าสู่ *E. coli* DH5 α แล้วตรวจสอบความสามารถของโคลนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส พบว่าโคลนที่ได้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสเช่นกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากความไม่เสถียรของพลาสมิดที่เมื่อมีการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องหลายๆ รุ่น ซึ่งพบได้ในลักษณะ segregation instability คือพลาสมิดหายไปทั้งหมดหรือ structural instability ซึ่งอาจเกิดได้ทั้ง DNA rearrangement, insertion และ deletion (Cordes *et al.*, 1996; Bi and Liu, 1996) ซึ่งความความไม่เสถียรของพลาสมิดจะสูงขึ้นเมื่อพลาสมิดมีขนาดใหญ่ (Smith and Bidochka, 1998) ดังนั้นเมื่อเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ 2 ถึง 6 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิด pHT43 ซึ่งมีขนาด 8,057 คู่เบส แล้วจะทำให้พลาสมิดมีขนาดใหญ่ประมาณ 10 ถึง 14 กิโลเบส ซึ่งทำให้พลาสมิดในโคลน e101 มีโอกาสที่จะเกิดความไม่เสถียรสูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสจากโคลน e101

เชื้อจุลินทรีย์	กิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
<i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	6.67
Clone e101	5.73
<i>E.coli</i> DH5 α	-
<i>E.coli</i> DH5 α + pHT43	-
Mineral salt	-



ภาพที่ 8 การตรวจสอบขนาดของยีนเคราตินเนสจากโคลน e101 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- | | |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Eco</i> RI |
| ช่องที่ 2 | พลาสมิด pHT43 |
| ช่องที่ 3 | พลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 4 | พลาสมิดจากโคลน e101 |
| ช่องที่ 5 | พลาสมิดจากโคลน e101 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 6 | พลาสมิดจากโคลน e101 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Xba</i> I |

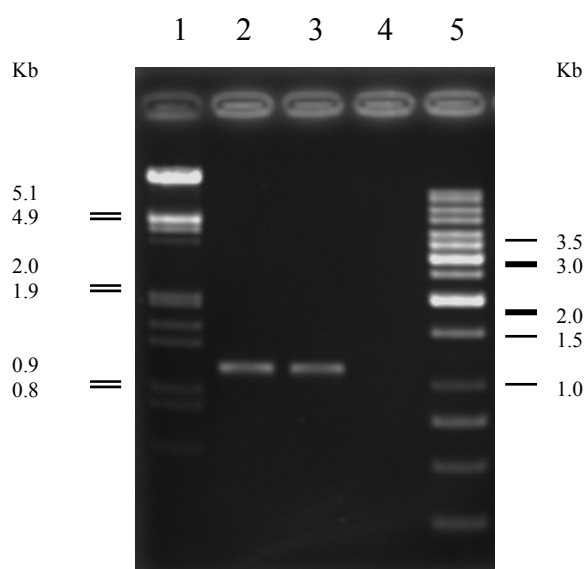
2.2 การโคลนยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ด้วยการทำพีซีอาร์

(Polymerase chain reaction : PCR)

สุดาทิพย์ (2546) รายงานว่าเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 จัดอยู่ในกลุ่ม alkaline serine protease เช่นเดียวกับสายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานไว้ และจากข้อมูลลำดับเบสของยีนเคราตินเนสในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ายีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* แต่ละสายพันธุ์จะมีความคล้ายคลึงของลำดับเบสค่อนข้างสูง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ FK และ RK จากบริเวณ consensus sequence ของยีนเคราตินเนสในส่วนของ start และ stop codon ตามลำดับเพื่อโคลนยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FK และ RK พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,140 คู่เบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดไว้ ดังภาพที่ 9 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของการทำพีซีอาร์ไปโคลนใน pGEM-T easy vector แล้วนำโคลนที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี จากผลการหาลำดับเบสพบว่าผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ FK และ RK มีขนาด 1,140 คู่เบส และนำลำดับเบสที่ได้ไปทำการแปลรหัสเป็นโปรตีนด้วยโปรแกรม translate tool ที่เว็บไซต์ <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> พบว่ายีนนี้จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนในเฟรม +1 โดยประกอบไปด้วย 379 กรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 10 เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้โปรแกรม blastx และ blastn พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastx ลำดับเบสที่ได้จาก *B. licheniformis* KUB-K0006 มีความเหมือนกับ subtilisin-like serine protease precursor จากเชื้อ *B. licheniformis* F11 มากที่สุด โดยมีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ในเฟรม +1 ซึ่งมีค่า e-value เท่ากับ $4e^{-180}$ และมีค่า Bit score เท่ากับ 634 ดังแสดงในตารางที่ 8 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn พบว่าลำดับเบสที่ได้จาก *B. licheniformis* KUB-K0006 มีความเหมือนกันลำดับเบสของยีนเคราตินเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* RG1 มากที่สุด โดยมีความเหมือน (identity) 99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า e-value เท่ากับ 0 และ bit score เท่ากับ 2,095 ดังแสดงในตารางที่ 9

การทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 และเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นๆที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนเพียง 4 ตำแหน่ง คือ 1) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 15 โดยเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 จะมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้เป็นลิวซีน (Leucine) ส่วนเคราตินเนสจากแหล่งอื่นจะมีกรดอะมิโนเป็นฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) 2) กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 249 เอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* RPK จะมีเป็นกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ส่วนเอนไซม์เคราตินเนสจากแหล่งอื่นจะเป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine)

3) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 327 เอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 จะมีกรดอะมิโนเป็นวาลีน (Valine) ในขณะที่เอนไซม์เคราตินเนสจากแหล่งอื่นจะใช้มีกรดอะมิโนเป็นอะลานีน (Alanine) และ 4) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 376 *B. licheniformis* MKU3 มีกรดอะมิโนเป็นไกลซีน (Glycine) แต่เอนไซม์เคราตินเนสจากแหล่งอื่นจะเป็นกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine) ดังแสดงในภาพที่ 11 ดังนั้นจึงได้นำลำดับกรดอะมิโนของเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* แต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งลำดับกรดอะมิโนของเคราตินเนสจาก *Bacillus* สปีชีส์อื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลไปทำ Homology modeling เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจากแต่ละแหล่งต่อไป



ภาพที่ 9 ผลิตรัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FK และ RK จาก *B. licheniformis*

KUB-K0006

ช่องที่ 1 Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI*

ช่องที่ 2 และ 3 ผลิตรัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้โครโมโซมจาก *B. licheniformis*

KUB-K0006 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 4 negative control

ช่องที่ 5 1 Kb DNA marker

```

atgatgaggaaaaagagtttttggccttgggatgctgacggccttaatgctcgtgttcacg
M M R K K S F W L G M L T A L M L V F T
atggccttcagcgattccgcgtctgctgctcagccggcgaaaaatgttgaaaaggattat
M A F S D S A S A A Q P A K N V E K D Y
attgtcggatttaagtcaggagtgaaaaccgcctcgtcaaaaaggacatcatcaaaagag
I V G F K S G V K T A S V K K D I I K E
agcggcggaagtgacaaagcagtttagaatcatcaacgcggcaaaagcgaagctagac
S G G K V D K Q F R I I N A A K A K L D
aaagaagcgcttaaggaagtcaaaaatgatccggatgtcgcttatgtggaagaggatcat
K E A L K E V K N D P D V A Y V E E D H
gtggcccatgccttggcgcaaacggttccttacggcattcctctcattaaagcggacaaa
V A H A L A Q T V P Y G I P L I K A D K
gtgcagggctcaaggctttaaggagcgaatgtaaaagtagccgtcctggatacaggaatc
V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I
caagcttctcatccggacttgaacgtagtcggcgagcaagctttgtggctggcgaaagct
Q A S H P D L N V V G G A S F V A G E A
tataacaccgacggcaacggacacggcacacatgttgccgggtacagtagctgcgcttgac
Y N T D G N G H G T H V A G T V A A L D
aatacaacgggtgtattagcggttgccgaagcgtatccttgtagcggttaaagtagctg
N T T G V L G V A P S V S L Y A V K V L
aattcaagcgggaagcggatcatcacagcggcattgtaagcgggaatcgagtgggcgacaca
N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T
aacggcatggatgttatcaatatgagccttgggggagcatcaggctcgcacagcagatgaaa
N G M D V I N M S L G G A S G S T A M K
caggcagtcgacaatgcatatgcaagaggggttgctggttagctgcagcaggggaacagc
Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S
ggatcttcaggaacacgaatacaattggctatcctgcgaaatacgattctgtcatcgct
G S S G N T N T I G Y P A K Y D S V I A
gttggtgcggttagactctaacagcaacagagcttcattttccagtggtgggagcagagctt
V G A V D S N S N R A S F S S V G A E L
gaagtcatggctcctggcgagggcgtatacagcacttacccaaacgaacacttatgcaaca
E V M A P G A G V Y S T Y P T N T Y A T
ttgaacggaacgtcaatggcttctcctcatgtagcgggagcagcagctttgatcctgtca
L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S
aaacatccgaacctttcagcttcacaagtcggcaaccgtctctccagcagcggcgacttat
K H P N L S A S Q V R N R L S S T A T Y
ttgggaagctccttctactatgggaaaggtctgatcaatgtcgaagctgccgctcaataa
L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q -

```

ภาพที่ 10 ลำดับเบสอินและลำดับกรดอะมิโนของเกราดิเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006

