

การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนต์เบต้า- กลูโคซิเดสจากพะยูง

Production and Site-directed Mutagenesis of Recombinant β -Glucosidase from Thai Rosewood

คำนำ

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส (EC 3.2) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ที่เชื่อมสารประกอบระหว่างไกลโคโคน (กลูโคส) กับอะไกลโคโคน เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 55-65 กิโลดาลตัน pH ที่เหมาะสมประมาณ pH 5-6 และพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ รา สาหร่ายและแบคทีเรีย นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตแตกต่างกัน โดยมากจะมีความจำเพาะต่อส่วนไกลโคโคนคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันในความจำเพาะต่ออะไกลโคโคน เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่แตกต่างกัน (Esen, 1993) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสมีหลายชนิดและสามารถย่อยสารได้มากมาย เช่น ไชยา โนจินิกกลูโคไซด์ เซลโลไบโอส ไอโซฟลาโวนอยด์กลูโคไซด์ ฟีนอลิกกลูโคไซด์ และ ไธโอกลูโคไซด์ เป็นต้น (Svasti *et al.*, 1999)

ปัจจุบันนี้มีการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอย่างกว้างขวาง ทั้งในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานและการประยุกต์ใช้ให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจ สำหรับในมนุษย์เบต้า-กลูโคซิเดสเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากลูโคเซอริโบรซิเดส (glucocerebrosidase, β -D-glucosyl-N-acylsphingosine) ซึ่งมีการศึกษากันมากในระดับยีนและโปรตีน พบว่าเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายกลูโคซิลเซอรามีด์ (glucosylceramide) ในไลโซโซม ถ้าขาดเอนไซม์ชนิดนี้จะทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่ชื่อว่าโรคเกาเชอร์ส (Gaucher's disease) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเบต้า-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตพวกเซลล์ไลติก (cellulolytic) เช่น รา สาหร่ายบางชนิด และแบคทีเรีย ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสตามลำดับ กลูโคสที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเป็นพลังงานเชื้อเพลิงต่อไป (Esen, 1993) ส่วนในพืชเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญหลาย

กระบวนการเช่น การควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม การสร้าง ลิกนิน การย่อยสลายเซลโลไบโอส การกระตุ้นให้ฮอร์โมนทำงาน และการป้องกันอันตรายจาก จุลินทรีย์และสัตว์กัดแทะ เป็นต้น (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในมนุษย์ พืช รา สาหร่ายและแบคทีเรียโดยทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) พบว่ามีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีกรดอะมิโน 2 ตัว (กลูตามेट หรือ แอสปาร์เตต) ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst กับ nucleophile ระหว่างการเร่งปฏิกิริยาการสลายของพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ขณะนี้มีการศึกษากลไกการทำงานของเบต้า-กลูโคซิเดสกันอย่างกว้างขวาง แต่ไม่มีใครเข้าใจถึงความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ (Esen, 1993) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในธรรมชาติจะมีความจำเพาะต่อไกลโคโคนหรืออะไกลโคโคนได้หลายกลุ่ม ดังนั้นจึงพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 1 ชนิดสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้หลายชนิด เช่นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai rosewood) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าดัลโคซินเนส (dalcochinase) มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งเบต้า-กลูโคซิเดสซึ่งย่อยสลายเบต้า-กลูโคไซด์ และเบต้า-ฟูโคซิเดสที่สามารถย่อยสลายเบต้า-ฟูโคไซด์ได้ เป็นต้น (Svasti *et al.*, 1999) นอกจากนี้จะมีคุณสมบัติการสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิกแล้ว ดัลโคซินเนสยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) ได้ดี (Srisomsap *et al.*, 1999) กล่าวคือมันสามารถสังเคราะห์ไฮดรอกไซด์หรือไฮดรอกไซด์ได้ แต่เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทูตียภูมิ และตติยภูมิเป็นตัวรับ เพื่อสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ (alkyl glucoside) ได้น้อย (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz หรือ cassava) ซึ่งมีอีกชื่อหนึ่งว่าลินามาราส (linamarase) สามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้น้อยแต่เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดี คือสามารถย้ายหมู่กลูโคสจาก *para*-nitrophenyl- β -D-glucosides ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้กลูโคส ไปยังแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทูตียภูมิ และตติยภูมิ เพื่อสังเคราะห์เป็นอัลคิลกลูโคไซด์ได้เป็นอย่างดี ทั้งๆที่ลำดับกรดอะมิโนของดัลโคซินเนสและลินามาราสมีความคล้ายคลึงกันถึง 60% ที่เดียว (Svasti *et al.*, 2003)

จากความสัมพันธ์ดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างหน้าที่และการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยใช้เอนไซม์ดัลโคซินเนสและลินามาราสเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ ซึ่งจะทำให้การศึกษาด้วยวิธีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed

mutagenesis) โดยทำการเปลี่ยนเบสบางตัวในยีนของอัลโคซิเนส มีผลทำให้กรดอะมิโนบางตัวของเอนไซม์อัลโคซิเนสเปลี่ยนไปด้วย เพื่อที่จะทำให้เอนไซม์อัลโคซิเนสสามารถแสดงปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้เหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรส และทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออก (expression) และการทำบริสุทธิ์ (purification) ของรีคอมบิแนนต์อัลโคซิเนส
2. สร้างเอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ โดยการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์อัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส
3. หากรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับการเร่งปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ของเบต้า-กลูโคซิเดสได้

การตรวจเอกสาร

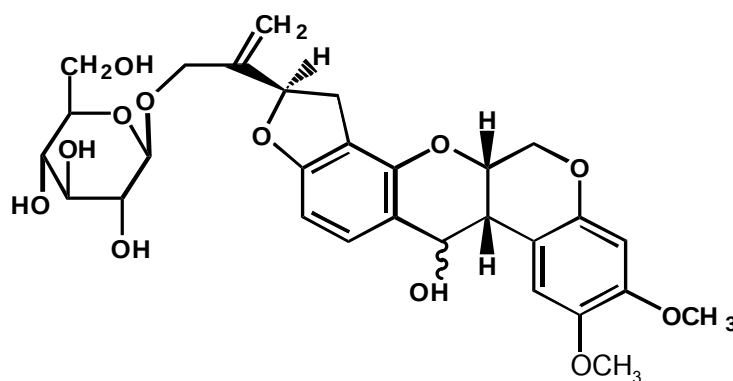
1. เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน

จากการหาเอนไซม์ไกลโคซิเดสในเมล็ดพืชมากกว่า 50 ชนิดของพืชในประเทศไทยโดยใช้ *para*-nitrophenyl- β -D-glycosides เป็นสับสเตรท พบว่ามีเอนไซม์ไกลโคซิเดส 9 ชนิด โดยเฉพาะเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเมล็ดของพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai rosewood) ซึ่งเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า คัลโคซิเนส (dalcocchinase) มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไกลโคซิเดสที่พบในเมล็ดชนิดอื่นๆ (Surarit *et al.*, 1995) เมื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่สกัดได้จากหลายๆส่วนของพะยูน พบว่าในเมล็ดที่กำลังงอกจะมีระดับการทำงานสูงสุด (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

ได้มีการทำเอนไซม์คัลโคซิเนสจากเมล็ดของพะยูนให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulphate โดยใช้สภาวะอิ่มตัวที่ 35-70% isoelectric focusing และ Sephadex G-150 chromatography (Srisomsap *et al.*, 1996) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสมีน้ำหนักโมเลกุลในสภาวะปกติ 330,000 ดาลตัน และสภาวะเสื่อมสภาพ 66,000 ดาลตัน ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าเอนไซม์น่าจะประกอบด้วย 4-6 หน่วยย่อยของโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน คัลโคซิเนสสามารถย่อยสลาย *para*-nitrophenyl- β -D-glycosides ได้หลายชนิด แต่มีความจำเพาะต่อ *para*-nitrophenyl- β -D-glucoside (pNP-Glc) และ *para*-nitrophenyl- β -D-fucoside (pNP-Fuc) ที่ pH 5 ได้ดีกว่า *para*-nitrophenyl- β -D-glycoside ชนิดอื่น และยังถูกยับยั้งได้ดีโดย δ -gluconolactone, HgCl_2 และ *para*-chloromercuribenzoate อีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์นี้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเป็นกรด จึงเป็นไปได้ว่าหมู่ที่ทำงานที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เป็นหมู่ที่แตกตัวได้ใน pH ที่เป็นกรด ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า สารประกอบจำพวกปรอทสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยจับกับประจุลบที่เกิดขึ้น หลังจากการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (ชัยนุสรณ์ และคณะ, 2538) เมื่อศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของคัลโคซิเนสพบว่า K_m ในการย่อยสลาย pNP-Glc (5.4 mM) มีค่าสูงกว่า K_m ในการย่อยสลาย pNP-Fuc (0.54 mM) ถึง 10 เท่า ส่วนค่า k_{cat} ของการย่อยสลาย pNP-Glc (307 sec^{-1}) สูงกว่าการย่อยสลาย pNP-Fuc (151 sec^{-1}) ถึง 2 เท่า ดังนั้นจึงมีอัตราส่วน k_{cat}/K_m ของการย่อยสลาย pNP-Fuc ($283,100 \text{ M}^{-1}.\text{sec}^{-1}$) สูงกว่าการย่อยสลาย pNP-Glc ($57,300 \text{ M}^{-1}.\text{sec}^{-1}$) (Srisomsap *et al.*, 1996) จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์คัลโคซิเนส พบว่า pNP-Fuc สามารถยับยั้งการ

สลาย *p*NP-Glc ได้แบบแข่งขันโดยมีค่า K_i เท่ากับ 0.42 mM จึงสรุปได้ว่าสับสเตรททั้ง 2 ชนิดถูกย่อยสลายตรงบริเวณเร่งเดียวกัน (Surarit *et al.*, 1997) แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าในธรรมชาติเอนไซม์ คัลโคซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิดเบต้า-กลูโคซิเดสหรือเบต้า-ฟูโคซิเดส

นอกจากนี้มีการนำเอนไซม์คัลโคซิเนสไปทดสอบกับสับสเตรทในธรรมชาติที่หาซื้อได้ทางการค้า เช่น ไชยานอนินิกกลูโคไซด์ กลูโคส ไดแซคคาไรด์ และไรโอกลูโคไซด์ พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ไม่ดีเท่า *p*NP-Glc ดังนั้นจึงมีการสกัดสับสเตรทในธรรมชาติของ คัลโคซิเนสจากเมล็ดของพะยูน และพบไอโซฟลาโวนอยด์ เบต้า-กลูโคไซด์ (isoflavonoid β -glucoside) ชนิดใหม่ ซึ่งมีมากกว่า 3% ในเมล็ด จึงเรียกชื่อสารชนิดนี้ว่า dalcochinin-8'-*O*- β -D-glucoside (ภาพที่ 1) โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 574 ส่วนอะไกลโคนจะเป็นสารประเภท 12-dihydroamorphigenin ซึ่งจะถูกรู้จักว่า คัลโคซินิน (dalcochinin) สำหรับค่า K_m ในการย่อยสลาย dalcochinin-8'-*O*- β -D-glucoside คือ 1.68 mM จะเห็นได้ว่ามีค่าอยู่ระหว่างค่า K_m ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc โครงสร้างของคัลโคซินินคล้ายกับโรทีโนน (rotenone) ซึ่งเป็นสารพิษที่พบในธรรมชาติใช้ในการกำจัดแมลง จึงคาดว่าส่วนอะไกลโคนของสารตัวนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันสัตว์ที่จะมากัดแทะเมล็ด (Svasti *et al.*, 1999)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ dalcochinin-8'-*O*- β -D-glucoside

ที่มา: Svasti (1999)

มีผู้วิจัยได้ทำการโคลนเพื่อศึกษาโครงสร้างและวิวัฒนาการของคัลโคซิเนส พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 547 ตัว แบ่งเป็น propeptide 23 ตัว และ mature protein 524 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่า mature protein มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก

white clover ถึง 60% จึงคาดว่าคัลโคซิเนสน่าจะมีโครงสร้างเป็นแบบ $(\alpha/\beta)_8$ barrel (ภาพที่ 2) จากการเปรียบเทียบลำดับโปรตีนของคัลโคซิเนสกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า E396 ของคัลโคซิเนสน่าจะเป็นตำแหน่ง nucleophile (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000) เนื่องจากเป็นตำแหน่งอนุรักษ์กับ E358 ในเบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium* sp. ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile (Esen, 1993) และตำแหน่ง E182 ของคัลโคซิเนสก็เป็นตำแหน่งอนุรักษ์กับตำแหน่ง E198 ของเบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง ซึ่งทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst นอกจากนี้บริเวณใกล้เคียงกับบริเวณเร่งของเบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover มีความเหมือนกับคัลโคซิเนส แต่มีเพียงตำแหน่ง V254 ของเบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover ที่เป็น H253 ในคัลโคซิเนส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะทำให้สภาพแวดล้อมรอบ E182 มีความเป็น hydrophobic ลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาริคอมบิแนนต์คัลโคซิเนสใน *Escherichia coli* และ *Pichia pasporis* พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ต้องมีกระบวนการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วยจึงจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ และริคอมบิแนนต์เอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *P. pasporis* จะมีค่าจลนพลศาสตร์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเมล็ดพะยูน (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

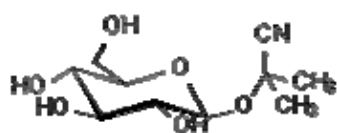


ภาพที่ 2 แบบจำลองโครงสร้างของเอนไซม์คัลโคซิเนส

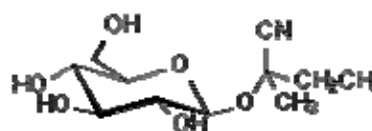
ที่มา: Toonkool (2003)

2. ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส (cyanogenic β -glucosidase) เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น white clover มันสำปะหลัง ป่าน ยางพารา เป็นต้น และพบได้ในส่วนต่างๆของพืชหลายส่วนทั้งในราก ลำต้น และใบ เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาการสลายสารจำพวกไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ 2 ชนิด คือลินามาริน (linamarin หรือ 2-hydroxy-isobutyronitrile- β -D-glucopyranoside) และโลตัสตราลิน (lotaustralin หรือ 2-hydroxy-2-methylbutyronitrile- β -D-glucopyranoside) ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 3 (ชัยนุสร และคณะ, 2538) โดย 95% ของไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ในมันสำปะหลังจะเป็นลินามาริน (Keresztessy *et al.*, 2001) ปกติเอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดสและสับสเตรทจะแยกกันอยู่คนละส่วนภายในเซลล์ และจะมาทำปฏิกิริยากันเมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลาย ในปฏิกิริยาการสลายไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์นั้นจะให้ผลิตภัณฑ์คือกลูโคสและไฮดรอกซีไนด์ไทรล์ (hydroxynitrile) ซึ่งในพืชหลายชนิดจะมีเอนไซม์ไฮดรอกซีไนด์ไทรล์ไลเอส (hydroxynitrile lyase) ที่มาสลายไฮดรอกซีไนด์ไทรล์ให้เป็น คีโตนและกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) ดังภาพที่ 4 (Hughes, 1993) กรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้นจะเป็นสารพิษในพืช จึงเชื่อว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้น่าจะเป็นกลไกการป้องกันต่อสัตว์กินพืช



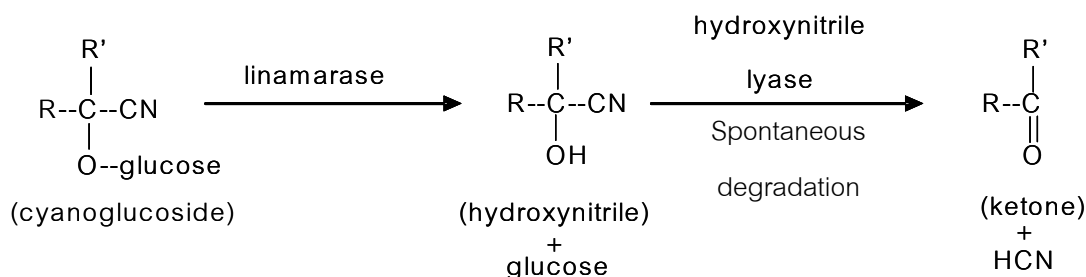
ลินามาริน



โลตัสตราลิน

ภาพที่ 3 โครงสร้างของลินามารินและโลตัสตราลิน

ที่มา: Kemisk Institute of Syddansk University (2001)



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาการสลายไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคไซด์; $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}' = \text{CH}_3$ ลินามาริน;
 $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$ โลตัสตราลิน;
 ที่มา: Hughes (1993)

เอนไซม์ไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคไซด์ได้จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz หรือ cassava) หรือลินามาริส (linamarase) จะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคไซด์จาก white clover ถึง 50% จึงคาดว่าเอนไซม์ชนิดนี้น่าจะมีโครงสร้างเป็นแบบ $(\alpha/\beta)_8$ barrel (ภาพที่ 2) เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์ลินามาริสจากมันสำปะหลังมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70,000 ดาลตัน และเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีแมนโนสถึง 7-15% นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาน้ำที่ของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์ลินามาริสจากมันสำปะหลังโดยทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) และให้มีการแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า E198 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst ส่วน E413 จะทำหน้าที่เป็น nucleophile กรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวนี้จะอยู่ใน motif NEP/I และ I/VTENG ตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ใน family 1 ของไกลโคซิลไฮโดรเลส เมื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของ รีคอมบิแนนต์ลินามาริสพบว่า K_m ในการย่อยสลายลินามารินและ pNP-Glc มีค่าเท่ากับ 1.06 mM และ 0.36 mM ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ได้จากพืช (Keresztessy *et al.*, 2001)

3. กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส

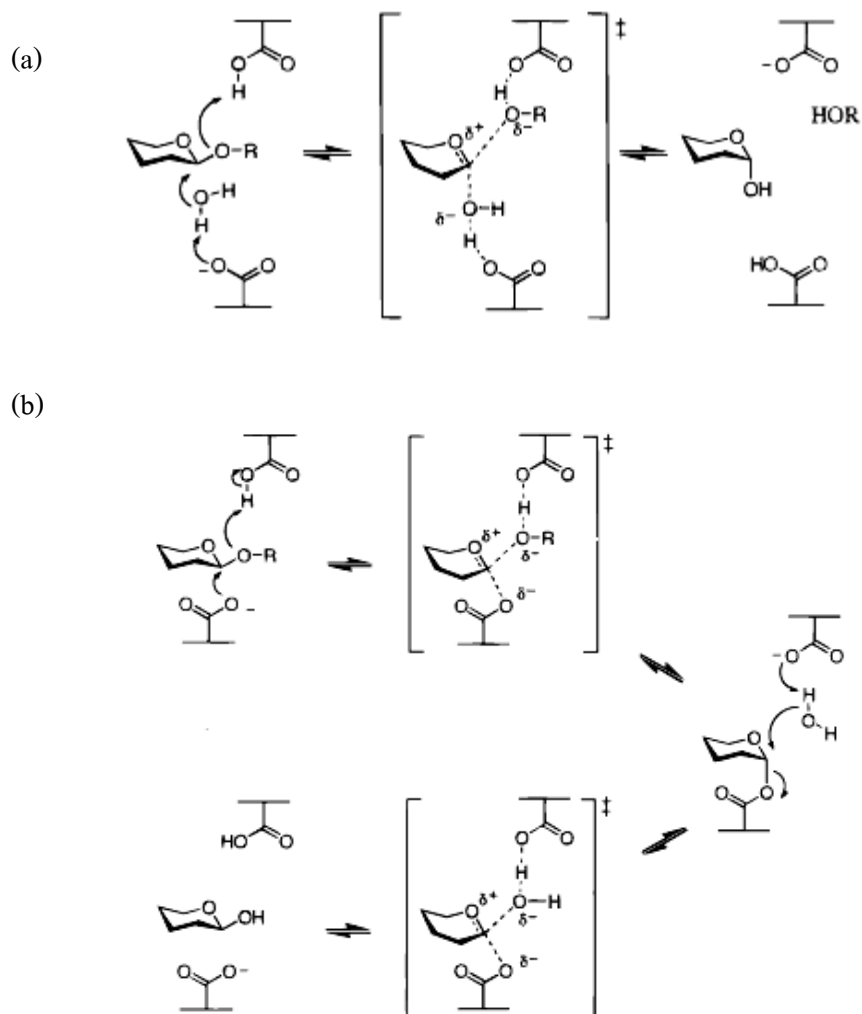
ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ คือ inversion หรือ retention โดยเอนไซม์ที่อยู่ในตระกูลเดียวกันการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดในรูปแบบเดียวกัน (Zechel and Withers, 2000)

การเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion จะเกี่ยวข้องกับหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid และ base catalysts โดยจะวางอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมห่างกันประมาณ 10.5 Å โมเลกุลของ

สับสเตรทและน้ำจะมาจับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลทั้ง 2 พร้อมกัน โดยหมู่คาร์บอกซิลตัวแรกจะให้โปรตอนแก่ glycosidic oxygen พร้อมกันนั้นโมเลกุลของน้ำจะเข้าโจมตีหมู่คาร์บอกซิลอีกตัวและ anomeric center ของสับสเตรท ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็น single-displacement โดยผ่านสภาพเปลี่ยน (transition states) ที่เป็นออกโซคาร์บีนียม ไอออน (oxocarbenium ion) ดังภาพที่ 5a ผลึกที่เกิดขึ้นจะมีโครงสร้าง anomeric ไม่เหมือนกับสับสเตรท

สำหรับการเร่งปฏิกิริยาแบบ retention หมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ จะอยู่ห่างกัน 5.5 Å ปฏิกิริยาจะเป็น double-displacement ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง covalent glycosyl-enzyme intermediate โดยในขั้นตอนแรกซึ่งเรียกว่าขั้นไกลโคซิเลชัน (glycosylation) หมู่คาร์บอกซิลตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid catalyst ซึ่งจะให้โปรตอนแก่ glycosidic oxygen พร้อมกับสลายพันธะ ส่วนหมู่คาร์บอกซิลอีกตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งจะสร้างเป็น covalent glycosyl-enzyme intermediate สำหรับในขั้นตอนที่สองนี้จะเรียกว่าขั้นดีไกลโคซิเลชัน (deglycosylation) โดยโมเลกุลของน้ำจะเข้ามาทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลที่สูญเสียโปรตอน (base catalyst) และ anomeric center ทำให้ได้น้ำตาลหลุดออกมา ทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นผ่านสภาพเปลี่ยนที่มีลักษณะเป็นออกโซคาร์บีนียม ไอออน (ภาพที่ 5b) และผลึกที่เกิดขึ้นได้จะมีโครงสร้าง anomeric เหมือนกับสับสเตรท

มีการศึกษากลไกของเอนไซม์ *Agrobacterium* sp. β -glucosidase (Abg) โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าจลนพลศาสตร์สำหรับการย่อยสลายของอนุกรมของแอริลกลูโคไซด์ (aryl glycosides) กับความสามารถในการปลดปล่อยหมู่ฟีนอล พบว่ากราฟ Hammett ที่ได้จะเกิดเป็น biphasic คือจะมีลักษณะเว้าลาดต่ำลง แสดงให้เห็นว่ากลไกจะเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน (Zechel and Withers, 2000) Abg เป็นสมาชิกใน family 1 ของไกลโคซิลไฮโดรเลส ดังนั้นสมาชิกทุกตัวในตระกูลนี้รวมทั้งคัลโคซิเนสและลินามาเรสก็น่าจะมีกลไกเป็นแบบ double-displacement ด้วย



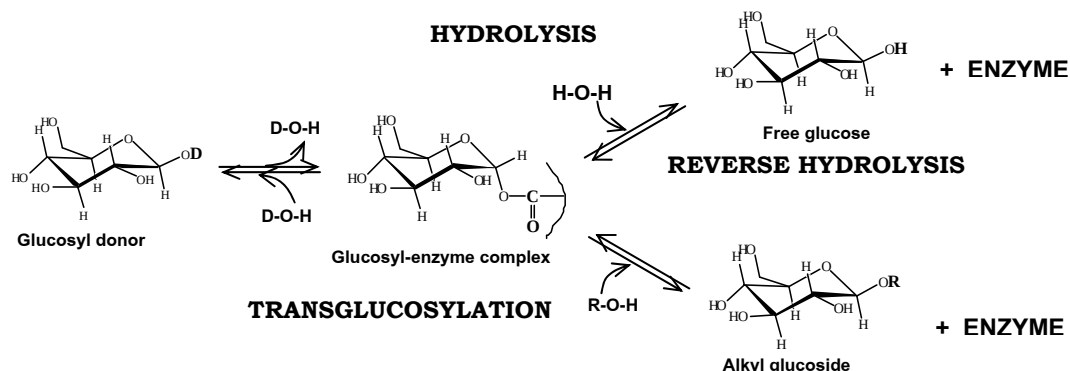
ภาพที่ 5 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส: (a) inversion, (b) retention

ที่มา: Zechel and Withers (2000)

4. การเกิดปฏิกิริยาย้อนการสลายและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

โดยปกติเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะสามารถสลายสับสเตรทที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูโคไซด์ได้ แต่ถ้าเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ กล่าวคือ ถ้าเอนไซม์และกลูโคสมีความเข้มข้นมากพอ อุณหภูมิสูง และกิจกรรมของน้ำต่ำ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) ดังภาพที่ 6 ซึ่งจะสร้างพันธะระหว่างกลูโคสได้เป็นไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ หรือโอลิโกแซคคาไรด์ มีการศึกษาพบว่าคัลโคจีนเนสสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนการสลายโดยใช้ 40-70% (w/w) กลูโคส ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วันในการสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์ ประมาณ 75% ของไดแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดจะเป็นเจนทิโอไบโอส (gentiobiobiose หรือ β 1-6-diglucose) และไม่สามารถสังเคราะห์เซลโลไบโอส (cellobiose หรือ β 1-4-diglucose) ได้ ซึ่งอธิบายได้ว่าเอนไซม์คัลโคจีนเนสชอบที่จะสร้างพันธะ β 1-6 มากกว่าพันธะ β 1-4 ดังนั้นในการสังเคราะห์เฮเทอโรโอลิโกแซคคาไรด์ (hetero-oligosaccharides) โดยปฏิกิริยาย้อนการสลายของเอนไซม์คัลโคจีนเนสซึ่งมี D-glucose กับ D-fucose เป็นสับสเตรทจึงได้ผลิตภัณฑ์เป็น D-fucosyl (β 1-6)-D-glucose (Srisomsap *et al.*, 1999)

นอกจากการเกิดปฏิกิริยาย้อนการสลายแล้วเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้อีกด้วย (ภาพที่ 6) คือมีการนำหมู่กลูโคสจากตัวให้ เช่น pNP-Glc หรือเซลโลไบโอสไปให้ตัวรับ เช่นแอลกอฮอล์ (แทนที่น้ำ) กลายเป็นอัลคิลกลูโคไซด์ (alkyl glucosides) ซึ่งอัลคิลกลูโคไซด์หลายๆตัวมีประโยชน์ที่น่าสนใจ ตัวอย่างเช่น ช่วยในการทำละลายของเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ใช้เป็นตัวล้างยา เป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์กลีโคลินและรส (Hommalai *et al.*, 2005) หรือใช้ในการสังเคราะห์สารเพื่อใช้ย่อยสลายสารพิษได้ ในธรรมชาติไม่พบว่าเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลสจะเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของแอลกอฮอล์ในสิ่งมีชีวิตได้ แต่สิ่งมีชีวิตสามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้โดยผ่านกระบวนการอื่น ตัวอย่างเช่น ไชยานอนจิณิกกลูโคไซด์ที่ถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyl transferases) มากกว่าเป็นผลมาจากปฏิกิริยาย้อนการสลายหรือย้ายหมู่กลูโคสโดยกิจกรรมของเอนไซม์ใน family 1 ของไกลโคซิลไฮโดรเลส (Hommalai *et al.*, 2005)



ภาพที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาย้อนการสลายและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

ที่มา: Toonkool (2003)

ในการเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอนด์ *Fusarium oxysporum* และพะยูน สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่าแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้ ดังนั้นมันจึงไม่สามารถสังเคราะห์ tertiary alkyl glucoside ได้ (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) แต่เอนไซม์ลินามารสสามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่า แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (Svasti *et al.*, 2003) เมื่อวิเคราะห์ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ลินามารสและคัลโคซิเนสโดยใช้ 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates ซึ่งชี้ให้เห็นว่าบริเวณจับอะไกลโคโคน (aglycone binding pocket) ของทั้ง 2 เอนไซม์มีความเป็น hydrophobic ดังนั้นเอนไซม์จะเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ที่มีความเป็น hydrophobic สูงได้ดีกว่าหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาล หรืออาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ชอบโครงสร้างสายตรงของแอลกอฮอล์มากกว่าโครงสร้างวงแหวนของน้ำตาล เมื่อทำการศึกษาปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์ลินามารสกับ *n*-butanol *sec*-butanol *tert*-butanol *iso*-butanol ที่มีความเป็น hydrophobic คล้ายกัน พบว่าจะมีค่า K_s แตกต่างกัน โดย *tert*-butanol จะมีค่า K_s สูงที่สุด (968 ± 100 mM) ขณะที่ *iso*-butanol จะมีค่า K_s น้อยที่สุด (154 ± 28 mM) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างที่ถูกต้องก็เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการจับที่เหมาะสมของแอลกอฮอล์กับเอนไซม์ลินามารส (Hommalai *et al.*, 2005) ดังนั้นคาดว่าถ้าทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนตรงบริเวณจับอะไกลโคโคนของคัลโคซิเนสให้เป็นกรดอะมิโนของลินามารส น่าจะทำให้คัลโคซิเนสสามารถเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิ ได้ดีขึ้น

5. การศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์

ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสนั้น มีโจทย์วิจัยที่สำคัญสำหรับนักวิจัย คือ การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิกระหว่างไกลโคโคน 2 ตัว เช่น เซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์ หรือระหว่างกลูโคสกับอะไกลโคโคนที่เป็นหมู่แอริลหรืออัลคิล (aryl/alkyl) เช่น สับสเตรทที่พบในธรรมชาติของเอนไซม์ในพืช และการศึกษากลไกที่ทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท รวมทั้งตำแหน่งและกลไกในการจับอะไกลโคโคน มีงานวิจัยมากมายที่ช่วยอธิบายกลไกของการเร่งปฏิกิริยาและหาความสำคัญของกรดอะมิโนภายในบริเวณเร่ง (Cicek *et al.*, 2000) เช่น การทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nucleophile ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium* sp. (Abg) โดยสร้างเอนไซม์กลายพันธุ์ E358A ทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ถึง 90% โดยใช้ α -glycosyl fluoride เป็นตัวให้และแอริลกลูโคไซด์เป็นตัวรับ (Mackenzie *et al.*, 1998) แต่ถ้าเป็นเอนไซม์กลายพันธุ์ E358S จะทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นถึง 24 เท่า เนื่องจากเกิดความเสถียรระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของเซรินกับ anomeric fluorine ของ α -glycosyl fluoride (Mayer *et al.*, 2000) นอกจากนี้มีการทำการกลายพันธุ์พร้อมกัน 2 ตำแหน่งตรงบริเวณเร่งของ Abg คือเอนไซม์กลายพันธุ์ E171A กับ E358G โดยวิธีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ พบว่าแม้เปลี่ยนแขนงข้าง (side chain) ของโปรตีนจากมีประจุเป็นไม่มีประจุ เอนไซม์ก็ยังสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการทำการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียว (E171A หรือ E358G) (Jahn *et al.*, 2004)

นอกจากนี้มีการทำการกลายพันธุ์เอนไซม์ Abg แบบสุ่ม (random mutagenesis) โดยใช้ AbgE358G เป็นแม่แบบ ปรากฏว่าได้เอนไซม์ที่มีระดับการทำงานสูงคือ 1D12 (A19T, E358G) จากนั้นนำ 1D12 มาทำการกลายพันธุ์แบบสุ่มอีก 2 รอบ ได้เอนไซม์กลายพันธุ์ ชนิดใหม่ซึ่งเรียกว่า 2F6 (A19T, E358G, Q248R, M407V) โดยอัตราส่วนค่า k_{cat}/K_m ของ AbgE358G : 1D12 : 2F6 เป็น 1:7:27 ซึ่งใช้ α -D-galactopyranosyl fluoride และ 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside เป็นสับสเตรท ทั้งนี้ 2F6 นอกจากจะมีประสิทธิภาพสูงแล้วมันยังสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้หลายชนิดอีกด้วย และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของ 2F6 แสดงให้เห็นว่าการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A19T และ M407V ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับสับสเตรท แต่มีผลในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของบริเวณเร่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น สำหรับ Q248R นั้นยังไม่ทราบเหตุผลแน่ชัด (Kim *et al.*, 2004)

แต่ในความเป็นจริงแล้วเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน ดังนั้นจึงน่าจะมีส่วนอื่นนอกเหนือจากบริเวณเร่งที่ทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการจับหมู่อะไกลโคน Singh และ Hayashi (1995) ได้ทำการแลกเปลี่ยนกรดอะมิโน 58 ตัวทางด้าน C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Celvibrio gilvus* กับกรดอะมิโน 60 ตัวทางด้าน C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ได้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเหมือนกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. tumefaciens* ต่อมา Hoa และ Hayashi ได้ทำการตัดกรดอะมิโน 70 ตัวทางด้าน C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *C. gilvus* ทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน แสดงว่าตำแหน่งทางด้าน C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *C. gilvus* มีความสำคัญสำหรับการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสับสเตรท (Cicek *et al.*, 2000)

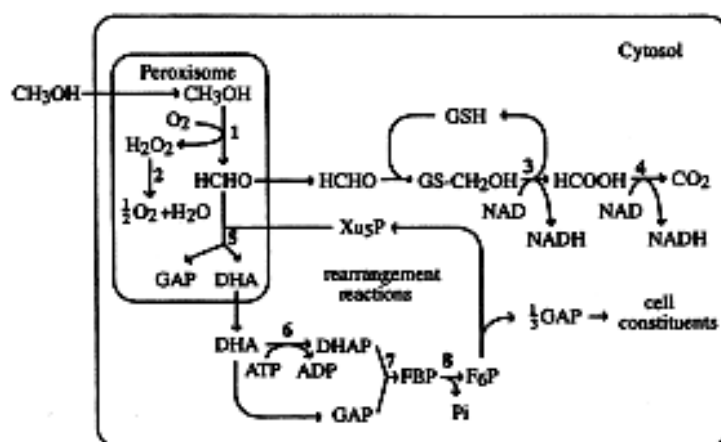
สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืชพบงานวิจัยมากมาย เช่น การทำการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ลินามารส ด้วยวิธีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ E413G และ Q339 ไม่แสดงกิจกรรม เนื่องจากตำแหน่งที่กลายพันธุ์เป็นตำแหน่ง nucleophile และ acid/base catalyst ตามลำดับ เอนไซม์กลายพันธุ์ A201V มีค่า pK_a ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7.22 เป็น 7.44 ส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ F269N น่าจะเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของเอนไซม์เนื่องจากมันทำให้ค่า K_m ของการย่อยสลายลินามารินและ *pNP-Glc* เพิ่มขึ้น 16 เท่า และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (Keresztesy *et al.*, 2001) จากการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทระหว่างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวโพด (*ZmGlu1*) ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้มากมายนอกเหนือจากสับสเตรทตามธรรมชาติของมัน (DIMBOA-Glc) แต่ไม่สามารถย่อยสลาย *dhurrin* ได้ กับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวฟ่าง (*SbDhr1*) ซึ่งสามารถย่อยสลายได้เฉพาะ *dhurrin* ที่เป็นสับสเตรทตามธรรมชาติ โดยทำการแลกเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C-terminus ซึ่งกันและกันของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เมื่อศึกษาโครงสร้างและทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่า S462 S463 และ F469 ของ *SbDhr1* ซึ่งตรงกับลำดับกรดอะมิโน F466 A467 และ Y473 ของ *ZmGlu1* เป็นตำแหน่งที่จับกับอะไกลโคนของ *SbDhr1* เนื่องจากตำแหน่งเหล่านี้สามารถทำให้ *ZmGlu1* ย่อยสลาย *dhurrin* ได้ (Cicek *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ *ZmGlu1* กลายพันธุ์ที่แทนที่ F198 ด้วยเวเลินของ *SbDhr1* จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ คือทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายเบต้า-กลูโคไซด์ได้เลย เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างผลึกของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท และเอนไซม์-อะไกลโคนของ

ZmGlu1 พบว่ามีกรดอะมิโน 4 ตัวคือ F198 F205 W378 และ F466 เป็นตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณจับอะไกลโคน (Czjzek *et al.*, 2000) ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 4 ตัวของ ZmGlu1 นี้จะตรงกับกรดอะมิโน N189 F196 W368 และ A454 ของเอนไซม์คัลโคซิเนส และตรงกับกรดอะมิโน F205 F212 W385 และ N472 ของเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

6. การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนใน *Pichia pastoris*

ในการผลิตโปรตีนเพื่อศึกษาการทำงานนั้นเราควรคำนึงถึงสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการผลิตด้วย *Pichia pastoris* เป็นยีสคาร์ิโอตชั้นสูงที่มีข้อดีหลายอย่าง เช่น มีขั้นตอนการหมักพบโปรตีนและการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์คล้ายกับขั้นตอนที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทั่วไป *P. pastoris* เลี้ยงง่าย โตเร็ว ใช้อาหารที่มีราคาถูกกว่ายีสคาร์ิโอตที่ใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดอื่น (Invitrogen, n.d.) และสามารถนำไปใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังไม่ต้องกังวลถึงปัญหาจากสารพิษภายใน (endotoxin) เหมือนในแบคทีเรีย หรือปัญหาการปนเปื้อนจากไวรัสเหมือนในเซลล์สัตว์ (Cino, n.d.)