โดยแถบสีแดง คือ start codon และ แถบสีเหลือง คือ stop codon

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastx

Accession no.	เชื้อจุลินทรีย์	ยีน	frame	Bit score	e-value	Identity (%)
CAJ70734	<i>B. licheniformis</i> strainF11	subtilisin-like serin protease precursor	+1	634	4e ⁻¹⁸⁰	100
ABU68339	<i>B. licheniformis</i> YP1A	protease	+1	634	5e ⁻¹⁸⁰	100
AAS86761	<i>B. licheniformis</i> RG1	keratinase	+1	632	1e ⁻¹⁷⁹	99
AAV85775	<i>B. licheniformis</i> RG2	keratinase	+1	632	1e ⁻¹⁷⁹	99
AAY82466	<i>B. licheniformis</i> MKU2	keratinase	+1	632	1e ⁻¹⁷⁹	99
ACA97991	<i>B. licheniformis</i> RPK	keratinase	+1	631	2e ⁻¹⁷⁹	99
AAY82467	<i>B. licheniformis</i> MKU3	keratinase	+1	631	3e ⁻¹⁷⁹	99
AAT75301	<i>B. mojavensis</i>	keratinase	+1	631	3e ⁻¹⁷⁹	99
AAB34259	<i>B. licheniformis</i> PWD-1	keratinase	+1	631	3e ⁻¹⁷⁹	99
CAB56500	<i>B. licheniformis</i> NCIMB 6816	SubC (subtilisin Carlsberg precursor)	+1	629	2e ⁻¹⁷⁸	98

หมายเหตุ สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 15 มกราคม 2551

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม blastn

Accession no.	เชื้อจุลินทรีย์	ยีน	Bit score	e-value	Identity (%)
AY817143	<i>B. licheniformis</i> RG2	keratinolytic protease gene	2,095	0	99
EU090908	<i>B. licheniformis</i> YP1A	protease gene	2,078	0	99
AM183796	<i>B. licheniformis</i> F11	aprE gene	2,078	0	99
AY590140	<i>B. licheniformis</i> n RG1	keratinase gene	2,073	0	99
S78160	<i>B. licheniformis</i> PWD-1	keratinase gene	2,073	0	99
DQ071569	<i>B. licheniformis</i> MKU2	keratinolytic gene	2,073	0	99
AY665611	<i>B. mojavensis</i>	keratinase gene	2,067	0	99
DQ149211	<i>B. licheniformis</i> NH1	alkaline serine protease	2,067	0	99
DQ071570	<i>B. licheniformis</i> MKU3	keratinase gene	2,061	0	99
AF205190	<i>B. licheniformis</i> NCIMB 10689	subtilisin precursor (SubC) gene	2,049	0	99

หมายเหตุ สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 15 มกราคม 2551

```

RPk      MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
PWD - 1  MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
MKU3     MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
MKU2     MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
RG1      MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
RG2      MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
K6       MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
*****

RPk      SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
PWD - 1  SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
MKU3     SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
MKU2     SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
RG1      SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
RG2      SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
K6       SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPVYGIPLIKADK 120
*****

RPk      VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
PWD - 1  VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
MKU3     VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
MKU2     VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
RG1      VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
RG2      VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
K6       VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDNLNVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALD 180
*****

RPk      NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
PWD - 1  NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
MKU3     NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
MKU2     NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
RG1      NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
RG2      NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
K6       NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLG6ASGSTAMK 240
*****

RPk      QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
PWD - 1  QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
MKU3     QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
MKU2     QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
RG1      QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
RG2      QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
K6       QAVDNAYAGV VVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAE 300
*****

RPk      EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
PWD - 1  EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
MKU3     EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
MKU2     EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
RG1      EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
RG2      EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
K6       EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
*****

RPk      LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
PWD - 1  LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
MKU3     LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
MKU2     LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
RG1      LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
RG2      LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
K6       LGSSFYYGKGLINVEAAQ 379
*****

```

ภาพที่ 11 Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูลโดย K6, RG1, RG2, MKU2, MKU3, RPK และ PWD-1 คือ ลำดับกรดอะมิโนของเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006, *B. licheniformis* RG1, *B. licheniformis* RG2, *B. licheniformis* MKU2, *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK และ *B. licheniformis* PWD-1 ตามลำดับ โดยแถบสีเขียว คือ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกัน

3. การทำ Homology modeling เพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนส

Homology modeling เป็นการสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่สนใจจากลำดับกรดอะมิโน โดยอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทราบโครงสร้างสามมิติแล้วในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ต่างๆ *B. subtilis* BF20, *B. mojavensis* และ *B. pumilus* ซึ่งมีรายงานไว้ในฐานข้อมูล ทั้งนี้เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างสามมิติและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเอนไซม์เคราตินเนสจากแหล่งต่างๆกัน

3.1 การสร้างโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสด้วยโปรแกรม Swiss-Model

นำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006, *B. licheniformis* RG1, *B. licheniformis* RG2, *B. licheniformis* MKU2, *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK, *B. licheniformis* PWD-1, *B. subtilis* BF20, *B. mojavensis* และ *B. pumilus* มาทำนายโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม Swiss-Model ที่เว็บไซต์ <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> โดยโปรแกรมจะนำลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน(PDB) โดยโปรแกรมจะเลือกโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอย่างมากที่สุดมาเป็นเทมเพลตในการสร้างโมเดล ซึ่งพบว่าเทมเพลตที่ใช้ในการสร้างโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* แต่ละสายพันธุ์รวมทั้ง *B. subtilis* BF20 และ *B. mojavensis* คือ 1cseE ซึ่งเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ subtilisin Carlsberg จาก *B. licheniformis* โดยจัดอยู่ในแฟมิลี subtilase เช่นเดียวกับเอนไซม์เคราตินเนส โดยมีค่าร้อยละความเหมือนคิดเป็น 99 เปอร์เซนต์ ส่วนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. pumilus* ถูกสร้างขึ้นโดยมี 1scjA เป็นเทมเพลต ซึ่งเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ subtilisin E จาก *B. subtilis* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนคิดเป็น 76 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในตารางที่ 10

โมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* ทุกสายพันธุ์ ถูกสร้างขึ้นตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 106 ถึงตำแหน่งที่ 379 นั่นคือตำแหน่งที่ 1 ถึง 105 ไม่ได้ถูกนำไปสร้างโมเดลของเอนไซม์ เนื่องจากเป็นตำแหน่งของ pre sequence และ pro sequence ที่จะแปลรหัสไปเป็น

signal peptide และ pro-peptide ตามลำดับ โดย signal peptide มีความสำคัญในการขนส่งโปรตีนไปที่ตำแหน่งต่างๆ โดยจะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ signal peptidase ระหว่างขนส่งโปรตีนไปยังตำแหน่งที่ต้องการ ส่วน pro-peptide เป็นส่วนที่ช่วยให้โปรตีนมีการม้วนพับได้อย่างถูกต้องเพื่อให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ทำงานได้ จากนั้นจะเกิด self-cleavage เพื่อตัด pro-peptide ออก เหลือเพียง mature peptide (Harwood and Cranenburgh, 2008) และจากการทำ multiple alignment ดังภาพที่ 11 พบว่าเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 มีลำดับกรดอะมิโนต่างจาก *B. licheniformis* RG1, *B. licheniformis* RG2 และ *B. licheniformis* MKU2 เพียงตำแหน่งเดียวคือ Leu15 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการสร้างเป็นโมเดลเอนไซม์เคราตินเนส ทำให้โมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* ทั้งสี่สายพันธุ์มีโครงสร้างสามมิติไม่แตกต่างกัน ส่วนกรดอะมิโนที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. subtilis* BF20 และ *B. mojavensis* นั้น ไม่มีความแตกต่างกับลำดับกรดอะมิโนที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ทำให้โมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. subtilis* BF20, *B. mojavensis* ไม่แตกต่างไปจากโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสของ *B. licheniformis* KUB-K0006 เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือกเพียงโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006, *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK, *B. licheniformis* PWD-1 และ *B. pumilus* ไปใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งและเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของโครงสร้างสามมิติต่อไป โดยโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสที่ได้ประกอบด้วยโครงสร้างทุติยภูมิแบบ α -helix และ β -sheet ที่เชื่อมต่อกันด้วยบริเวณที่เป็น loop ดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งการม้วนพับของโปรตีนมีลักษณะการเรียงตัวของ β -sheet ขนานกัน ทำให้จัดอยู่ในคลาส α and β protein (α/β) และอยู่ในโฟลด์ subtilisin-like ซึ่งมีลักษณะการเรียงตัวเป็นแบบ 3 layers คือ มีการเรียงตัวสลับกันแบบ $\alpha / \beta/\alpha$

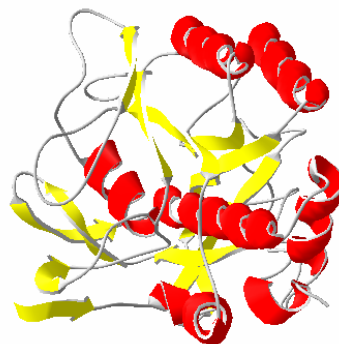
ตารางที่ 10 เทมเพลตในการสร้างโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนส

model	Template	Modelled residue range	E-value	% identity
<i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	1cseE	106-379	1.23144e ⁻¹⁰⁹	99
<i>B. licheniformis</i> RG1	1cseE	106-379	7.27984e ⁻¹¹⁰	99
<i>B. licheniformis</i> RG2	1cseE	106-379	7.27984e ⁻¹¹⁰	99
<i>B. licheniformis</i> MKU2	1cseE	106-379	7.27984e ⁻¹¹⁰	99
<i>B. licheniformis</i> MKU3	1cseE	106-379	1.50445e ⁻¹⁰⁹	99
<i>B. licheniformis</i> RPk	1cseE	106-379	1.43099e ⁻¹⁰⁹	99
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	1cseE	106-379	6.53153e ⁻¹¹⁰	99
<i>B. subtilis</i> BF20	1cseE	81-354	4.37784e ⁻¹⁰⁷	99
<i>B. mojavensis</i>	1cseE	106-379	7.27984e ⁻¹¹⁰	99
<i>B. pumilus</i>	1scjA	109-382	2.55098e ⁻⁹³	76

หมายเหตุ สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 1 มีนาคม 2551



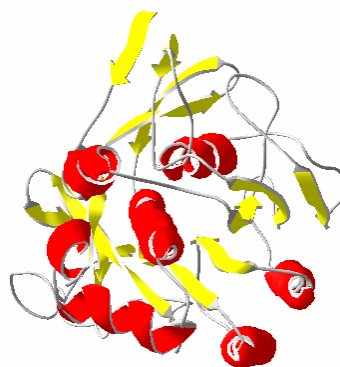
B. licheniformis KUB-K0006



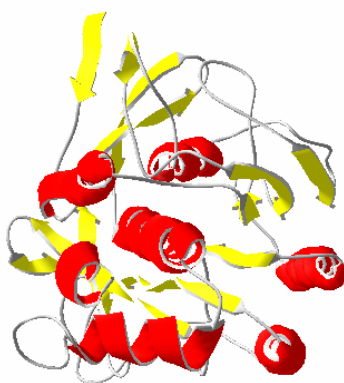
B. licheniformis MKU3



B. licheniformis RPK



B. licheniformis PWD-1



B. pumilus

ภาพที่ 12 โมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ต่างๆ และ *B. pumilus* ที่ได้จากการจำลองโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม Swiss-model

3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสเพื่อหาบริเวณเร่ง

การหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนสจะต้องอ้างอิงจากบริเวณเร่งของเทมเพลตที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) โดยใช้โปรแกรม blastp ในการเลือกเทมเพลตที่เหมาะสม ซึ่งการเลือกเทมเพลตนั้นจะต้องพิจารณาจากค่าร้อยละของความเหมือน (% identity) และค่า resolution ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความละเอียดของโครงสร้างเอนไซม์ โดยค่าร้อยละความเหมือนระหว่างเทมเพลตกับตัวอย่างจะต้องมีค่ามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จึงจะเป็นโมเดลที่มีความน่าเชื่อถือตามกฎของ Doolittle (Doolittle's rule of thumb) (Balaji *et al.*, 2006) และค่า resolution ของเทมเพลตที่มีค่าต่ำจะแสดงให้เห็นว่าเป็นโครงสร้างที่ดี เนื่องจากทำให้ทราบรายละเอียดภายในโครงสร้างได้อย่างถูกต้องมากกว่าเทมเพลตที่มีค่า resolution สูง ซึ่งการหาบริเวณเร่งบนเทมเพลตสามารถทำได้โดยใช้โปรแกรม DSViewerPro (Accelrys, USA) โดยบริเวณเร่งที่หาได้บนเทมเพลตจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนตัวอย่างโดยการทำให้ multiple alignment ทำให้บอกได้ว่าตำแหน่งเดียวกันนั้นบนโปรตีนตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่เหมือนหรือแตกต่างไปจากเทมเพลต จากการคัดเลือกเทมเพลตในการหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนส พบว่า 1bh6A เป็นเทมเพลตที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงและมีค่า resolution ต่ำ รวมทั้งมีรายงานบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการจับสับสเตรทหรือสารยับยั้ง ดังนั้นจึงได้เลือก 1bh6A ซึ่งเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ subtilisin DY จาก *B. licheniformis* ที่จับอยู่กับ *N*-benzyloxycarbonyl-Ala-Pro-Phe-chloromethyl Ketone โดยมีค่า resolution เท่ากับ 1.55 และมีค่าร้อยละความเหมือนเมื่อเทียบกับเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* และ *B. pumilus* เป็น 87 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มาเป็นเทมเพลตในการหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเนสต่อไป

การใช้โปรแกรม DSViewerPro ในการตรวจสอบเรซิดิวที่เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างเอนไซม์ subtilisin DY กับ *N*-benzyloxycarbonyl-Ala-Pro-Phe-chloromethyl ketone คือเรซิดิว 1BH300 และเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ระยะ 5 อังสตรอม รอบเรซิดิวดังกล่าวพบกรดอะมิโน His64, Gly100, Ser101, Gly102, Tyr104, Ser125, Leu126, Gly127, Gly128, Ala152, Gly154, Asn155, Gly219, Thr220 และ Ser221 ซึ่งกรดอะมิโนที่คาดว่าเป็นบริเวณเร่งคือ His64 และ Ser221 แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Eschenburg *et al.* (1998) ได้รายงานว่า subtilisin DY มีกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งอีกหนึ่งแห่งคือ Asp32 ดังนั้นเทมเพลต 1bh6A จึงมีกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง ได้แก่ Asp32, His68 และ Ser221 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเป็น Asp-His-Ser นี้เป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease แคลน SB และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006, *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis*

RPk, *B. licheniformis* PWD-1 และ *B. pumilus* ไปทำ multiple alignment กับลำดับกรดอะมิโนของ subtilisin DY เพื่อเปรียบเทียบหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเอส พบว่าเคราตินเอสจาก *Bacillus* ทุกสปีชีส์มีกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเป็น Asp-His-Ser เช่นเดียวกับ subtilisin DY (ภาพที่ 13) โดยเคราตินเอสจาก *B. licheniformis* มีกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเป็น Asp137, His168 และ Ser325 ส่วนเคราตินเอสจาก *B. pumilus* มีกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งอยู่ที่ Asp140, His172 และ Ser329 ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เคราตินเอสจาก *B. licheniformis* แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ subtilisin DY จาก *B. licheniformis* (PDB code: 1bh6A)

model	กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งบนเทมเพลต 1bh6A		
	Asp32	His64	Ser221
<i>B. licheniformis</i> KUB-K0006	Asp137	His168	Ser325
<i>B. licheniformis</i> MKU3	Asp137	His168	Ser325
<i>B. licheniformis</i> RPk	Asp137	His168	Ser325
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Asp137	His168	Ser325
<i>B. pumilus</i>	Asp140	His172	Ser329

```

PWD-1      MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
MKU3       MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
RPk        MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
kerK6      MMRKKSFWLGMLTALMLVFTMAFSDSASAAQPAKNVEKDYIVGFKSGVKTSVKKDIIKE 60
1BH6      -----

PWD-1      SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPYGIPLIKADK 120
MKU3       SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPYGIPLIKADK 120
RPk        SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPYGIPLIKADK 120
kerK6      SGGKVDKQFRIINAAKAKLDKEALKEVKNDPDVAYVEEDHVAHALAQTPYGIPLIKADK 120
1BH6      -----AQTVPYGIPLIKADK 15
                *****

PWD-1      VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEAYNTDGNHGHTHVAGTVAALD 180
MKU3       VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEAYNTDGNHGHTHVAGTVAALD 180
RPk        VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEAYNTDGNHGHTHVAGTVAALD 180
kerK6      VQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEAYNTDGNHGHTHVAGTVAALD 180
1BH6      VQAQGYKGANVKVGII DTGIASSHTDLKVVGGSFVSGESYNTDGNHGHTHVAGTVAALD 75
                *****

PWD-1      NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMK 240
MKU3       NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMK 240
RPk        NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMK 240
kerK6      NTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMK 240
1BH6      NTTGVLGVAPNVSLYAIKVLNSSGSGSYSAIVSGIEWATQNGLDVINMSLGGPSGSTALK 135
                *****

PWD-1      QAVDNAYARGVVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAEL 300
MKU3       QAVDNAYARGVVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAEL 300
RPk        QAVDNAYAKGVVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAEL 300
kerK6      QAVDNAYARGVVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAEL 300
1BH6      QAVDKAYASGIVVVAAAGNSGNSGQNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNKNRASFSSVGSSEL 195
                *****

PWD-1      EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMVSPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
MKU3       EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
RPk        EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
kerK6      EVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATY 360
1BH6      EVMAPGVSVYSTYPSNTYTSLNGTSMASPHVAGAAALILSKYPTLSASQVRNRLSSTATN 255
                *****

PWD-1      LGSSFYYGKGLINVEAAAQ 379
MKU3       LGSSFYYGKGLINVEAAAQ 379
RPk        LGSSFYYGKGLINVEAAAQ 379
kerK6      LGSSFYYGKGLINVEAAAQ 379
1BH6      LGDSFYYGKGLINVEAAAQ 274
                **

```

ภาพที่ 13 Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006, *B. licheniformis* PWD-1, *B. licheniformis* MKU3 และ *B. licheniformis* RPK เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ subtilisin DY จาก *B. licheniformis* (PDB code: 1bh6A) โดยแถบสีเหลือง คือ กรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง

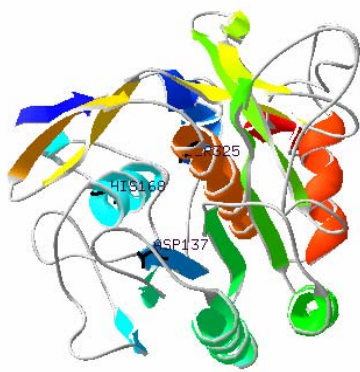
3.3 การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติโดยการทำ model fit