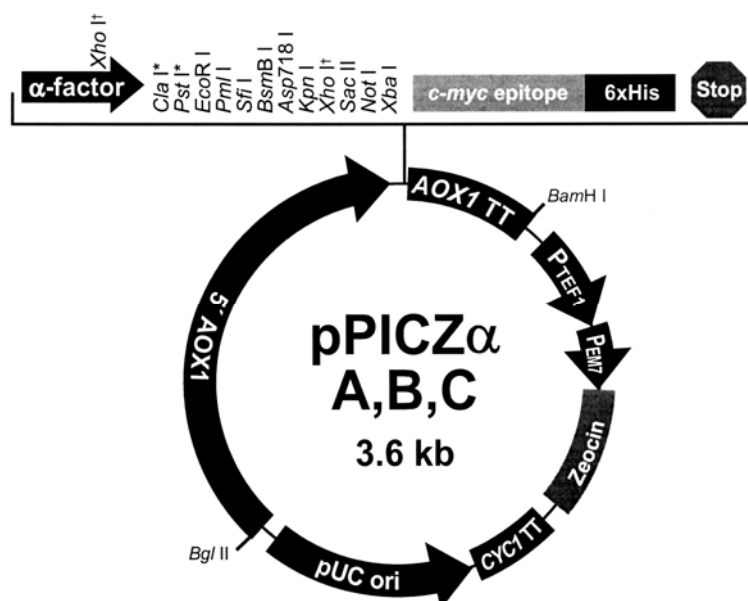
P. pastoris เป็น methylotrophic yeast ที่สามารถใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ กลไกการสลาย methanol จะเกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase) จะนำออกซิเจนมาให้ methanol ทำให้ methanol กลายเป็นฟอร์มัลดีไฮด์และปล่อยไฮดรอกเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ออกมา ดังภาพที่ 7 หลังจากนั้นฟอร์มัลดีไฮด์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อไป แต่ไฮดรอกเจนเปอร์ออกไซด์จะเป็นพิษกับเซลล์ ดังนั้นกลไกการย่อยสลาย methanol จึงเกิดขึ้นภายในเพอรอกซิโซม (peroxisome) เพื่อจะได้กำจัดไฮดรอกเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากเซลล์ได้ง่าย *P. pastoris* สามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสได้เป็นจำนวนมากเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย methanol ดังนั้นจึงมีการนำโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส มาใช้ในการควบคุมการผลิตเฮเทอโรกัสโปรตีน ซึ่งยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสมีด้วยกัน 2 ยีน คือ *AOX1* และ *AOX2* ส่วนมากเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่พบในเซลล์จะผลิตมาจากยีน *AOX1* การควบคุมการแสดงออกของยีน *AOX1* จะอยู่ในระดับการถอดรหัส (transcription) โดยจะเกี่ยวข้องกับกลไก 2 กลไก คือ กลไก repression/derepression และกลไกการเหนี่ยวนำ (induction) กล่าวคือถ้ามี methanol จะไปชักนำให้เกิดการถอดรหัสของยีน *AOX1* ในทางกลับกันถ้าขาด methanol การถอดรหัสของยีน *AOX1* ก็ไม่เกิดขึ้น (Cereghino and Cregg, 2000)



ภาพที่ 7 กลไกการสลาย methanol ใน *Pichia pastoris* 1 alcohol oxidase; 2 catalase; 3 formaldehyde dehydrogenase; 4 formate dehydrogenase; 5 dihydroxyacetone synthase; 6 dihydroxyacetone kinase; 7 fructose 1,6-biphosphate aldolase; 8 fructose 1,6-biphosphatase

ที่มา: Cereghino and Cregg (2000)

การแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris* ทำได้โดยอาศัยการโคลนยีนที่สนใจเข้าสู่พลาสมิด pPICZαB (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ออกแบบมา ให้สามารถแสดงออกได้ทั้งใน *E.coli* และ *P. pastoris* (Invitrogen, n.d.)



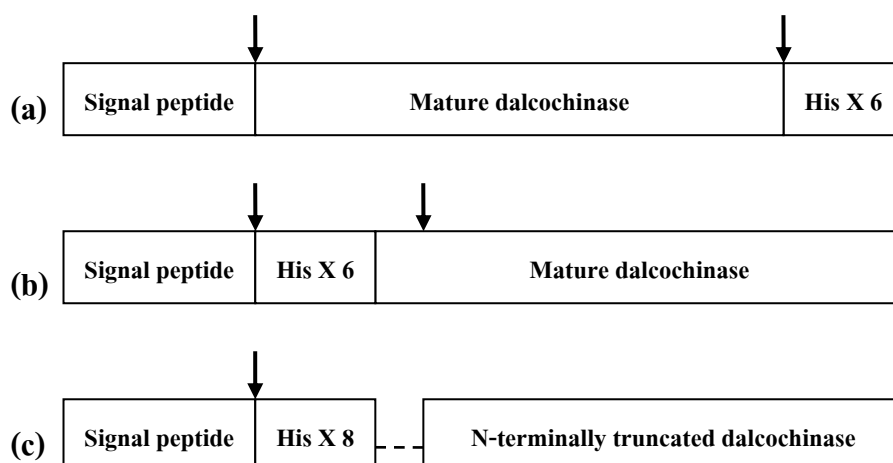
ภาพที่ 8 พลาสมิด pPICZαB ประกอบด้วย (a) pUC ori คือจุดเริ่มต้นของกระบวนการจำลองตัว (replication) (b) 5' *AOX1* เป็นโปรโมเตอร์สำหรับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน (c) α-factor signal เป็นตัวส่งโปรตีนออกสู่เซลล์ (d) multiple cloning site เป็นบริเวณที่จะใส่ยีนของโปรตีนที่ต้องการให้แสดงออก (e) *c-myc* epitope เป็นยีนของโปรตีน *myc* ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จะจับกับ anti *myc* antibody (f) 6xHis คือฉลากฮิสติดีน (polyhistidine tag) ซึ่งประกอบด้วยฮิสติดีน 6 ตัวใช้สำหรับจับกับนิกเกิลในคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography เพื่อให้โปรตีนบริสุทธิ์ (g) *AOX1* TT คือ จุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีน *AOX1* (h) P_{TEF1} เป็นโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin ใน *P. pastoris* (i) P_{EM7} เป็นโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin ใน *E. coli* (j) zeocin คือยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin (k) *CYC1* TT คือจุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin

ที่มา: Invitrogen (n.d.)

7. การสร้างยีนรีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส

ก่อนหน้านี้ได้ทำการโคลนยีนคัลโคซิเนส “TRBG-His6” ซึ่งมีฉลากฮิสติดีน (polyhistidine tag) อยู่ทางด้านปลาย C-terminus ของโปรตีน (ภาพที่ 9a) ใส่ในพลาสมิด pPICZαB และให้มีการแสดงออกใน *P. pastoris* พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลาย pNP-Glc ได้ แต่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ได้ คาดว่าน่าจะเกิดการตัดโปรตีนทางด้านปลาย C-terminus ในระหว่างกระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) จึงได้มีการนำฉลากฮิสติดีนมาวางไว้อยู่ทางด้านปลาย N-terminus ของยีนคัลโคซิเนส “His6-TRBG” (ภาพที่ 9b) แล้วทำการโคลนใส่ในพลาสมิด pPICZαB และให้มีการแสดงออกใน *P. pastoris* ปรากฏว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลาย pNP-Glc ได้ แต่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ได้ จึงนำโปรตีนที่ได้จากโครงสร้างนี้ไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminus ของโปรตีนขาดหายไป 12 ตัว คาดว่าน่าจะเป็นบริเวณตัดของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างกระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์ทางปลาย N-terminus ของเอนไซม์คัลโคซิเนสมีผลทำให้ฉลากฮิสติดีนถูกตัดออกไปด้วย

ดังนั้นได้มีการทำการโคลนยีนคัลโคซิเนสใหม่ “His8-truncTRBG” โดยให้ฉลากฮิสติดีนซึ่งประกอบด้วยฮิสติดีน 8 ตัว อยู่ทางปลาย N-terminus ของยีนคัลโคซิเนสที่เริ่มต้นลำดับกรดอะมิโนด้วย VPPFN ซึ่งอยู่หลังบริเวณตัดของเอนไซม์โปรติเอส (ภาพที่ 9c) แล้วใส่ในพลาสมิด pPICZαB โดยเรียกชื่อพลาสมิดนี้ว่า pPICZ-His8-truncTRBG จากนั้นให้มีการแสดงออกใน *P. pastoris* พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ได้ ดังนั้นจึงได้นำพลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG นี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 9 การสร้างยีนรีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งตัดของเอนไซม์โปรตีเอสในกระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์

(a) ยีนคัลโคซิเนส TRBG-His6 ซึ่งมีฉลากฮิสติดีนอยู่ทางด้านปลาย C-terminus,

(b) ยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ซึ่งมีฉลากฮิสติดีนอยู่ทางด้านปลาย N-terminus

และ (c) ยีนคัลโคซิเนส His8-truncTRBG ซึ่งเริ่มต้นลำดับกรดอะมิโนด้วย VPPFN และมีฉลากฮิสติดีนอยู่ทางด้านปลาย N-terminus

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

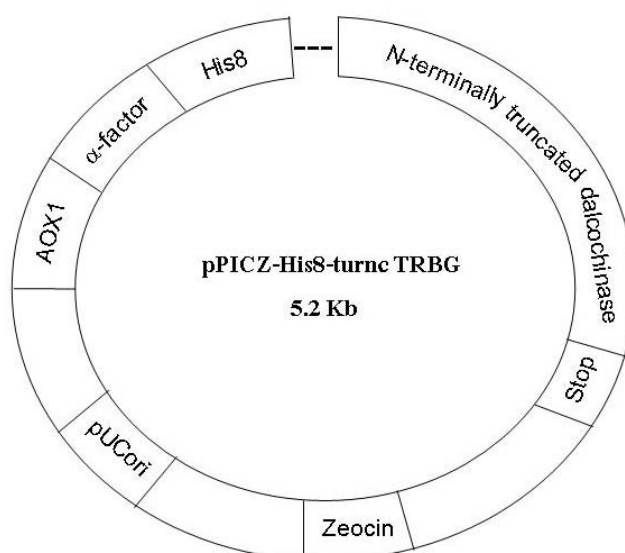
1. เชื้อและพลาสมิด

1.1 *Pichia pastoris* (GS115) genotype *his4*

1.2 *Escherichia coli* (DH5 α) genotype *supE44* Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17*
*recA1**endA1**gyrA96**thi-1**relA1*

1.3 *Escherichia coli* (XL1-Blue) genotype *supE44**hsdR17**recA1**endA1**gyrA46**thi**relA1*
lac⁻ F' [*proAB*⁺*lacI*^h*lacZ* Δ M15 Tn10(*tet*^r)]

1.4 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG ที่มีลำดับเบสของฮิสติดีน 8 ตัวตามด้วยยีนของ คัลโคซิเนส (ลำดับกรดอะมิโนเริ่มที่ VPPFN) ดังภาพที่ 10 ซึ่งได้มาจาก ผศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 10 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG ประกอบด้วย จุดเริ่มต้นของกระบวนการ จำลองตัว (pUCori) โปรโมเตอร์ *AOX1* ตัวส่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ (α -factor) ยีนคัลโคซิเนสที่เริ่มต้นลำดับกรดอะมิโนด้วย VPPFN โดยมีฉลาก ฮิสติดีนอยู่ทางด้านปลาย N-terminus และยีนต้านยาปฏิชีวนะ zeocin

2. สารเคมีและเอนไซม์

2.1 คัลโคซิเนสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.2 ลินามาริน (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.3 ลินามาเรสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.4 Acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.5 Agarose (Research Organics, USA)

2.6 Amicon Ultra Centrifugal Filter (Millipore, USA)

2.7 alpha-D-Methylglucoside (ACROS organics, USA)

2.8 Ammonium Sulphate (Ajax Finechem, Australia)

2.9 Bis-acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.10 Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce, USA)

2.11 Dalcichinin-glucoside (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.12 Dimethylsulphoxide (DMSO) (Lab-Scan, Thailand)

2.13 ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham, Sweden)

2.14 Ethanol (Carlo ERBA, Italy)

2.15 Ethyl acetate (Carlo ERBA, Italy)

2.16 Glucose Oxidase Kit (Bio-Medical Laboratory, Thailand)

2.17 Imidazole (ICN Biomedicals, Germany)

2.18 *iso*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.19 *iso*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)

2.20 Methanol (Lab-Scan, Thailand)

2.21 *n*-Butanol (Lab-Scan, Thailand)

2.22 Ni-NTA Superflow (Qiagen, Germany)

2.23 *n*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)

2.24 NucleoSpin® Plasmid kit (Macherey-Nagel, Germany)

- 2.25 *para*-nitrophenyl- β -D-fucopyranoside (*p*NP-Fuc) (Sigma, USA)
- 2.26 *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) (Sigma, USA)
- 2.27 PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, Germany)
- 2.28 pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA)
- 2.29 Phenyl-Sepharose CL-4B (Amersham, Sweden)
- 2.30 QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)
- 2.31 Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako Cytomation, Denmark)
- 2.32 *SacI* (Fermentas, USA)
- 2.33 *sec*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.34 Sodium acetate (Merck, Germany)
- 2.35 Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.36 *tert*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.37 Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets (Merck, Germany)
- 2.38 Zeocin (Invitrogen, USA)

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ทุกรายการเป็น analytical grade

วิธีการ

1. เทคนิคทางรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียม competent *E. coli* (DH5 α)

การเตรียม competent *E. coli* (DH5 α) สำหรับถ่ายยีนโดยวิธี electroporation นั้น ทำโดยนำเซลล์ *E. coli* มา 1 โคโลนี เลี้ยงใน LB [1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl] ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์มาใส่ใน LB ปริมาตร 200 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C จนกว่าค่า OD₆₀₀ = 0.5-1 แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 15-30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นนำเซลล์มาละลายในน้ำเย็นปริมาตร 200 ml แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่สภาวะเดิม ทิ้งส่วนใสแล้วเติมน้ำเย็นปริมาตร 100 ml เพื่อละลายเซลล์แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงทิ้งส่วนใสแล้วนำเซลล์มาละลายใน 10%(w/v) glycerol ที่เย็นปริมาตร 4 ml เอาไปหมุนเหวี่ยง

จากนั้นนำเซลล์ที่ได้เติมด้วย 10%(w/v) glycerol ขึ้นปริมาตร 0.4 ml (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ $1-3 \times 10^{10}$ cell/ml) แบ่งใส่หลอดๆละ 40 μ l เก็บที่อุณหภูมิ -70°C ซึ่งสามารถเก็บได้นาน 6 เดือน

สำหรับการเตรียม competent *E. coli* ในการถ่ายยีนโดยวิธี heat shock นั้น จะนำเซลล์ *E. coli* มา 1 โคโลนี เลี้ยงใน LB ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์มาใส่ใน LB ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จนกว่าค่า $\text{OD}_{600} = 0.1$ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายเซลล์ด้วย 0.1 M CaCl_2 ปริมาตร 10 ml แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายเซลล์อีกครั้งด้วย 0.1 M CaCl_2 ปริมาตร 2 ml

1.2 การขนถ่ายยีนดัดโคชินเนสเข้าสู่ competent *E. coli* โดยวิธี electroporation

นำ competent cell *E. coli* (DH5 α) จากข้อ 1.1 มา 40 μ l และ พลาสมิดประมาณ 1-10 ng ใส่ในหลอดที่แช่เย็น แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งนาน 0.5-1 นาที ใช้ pasteur pipette ดูดเซลล์ไปใส่ใน cuvette เคาะ cuvette เบาๆให้เซลล์นอนก้น สำหรับการถ่ายยีนโดยวิธี electroporation จะทำการปรับเครื่อง Gene PulserTM ที่ 25 μF , 200 Ω , 2.5 kv แล้วกดปุ่ม pulse จากนั้นเติม LB pH 7.5 ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เอาอาหารออก 800 μ l ที่เหลือ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB pH 7.5 [1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl, 1.5%(w/v) agar] ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

1.3 การขนถ่ายยีนดัดโคชินเนสเข้าสู่ competent *E. coli* ด้วยวิธี heat shock

นำ competent cell *E. coli* (DH5 α) จากข้อ 1.1 มา 200 μ l และพลาสมิด 10 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แช่ในน้ำแข็งโดยทันทีนาน 2 นาที แล้วเติม LB ปริมาตร 1 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น spread เชื้อปริมาตร 250 μ l บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 0.1 M isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) และ 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalactoside (XGAL) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

สำหรับ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue (จากชุด QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, USA) จะกระทำโดยนำ competent cell มา 50 µl และพลาสมิด 1 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที แช่ในน้ำแข็งโดยทันทีนาน 2 นาที แล้วเติม LB pH 7.5 ปริมาตร 0.5 ml บ่มพร้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น spread เชื้อปริมาณ 250 µl บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB pH 7.5 ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

1.4 การสกัดพลาสมิดจาก *E.coli*

นำเชื้อจากข้อ 1.2 หรือ ข้อ 1.3 มา 1.5 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วเติม solution 1 [50 mM กลูโคส, 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0] ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันอย่างแรง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ต่อจากนั้นเติม solution 2 [1% SDS, 0.2 M NaOH] ปริมาตร 200 µl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที หลังจากนั้นเติม solution 3 ที่เย็น [3 M potassium acetate, 2 M acetic acid] ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 100%(v/v) ethanol ปริมาตร 900 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70%(v/v) ethanol ปริมาตร 150 µl หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสทิ้งไป เปิดฝาหลอดรอให้ตะกอนพลาสมิดแห้ง ละลายตะกอนพลาสมิดด้วย TE buffer [10 mM Tris.HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA] ปริมาตร 20 µl

สำหรับการสกัดพลาสมิดจาก *E.coli* เพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ จะใช้ NucleoSpin® Plasmid kit ในการสกัด โดยนำโคลนจาก ข้อ 1.2 หรือ 1.3 มา 1 โคลนเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB pH 7.5 ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 µg/ml ปริมาตร 6 ml บ่มที่พร้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นดูดเชื้อมาปริมาณ 5 ml เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีนดัลโคซิเนสเพื่อให้แน่ใจว่ามีลำดับเบสที่ถูกต้อง โดยในการหาลำดับเบสนั้นจะส่งไปทำที่ Bioservice Unit (BSU)

1.5 การเตรียมพลาสมิดให้อยู่ในรูปเส้นตรง

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 1.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ตรวจสอบว่าพลาสมิดถูกตัดหมดแล้วโดยนำสารละลายมา 2 µl ไปวิเคราะห์ด้วย 1%(w/v) agarose gel ใน 1X TAE [40 mM Tris, 0.1142%(v/v) acetic acid, 2 mM EDTA, pH8.5] และย้อมด้วย 10 mg/ml ethidium bromide นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 15 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอที่ได้ว่าถูกตัดเป็นเส้นตรงหมดหรือไม่ ต่อจากนั้นทำการตกตะกอนพลาสมิดที่เป็นเส้นตรงที่เหลือนด้วยวิธี ethanol precipitation ซึ่งทำโดยเติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมด และเติม 100%(v/v) ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมด บ่มในน้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70%(v/v) ethanol ปริมาตร 100 µl นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1-3 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 10 µl

1.6 การเตรียม competent *P. pastoris*

นำโคโลนี *P. pastoris* มาเลี้ยงในอาหาร YPD [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) กลูโคส] ปริมาตร 5 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เลี้ยงข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อมาปริมาตร 1 ml ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 50 ml บ่มที่สภาวะเดิมข้ามคืน ทำการเก็บเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำเย็นที่ปลอดเชื้อปริมาตรเท่ากับอาหารที่เลี้ยงเชื้อ หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1 M sorbitol ที่เย็นปริมาตรเท่ากับอาหารที่เลี้ยงเชื้อ หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที เติม 1 M sorbitol ที่เย็นประมาณ 1-2 ml วัด OD₆₀₀ ให้ได้ประมาณ 100

1.7 การขนถ่ายยีนดัดโคชินเนสเข้าสู่ competent *P. pastoris* โดยวิธี electroporation