ถึงแม้ว่าบนโครงสร้างสามมิติของ *B. licheniformis* KUB-K0006 จะมีบริเวณเร่งเป็น Asp-His-Ser เช่นเดียวกับโครงสร้างสามมิติของเคราตินเอนจาก *B. pumilus* และ *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น แต่ยังคงมีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจส่งผลต่อการม้วนพับของโปรตีน ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK, *B. licheniformis* PWD-1 และ *B. pumilus* เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างระหว่างโครงสร้างสามมิติโดยการทำ model fit ด้วยโปรแกรม SPDBV จากการวิเคราะห์ตำแหน่งของบริเวณเร่งบนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอน จากทุกแหล่งพบว่ากรดอะมิโนแอสพาร์เตตอยู่ที่ปลาย β -sheet ที่ 2 ส่วนฮิสทีดินและซีรีนอยู่บน α -helix ที่ 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 14) และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น พบว่าโครงสร้างสามมิติและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งสามารถซ้อนทับกันได้พอดี ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างของกรดอะมิโนที่บางตำแหน่ง โดยเมื่อพิจารณาจากผลการทำ secondary structure alignment แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ต่างไปนั้นถูกสร้างเป็น secondary structure แบบเดียวกัน ดังนั้นความแตกต่างของกรดอะมิโนที่พบใน *B. licheniformis* KUB-K0006 ไม่ได้ส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นแต่อย่างใด และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. pumilus* พบว่าโครงสร้างสามมิติแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ความแตกต่างนี้ไม่ทำให้โครงสร้างสามมิติโดยรวมของเอนไซม์เคราตินเอนสลับเปลี่ยนไปเนื่องจากบริเวณที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในการทำ model fit คือ บริเวณที่เป็น loop ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่สามารถทำนายโครงสร้างทุติยภูมิได้ จึงทำให้บริเวณที่เป็น loop มีความผันแปรค่อนข้างมากและทำให้เกิดความยืดหยุ่นขึ้นในโมเลกุล ในขณะที่โครงสร้างทุติยภูมิ ได้แก่ α -helix และ β -sheet เป็นโครงสร้างที่มีความแน่นอนค่อนข้างสูง ดังนั้นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการซ้อนทับกันในบริเวณ loop จึงไม่ส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติโดยรวมของเอนไซม์และเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งพบว่ากรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเคราตินเอนจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 และ *B. pumilus* สามารถซ้อนทับกันได้พอดีเช่นเดียวกันกับเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเอนจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ต่างๆ โดยผลการทำ model fit แสดงในภาพที่ 15 -18

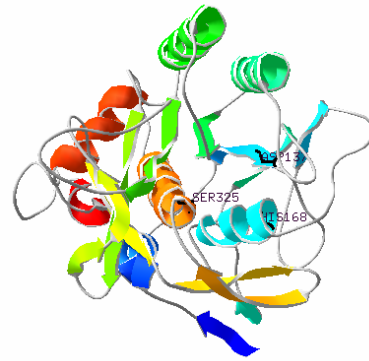
จากการทำ Homology modeling เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยการแปลรหัสจากลำดับเบสของยีนเคราตินเนสที่ได้จากการทำพีซีอาร์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนและสร้างโมเดลของเอนไซม์เคราตินเนสขึ้นมาแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 กับยีนเคราตินเนสที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล ได้แก่ ยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ต่างๆ รวมทั้ง *B. subtilis* BF20, *B. mojavensis* และ *B. pumilus* นั้นไม่ส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ดังนั้นยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ได้จากการทำพีซีอาร์นี้น่าจะสามารถแปลรหัสเพื่อสร้างเป็นเอนไซม์เคราตินเนสที่ทำงานได้เช่นเดียวกับยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นๆ

5. การแสดงออกของยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ใน *B. subtilis* 1A751

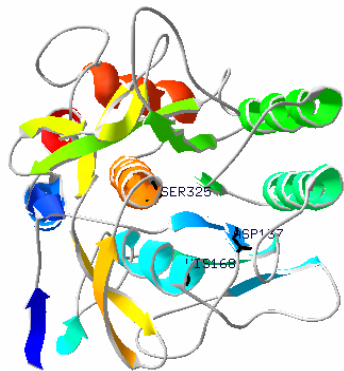
การเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NFK และ ARK เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสที่ไม่มีส่วนของ signal peptide ซึ่งไพรเมอร์ NFK จะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bam*HI และไพรเมอร์ ARK จะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Aat*II ซึ่งหลังจากการทำพีซีอาร์จะทำให้ได้ชิ้นยีนเคราตินเนสที่สามารถตัดปลาย 5' และ 3' ได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II ตามลำดับ เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II เช่นเดียวกัน ซึ่งการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดในตัดชิ้นดีเอ็นเอและดีเอ็นเอพาหะจะเป็นการช่วยควบคุมทิศทางของการเชื่อมต่อให้มีความถูกต้องด้วย ผลการทดลองพบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,071 คู่เบส ดังภาพที่ 19 จากนั้นทำการยีนโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega, USA) และถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5 α เพื่อให้สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้สะดวกขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำงานได้ไม่ดีหากตำแหน่งตัดอยู่ใกล้กับปลายของชิ้นดีเอ็นเอมากเกินไป ดังนั้นการโคลนยีนเข้ากับ pGEM-T easy vector จึงเป็นการเพิ่มพื้นที่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจับกับตำแหน่งจดจำในการตัดได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสและพลาสมิด pHT 43 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II แสดงในภาพที่ 20



B. licheniformis KUB-K0006



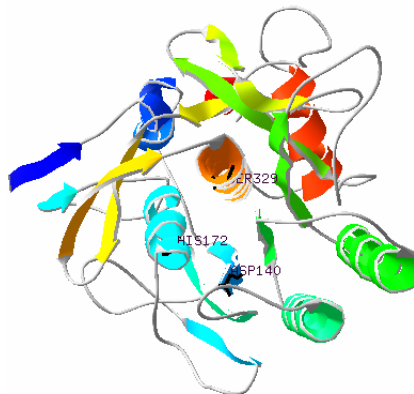
B. licheniformis MKU3



B. licheniformis RPK



B. licheniformis PWD-1



B. pumilus

ภาพที่ 14 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งบนโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เคราตินเนสจาก

B. licheniformis KUB-K0006, *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPK,

B. licheniformis PWD-1 และ *B. pumilus* โดยบริเวณสีม่วง คือ ปลาย N-terminal และ

สีแดง คือ ปลาย C-terminal

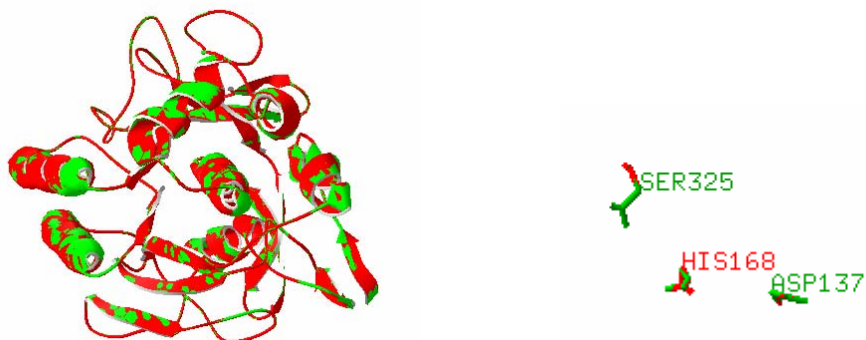


ภาพที่ 15 ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ *B. licheniformis*

KUB-K0006 กับ *B. licheniformis* MKU3

โดย โมเดลสีเขียว คือ โมเดลของ *B. licheniformis* KUB-K0006

โมเดลสีแดง คือ โมเดลของ *B. licheniformis* MKU3

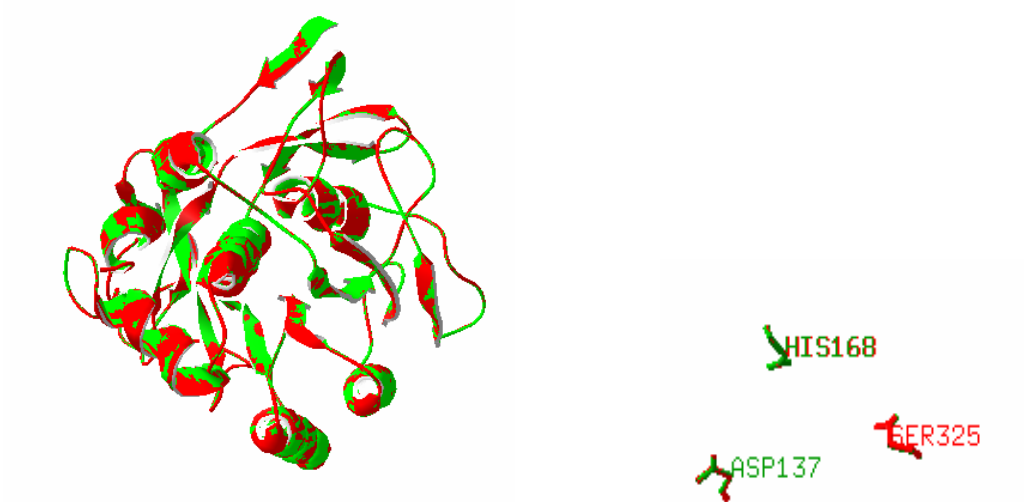


ภาพที่ 16 ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ *B. licheniformis*