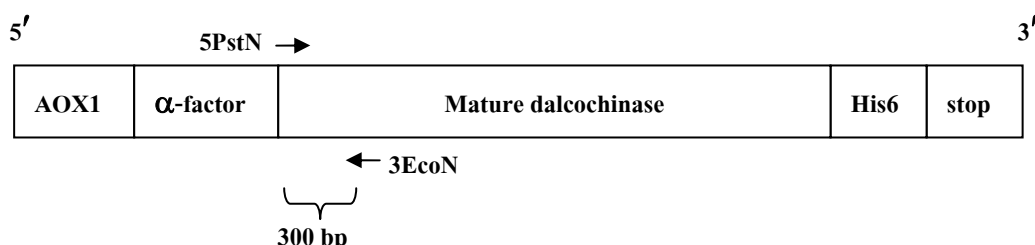
นำ competent cell *P. pastoris* จากข้อ 1.6 มา 80 µl และพลาสมิดที่ถูกตัดเป็นเส้นตรง แล้วตามข้อ 1.5 มา 10 µl ใส่ในหลอดที่แช่เย็น บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที ในการถ่ายพลาสมิดโดยวิธี electroporation จะทำการปรับเครื่อง Gene Pulser™ ที่ 25 µF, 200 Ω, 1.5 kv แล้วกดปุ่ม pulse

จากนั้นเติม 1 M sorbitol ที่เย็นปริมาตร 1 ml โดยทันที แล้ว spread เชื้อทั้งหมดบนอาหาร YPDS [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) กลูโคส, 1 M sorbitol, 2%(w/v) agar] ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 100 µg/ml ปุ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 4-5 วัน

2. การโคลนยีนดัลโคซิเนส His6-TRBG

2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 5' ของยีนดัลโคซิเนสที่มีฉลากฮิสติดีน

นำพลาสมิด pPICZαB ที่มียีน TRBG-His6 (ภาพที่ 9a) มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ไพรเมอร์ 5PstN เป็น forward primer โดยออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณตัดจำเพาะ (cutting site) ของเอนไซม์ *Pst*I ตามด้วยลำดับเบสของฮิสติดีน 6 ตัว โดยไพรเมอร์ 5PstN จะจับทางปลาย 5' ของยีนดัลโคซิเนส TRBG-His6 และใช้ไพรเมอร์ 3EcoN เป็น reverse primer โดยออกแบบให้ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 3EcoN อยู่ห่างจากปลายด้าน 5' ของยีนดัลโคซิเนส TRBG-His6 เข้าไปประมาณ 300 bp ตามด้วยลำดับเบสที่เป็นบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ 5PstN และ 3EcoN ในพลาสมิด pPICZαB ที่มียีนดัลโคซิเนส TRBG-His6 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้คือ

ไพรเมอร์ 5PstN %GC = 39 ความยาว 23 bases

5' GCT GCA GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT ATT GAC TTT GCA AAA GAA GTC CG 3'

ไพรเมอร์ 3EcoN %GC = 56 ความยาว 25 bases

5' GGG AGA ATT CTA GGC CAG GAG ATG G 3'

โดยใช้สภาวะดังนี้

1 รอบ	97 °C	3 นาที	เติมเอนไซม์ DNA polymerase ปริมาณ 2.6 U
	37 °C	5 นาที	
3 รอบ	97 °C	1 นาที	
	45 °C	30 วินาที	
	72 °C	1 นาที	
29 รอบ	94 °C	1 นาที	
	45 °C	30 วินาที	
	72 °C	1 นาที	
1 รอบ	72 °C	8 นาที 30 วินาที	
	4 °C	∞	

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1.5%(w/v) agarose gel ที่มี 10 mg/ml ethidium bromide ใน 1X TAE จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นสูง แล้วทำการตัดเจลบริเวณรอบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 bp แล้วนำเจลที่ถูกตัดไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin[®] Extract II ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาณ 3 U แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นทำการขนถ่าย พลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วเข้าสู่ competent cell *E. coli* (DH5α) ด้วยวิธี heat shock แล้วทำการเลือกเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวเลี้ยงใน LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* (ตามวิธีการทดลองข้อ 1.3-1.4) แล้วตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Eco*RI ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วย 1.5%(w/v) agarose gel ที่มี 10 mg/ml ethidium bromide ใน 1X TAE จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นสูง แล้วทำการตัดเจลบริเวณรอบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 bp นำเจลที่ถูกตัดไปสกัด ดีเอ็นเอโดยใช้ PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin[®] Extract II ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

2.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 3' ของยีนดัลโคซิเนส

นำพลาสมิด pPICZ α B ที่มียีนดัลโคซิเนส TRBG-His6 (ภาพที่ 9a) มาตัดด้วยด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Eco*RI บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วย 0.75%(w/v) agarose gel ที่มี 10 mg/ml ethidium bromide ใน 1X TAE จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นสูง แล้วทำการตัดเจลบริเวณรอบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 4.9 kb นำเจลที่ถูกตัดไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin[®] Extract II ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

2.3 การโคลนยีนดัลโคซิเนส His6-TRBG ที่มีฉลากฮิสติดีนทางปลาย N-terminus เข้าสู่

E. coli และ *P. pastoris*

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 และข้อ 2.2 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาณ 3 U แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน เรียกพลาสมิดที่ได้นี้ว่า pPICZ-His6-TRBG หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิด pPICZ-His6-TRBG เข้าสู่ competent cell *E. coli* (DH5 α) แล้วด้วยวิธี electroporation (ตามข้อ 1.2) ทำการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีนดัลโคซิเนส จากนั้นนำเซลล์มา 1 โคโลนี เลี้ยงใน LB pH 7.5 ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μ l/ml ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิด หลังจากนั้นตัดพลาสมิดให้เป็นเส้นตรง ทำการขนถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent *P. pastoris* โดยวิธี electroporation (ตามวิธีข้อ 1.4-1.7) แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้เพื่อหาโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสในปริมาณมาก (ดูข้อ 5.1)

3. การโคลนยีนดัลโคซิเนส His8-truncTRBG

ทำการขนถ่ายพลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG (ได้มาจาก ผศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) เข้าสู่ competent *E. coli* โดยวิธี electroporation ตามข้อ 1.2 ทำการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* เพื่อหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีนดัลโคซิเนส จากนั้นนำเซลล์มา 1 โคโลนี เลี้ยงใน LB pH 7.5 ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μ l/ml ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิด หลังจากนั้นตัดพลาสมิดให้เป็นเส้นตรง ทำการขนถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent *P. pastoris* โดยวิธี electroporation (ตามวิธีข้อ

1.4-1.7) แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่ได้เพื่อหาโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์ตัดโคชีเนสในปริมาณมาก (ดูข้อ 5.1)

4. การทำการกลายพันธุ์ของยีนตัดโคชีเนสที่ตำแหน่งจำเพาะ

4.1 การหาตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์

ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ตัดโคชีเนสกับเอนไซม์ลีนามารส ด้วยวิธี CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment และตรวจสอบตำแหน่งของแขนงข้าง (side chain) ในโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ตัดโคชีเนส เพื่อหาตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) โดยในการทดลองนี้จะทำการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งคือ กรดอะมิโนแอสปารากีนในตำแหน่งที่ 189 ของตัดโคชีเนสซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน เบนิลอะลานีนของลีนามารส (N189F) และกรดอะมิโนอะลานีนในตำแหน่งที่ 454 ของตัดโคชีเนสจะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนแอสปารากีนของลีนามารส (A454N) โดยทั้ง 2 ตำแหน่งนี้คาดว่าจะอยู่ในส่วนที่เป็นบริเวณจับอะไกลโคน (aglycone binding pocket) และมีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันระหว่างตัดโคชีเนส กับลีนามารส

4.2 การออกแบบไพรเมอร์กลายพันธุ์

ทำการออกแบบไพรเมอร์กลายพันธุ์ (mutagenic primers) ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นจะมีลักษณะดังนี้

- ไพรเมอร์ทั้ง 2 สายควรมีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ต้องการอยู่ตรงกลางของสายไพรเมอร์และมีลำดับเบสคู่สมกัน และคู่สมกับลำดับเบสของยีนตัดโคชีเนสที่อยู่บนสายของพลาสมิด
- ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีความยาวประมาณ 25-45 เบส และมี melting temperature (T_m) ≥ 78 °C ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า 45 เบส อาจจะนำมาใช้ได้ แต่การใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากๆจะทำให้เกิดการสร้างเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของไพรเมอร์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการกลายพันธุ์
- $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$ โดยที่ N คือ จำนวนเบสของไพรเมอร์

- ไพรเมอร์ที่ดีควรมี %GC อย่างน้อยที่สุดประมาณ 40% และควรมีเบส C หรือ G 1 เบส หรือมากกว่านั้น อยู่ทางด้านปลายของไพรเมอร์

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้คือ

N189F

ไพรเมอร์ BeerN189Ffor %GC = 53 ความยาว 38 bases

5' GAG CCA TCA AT **C TTC** ACC GCG TTT GGG TAT GCA TAC GG 3'

ไพรเมอร์ BeerN189Frev %GC = 53 ความยาว 38 bases

5' CCG TAT GCA TAC CCA AAC GCG GT **G AAG** ATT GAT GGC TC 3'

A454N

ไพรเมอร์ BeerA454Nfor %GC = 41 ความยาว 46 bases

5' GGT CAT TGT TGG ACA **ACT** TTG AAT GGA ATG AGG GTT ATA CAT CAC G 3'

ไพรเมอร์ BeerA454Nrev %GC = 41 ความยาว 46 bases

5' CGT GAT GTA TAA CCC TCA TTC CAT TCA AA **G TTG** TCC AAC AAT GAC C 3'

4.3 การทำปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

ทำปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) โดยใช้ QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit ซึ่งในปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์จะกระทำโดยเดิมสารดังต่อไปนี้

pPICZ-His8-truncTRBG template (50 ng)	2	μl
10x reaction buffer	5	μl
25 ng/μl oligonucleotide primer # 1	5	μl
25 ng/μl oligonucleotide primer # 2	5	μl
dNTP mix	1	μl
น้ำกลั่น	32	μl
ปริมาตรรวม	50	μl

หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ 2.5 U/μl *PfuUltra* HF DNA polymerase ปริมาตร 1 μl แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้สภาวะดังนี้

1 รอบ	95 °C	30 วินาที
16 รอบ	95 °C	30 วินาที
	55 °C	1 นาที
	68 °C	5 นาที
1 รอบ	4 °C	∞

จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติมเอนไซม์ 10 U/μl *Dpn* I ปริมาตร 1 μl เพื่อทำลายดีเอ็นเอแม่แบบที่ไม่ได้เกิดการกลายพันธุ์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4 การขนถ่ายยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E. coli* (XL1-Blue) และ *P. pastoris*

ทำการขนถ่ายพลาสมิดที่มียีนดัดโคชินสกลายพันธุ์จากข้อ 4.3 เข้าสู่ competent *E. coli* (XL1-Blue) โดยวิธี heat shock ตามข้อ 1.3 ทำการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีนดัดโคชินสเพื่อให้แน่ใจว่าเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งที่ถูกต้อง จากนั้นนำเซลล์มา 1 โคโลนี เลี้ยงใน LB pH 7.5 ที่มีสารปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μl/ml ปริมาตร 2 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิด ดัดพลาสมิดให้เป็นเส้นตรง แล้วทำการขนถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent *P. pastoris* โดยวิธี electroporation (ตามวิธีข้อ 1.4-1.7) ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้เพื่อหาโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์ดัดโคชินส กลายพันธุ์ในปริมาณมาก (ดูข้อ 5.1)

5. การแสดงออกของเอนไซม์ดัดโคชินสโดย *P. pastoris*

5.1 การคัดเลือกโคโลนีที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ดัดโคชินสในปริมาณมาก

เลี้ยง *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนดัดโคชินสในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulfate, 1%(w/v) glycerol, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 4x10⁻⁵%(w/v) biotin, 0.004% (w/v) histidine] ปริมาตร 5 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น

แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงใน BMMY [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulfate, 0.5%(w/v) cassamino acid, 0.5%(v/v) methanol, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 4×10^{-5} %(w/v) biotin, 0.004% (w/v) histidine] ปริมาตร 5 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วเติม 100%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยให้อาหารมีความเข้มข้น 0.5%(v/v) methanol เลี้ยงไปประมาณ 4-6 วัน แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ตามข้อ 7.1) เพื่อเลือกโคโลนีที่มีการทำงานสูงสุด

5.2 การเลือกอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแสดงออกของ *P. pastoris*

นำโคโลนี *P. pastoris* ที่ได้จากข้อ 2.3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1%(w/v) glycerol ปริมาตร 5 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารที่มี 0.5%(v/v) methanol ปริมาตร 5 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วเติม 100%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยให้อาหารมีความเข้มข้น 0.5%(v/v) methanol เลี้ยงไปประมาณ 4-6 วัน แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ตามข้อ 7.1) โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีดังนี้

(1) BMGH [0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulfate, 1%(w/v) glycerol, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 4×10^{-5} %(w/v) biotin, 0.004% (w/v) histidine] เปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ใน BMMH [0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulfate, 0.5%(v/v) methanol, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 4×10^{-5} %(w/v) biotin, 0.004% (w/v) histidine]

(2) BMGY [เหมือน BMGH แต่เพิ่ม 1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone] เปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ใน BMMY [เหมือน BMGY แต่เปลี่ยนจาก 1%(w/v) glycerol เป็น 0.5%(v/v) methanol]

(3) MGYH [เหมือน BMGH แต่ไม่ต้องปรับ pH ด้วย 100 mM potassium phosphate, pH 6.0] เปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ใน MMH [เหมือน MGYH แต่เปลี่ยนจาก 1%(w/v) glycerol เป็น 0.5%(v/v) methanol]

5.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสในปริมาณมาก

เลี้ยง *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนคัลโคซิเนสใน BMGH ปริมาตร 20 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เหย้าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วเลี้ยงต่อใน BMGH ปริมาตร 150 ml ต่ออีก 1 คืน จากนั้นนำมาหมวนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหมวนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงใน BMMH ที่เติม 0.5%(w/v) cassamino acid โดยให้ OD₆₀₀ เริ่มต้นประมาณ 10 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เหย้าให้มีความเร็วรอบ 180-200 rpm ข้ามคืน แล้วเติม 100%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยให้อาหารมีความเข้มข้น 0.5%(v/v) methanol แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 5.1 เลี้ยงเชื้อไปจนกระทั่งกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มอีกต่อไป

6. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (purification)

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่ผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสไปผ่านการกรองด้วย ultrafiltration ซึ่งมีรูของเมมเบรนขนาด 30 กิโลดาลตัน เพื่อลดปริมาตรสารละลาย จากนั้นเติม ammonium sulfate ให้มีความเข้มข้น 1 M แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 ที่มี 1 M ammonium sulfate และชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 แล้วเก็บเป็น fraction ทั้งหมด 10 fraction แต่ละ fraction มีปริมาตร 2 ml ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละ fraction ตามข้อ 5.1 แล้วรวม fraction ที่มีการทำงานของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน

นำ fractions ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose มาปรับ pH ให้ได้ pH 8 ด้วยการไดอะลิซิส (dialysis) กับ 10 mM sodium phosphate, pH 8.0 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Ni²⁺-ion affinity chromatography (Ni-NTA) จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) แล้วชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) เก็บ fraction ไว้ทั้งหมด 10 fraction แต่ละ fraction มีปริมาตร 1 ml ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละ fraction ตามข้อ 5.1 แล้วรวม fraction ที่มีการทำงานของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน นำไปผ่าน amicon ultra centrifugal filter ที่มีรูของเมมเบรนขนาด 30 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัด imidazole จากนั้นละลาย

เอนไซม์ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 1-5 ml ต่อจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์หิโกลโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจล (ตามข้อ 8) อิโกลโทรโฟริซิสแบบนอน-ซีแนซเซอร์ริง-พอลิอะครีลาไมด์เจล (ตามข้อ 9) เวสเตอร์นอิมมูโนวิเคราะห์ (ตามข้อ 10) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit แล้วเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ซึ่งจะเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพผนวกที่ ก1)

7. การวัดกิจกรรมเอนไซม์

7.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

ทำโดยนำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มกับ 1 mM *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNP-Glc) ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ให้ได้ปริมาตรรวม 500 μl บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm แล้วเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenyl (pNP) ซึ่งทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน pNP ที่มีความเข้มข้น 0-1 mM ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้ได้ปริมาตรรวม 500 μl จากนั้นเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm (ภาพผนวกที่ ก2)

7.2 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณกลูโคส

การหาปริมาณกลูโคสที่เป็นผลผลิตจากการสลายสับสเตรท 3 ชนิดคือ *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNP-Glc), dalcochinin glucoside และลินามาริน ใช้เอนไซม์ ปริมาตร 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 0-50 mM pNP-Glc, 0-15 mM dalcochinin glucoside และ 0-50 mM ลินามาริน ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 μl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วต้มเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม glucose oxidase reagent ปริมาตร 1 ml ต่อจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm แล้วเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานกลูโคส ซึ่งทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0-3 mM โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 μl ต้มเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม glucose oxidase reagent ปริมาตร 1 ml บ่มที่

อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm (ภาพผนวกที่ ก3) ค่าจลนพลศาสตร์ที่ได้คำนวณมาจากสมการของ Michaelis-Menten โดยใช้โปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software)

8. อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

ทำการวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE) โดยการเตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel (ตารางผนวกที่ ข1) โดยเติม 10% (w/v) ammonium persulfate และ TEMED ในขั้นตอนสุดท้าย นำละลายสารตัวอย่างใน 1X sample buffer [1%(w/v) SDS, 5%(w/v) glycerol, 1.25%(v/v) β -mercaptoethanol, 0.0025%(w/v) coomassie blue G, 12.5 mM Tris, pH 6.8] ต้มเป็นเวลา 10 นาที หยอดตัวอย่างลงในแต่ละช่องของพอลิอะคริลาไมด์เจล หลังจากนั้นต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำเจลไปผ่านกระแสไฟฟ้า 30 mA ใน 1X running buffer [25 mM Tris, pH8.3, 0.2 M glycine, 0.1%(w/v) SDS] เป็นเวลา 90 นาที นำเจลที่ได้ไปแช่ใน 50%(w/v) methanol เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วย staining solution [0.125%(w/v) coomassie blue R, 45%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid] เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีออกด้วย destaining buffer [25%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid] เป็นเวลา 15 นาที

9. อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนซเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล

ทำการวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนซเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis หรือ non-denaturing PAGE) โดยการเตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel (ตารางผนวกที่ ข2) โดยเติม 10% (w/v) ammonium persulfate และ TEMED ในขั้นตอนสุดท้าย นำละลายสารตัวอย่างใน 1X sample buffer [12.5%(w/v) bromophenol blue, 125 mM Tris pH 6.8, 10%(w/v) glycerol] หยอดลงในแต่ละช่องของพอลิอะคริลาไมด์เจล หลังจากนั้นต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำเจลไปผ่านกระแสไฟฟ้า 90 mA ใน 1X running buffer [25 mM Tris, pH8.3, 0.2 M glycine] เป็นเวลา 150 นาที นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside จากนั้นนำเจลไปดูการเรืองแสงของแถบเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเบต้า-กลูโคซิเดส ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

10. การทำเวสเทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์ (western blot)

นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (จากข้อ 6) มาแช่ใน transfer buffer [10 mM Tris, 100 mM glycine] เป็นเวลา 20-60 นาที เตรียมเมมเบรน polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane และกระดาษกรอง โดยตัดให้เมมเบรนมีขนาดกว้างกว่าเจล 1 cm. และกระดาษกรองมีขนาดกว้างกว่าเมมเบรน 1 cm จากนั้นแช่เมมเบรนใน 100%(v/v) methanol เป็นเวลา 5 วินาที แล้วแช่ต่อใน transfer buffer เป็นเวลา 10-20 นาที สำหรับกระดาษกรองจะแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจะทำการ blot ด้วยเครื่อง Trans-Blot® Semi-Dry โดยใช้กระแสไฟฟ้า 10 V. เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นทำการบ่มเมมเบรนกับ 5% skim milk ที่ละลายอยู่ใน phosphate buffered saline plus tween, pH 7.5 (PBST) [80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, 0.1% tween 20] เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ต่อจากนั้นบ่มกับ mouse monoclonal antibody against natural dalcochinase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ต่อด้วย PBST 15 นาที และล้างต่อด้วย PBST อีก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal antibody against mouse immunoglobulins เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย PBST อีก 15 นาที และล้างต่อด้วย PBST อีก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นนำเมมเบรนมาซับให้พอหมาดๆ แล้วบ่มกับ ECL plus Western Blotting Detection System เป็นเวลา 5 นาที ซับหมาดๆพอแห้ง นำเมมเบรนที่ได้ไปปะกบกับฟิล์มในห้องมืดเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ใน developer, fixer และน้ำกลั่น ตามลำดับ

11. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลโคซินในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.02 U มาทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นตัวรับกลูโคส ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่าเป็นเวลา 20 ชั่วโมง คูดตัวอย่างมา 80 µl มาใส่ใน acetone ที่เย็นปริมาตร 1 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปแช่ที่ -80 °C ประมาณ 30 นาที แล้วทำให้แห้งโดย

วิธี speed vacuum เมื่อแห้งแล้วเติม 15%(v/v) Dimethylsulphoxide 10 μ l เพื่อทำละลายสาร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

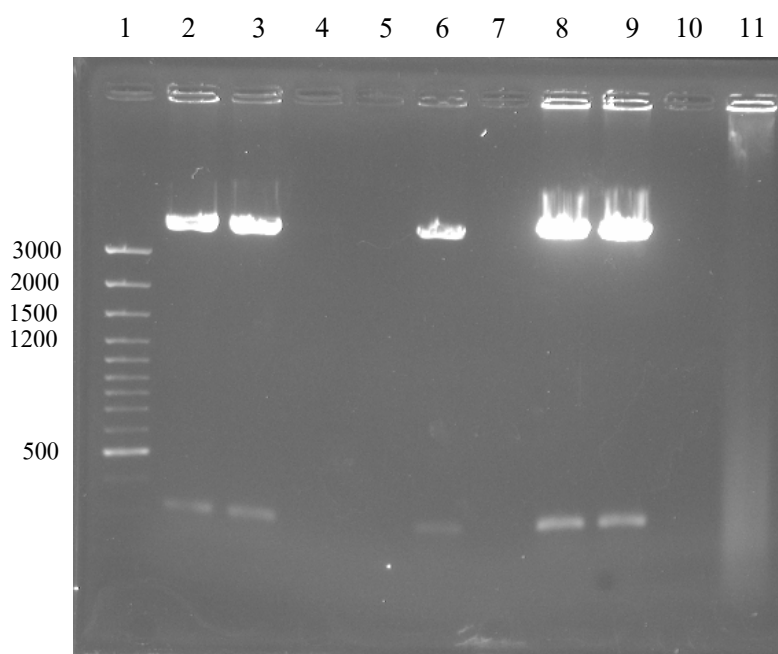
12. การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจากปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยวิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) โดยการนำตัวอย่างที่ละลายใน 15%(v/v) Dimethylsulphoxide มา 2 μ l หยดบนแผ่น silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet โดยหยดให้ห่างจากขอบแผ่น silica gel ประมาณ 1 cm แล้วนำไปแช่ในตัวชะ A (ethyl acetate/methanol/water 16:6:1 v/v) ให้ตัวชะ A วิ่งผ่านแผ่น silica ประมาณ 4.25 cm ทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในตัวชะ P (iso-propanol/ethanol/water 5:1:2 v/v) และให้ตัวชะ P วิ่งผ่านแผ่น silica ประมาณ 1.75 cm ทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น silica ที่ได้ไปพ่นด้วย 10%(v/v) sulfuric acid ใน ethanol แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 125 °C เป็นเวลา 5 นาที สำหรับ standard marker จะประกอบด้วย 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, methyl-glucoside

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน His6-TRBG เข้าสู่ *Pichia pastoris* (GS115)

นำชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 5' ของยีนคัลโคซิเนสที่มีขนาดประมาณ 300 bp ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR มาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 3' ของยีนคัลโคซิเนสด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาณ 3 U ซึ่งเรียกพลาสมิดที่ได้ใหม่ว่า pPICZ-His6-TRBG หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิด pPICZ-His6-TRBG เข้าสู่ competent cell *E. coli* (DH5α) แล้วเลี้ยงบนอาหาร LB pH 7.5 ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน พบว่ามีโคโลนีเจริญจำนวนมาก ดังนั้นจึงคัดเลือกโคโลนี 10 โคโลนี มาสกัดพลาสมิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Eco*RI ดังภาพที่ 12 จะเห็นได้ว่าโคโลนีที่ 1, 2, 5, 7 และ 8 มีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 300 bp และ 4.9 kb ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีที่ 2 ไปหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ผลของการหาลำดับเบสทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ก



ภาพที่ 12 พลาสมิด pPICZ-His6-TRBG จากโคโลนี *E. coli* ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Eco*RI ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 300 bp และ 4.9 kb

lane 1 = 100 bp ladder

lane 2-11 = พลาสมิด pPICZ-His6-TRBG โคโลนีที่ 1-10

หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ 2 แล้วตัดพลาสมิดด้วย *SacI* ให้เป็นเส้นตรง ทำการขนถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent *P. pastoris* โดยวิธี electroporation แล้วเลี้ยงบนอาหาร YPDS ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 5-6 วัน พบว่ามีโคโลนีทั้งหมด 12 โคโลนี จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้ โดยเลี้ยงในอาหาร BMGY ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน แล้วย้ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMY ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเหนี่ยวนำด้วย 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงไปประมาณ 4 วัน แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่ามี 1 โคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จึงตั้งชื่อโคโลนีนี้ว่า T11 ดังแสดงในตารางที่ 1

การที่พบว่าแต่ละโคโลนีมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เท่ากันอาจเป็นเพราะ ในแต่ละโคโลนีมีความแตกต่างของจำนวนซ้ำ (copy number) ของยีนตัดโคซินเนสที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของยีสต์ ทำให้มีผลต่อปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในแต่ละโคโลนี นอกจากนี้การเจริญเติบโตของแต่ละโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วย methanol ที่แตกต่างกัน ก็อาจเป็นอีกเหตุผลสำคัญที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละโคโลนีไม่เท่ากัน

เมื่อเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์ตัดโคซินเนส (T11) ในปริมาณมาก จะพบกิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.5% (v/v) methanol ซึ่งทำให้ง่ายต่อการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากถ้าเอนไซม์ถูกผลิตอยู่ในเซลล์ไม่มีการส่งออกมานอกเซลล์ ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นจะต้องอาศัยเอนไซม์ ลิติเคส (lyticase) มาย่อยผนังเซลล์ก่อนจะผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตก ซึ่งจะทำให้ยุ่งยาก เสียเวลา และเสียค่าใช้จ่ายตรงส่วนนี้มากอีกด้วย

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกิจกรรมของรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ที่ผลิตจาก T11 ไปทำให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni²⁺-ion affinity chromatography ได้ จึงนำโปรตีนที่ได้จากโครงสร้างนี้ไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminus ของโปรตีนขาดหายไป 12 ตัว คาดว่าน่าจะเป็นบริเวณตัดของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างกระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) ทางปลาย N-terminus ของเอนไซม์ตัดโคซินเนส มีผลทำให้กรดอะมิโนถูกตัดออกไปด้วย ดังนั้นได้มีการทำการโคลนยีนตัดโคซินเนสใหม่ชื่อว่า His8-truncTRBG โดยผศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยให้กรดอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัว อยู่ทางปลาย

N-terminus ของยีนคัดโคซิเนสที่เริ่มต้นลำดับกรดอะมิโนด้วย VPPFN ซึ่งอยู่หลังบริเวณตัดของ เอนไซม์โปรติเอส แล้วใส่ในพลาสมิด pPICZ α B และเรียกชื่อพลาสมิดนี้ว่า pPICZ-His8-truncTRBG

ตารางที่ 1 โคโลนี *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZ-His6-TRBG ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ริกอมบิแนนต์คัดโคซิเนส กับ 1 mM pNP-Glc

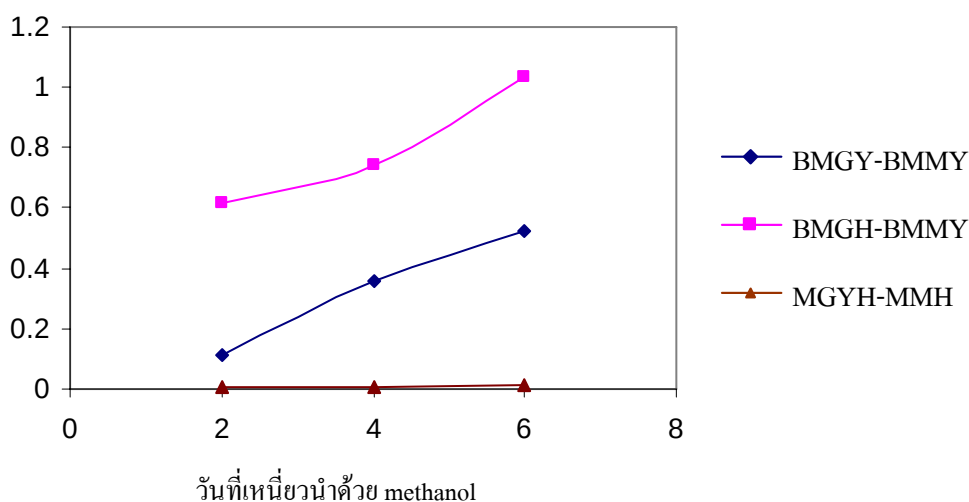
ชื่อโคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
T1	0.142
T2	0.185
T3	0.101
T4	0.146
T5	0.102
T6	0.134
T7	0.055
T8	0.056
T9	0.059
T10	0.314
T11	0.388
T12	0.193

2. การเลือกอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแสดงออกของ *P. pastoris*

นำโคโลนี T11 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1%(w/v) glycerol ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน แล้วย้ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารที่มี 0.5%(v/v) methanol ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงไป 6 วัน แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีดังนี้

- (1) BMGH ย้ายเซลล์มาเลี้ยงใน BMMH
- (2) BMGY ย้ายเซลล์มาเลี้ยงใน BMMY
- (3) MGYH ย้ายเซลล์มาเลี้ยงใน MMH

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm



ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์คัตโคซิเนสกับ 1 mM *p*NP-Glc ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 13 จะเห็นได้ว่า *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMGH- BMMH จะถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์คัตโคซิเนสได้ในปริมาณมากที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในอาหาร BMGH-BMMH ไม่มี yeast extract และ peptone เหมือนในอาหาร BMGY-BMMY ซึ่ง yeast extract และ peptone อาจจะมีสารอาหารบางอย่างที่ไม่เหมาะสมสำหรับแสดงออกของยีนคัตโคซิเนส หรือไม่เหมาะสมสำหรับการส่งเอนไซม์คัตโคซิเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ หรืออาจเป็นเพราะในอาหาร BMGY-BMMY ไม่มีการเติม 0.004% (w/v) histidine เมื่อเลี้ยง *P. pastoris* (GS115)

genotype *his4* ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ฮิสติดีนได้เองอาหาร จึงส่งผลให้ *P. pastoris* ผลิต คัลโคซิเนสได้น้อย นอกจากนี้ yeast extract ยังขัดขวางในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อีกด้วย ต่อมาได้พบว่าการเติม 0.5%(w/v) cassamino acid ในอาหาร BMMH ซึ่งจะช่วยในการรักษา สภาพ pH ให้คงที่ประมาณ pH 5-6 และทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสสูงขึ้นกว่าเดิม สำหรับในอาหาร MGYH-MMH ไม่มีการปรับ pH อาจทำให้ pH ในอาหารไม่เหมาะสมกับการ เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสของเชื้อ *P. pastoris*

ดังนั้นในการเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสสำหรับงานวิจัยนี้จึงเลือกเลี้ยง เชื้อในอาหาร BMGH แล้วเหี่ยวนำไปผลิตเอนไซม์ในอาหาร BMMH ที่มี การเติม 0.5%(w/v) cassamino acid

3. การโคลนยีน His8-truncTRBG เข้าสู่ *P. pastoris* (GS115)

ทำการขนถ่ายพลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG เข้าสู่ competent *Escherichia coli* (DH5α) ด้วยวิธี eletroporation จากนั้นเลี้ยงบนอาหาร LB pH 7.5 ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อไปหาลำดับเบสตลอดความยาวของยีน คัลโคซิเนส ผลของการหาลำดับเบสทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ง แล้วนำพลาสมิดที่มีลำดับเบส ถูกต้องแล้วมาตัดด้วย *SacI* เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิดที่เป็น เส้นตรงนี้เข้าสู่ *P. pastoris* (GS115) โดยวิธี eletroporation แล้วเลี้ยงบนอาหาร YPDS ที่มียา ปฏิชีวนะ zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 5-6 วัน พบว่ามีโคโลนีทั้งหมด 56 โคโลนี

จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้ โดยเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน แล้วย้ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C โดย เหี่ยวนำด้วย 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงไปประมาณ 4 วัน แล้วนำไปหาค่า กิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *pNP-Glc* ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่ามี 1 โคโลนี ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จึงตั้งชื่อโคโลนีนี้ว่า H18 ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำ รีคอมบิแนนต์เอนไซม์ที่ผลิตจาก H18 ไปทำให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน คอลัมน์ Ni²⁺-ion affinity chromatography ได้ จึงใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากโคโลนี H18 ไปใช้ในการ ศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 โคโลนี *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ไรคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส กับ 1 mM pNP-Glc

ชื่อโคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
H1	1.806
H2	1.514
H5	1.798
H6	1.694
H8	1.276
H9	1.564
H13	1.106
H18	1.906
H28	0.618
H30	0.585
H32	0.939
H41	0.668
H45	1.257
H53	0.936
H56	0.583

4. การทำการกลายพันธุ์ของยีนคัลโคซิเนสที่ตำแหน่งจำเพาะ

4.1 การหาตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์

เนื่องจากเรายังไม่ทราบโครงสร้างที่แท้จริงของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่จับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของคัลโคซิเนส และยังไม่ทราบโครงสร้างของเอนไซม์ลินามาเรสที่จับกับลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของลินามาเรส จึงไม่สามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดใช้กรดอะมิโนตัวใดในการจับกับส่วนใดของสับสเตรท แต่เราทราบถึงโครงสร้างผลึกของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท และเอนไซม์-อะโกลโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวโพด (ZmGlu1) กับ DIMBOA-Glc ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของมัน พบว่ากรดอะมิโน F198 F205 W378 และ F466 ทำหน้าที่จับกับอะโกลโคนของ ZmGlu1 (Czjzek *et al.*, 2000) เนื่องจากเอนไซม์ ZmGlu1 และ คัลโคซิเนส จัดอยู่ใน family 1 ของโกลโคซิลไฮโดรเลส ดังนั้นจึงคาดว่าบริเวณจับอะโกลโคนน่าจะเป็นบริเวณเดียวกัน

งานวิจัยนี้จึงทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ZmGlu1 กับเอนไซม์คัลโคซิเนส และเอนไซม์ลินามาเรสด้วยวิธี CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment (ภาพที่ 14) พบว่ากรดอะมิโน F205 และ W378 ของ ZmGlu1 จะตรงกับกรดอะมิโน F196 และ W368 ของคัลโคซิเนส และตรงกับกรดอะมิโน F212 และ W385 ของลินามาเรส ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน คือ เฟนิลอะลานีนและทริปโตเฟน แต่กรดอะมิโน F198 และ F466 ของ ZmGlu1 อยู่ในตำแหน่งที่ตรงกับกรดอะมิโน N189 และ A454 ของคัลโคซิเนส และตรงกับกรดอะมิโน F205 และ N472 ของลินามาเรส ตามลำดับ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนต่างชนิดกัน เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของแขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโน N189 และ A454 ของคัลโคซิเนสในโครงสร้างจำลองของเอนไซม์คัลโคซิเนสดังภาพที่ 15 ก็พบว่าแขนงข้างชี้เข้าไปในอุโมงค์ของเอนไซม์ตรงบริเวณจับอะโกลโคน ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทำการสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ดังนี้

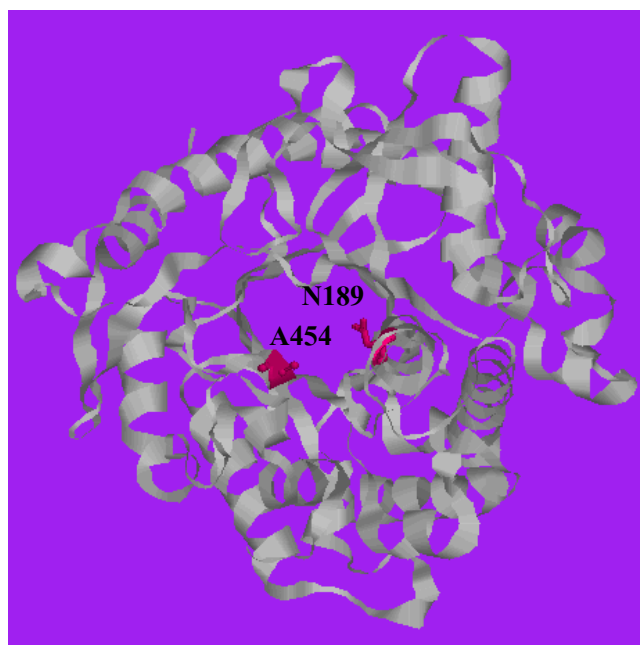
1. เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F ซึ่งเป็นการแทนที่กรดอะมิโนแอสปารากีนที่ตำแหน่ง 189 ของคัลโคซิเนส ด้วยเฟนิลอะลานีนของลินามาเรส
2. เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N ซึ่งเป็นการแทนที่กรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 454 ของคัลโคซิเนส ด้วยแอสปารากีนของลินามาเรส