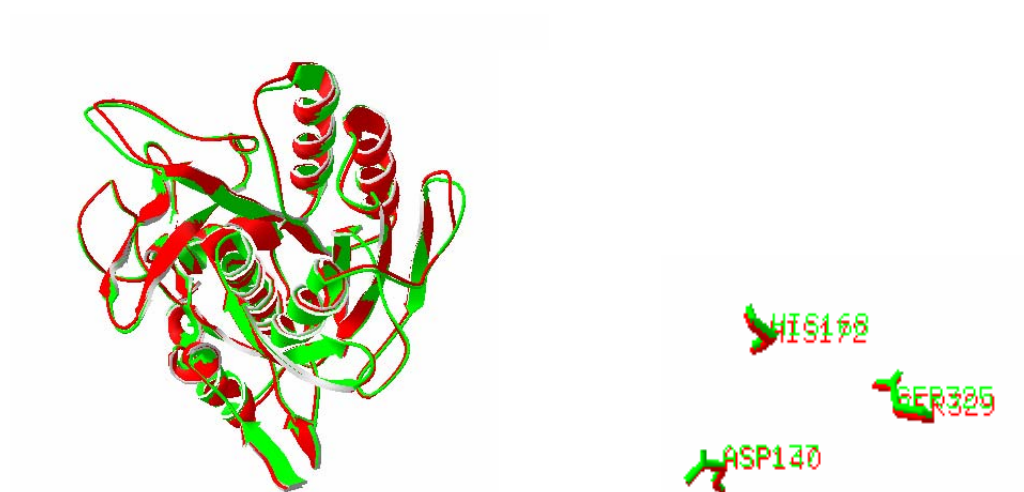
KUB-K0006 กับ *B. licheniformis* RPK1

โดย โมเดลสีเขียว คือ โมเดลของ *B. licheniformis* KUB-K0006

โมเดลสีแดง คือ โมเดลของ *B. licheniformis* RPK



ภาพที่ 17 ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ *B. licheniformis* KUB-K0006 กับ *B. licheniformis* PWD-1
 โดย โมเดลสีเขียว คือ โมเดลของ *B. licheniformis* KUB-K0006
 โมเดลสีแดง คือ โมเดลของ *B. licheniformis* PWD-1



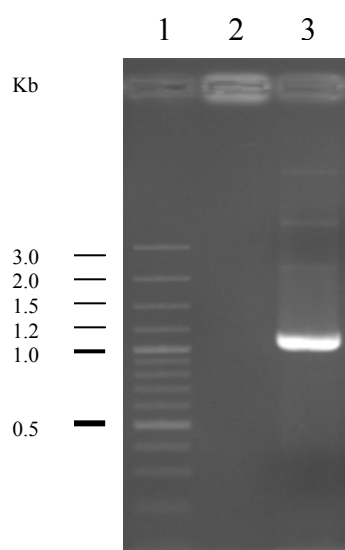
ภาพที่ 18 ผลการทำ model fit ระหว่างโมเดลและกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ *B. licheniformis* KUB-K0006 กับ *B. pumilus*
 โดย โมเดลสีเขียว คือ โมเดลของ *B. licheniformis* KUB-K0006
 โมเดลสีแดง คือ โมเดลของ *B. pumilus*

เมื่อเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสเข้ากับพลาสมิด pHT43 แล้วถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* DH5 α พบเพียง 11 โคลนที่สามารถเจริญบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน จากนั้นนำโคลนทั้งหมดมาสกัดพลาสมิดด้วย QIAprep[®] Spin Miniprep kit (Qiagen, USA) แล้วนำมาคัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเนสด้วยการทำพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NFK กับ ARK พบว่ามี 9 โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอของยีนเคราตินเนสซึ่งมีขนาด 1,071 คู่เบส ดังภาพที่ 21(ก) เมื่อนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK ไปตรวจสอบซ้ำด้วยการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FSq และ RSq ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสบนพลาสมิด pHT43 พบว่าทุกโคลนมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,343 คู่เบส ดังภาพที่ 21(ข) จากนั้นนำพลาสมิดจากโคลนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายในพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Aat*II พบว่าทุกโคลนที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีแถบดีเอ็นเอสองขนาดคือ 8,057 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pHT43 และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,071 คู่เบสของยีนเคราตินเนส ดังแสดงในภาพที่ 22 นำพลาสมิดจากทุกโคลนส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ซึ่งพบว่ายีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ถูกเชื่อมต่อกับตำแหน่งของ signal peptide ในพลาสมิด pHT43 ที่ตำแหน่ง *Bam*HI ได้ถูกต้องตามเฟรมการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ดังภาพที่ 23 และลำดับเบสของยีนเคราตินเนสภายในพลาสมิดไม่ได้มีความแตกต่างไปจากลำดับเบสของยีนเคราตินเนสที่เคยทำการวิเคราะห์มาก่อน จึงถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนเคราตินเนสเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHT43 เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 แล้ว สุ่มเลือกโคลนจำนวน 10 โคลนเพื่อนำมาคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส โดยนำโคลนที่เลือกมาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบว่าเป็นโคลนที่มียีนเคราตินเนสหรือไม่ด้วยการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ NFK กับ ARK และ FSq กับ RSq พบว่าโคลนมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,071 และ 1,343 คู่เบส ตามลำดับ ดังภาพที่ 24 และ 25 ตามลำดับ แต่เมื่อนำโคลนไปตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและความสามารถในการย่อยขนไก่พบว่าทุกโคลนไม่สร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร skim milk และไม่สามารถย่อยขนไก่ได้ ซึ่งการไม่แสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนเป็นปัญหาที่พบได้ในการทำ heterologous gene expression ทั้งนี้อาจเกิดจากการเกิด secondary structure ที่บริเวณเริ่มต้นในการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (de Smith and van Duin, 1994a) นั่นคือโปรโมเตอร์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสมกับยีนที่ต้องการแสดงออกทำให้เกิด secondary structure ระหว่าง 5' untranslated region กับตำแหน่งเริ่มต้นของ coding sequence ไรโบโซมจึงไม่สามารถแปลรหัสจาก mRNA ไปเป็นโปรตีนได้หรือเอนไซม์ที่ผลิตอาจไม่อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้เนื่องจากการม้วนพับของโปรตีน

ที่ไม่ถูกต้องเนื่องพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่มักจะเป็น inducible plasmid ซึ่งเมื่อมีการเติมสารเหนี่ยวนำแล้วจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ไม่สามารถจะควบคุมการม้วนพับของโปรตีนได้ โปรตีนที่ผลิตออกมาจึงอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำและไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Nick, 2007) นอกจากนี้อาจเกิดจาก signal peptide ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนออกนอกเซลล์ไม่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ที่เลือกใช้ เช่นเดียวกับในกรณีการแสดงออกของ Interleukin-3 (IL-3) ใน *B. subtilis* WB700/WB800 พบว่าเมื่อใช้ signal peptide เป็น Lat signal เซลล์ถูกผสมสามารถผลิตโปรตีนได้ แต่เมื่อใช้ SacB signal ไม่พบการผลิตโปรตีนออกนอกเซลล์ และเมื่อใช้ Pel signal โปรตีนที่ผลิตได้จะถูกย่อยสลายและพบปัญหาความไม่เสถียรของพลาสมิด (Fu *et. al*, 2007)

ดังนั้นในการโคลนและการแสดงออกของยีนจึงควรเลือกระบบในการแสดงออกให้เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นระหว่างยีนกับดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอพาหะกับเซลล์เจ้าบ้าน รวมทั้งควรเลือก signal peptide ที่เหมาะสมกับยีนที่ต้องการแสดงออกเพื่อให้การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนมีประสิทธิภาพสูงสุด

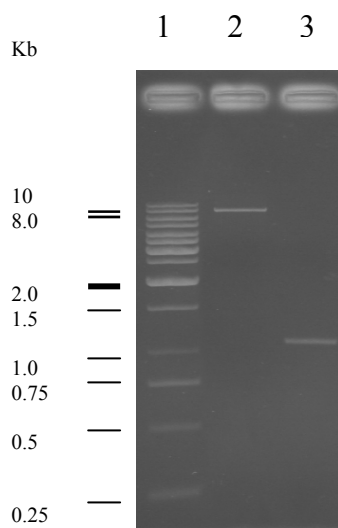


ภาพที่ 19 ผลการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder plus

ช่องที่ 2 negative control

ช่องที่ 3 ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ NFK และ ARK

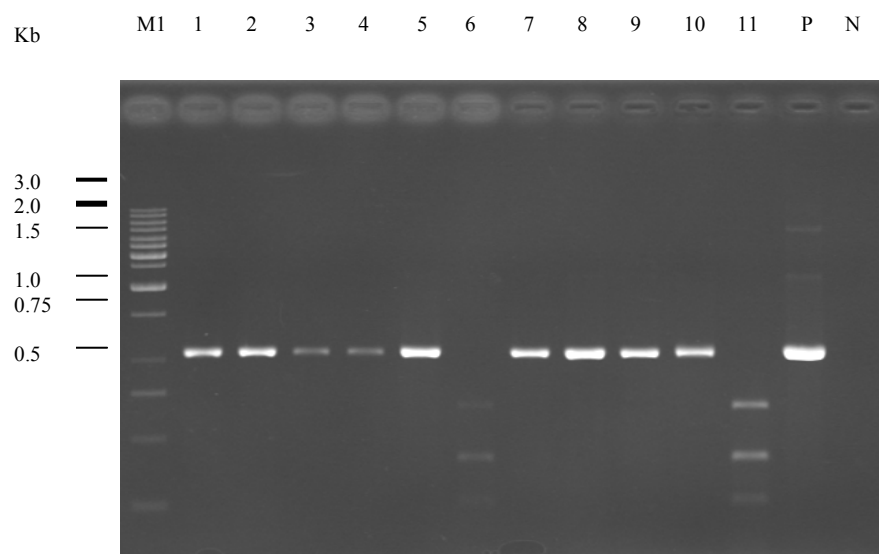


ภาพที่ 20 ยีนเคราตินเนสและพลาสมิด pHT43 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II