Dalcochinase	160	QDYADLCFQLFGDRVKHWIT	LNEP	SIFTANGYAYGM	F	APGRCSPSYNP	207
Linamarase	176	LQYADLLFERFGDRVKPWT	FNEP	SAYVGF	AHDDGV	F	APGRCSSWVNR 223
ZmGlu 1	169	TYFAKVCFDNFGDKVKNWLT	FNEP	QTFTS	FSYGTGV	F	APGRCSPLDC 216
		: * . : : * . : .		* : * * *		: . *	
Dalcochinase	355	RNGVFIGPVTPSGW	M	CIYPKGLRDLLLYFKEKYNNPLVY	ITENG	I	IDEK 402
Linamarase	372	LNGNLIGPQAYSSW	F	YIFPKGIRHFLNYTKDTPVIY	VTENG	V	VDNY 419
ZmGlu 1	365	PDGKPIGPPMGNPW	I	YMYPEGLKDLLMIMKNKYGNPPIY	ITENG	I	IGDV 412
		: *		: . . : : :		: * . *	* : * * * *
Dalcochinase	422	YYRHLFYVRYAIR-SGANVKGFFAWSLLDNFEW	A	EGYTSRFGLYFVNY			468
Linamarase	439	YKKHMWNALGSLKNYGV	K	LKGYFAWSYLDNFEW	N	IGYTSRFGLYYVDY	486
ZmGlu 1	434	IQRHIATLKESID-LGSNVQGYFAWSLLDNFEW	F	AGFTERYGIVYVDR			480
		. * : : : *		: : * : * * * * :		* : * : * : . * :	

ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ZmGlu1 ตัลโคซินเนสและลินามาเรส ส่วนที่แรงเงาสีฟ้า คือ ตำแหน่งอนุรักษ์ motif L/FNEP และ I/VTENG ส่วนที่แรงเงาสีเหลือง คือ ตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณจับอะไกลโคโคน

* - single, fully conserved residue; : - conservation of strong groups;

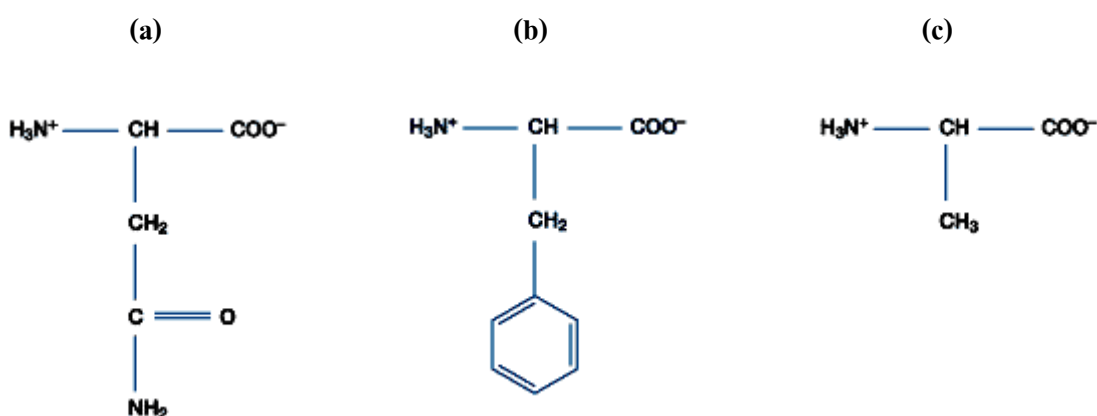
. - conservation of weak groups; - no consensus



ภาพที่ 15 ตำแหน่งของ N189 และ A454 ในโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ตัลโคซินเนส

เมื่อพิจารณาเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F จะพบว่ากรดอะมิโนแอสปารากีน (ภาพที่ 16a) เป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างประเภทมีขั้ว ขณะที่เฟนิลอะลานีน (ภาพที่ 16b) เป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic) จึงไม่มีขั้ว การเปลี่ยนแอสปารากีนไปเป็นเฟนิลอะลานีนอาจจะไปเพิ่มความเป็น hydrophobic ให้กับสภาพแวดล้อมบริเวณบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F ได้ และอาจจะมีผลทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F สามารถจับกับแอลกอฮอล์หรือส่วนอะไกลโคโคน ตรงบริเวณที่ไม่มีขั้วของ *p*NP-Glc, dalcochinin glucoside และลินามาริน ได้ดีขึ้น จึงคาดว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F จะสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทที่มีส่วนอะไกลโคโคนเป็นชนิดไม่มีขั้ว และเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้ดีกว่าอัลโคซินธรรมชาติ

สำหรับ เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N จะเห็นได้ว่ากรดอะมิโนอะลานีน (ภาพที่ 16c) มีขนาดเล็ก แขนงข้างสั้นและไม่มีขั้ว ขณะที่กรดอะมิโนแอสปารากีน (ภาพที่ 16a) มีแขนงข้างที่ยาวกว่า และมีขั้ว เมื่อทำการเปลี่ยนอะลานีนไปเป็นแอสปารากีน อาจจะทำให้แขนงข้างเข้าถึงสับสเตรท ลินามาริน หรือ *p*NP-Glc ที่มีส่วนอะไกลโคโคน ขนาดสั้นได้ง่ายขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรท 2 ชนิดนี้เกิดได้ดีกว่าเอนไซม์อัลโคซินธรรมชาติ นอกจากนี้แอสปารากีนเป็นกรดอะมิโนของลินามาเรส ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N มีสมบัติบางอย่าง เช่น การเร่งปฏิกิริยาการสลายลินามาริน หรือการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ได้คล้ายกับ เอนไซม์ลินามาเรส

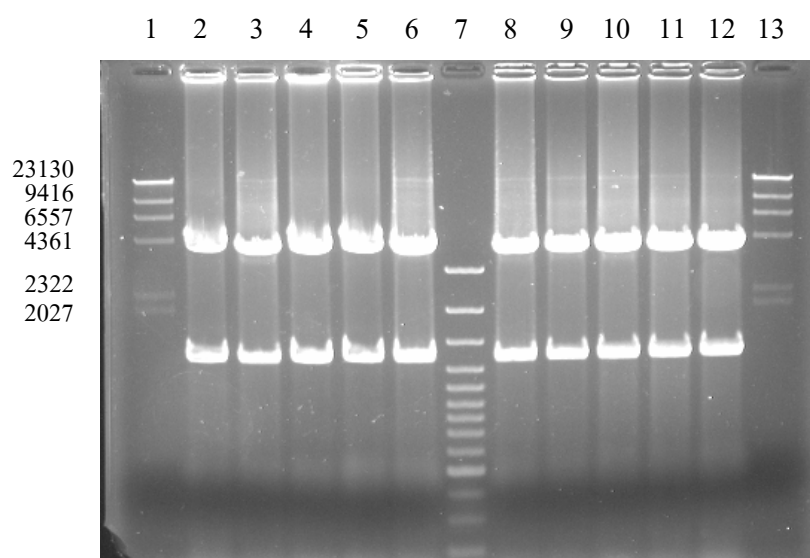


ภาพที่ 16 โครงสร้างกรดอะมิโน (a) แอสปารากีน, (b) เฟนิลอะลานีน และ (c) อะลานีน
ที่มา: Eppendorf North America (2006)

4.2 การทำการกลายพันธุ์และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N

ในการทำปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) โดยใช้ QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit นั้น เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F จะใช้ไพรเมอร์ BeerN189Ffor และ BeerN189Frev ซึ่งเปลี่ยนลำดับเบสจาก AAT เป็น TTT ส่วน เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N จะใช้ไพรเมอร์ BeerA454Nfor และ BeerA454Nrev ที่เปลี่ยนลำดับเบสจาก GCT เป็น AAT สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ competent *E. coli* (XL1-Blue) ด้วยวิธี heat shock แล้วเลี้ยงบนอาหาร LB pH 7.5 ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F มีโคโลนีเจริญ 148 โคโลนี ส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N พบ 52 โคโลนี จากนั้นเลือกโคโลนีในแต่ละ เอนไซม์กลายพันธุ์ มา 5 โคโลนี เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้วไปวิเคราะห์ด้วย 1%(w/v) agarose gel ดังภาพที่ 17 พบว่าทุกโคโลนีมีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 1.4 kb และ 3.8 kb ดังนั้นจึงเลือกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีที่ 1 ของ เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ โคโลนีที่ 1 ของ เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อให้แน่ใจว่าเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งที่ต้องการของ N189F (ภาพที่ 18) และ A454N (ภาพที่ 19) ผลของการหาลำดับเบสทั้งหมดแสดงในภาคผนวก จ และภาคผนวก จ ตามลำดับ

หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิดที่มียีนคลอซีเนสกลายพันธุ์ที่ได้เข้าสู่ *P. pastoris* โดยวิธี electroporation แล้วเลี้ยงบนอาหาร YPDS ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin ต่อจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 5-6 วัน พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F มีโคโลนีเจริญ 16 โคโลนี ส่วน เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N พบ 20 โคโลนี จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนี โดยเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำเซลล์มาเลี้ยงต่อในอาหาร BMMH ปริมาตร 5 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเติม 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงไปประมาณ 4 วัน แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N มี 1 โคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ดังตารางที่ 3 และ 4 จึงตั้งชื่อโคโลนีนี้ว่า N189F8 และ A454N11 ตามลำดับ



ภาพที่ 17 พลาสมิดจากโคลน *E. coli* ที่มีชิ้นของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 1.4 kb และ 3.8 kb

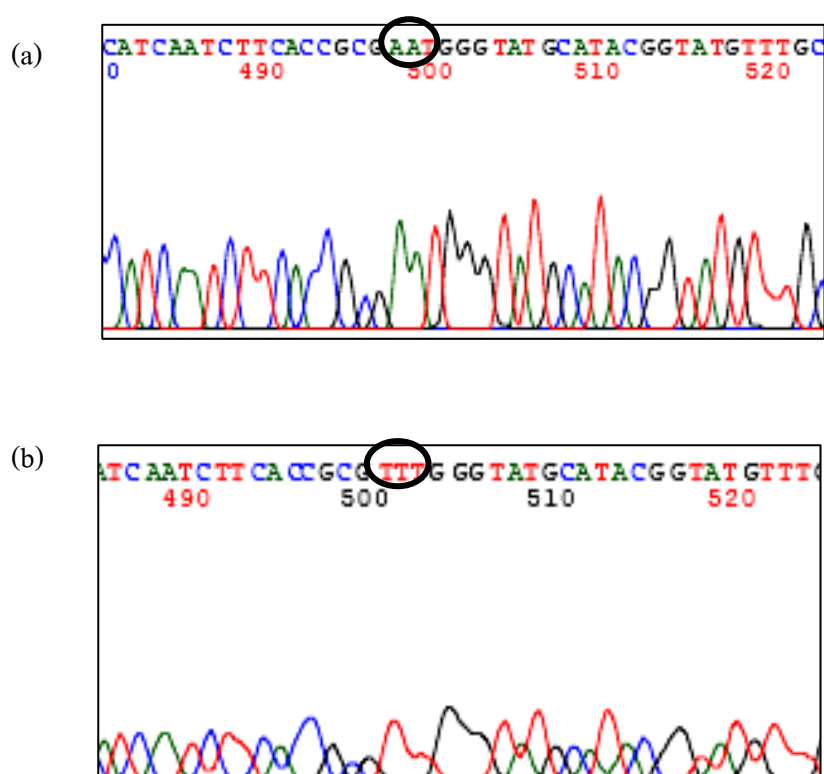
lane 1 = lambda/*Hind* III standard

lane 2-6 = พลาสมิดของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F โคลนที่ 1-5

lane 7 = 100 bp ladder

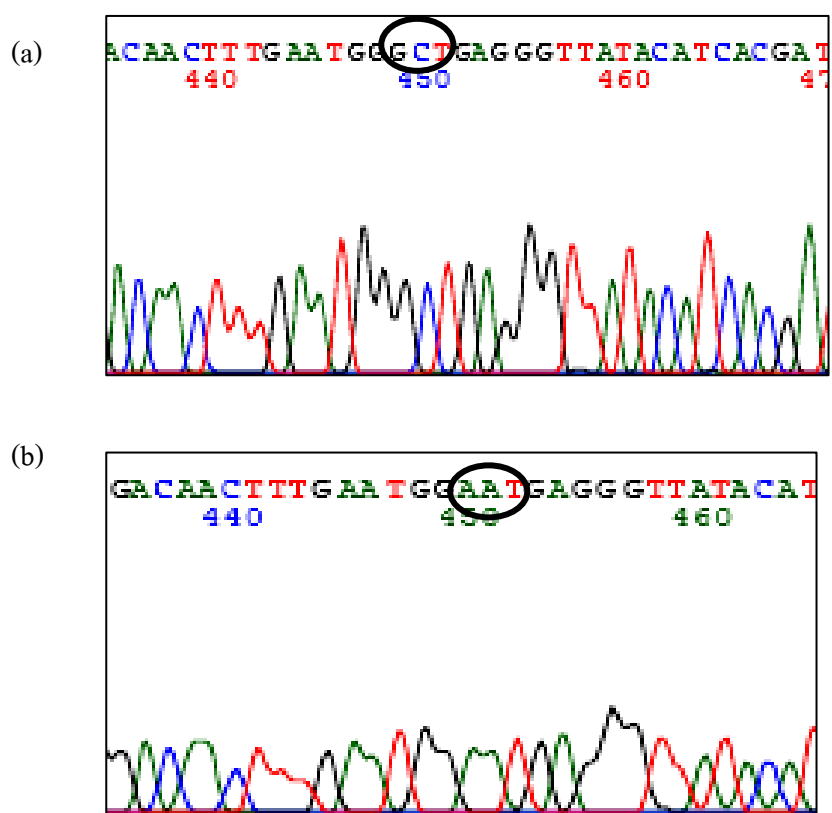
lane 8-12 = พลาสมิดของเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N โคลนที่ 1-5

lane 13 = lambda/*Hind* III standard



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนดัดโคจีนกับเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F

(a) รีคอมบิแนนต์ดัดโคจีน (H18) ลำดับเบส AAT ซึ่งเป็นโคดอน (codon) ของกรดอะมิโนแอสปารากีน (b) เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F เปลี่ยนลำดับเบสเป็น TTT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน วงกลมคือลำดับเบสที่ต่างกัน



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนดัดโคจีนกับเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N

(a) รีคอมบิแนนต์ดัดโคจีนส (H18) ลำดับเบส GCT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนอะลานีน (b) เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N เปลี่ยนลำดับเบสเป็น AAT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนแอสปารากีน วงกลมคือลำดับเบสที่ต่างกัน

ตารางที่ 3 โคโลนี *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F กับ 1 mM *p*NP-Glc

ชื่อโคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
N189F1	3.304
N189F2	0.095
N189F3	0.079
N189F6	0.056
N189F7	1.516
N189F8	3.976
N189F9	0.076
N189F10	2.564
N189F14	0.113
N189F16	0.074

ตารางที่ 4 โคโลนี *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N กับ 1 mM *p*NP-Glc

ชื่อโคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
A454N1	0.523
A454N2	1.280
A454N3	0.460
A454N4	1.404
A454N5	0.825
A454N6	1.185
A454N7	0.102
A454N8	0.892
A454N9	1.068
A454N10	1.326
A454N11	1.752
A454N12	0.668
A454N13	1.66

5. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *P. pastoris* ที่ผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์อัลโคซิเนสและเอนไซม์กลายพันธุ์ ไปผ่าน ultrafiltration คอลัมน์ phenyl sepharose คอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography และ amicon ultra centrifugal filter ตามขั้นตอนดังที่อธิบายในวิธีทดลอง ซึ่งสามารถสรุปความบริสุทธิ์ของแต่ละเอนไซม์ได้ดังตารางที่ 5-7 โดยทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละ fraction กับ 1 mM *p*NP-Glc ที่มีปริมาตรรวม 0.5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ H18, N189F8 และ A454N11 ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะนำมาวิเคราะห์ห่อเลคโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE และเวสเทิร์นอิมมูโนวิเคราะห์ (western blot) ดังภาพที่ 20a และ b ตามลำดับ และวิเคราะห์โดย non-denaturing PAGE ดังภาพที่ 21

ตารางที่ 5 ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของเอนไซม์ H18 ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	total activity (unit)	total protein (mg)	specific activity (unit/mg)	purification (fold)	yield (%)
culture medium	46.06	121.22	0.38	1	100
ultrafiltration	55.21	150.38	0.36	0.97	119.86
phenyl sepharose	53.78	97.07	0.55	1.46	116.75
Ni^{2+} -ion chromatography	15.67	6.53	2.40	6.31	34.01
amicon ultrafiltration	19.48	4.13	4.71	12.40	42.3

ตารางที่ 6 ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8
ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	total activity (unit)	total protein (mg)	specific activity (unit/mg)	purification (fold)	yield (%)
culture medium	56.47	90.62	0.623	1	100
ultrafiltration	95.59	35.19	2.716	4.38	169.27
phenyl sepharose	54.54	12.99	4.20	6.78	96.58
Ni ²⁺ -ion chromatography	31.65	7.99	3.96	6.39	56.05
amicon ultrafiltration	22.56	4.11	5.486	8.85	39.94

ตารางที่ 7 ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N11
ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	total activity (unit)	total protein (mg)	specific activity (unit/mg)	purification (fold)	yield (%)
culture medium	59.33	109.52	0.54	1	100
ultrafiltration	71.98	76.686	0.94	1.73	121.32
phenyl sepharose	31.14	29.60	1.05	1.94	52.49
Ni ²⁺ -ion chromatography	13.34	10.03	1.33	2.45	22.49
amicon ultrafiltration	12.97	3.25	3.99	7.369	21.86

จากตารางที่ 5-7 เอนไซม์ H18, N189F8 และ A454N11 ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีปริมาณ 19.48, 22.56 และ 12.97 U/L ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (%yield) พบว่าในบางขั้นตอน เช่น ในขั้นตอนหลังผ่าน ultrafiltration ของเอนไซม์ H18, N189F8 และ A454N11 ที่ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 119%, 169.27% และ 121.32% ตามลำดับ หรือในขั้นตอนหลังผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose ของเอนไซม์ H18 (116.75%) จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเกิน 100% อาจจะเป็นเพราะว่าในขั้นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc นั้น ผู้ทำการทดลองใช้สารละลายเอนไซม์มากเกินไป ทำให้เอนไซม์มีจำนวนมากกว่าสับสเตรทที่มีอยู่ 500 nmol ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) จึงมีค่าสูงเกินควรจะเป็น ส่งผลถึงเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่ามากกว่าความเป็นจริง

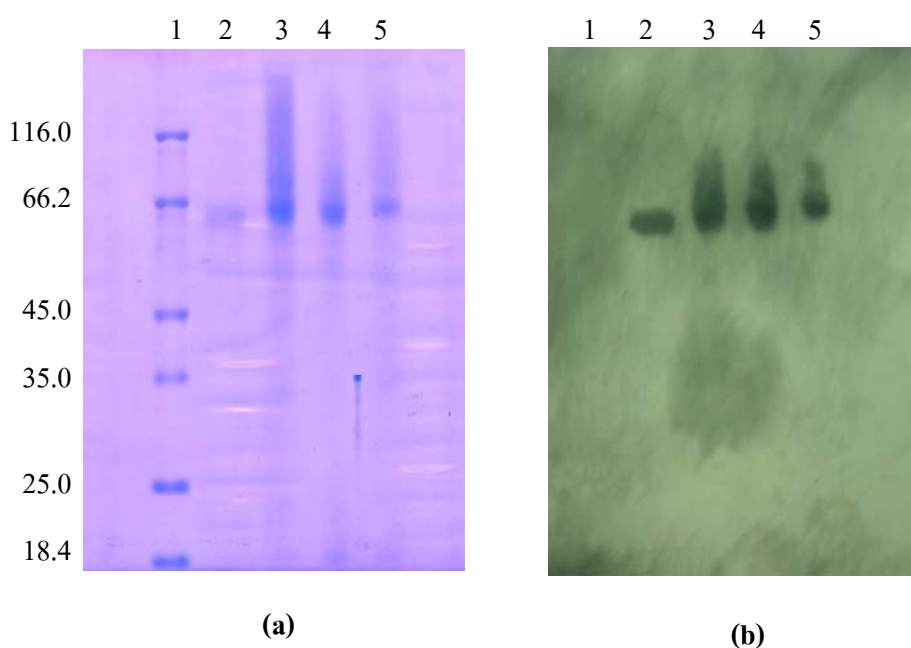
และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) จะสังเกตได้ว่าในบางขั้นตอนจะมีปริมาณโปรตีนมากกว่าในขั้นตอนก่อนหน้า เช่น ในขั้นตอนหลังผ่าน ultrafiltration ของเอนไซม์ H18 จะมีปริมาณโปรตีน 150.38 mg ซึ่งมีปริมาณมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโปรตีน 121.22 mg โดยหลักการความเป็นจริงแล้วเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผ่าน ultrafiltration ที่มีรูของเมมเบรนขนาด 30 กิโลดาลตัน โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 30 กิโลดาลตัน จะถูกกำจัดออกไปเหลือแต่ปริมาณโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการผ่าน ultrafiltration จะต้องมียังมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าอาหารที่ยังไม่ได้ผ่าน ultrafiltration ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในระหว่างการวัดปริมาณโปรตีน ผู้ทำการทดลองใช้อุปกรณ์ เช่น หลอดทดลอง tip เป็นต้น ที่ไม่สะอาด อาจมีโปรตีนอื่นติดอยู่ที่อุปกรณ์ทำให้ค่าที่วัดได้มีปริมาณโปรตีนมากกว่าที่ควรจะเป็น นอกจากนี้ในบางขั้นตอนยังพบว่ามียังมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เช่น ในขั้นตอนหลังผ่าน amicon ultra centrifugal filter ของเอนไซม์ H18, N189F8 และ A454N11 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 4.13, 4.11 และ 3.25 mg ตามลำดับ โดยจะมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าขั้นตอนหลังผ่าน คอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography (6.53, 7.99 และ 10.03 mg ตามลำดับ) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วก่อนผ่าน amicon ultra centrifugal filter โปรตีนในสารละลายเอนไซม์ต้องมีขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน เนื่องจากได้ผ่าน ultrafiltration มาก่อนหน้านี้แล้ว เมื่อนำสารละลายมาผ่าน amicon ultra centrifugal filter ที่มีรูของ เมมเบรนขนาด 30 กิโลดาลตัน จึงเป็นเพียงการกำจัด imidazole ออกจากสารละลายเอนไซม์เท่านั้น ดังนั้นปริมาณโปรตีนก่อนและหลังผ่าน amicon ultra centrifugal filter จึงควรมีปริมาณเกือบจะเท่ากัน แต่จากผลการทดลองพบว่าหลังผ่าน amicon ultra centrifugal filter มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าก่อนผ่าน amicon ultra centrifugal

filter ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านขั้นตอน ultrafiltration แล้ว จะต้องผ่านขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อีกหลายขั้นตอน เช่น นำไปผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose การไออะลิซิสและการผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography จึงอาจมีการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีนเอสในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งได้ ทำให้โปรตีนบางส่วนในสารละลายเอนไซม์ถูกตัดจนมีขนาดเล็กกว่า 30 กิโลดาลตัน ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณโปรตีนหลังผ่าน amicon ultra centrifugal filter มีน้อยกว่าก่อนผ่าน amicon ultra centrifugal filter และผลของปริมาณโปรตีนที่วัดได้ก็จะมีผลกระทบต่อค่า specific activity ของเอนไซม์ด้วย ทำให้ได้ค่าที่ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ เพื่อที่จะแก้ไขปัญหาเหล่านี้ผู้ทำการทดลองควรจะใช้สารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนที่พอเหมาะและควรล้างอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองให้สะอาด

ในการทดลองระยะแรก ผู้ทำการทดลองได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์ *P. pastoris* ที่ผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส ไปปรับ pH ให้ได้ pH 8.00 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography โดยไม่ได้นำไปผ่านขั้นตอน ultrafiltration และคอลัมน์ phenyl sepharose ปรากฏว่าต้องใช้ระยะเวลานานในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมาก และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าได้เอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ซึ่งไม่ได้แสดงผล ดังนั้นจึงต้องนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปผ่านขั้นตอน ultrafiltration เพื่อลดปริมาตร และนำไปผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการบางส่วนออกไปก่อนที่จะนำไปผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography

จากรูปเจล SDS-PAGE (ภาพที่ 20a) เห็นได้ว่าเอนไซม์ H18 (lane 3) A454N11 (lane 4) และ N189F (lane 5) จะพบแถบโปรตีน 2 แถบซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าคัลโคซิเนสธรรมชาติ (lane 2) ที่มีขนาดประมาณ 66 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนของเอนไซม์ H18, A454N11 และ N189F8 จะมีลักษณะเป็นปื้นไม่เป็นแถบที่คมชัดเหมือนแถบโปรตีนของคัลโคซิเนสธรรมชาติ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี western blotting (ภาพที่ 20b) พบว่าเอนไซม์ทุกตัวแสดงผลบนฟิล์ม แสดงว่าเอนไซม์ทุกตัวเป็นเอนไซม์คัลโคซิเนส แต่ผลบนฟิล์มของเอนไซม์ H18, A454N11 และ N189F8 จะมีลักษณะเป็นปื้นและมีขนาดใหญ่กว่าคัลโคซิเนสธรรมชาติ เหมือนกับผลที่แสดงในรูปเจล SDS-PAGE ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความแตกต่างกันของกระบวนการเติมน้ำตาล (glycosylation) ระหว่างยีสต์กับพืช การที่พบว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ถูกผลิตมาจากยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ถูกผลิตมาจากพืช อาจอธิบายได้ว่า ในยีสต์จะมีการเติมน้ำตาลที่มากกว่าในพืช ในระหว่างการวิเคราะห์ SDS-PAGE สายของน้ำตาลจะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง SDS

กับโปรตีน ทำให้โปรตีนที่ผลิตมาจากยีสต์มีประจุลบน้อยกว่าโปรตีนที่ผลิตมาจากพืชแต่โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีมวลโมเลกุลเท่ากัน ส่งผลให้โปรตีนที่ผลิตมาจากยีสต์เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่ผลิตมาจากพืช แถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE จึงมีขนาดใหญ่กว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ความหลากหลายของกระบวนการเติมน้ำตาล (microheterogeneity) เช่น ความยาวของสาย poly-*N*-acetylactosamine ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างหลากหลาย จึงส่งผลให้เกิดลักษณะเป็นปื้นบนเจล SDS-PAGE และการเติมน้ำตาลบนโปรตีนที่มาก (> 50% carbohydrate) ก็จะทำให้ปรากฏเป็นแถบโปรตีน 2 แถบบนเจล SDS-PAGE ได้ (Carlsson, 1993)



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์แต่ละตัวที่ผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี (a) SDS-PAGE ซึ่งย้อมด้วย Coomassie brilliant blue และ (b) western blot ซึ่งแสดงผลบนฟิล์ม

lane 1 = ขนาดของโปรตีน (กิโกลดาลตัน)

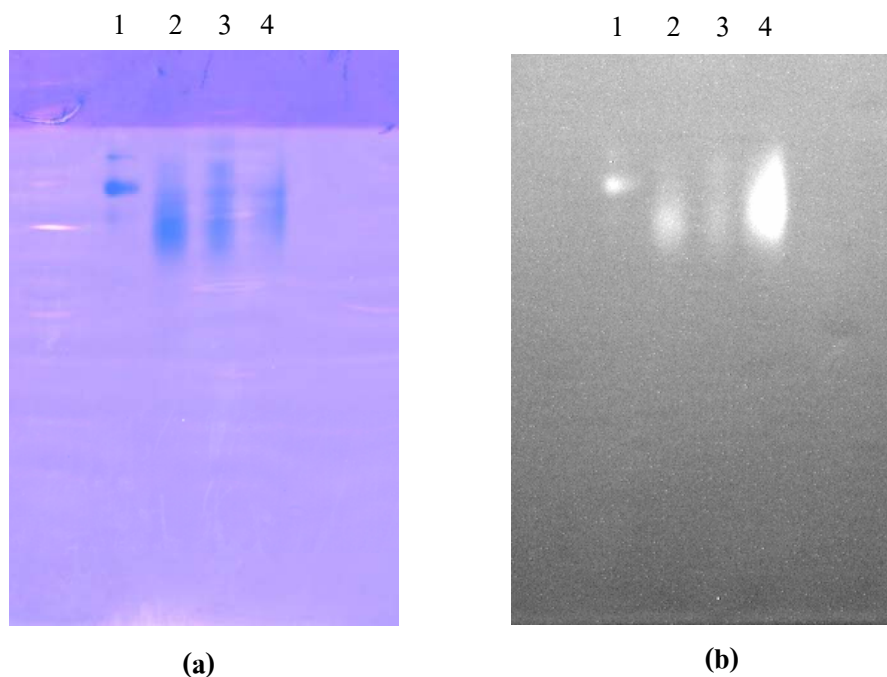
lane 2 = คัดโคชินเนสธรรมชาติ

lane 3 = H18

lane 4 = A454N11

lane 5 = N189F8

สำหรับการวิเคราะห์ non-denaturing PAGE (ภาพที่ 21) โดยในแต่ละ lane ใช้เอนไซม์ ปริมาณ 0.04 U แล้วตรวจการทำงานของเอนไซม์โดยการย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside เพื่อแสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏนั้นเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่แสดง กิจกรรม และเมื่อพิจารณาเจลที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue ที่ปริมาณเอนไซม์ 0.04 U จะ เห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 (ภาพที่ 21a, lane 4) มีปริมาณน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ lane อื่น แต่เมื่อย้อมแถบโปรตีนด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (ภาพที่ 21b, lane 4) เห็นได้ชัดเจนว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 สามารถสลาย 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside ได้ดีที่สุด ขณะที่ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N11 (ภาพที่ 21a, lane 3) มีปริมาณพอๆกับเอนไซม์ H18 (ภาพที่ 21a, lane 2) แต่เอนไซม์ กลายพันธุ์ A454N11 มีกิจกรรมต่อ 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (ภาพที่ 21b, lane 3) น้อย ที่สุด ส่วนเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18 มีกิจกรรมต่อ 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside ใกล้เคียงกัน และการที่แถบโปรตีนของเอนไซม์ H18, A454N11 และ N189F8 มี ลักษณะเป็นปื้นก็เพราะความแตกต่างกันของกระบวนการเติมน้ำตาล (glycosylation) ระหว่างยีสต์ กับพืชดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้การที่แถบโปรตีนของเอนไซม์ H18, A454N11 และ N189F8 มีขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ อาจเป็นเพราะประจุ รูปร่าง หรือขนาด (จำนวน oligomer) ของเอนไซม์ H18, A454N11 และ N189F8 ที่ผลิตมาจากยีสต์แตกต่างกับ เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติซึ่งผลิตมาจากพืช



ภาพที่ 21 การวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธี non-denaturing PAGE (a) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue และ (b) ย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside โดยแต่ละ lane ใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.04 U

lane 1 = คัดโคชินธรรมชาติ

lane 2 = H18

lane 3 = A454N11

lane 4 = N189F8

6. การศึกษาจลพลศาสตร์ของเอนไซม์

ค่าจลพลศาสตร์ของเอนไซม์ 5 ชนิด คือ คัดโคชินธรรมชาติ H18 N189F8 A454N11 และลินามารธรรมชาติ หาได้จากปริมาณกลูโคสที่เป็นผลผลิตจากการสลายสับสเตรท 3 ชนิดคือ *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc), dalcochinin glucoside และ ลินามาริน โดยใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 0-50 mM *p*NP-Glc, 0-15 mM dalcochinin glucoside และ 0-50 mM ลินามาริน ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 นาที แสดงค่าที่ได้ดังตารางที่ 8 (กราฟ Michaelis-Menten ของแต่ละปฏิกิริยาแสดงในภาพผนวกที่ ข1-15)

ตารางที่ 8 ค่า K_m (mM) และ V_{max} (mU) ในการสลายสับสเตรทของเอนไซม์

เอนไซม์	<i>p</i> NP-Glc		dalcochinin glucoside		ลินามาริน	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
คัลโคซิเนส	7.35±0.7	174.86±5.3	1.53±0.2	136.04±6.9	N.D.	N.D.
H18	3.73±0.5	182.22±5.7	2.26±0.3	180.69±9.9	N.D.	N.D.
N189F8	1.49±0.2	75.21±1.3	0.45±0.1	11.07±0.3	N.D.	N.D.
A454N11	4.06±0.3	169.68±4.0	2.86±0.3	185.13±6.9	N.D.	N.D.
ลินามาริน	0.85±0.1	36.44±0.6	N.D.	N.D.	0.42±0.1	10.52±0.1

หมายเหตุ N.D. คือ ไม่สามารถหาค่าได้

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าค่า K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ H18 และ A454N11 ในการสลาย *p*NP-Glc (7.35, 3.73 และ 4.06 mM ตามลำดับ) และ dalcochinin glucoside (1.53, 2.26 และ 2.86 mM ตามลำดับ) จะมีค่าใกล้เคียงกับ K_m ของคัลโคซิเนสธรรมชาติ ที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้คือ 5.37 mM สำหรับการย่อยสลาย *p*NP-Glc (Surarit *et al.*, 1997) และ 1.68 mM สำหรับการย่อยสลาย dalcochinin glucoside (Svasti *et al.*, 1999) เมื่อพิจารณาค่า V_{max} จะเห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ H18 และ A454N11 มีค่า V_{max} ในการสลาย *p*NP-Glc เท่ากับ 174.86, 182.22 และ 169.68 mU ตามลำดับ และค่า V_{max} ในการสลาย dalcochinin glucoside เท่ากับ 136.04, 180.69 และ 185.13 mU ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้มีความสามารถในการย่อยสลาย *p*NP-Glc และ dalcochinin glucoside ได้ดีพอๆกัน ในทำนองเดียวกันก็ชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง Ala454 ของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไม่น่าจะเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการย่อยสลาย *p*NP-Glc และ dalcochinin glucoside เพราะเมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่ทำให้เกิดความแตกต่างในค่าจลพลศาสตร์ต่อสับสเตรท 2 ชนิดนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่าจลพลศาสตร์ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดคือ คัลโคซิเนสธรรมชาติ H18 และ A454N11 กับ เอนไซม์ลินามารินธรรมชาติ พบว่า K_m และ V_{max} ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะมีค่ามากกว่าลินามารินธรรมชาติ (0.42 mM และ 10.52 mU) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ลินามารินธรรมชาติ ชอบจับกับสับสเตรท *p*NP-Glc ได้ดีแต่ย่อยสลาย *p*NP-Glc ได้น้อยกว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด

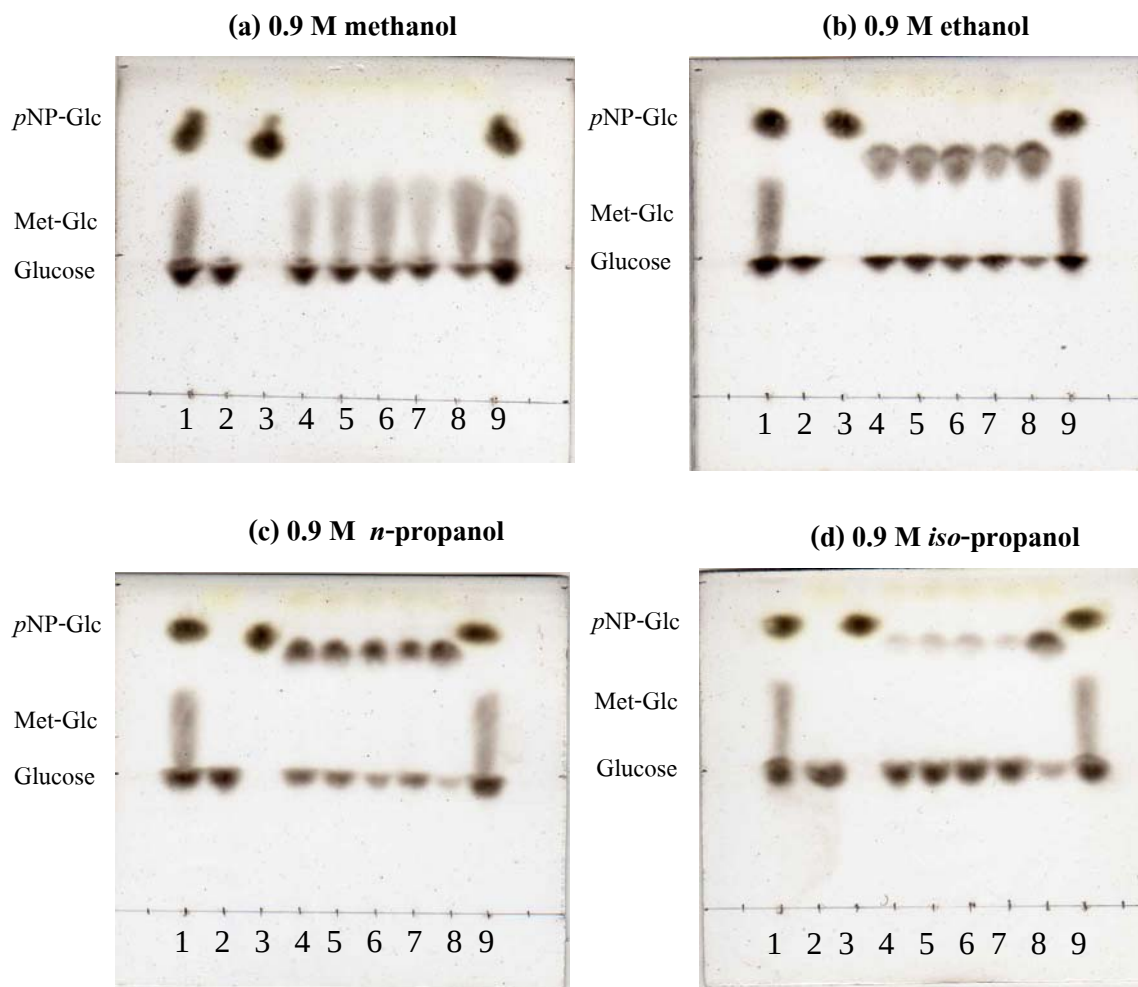
เมื่อพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 พบว่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc (1.49 mM) และ *dalcochinin* glucoside (0.45 mM) ลดลง 5 และ 3 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า K_m ของเอนไซม์ดัลโคชินเนสธรรมชาติ ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc (7.35 mM) และ *dalcochinin* glucoside (1.53 mM) ในทำนองเดียวกัน ค่า V_{max} ในการสลาย *p*NP-Glc (75.21 mU) และ *dalcochinin* glucoside (11.07 mU) ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 ก็ลดลงเมื่อเทียบกับค่า V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคชินเนสธรรมชาติ ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc (174.86 mU) และ *dalcochinin* glucoside (136.04 mU) เช่นเดียวกัน (2 และ 12 เท่า ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ N189F8 สามารถจับกับสับสเตรท *p*NP-Glc และ *dalcochinin* glucoside ได้ดีกว่าดัลโคชินเนสธรรมชาติ แต่ย่อยสลาย *p*NP-Glc และ *dalcochinin* ได้ไม่ดีเท่าเอนไซม์ดัลโคชินเนสธรรมชาติ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 กับเอนไซม์ ลินามาเรสธรรมชาติ จะเห็นว่าเอนไซม์ N189F8 มีค่า K_m และ V_{max} ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc (1.49 mM, 75.21 mU) สูงกว่าเอนไซม์ ลินามาเรสธรรมชาติ (0.85 mM, 36.44mU) ถึง 2 เท่า ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า N189F8 สามารถจับกับสับสเตรท *p*NP-Glc ได้น้อยกว่าเอนไซม์ ลินามาเรสธรรมชาติ แต่สลาย *p*NP-Glc ได้ดีกว่า เพราะฉะนั้นตำแหน่ง Asn189 น่าจะเป็นตำแหน่งที่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับสับสเตรทเมื่อแทนที่กรดอะมิโน Asn189 ด้วย Phe ซึ่งจะส่งผลทำให้สภาพแวดล้อมบริเวณบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์มีความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นแต่อาจจะน้อยกว่าเอนไซม์ลินามาเรส ส่วนอะไกลโคโคนของสับสเตรท *p*NP-Glc และ *dalcochinin* glucoside มีความเป็น hydrophobic อยู่แล้ว จึงส่งผลให้เอนไซม์ N189F8 จับกับสับสเตรททั้ง 2 ตัวนี้ได้เพิ่มมากขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 มีคุณสมบัติผสมระหว่างเอนไซม์ดัลโคชินเนสธรรมชาติกับเอนไซม์ ลินามาเรสธรรมชาติ