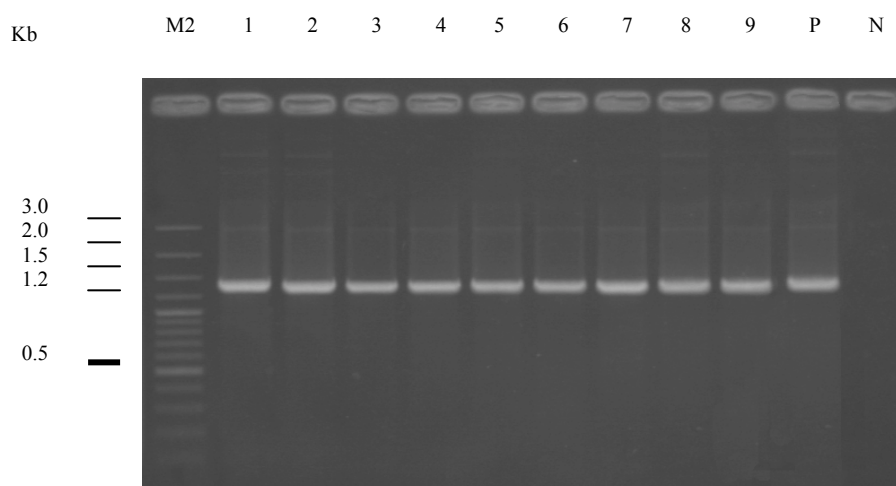
ช่องที่ 1 1 Kb DNA marker

ช่องที่ 2 พลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II

ช่องที่ 3 ยีนเคราตินเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II

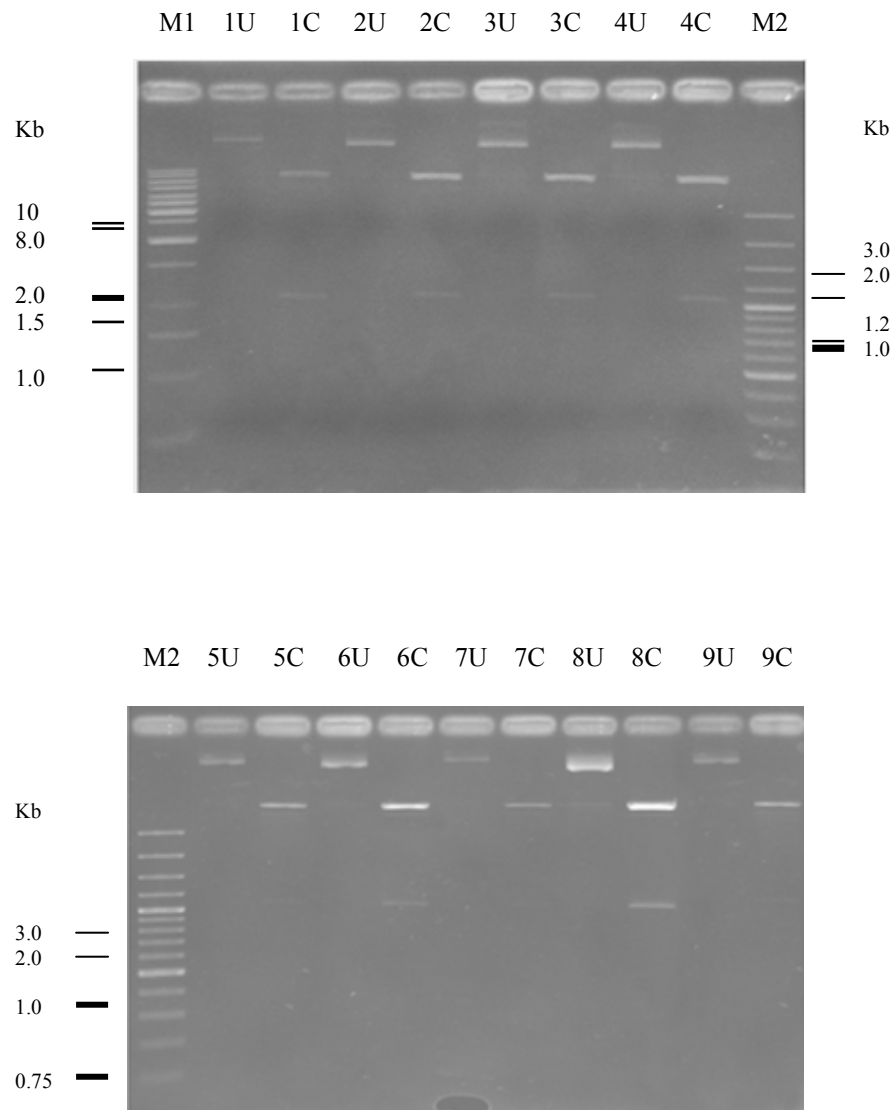


ก.



ข.

ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อยีนเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้ากับพลาสมิด pHT43 โดยการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ (ก) NFK และ ARK และ (ข) FSq และ RSq โดย M1 คือ 1 Kb DNA marker, M2 คือ 100 bp DNA ladder plus, หมายเลข 1-11 คือ หมายเลขโคลน, P คือ positive control และ N คือ negative control



ภาพที่ 22 ผลการตัดพลาสมิดของโคลนที่ผ่านการตรวจด้วยไพรเมอร์ NFK-ARK และ FSq-RSq ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Aat*II โดย M1 คือ 1 Kb DNA marker, M2 คือ 100 bp DNA ladder plus, 1-9 คือ หมายเลขโคลน, U คือ พลาสมิดที่ไม่ผ่านการตัดด้วย *Bam*HI และ *Aat*II และ C คือ พลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วย *Bam*HI และ *Aat*II

```

atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcggttcagacttgtgcttatgtgcacgctgtta
M I Q K R K R T V S F R L V L M C T L L
tttgtcagtttgccgattacaaaaacatcagccgtaggatcctctgctgctcagccggcg
F V S L P I T K T S A V G S S A A Q P A
aaaaatgttgaaaaggattatattgtcggatttaagt caggagtgaaaaccgcatccgtc
K N V E K D Y I V G F K S G V K T A S V
aaaaaggacatcatcaaagagagcggcggaagtggaacaagcagtttagaatcatcaac
K K D I I K E S G G K V D K Q F R I I N
gcggcaaaaagcgaagctagacaaagaagcgcttaagggaagtcaaaaatgatccggatgtc
A A K A K L D K E A L K E V K N D P D V
gcttatgtggaagaggatcatgtggcccatgccttggcgcaaacggttccttacggcatt
A Y V E E D H V A H A L A Q T V P Y G I
cctctcattaaagcggacaaaagtgcaggctcaaggccttaaggggagcgaatgtaaaagta
P I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V
gccgtcctggatcacaggaatccaagcttctcatccggacttgaacgtagtcggcgagca
A V L D T G I Q A S H P D L N V V G G A
agctttgtggctggcgaagcttataacaccgacggcaacggacacggcacacatgttgcc
S F V A G E A Y N T D G N G H G T H V A
ggtacagtagctgcgcttgacaatacaacgggtgtattaggcgcttgcgccaaagcgtatcc
G T V A A L D N T T G V L G V A P S V S
ttgtacgcgggttaaaagtactgaattcaagcgggaagcggatcatacagcggcattgtaaagc
L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S
ggaatcgagtgggcgacaacaacaggcatggatgttatcaatatgagccttggggggagca
G I E W A T T N G M D V I N M S L G G A
tcaggctcgacagcgtatgaaacagggcagtcgacaatgcatatgcaagaggggttgcgtt
S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V
gtagctgcagcagggaaacagcggatcttcaggaaacacgaatacaattggctatcctgcg
V A A A G N S G S S G N T N T I G Y P A
aaatacagattctgtcatcgctgttgggtgcggttagactctaacagcaacagagcttcattt
K Y D S V I A V G A V D S N S N R A S F
tccagtggtgggagcagagcttgaagtcatggctcctggcgagggcgtatcacgcacttac
S S V G A E L E V M A P G A G V Y S T Y
ccaacgaacacttatgcaacattgaacggaacgccaatggcttctcctcatgtagcggga
P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G
gcagcagctttgatcttgcataaacatccgaacctttcagcttcacaaagtcggcaaccgt
A A A L I L S K H P N L S A S Q V R N R
ctctccagcacggcgacttatttgggaagctccttctactatgggaaagggtctgatcaat
L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N
gtcgaagctgccgctcaatcaa
V E A A A Q -

```

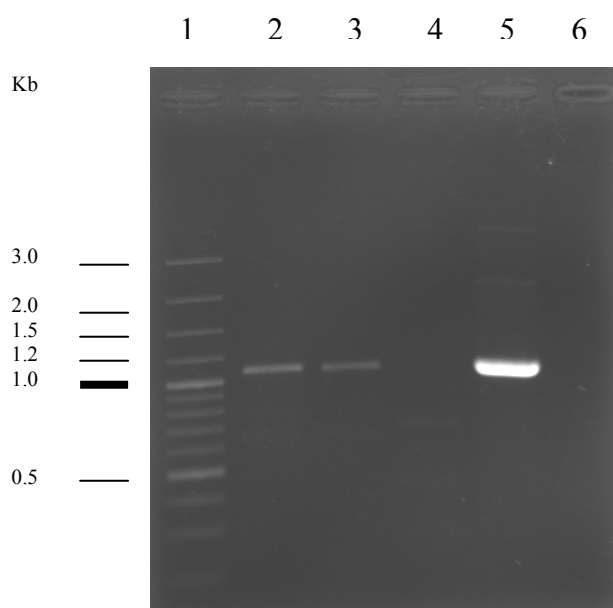
ภาพที่ 23 ลำดับเบสของยีนเคราตินเมื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHT43

โดย แถบสีเหลือง คือ signal peptide บนพลาสมิด pHT43

แถบสีเขียว คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bam*HI

แถบสีแดง คือ stop codon

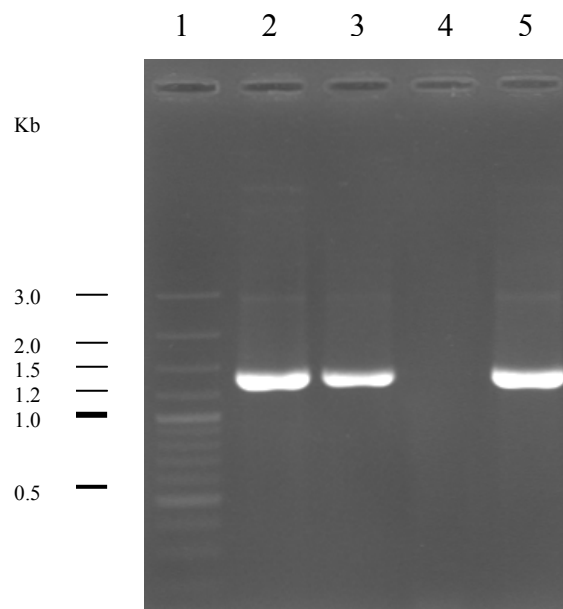
แถบสีฟ้า คือ กรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง



ภาพที่ 24 ผลการตรวจคัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเนสโดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ NFK และ

ARK

ช่องที่ 1	100 bp DNA ladder plus
ช่องที่ 2 และ 3	ผลการทำพีซีอาร์โดยใช้พลาสมิดจากโคลนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
ช่องที่ 4	ผลการทำพีซีอาร์โดยใช้ pHT43 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
ช่องที่ 5	positive control
ช่องที่ 6	negative control



ภาพที่ 25 ผลการตรวจคัดเลือกโคลนที่มียีนเคราตินเนสโดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ FSq และ RSq

ช่องที่ 1	100 bp DNA ladder plus
ช่องที่ 2 และ 3	ผลการทำพีซีอาร์โดยใช้พลาสมิดจากโคลนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
ช่องที่ 4	negative control
ช่องที่ 5	positive control

สรุป

การโคลนยีนเคราตินจาก genomic library พบเซลล์ลูกผสมทั้งหมด 1,020 โคลนี และมีเพียงโคลน e101 เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินสเท่ากับ 5.73 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่โคลนที่ได้ไม่เสถียรเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อต่อกันหลายๆ รุ่น ส่วนจากการโคลนยีนเคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ด้วยการทำฟิชอาร์ พบยีนเคราตินขนาด 1,140 คู่เบส ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีนเคราตินจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นๆ ในฐานข้อมูลถึง 99 เปอร์เซ็นต์

การทำ Homology modeling ของเอนไซม์เคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 พบว่าโครงสร้างสามมิติของเคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 มีกรดอะมิโน Asp137, His168 และ Ser325 อยู่ในบริเวณเร่งเช่นเดียวกับเอนไซม์เคราตินจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติพบว่าโครงสร้างของเอนไซม์เคราตินจาก *B. licheniformis* แต่ละสายพันธุ์สามารถซ้อนทับกันพอดี แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของกรดอะมิโนที่พบในเคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ไม่ได้ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เคราตินต่างไปจากเคราตินจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น ดังนั้นยีนเคราตินที่ได้จาก *B. licheniformis* KUB-K0006 อาจจะสามารถแปลรหัสเพื่อผลิตเป็นเอนไซม์เคราตินที่สามารถทำงานได้เช่นเดียวกับเคราตินจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น

การแสดงออกของยีนเคราตินจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ใน *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ เมื่อถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 และตรวจสอบโคลนด้วยการทำฟิชอาร์พบว่าเซลล์ลูกผสมทุกโคลนที่นำมาตรวจสอบมียีนเคราตินอยู่แต่ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษณ์ รัชชยานนท์. 2545. การโคลนนิ่งแสดงเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐวดี จันทศิลา. 2546. การโคลนนิ่ง *sukC* ซึ่งแสดงโปรตีนเคราตินเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* KUB-K0082. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, เกษตรศาสตร์.
- สุดาทิพย์ จิตะโกคา. 2546. การทำงานที่ส่งเสริมกันของเอนไซม์เคราตินเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 และ *Bacillus pumilus* KUB-K0082. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์. 2540. การศึกษาเอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยขนไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Baker, D.H., R.C. Blitenthal, K.P. Boebel, G.L. Czarnecki, L.L. Southern and G.M. Willis. 1981. Protein-amino acid evolution of steam-processed feather meal. **Poult. Sci.** 60: 1865-1872.
- Balaji, S., K. Rangaswamy and E.J. Santhosh. 2006. PIR pairwise alignment-A slip for signal peptide. **Bioinformation.** 1 (5): 188-193.
- Balint, B., Z. Bagi, G. Rakhely, K. Perei and K.L. Kovacs. 2005. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 69: 404-410.
- Bernal, C., L. Vidal, E. Valdivieso and N. Coello. 2003. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World. J. Microbiol. Biotechnol.** 19: 255-261.

- Bi, X. and L.F. Liu. 1996. DNA rearrangement mediated by inverted repeats. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 819-823.
- Birnboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic. Acids. Res.** 7: 1513-1523.
- Bockle, B., B. Galunsky and R. Muller. 1995. Characterization of keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3705-3710.
- Brandelli, A. 2007. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food. Bioprocess. Technol.** DOI 10.1007/s11947-007-0025-y.
- Bressollier, P., F. Letourneau, M. Urdaci and B. Verneuil. 1999. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (6): 2570-2576.
- Chitte, R.R., V.K. Nalawadee and S. Dey. 1999. Keratinolytic activity from the broth of feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Lett. Appl. Microbiol.** 28: 131-136.
- Cordes, C., R. Meima, B. Twiest, B. Kazemier, G. Venema, J. Maarten van DIJL and S. Bron. 1996. The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 178 (17): 5235-5242.
- de Smith, M.H., van Duin, J., 1994a. Translational initiation on structured messengers: Another role for the Shine–Dalgarno interaction. **J. Mol. Biol.** 235, 173–184.
- Eschenburg, S., N. Genov, K. Peters, S. Fittikau, S. Stova, K.S. Wilson and C. Betzel. 1998. Crystal structure of subtilisin DY, a random mutant of subtilisin Carlsberg. **Eur. J. Biochem.** 25: 309-318.

- Farag, A.M. and M.A. Hassan. 2004. Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme. Microb. Technol.** 34: 85-93.
- Friedrich, J. and G. Antranilkian. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel anaerobic species of the order thermitogales. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2875-2882.
- Fu, L.L., Z.R. Xu, W.F. Li, J.B. Shuai, P. Lu and C.X. Hu. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. **Biotechnol. Adv.** 25: 1-12.
- Gassesse, A., R.H. Kaul, B.A. Gashe and B. Mattiason. 2003. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme. Microb. Technol.** 32: 519-524.
- Gradisar, H., S kern and J. Friedrich. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 196-200.
- Gruss, A. and S.D. Ehrlich. 1988. Insertion of foreign DNA into plasmid from gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. **J. Bacteriol.** 170: 1183-1190.
- Gupta R., Q.K. Beg and P Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 15-32.
- _____. and P. Ramani. 2006. Microbial keratinases and their prospective application: an overview. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 21-33.
- Harwood, R.C. and R. Cranenburgh. 2008. Bacillus protein secretion: an unfolding story. **Trend. Microbiol.** 16: 73-79.

- Harwood, R.C. and S.M. Cutting. 1990. **Molecular biological method for *Bacillus***. John Wiley and Sons, Chichester.
- Hussein, A.M. and M.A. Swelim. 1995. Hydrolysis of chicken feather by *Thermoactinomyces keratinolyticum*. **Egypt. J. Botany**. 39 (2): 107-119.
- Jakubowski. 2008. **mechanisms of enzyme catalysis**. catalysis. Available Source: [http:// employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olcatenzmech.html](http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olcatenzmech.html) , March 5, 2008
- Joop, C., V.D. Lann, G. Geritse, L.G.S.M. Mulleners and R.A.V. van der Hoek. 1991. Cloning, sequencing and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 901-909.
- Kim, J.M., W.J. Lim and H.J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process. Biochem.** 37: 287-291.
- Koolman, J. and K.H. Roehm. 2005. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed. Thieme, New York.
- Langeveld, J. P.M., J.J. Wang, D.F.K. Van de Wiel, G.C. Shih, J. Garssen, A Bossers and J.C.H. Shih. 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and Sheep. **J. Infect. Dis.** 188: 1782-1789.
- Latshaw, J.D., N. Musharaf and R. Retrum. 1994. Processing of feather meal to maximize its nutritional value poultry. **Anim. Feed. Sci. Technol.** 47: 179-188.
- Lee, C.G., P.R. Ferget and J.C.H. Shih. 1991. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. **FASEB J.** 59: 1312.
- Lin X , S-L Wong, E.S. Miller and J.C.H. Shih. 1997. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *Bacillus subtilis*. **J. Indust. Microbiol.** 19: 134-138.

- Lin, X., C.G. Lee, E.S. Casale and J.C.H. Shih. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3271-3275.
- Lin, X., D.W. Kelemen., E.S. Miller and J.C.H. Shih. 1995. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene coding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (4): 1469-1474.
- Lucas F.S., O. Broennimann, I. Febbraro and P. Heeb. 2003. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbiol. Ecology.** 45: 282-290.
- Maciver, Bryce, R.H Mchale, D.J. Saul and, P.L. Bergquist. 1994. Cloning and sequencing of serine proteinase gene from a thermophilic *Bacillus* species and its expression in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60 (11): 3981-3988.
- Mercedo, A.J., WOB. da Silva., R Gava, D. Driemeier, JAP. Henriques and C. Termignoni. 2005. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 591-596.
- MoBiTec GmbH. 2007. ***Bacillus subtilis* expression vectors.** DNA vector systems. Available Source: [http:// www.mobitec.de/int/products/bio/04_vector_sys/bac_sub.html](http://www.mobitec.de/int/products/bio/04_vector_sys/bac_sub.html), January 30, 2007.
- Mohorcic, M., A. Torkar, J. Friedrich, J. Kristl and S. Murdan. 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **Int. J. Pharm.** 332: 196-201.
- Motero-Barientos, M., R. Rivas, E. Velazquez, E. Monte and M.G. Roig. 2005. *Terrabacter terrae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil in Spain. **IJSEM.** 55: 2491-2495.

- Nguyen, H.C., Q.A. Nguyen, R.C. Ferreira, L.C.S. Ferreira, L.T. Tran and W. Schumann. 2005. Construction of plasmid-based expression vector for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. **Plasmid**. 54: 241-248.
- Nick. 2007. **Heterologous gene expression problems?**. BiteSize Bio: the molecular and cell biologist's companion. Available Source: <http://bitesizebio.com/2007/10/09/heterologous-gene-expression-problems/>, March 5, 2008.
- Ogawa, A., N. Sumitomo, M. Okuda, K. Saeki and S. Kawai. 2003. Nucleotide and deduced amino acid sequences of a high-molecular-mass subtilisin from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. **Biochim. Biophys. Acta**. 1624: 109-114.
- Pan, J., Q. Huang and Y. Zhang. 2004. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. **Curr. Microbiol.** 49:165-169.
- Papadopoulos, M.C., A.R. El Boushy, A.E. Roodbeen and E.H. Ketelaars. 1986. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Anim. Feed. Sci. Technol.** 14: 279-290.
- Peng, Y., X.J. Yang, L. Xiao and Y.Z. Zhang. 2004. Cloning and expression of fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. **Res. Microbiol.** 155: 167-173.
- Phan, T.T.P, H.C. Nguyen and W. Schumann. 2006. Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant protein in *Bacillus subtilis*. **Prot. Expr. Purif.** 46: 189-195.
- Porres, J.M., M.J. Benito and X.G. Lei. 2002. Functional expression of keratinase (*kerA*) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. **Biotechnol Lett.** 24: 631-636.

- Radha S and P Gunasekaran. 2007. Cloning and Expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. **J. Appl. Microbiol.** 103: 1301-1310.
- Rao, M.B., A.M. tanksale, M.S. Ghatge and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. **Microbiol. Mol. Rev.** 62 (3): 597-635.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acid. **Arch. Biochem.** 67: 10-15.
- Rawlings, N.D. 2008. **Peptidases families.** Peptidase families: classification and list of entries. Available Source: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?peptidas.txt>, April 29, 2008.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh and T Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual..** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, R.M.D.B., A.A.P. Firmino, C.M. de Sa and C.R. Felix. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Curr. Microbiol.** 33: 364-370.
- Schallmeyer, M., A. Singh and O.P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol.** 50: 1-7.
- Smith, M.A. and M.J. Bidochka. 1997. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. **Can. J. Microbiol.** 44: 351-355.
- Tang X.M., W. Shen, F.M. Lakay, W.L. Shao, Z.X. Wang, B.A. Prior and J. Zhuge. 2004. Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett.** 26: 975-979.

- Tjalsma, H., A. Bolhuis, J.D.H. Jongbloed, S. Bron and J.M. van Dijl. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome based survey of secretome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64 (3): 515-547.
- Wang, J.J, K Rojanatavorn and J.C.H Shih. 2004. Increased production of *Bacillus* Keratinase by Chromosomal Integration of Multiple Copies of the *kerA* Gene. **Biotechnol. Bioeng.** 87 (4): 459-464.
- Wang, J.J. and J.C.H. Shih. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **J. Indust. Microbiol.** 22: 608-616.
- _____, J.D. Garlich and J.C.H. Shih. 2006. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. **J. Appl. Poult. Res.** 15: 544-550.
- Williams, C.M., C.G. Lee, J.D. Garlich and J.C.H. Shih. 1991. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate as a feed protein. **Poult. Sci.** 70: 85-94.
- _____, C.S. Richter, J.M. Mackenzie and J.C.H. Shih. 1990. Isolation, identification and characterization of feather-degrading bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 1509-1515.
- Wong, S.L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for expression and secretion of heterologous proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.** 6: 517-522.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. Luria-Bertani medium

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ในกรณีที่เป็อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ให้เติม agar 1.5 % ของปริมาณอาหาร

1.2 SOC

Bacto-tryptone	1	กรัม
Bacto-yeast extract	0.25	กรัม
NaCl	0.025	กรัม
2 M Glucose	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.3 Minimal-growth medium

Minimal salt	200	มิลลิลิตร
20% glucose	25	มิลลิลิตร
2% casamino acid	10	มิลลิลิตร
Yeast extract	50	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.4 Starvation medium

\

Minimal salt	200	มิลลิลิตร
20% glucose	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

โดย minimal salt ประกอบด้วย

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	กรัม
K_2HPO_4	74	กรัม
KH_2PO_4	24	กรัม
Tri-sodium citrate	9.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.5 skimmilk agar

NH_4Cl	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.354	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.24	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Skim milk	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.6 mineral salt

NH_4Cl	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.354	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.24	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและพลาสมิด

2.1 lysis buffer

ประกอบด้วย 50 mM EDTA และ 0.1 M NaCl

2.2 TE buffer

ประกอบด้วย 1 mM EDTA และ 10 mM Tris-HCl ,pH 8.0

2.3 Solution A

ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH8.0 , 10 mM EDTA , 50 mM NaCl และ 20%(W/V) Sucrose

2.4 Solution B

ประกอบด้วย 0.2 M NaOH และ 1% (W/V) SDS

2.5 Solution C

ประกอบด้วย 5 M Potassium acetate และ Glacial acetic acid 11.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

3.1 0.01 M NaCN

ประกอบด้วย NaCN 490 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.2 Acetate buffer

ละลาย sodium acetate ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 2700 กรัม ในน้ำกลั่น 2 ลิตร แล้วเติม glacial acetic 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 7.5 ลิตร ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์จะอยู่ประมาณ 5.3-5.4

3.3 Acetate-Cyanide

เตรียม 0.2 mM NaCN ใน acetate buffer โดยการนำสารละลายในข้อ 3.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยสารละลายในข้อ 3.2

3.4 3% Ninhydrin

ละลาย ninhydrin 3 กรัม ใน Methyl-Cellosolve:ethylene glycol monomethyl ether ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.5 สารละลายเจือจางประกอบด้วย isopropyl alcohol ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

ภาคผนวก ข

เทคนิคทางชีวโมเลกุลและวิธีวิเคราะห์

1. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อปริมาตรรวม 300 ไมโครลิตรแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนกรัม ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Bio Aqariust) แล้วคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{280} \times 50 \times \text{ค่าความเจือจาง}$$

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye ความเข้มข้น 6 เท่า แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใน 1x TBE buffer ความต่างศักย์คงที่ 50 โวลต์ หรือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที และ 40 นาที ตามลำดับ ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-transilluminator (Vilber Lourmat) และบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพ

2. การคำนวณหาขนาดของยีนเคราตินเนส

$$1 \text{ กรดอะมิโน} = 3 \text{ เบส} = 110 \text{ ดาลตัน}$$

เอนไซม์เคราตินเนส SUK A และ SUK B มีขนาด 70 กิโลดาลตัน

จึงประกอบด้วย 636 กรดอะมิโน ซึ่งเท่ากับเบสทั้งหมด 1,909 คู่เบส

3. การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลโดยใช้ Nucleospin Extract II[®]

สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยเติมบัฟเฟอร์ NT2 ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนัเจล นำบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มาใส่ในหลอด nucleospin และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่านเมมเบรนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อเทสารละลายที่ผ่านเมมเบรนทิ้ง แล้วนำหลอด nucleospin ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 2 นาที นำคอลัมน์ส่วนบนไปวางบนหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer NE3 หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM-T easy vector

ทำการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์เข้ากับ pGEM-T easy vector โดยใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้

2X Rapid ligation buffer	5	ไมโครลิตร
pGEM-T easy vector	2	ไมโครลิตร
PCR product	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 unit/ul)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12- 16 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระโดยวิธี Ninhydrin (Rosen, 1957)

- 1) เติมน้ำสารละลายบัฟเฟอร์ Acetate-cyanide จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร
- 2) เติมน้ำสารละลาย ninhydrin ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 3) บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที
- 4) เมื่อครบเวลาเจือจางด้วยสารละลายผสมของไอโซโพรพานอลต่อน้ำ (1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ
- 5) ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดอะมิโนลิซีนเป็นมาตรฐาน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวขวัญกนิษฐ์ อินทรตระกูล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 ตุลาคม 2525
สถานที่เกิด	เลย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนสนับสนุนและค้นคว้าวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2549) 2. ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการ ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ (2549)