การที่เอนไซม์ดัลโคชินเนสธรรมชาติ H18 N189F8 และ A454N11 สามารถสลาย ลินามารินได้น้อย ทำให้ไม่สามารถหาค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายลินามารินได้ (ตารางที่ 8) อาจเนื่องมาจากส่วนอะไกลโคโคนของ ลินามารินจะมีหมู่แทนที่ (substituent) 3 หมู่ ที่ติดกับคาร์บอนอะตอมที่สร้างพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ซึ่งจะขัดขวางการเข้าไปจับของแขนงข้าง ในบริเวณบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์เหล่านี้ จึงทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ และการที่เอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติไม่สามารถย่อยสลาย *dalcochinin* glucoside ได้ น่าจะเป็นเพราะส่วนอะไกลโคโคนของ *dalcochinin* glucoside มีขนาดใหญ่เกินไปสำหรับบริเวณจับอะไกลโคโคนของ ลินามาเรส

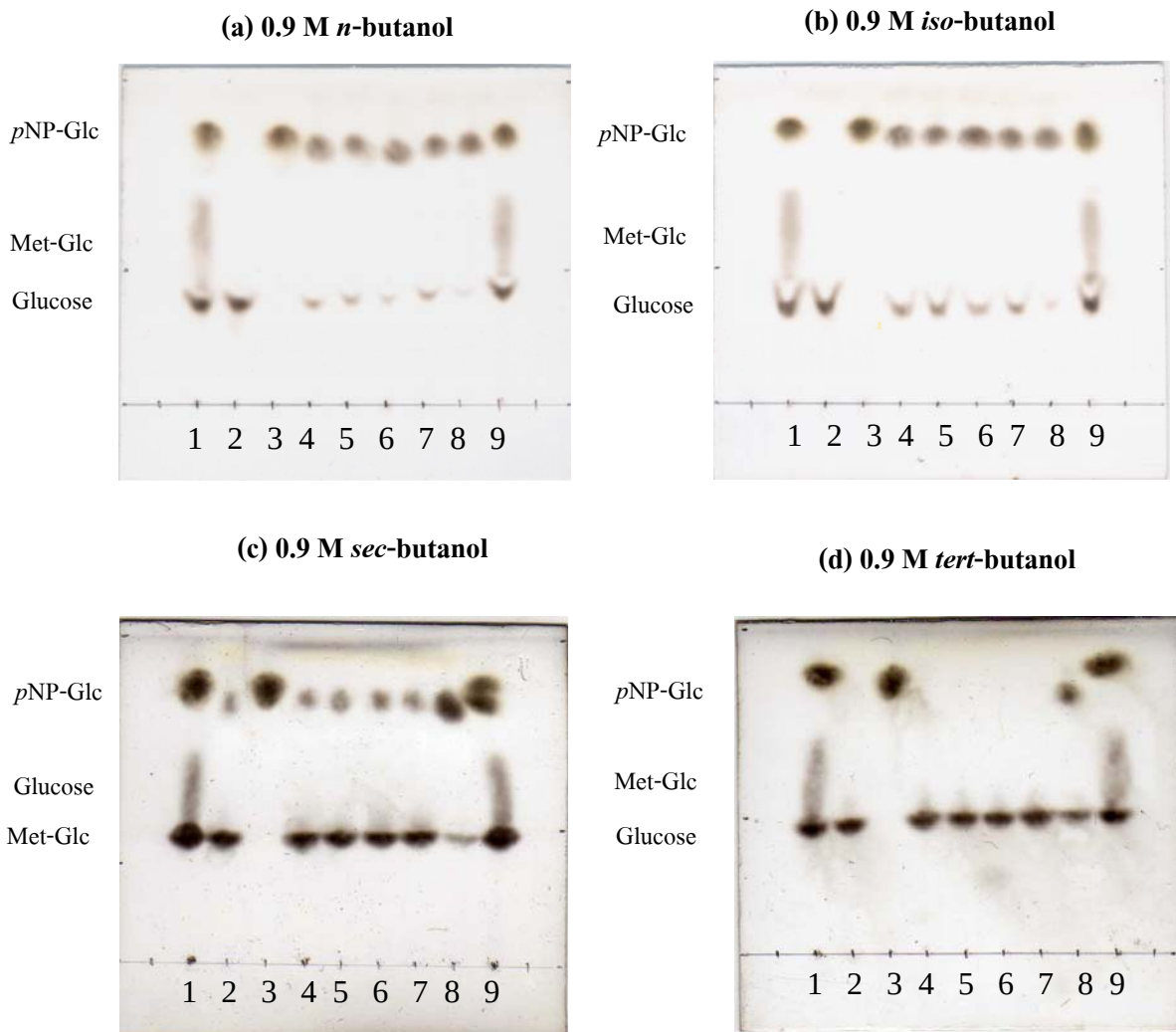
ในการย่อยสลาย *p*NP-Glc ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ จะเห็นได้ว่าค่า K_m ที่ได้จากการทดลอง (7.35 mM) จะมีค่าสูงกว่าค่า K_m ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ของเอนไซม์ (5.37 mM) (Surarit *et al.*, 1997) และ K_m ในการย่อยสลาย *dalcochin* glucoside ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ที่ได้จากการทดลอง (1.53 mM) ก็มีค่าน้อยกว่า K_m ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (1.68 mM) (Svasti *et al.*, 1999) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากผู้ทำการทดลองขาดความชำนาญและไม่มีความแม่นยำในการทดลองหรืออุปกรณ์ที่ใช้วัดไม่มีความเที่ยงตรงเท่าที่ควร ทำให้ค่าที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากค่า R^2 ที่ได้จากกราฟ Michaelis-Menten (ภาพผนวกที่ ๙1-15) ซึ่งจะใช้โปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software) ในการคำนวณ พบว่ามีค่าประมาณ 0.96-0.99 ซึ่งเป็นค่าที่พอจะยอมรับได้ นอกจากนี้ค่า K_m กับ V_{max} ในการสลาย *p*NP-Glc และ *dalcochin* glucoside ของเอนไซม์ คัลโคซิเนสธรรมชาติ (7.35 mM, 174.86 mU และ 1.53 mM, 136.04 mU) และ H18 (3.73 mM, 182.22 mU และ 2.26 mM, 180.69 mU) ที่ได้จากการทดลองก็มีความแตกต่างกันพอสมควร ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากการศึกษาจลนพลศาสตร์มีความคลาดเคลื่อนในการทดลองค่อนข้างสูงซึ่งดูได้จากเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนที่คำนวณได้จากกราฟ ดังนั้นความแตกต่างของค่า K_m กับ V_{max} ในการสลาย *p*NP-Glc และ *dalcochin* glucoside ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติและ H18 ที่ได้จากการทดลองสามารถอนุมานได้ว่ามีความใกล้เคียงกัน

7. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คัลโคซิเนสในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส

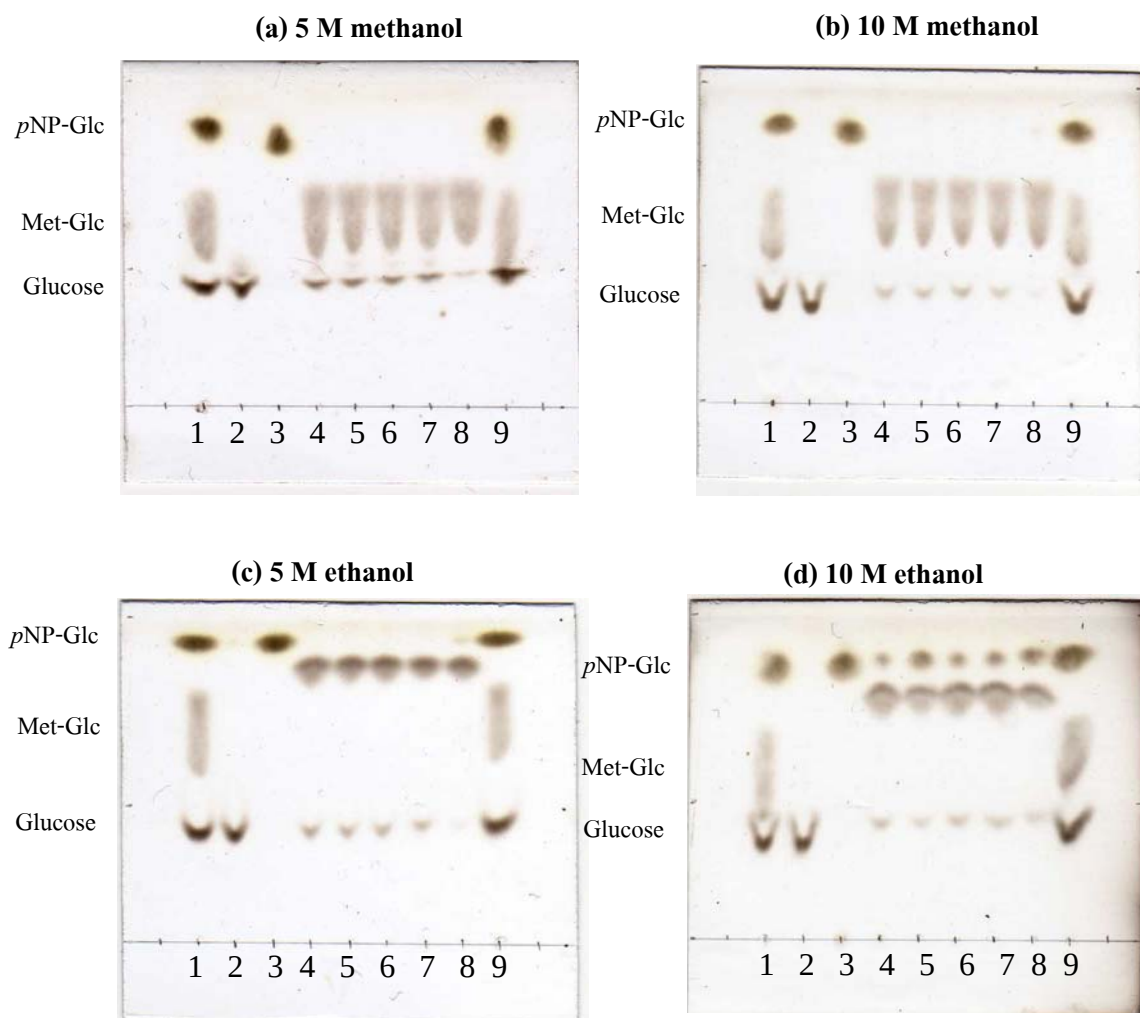
นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.02 U มาทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส (glucosyl donor) และใช้ methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นตัวรับกลูโคส (glucosyl acceptor) ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่าเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) และ ใช้ 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, methyl-glucoside (Met-Glc) เป็นมาตรฐาน (standard) ซึ่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 22-25 และเปรียบเทียบปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์ (alkyl glucoside) ที่ผลิตได้ในตารางที่ 9 โครงสร้างของตัวรับกลูโคสที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ๙



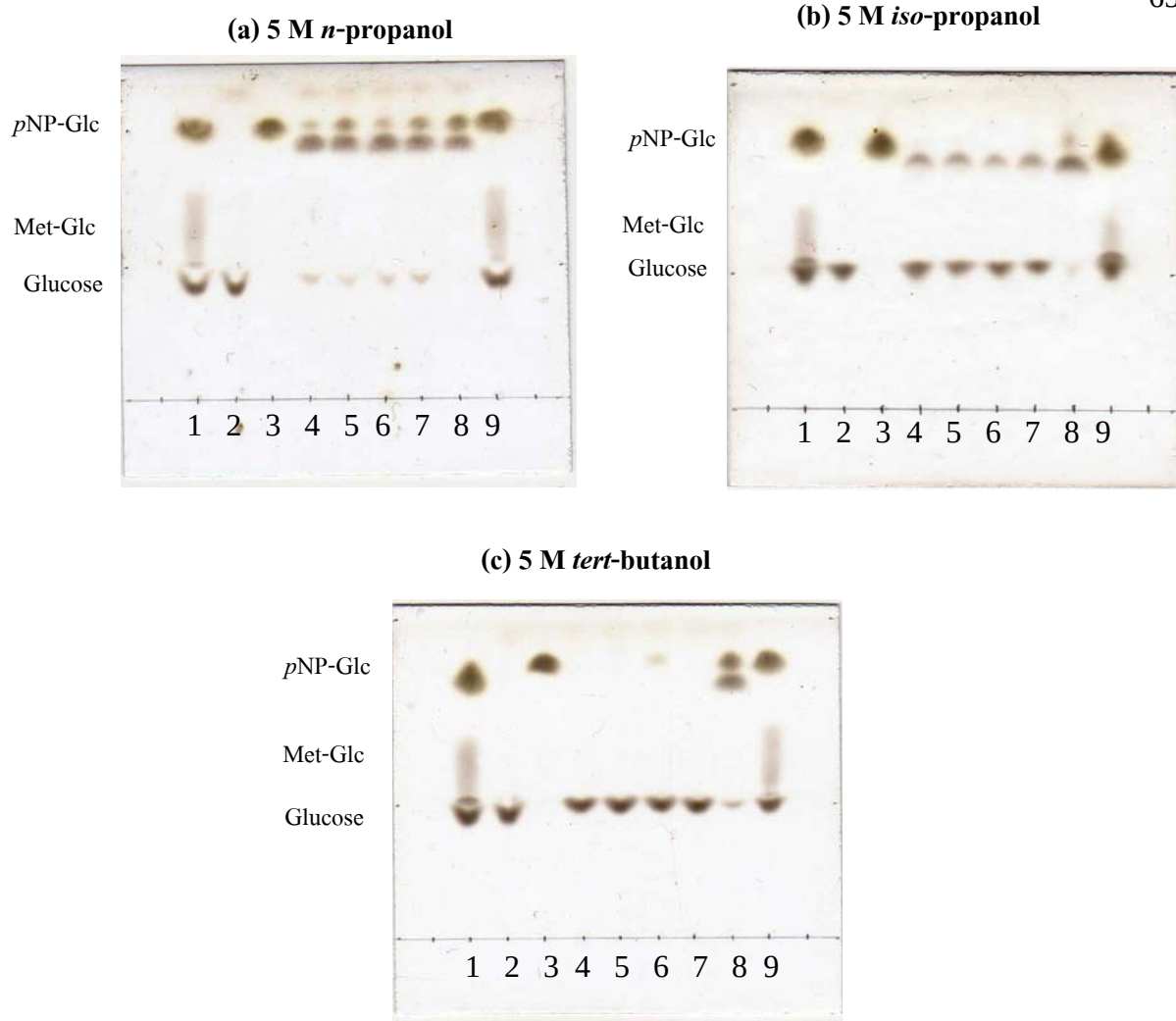
ภาพที่ 22 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาขั้วหมู่กลูโคส กับ 0.9 M C₁-C₃ แอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสชนิดต่างๆ ปริมาณ 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 10 mM *p*NP-Glc และ (a) methanol, (b) ethanol, (c) *n*-propanol และ (d) *iso*-propanol ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง: lane 1 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc, lane 2 = ไม่เติมแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยา, lane 3 = ไม่เติมเอนไซม์ในปฏิกิริยา, lane 4 = H18 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 5 = A454N11 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 6 = N189F8 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 7 = คัสโคซิเนสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 8 = ลินามาเรสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 9 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc



ภาพที่ 23 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับ 0.9 M C₄ แอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ชนิดต่างๆ ปริมาณ 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 10 mM *p*NP-Glc และ (a) *n*-butanol, (b) *iso*-butanol, (c) *sec*-butanol และ (d) *tert*-butanol ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง: lane 1 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc, lane 2 = ไม่เติมแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยา, lane 3 = ไม่เติมเอนไซม์ในปฏิกิริยา, lane 4 = H18 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 5 = A454N11 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 6 = N189F8 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 7 = คัสโคซินธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 8 = ลินามาเรสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 9 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc



ภาพที่ 24 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับ methanol และ ethanol ที่ความเข้มข้นสูง โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ชนิดต่างๆ ปริมาณ 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 10 mM *p*NP-Glc และ (a) 5 M methanol, (b) 10 M methanol, (c) 5 M ethanol และ (d) 10 M ethanol ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่าเป็นเวลา 20 ชั่วโมง: lane 1 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc, lane 2 = ไม่เติมแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยา, lane 3 = ไม่เติมเอนไซม์ในปฏิกิริยา, lane 4 = H18 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 5 = A454N11 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 6 = N189F8 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 7 = คัดโคซิเนสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 8 = ลินามาเรสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 9 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc



ภาพที่ 25 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับ C_3 และ C_4 แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นสูง โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ชนิดต่างๆ ปริมาณ 0.02 U ทำปฏิกิริยากับ 10 mM *p*NP-Glc เป็น glucosyl donor และใช้ (a) 5 M *n*-propanol, (b) 5 M *iso*-propanol, และ (c) 5 M *tert*-butanol ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง: lane 1 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc, lane 2 = ไม่เติมแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยา, lane 3 = ไม่เติมเอนไซม์ในปฏิกิริยา, lane 4 = H18 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 5 = A454N11 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 6 = N189F8 ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 7 = คัดโคซินเนสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 8 = ลินามาเรสธรรมชาติทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์, lane 9 = 160 nmol ของ กลูโคส, *p*NP-Glc, Met-Glc

ตารางที่ 9 ปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์ที่ปรากฏในปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ภาพที่ 22-25

glucosyl acceptor	ความเข้มข้น (M)	%v/v	H18	A454N11	N189F8	ดัลโคซิเนส ธรรมชาติ	ลินามารส ธรรมชาติ
<u>primary alcohols</u>							
methanol	0.9	3.6	++	++	+++	++	+++
	5.0	20.2	+++	+++	+++	+++	+++b
	10.0	40.5	+++	+++	+++	+++	+++b
ethanol	0.9	5.2	++	++	+++	++	+++a
	5.0	29.2	+++	+++	+++	+++	+++b
	10.0*	58.3	++	++	++	++	+++b
<i>n</i> -propanol	0.9	6.7	+++	+++	+++a	+++	+++b
	5.0*	37.4	++	++	++	++	++b
<i>n</i> -butanol	0.9	8.2	+++	+++	+++a	+++	+++b
<i>iso</i> -butanol	0.9	8.3	+++	+++	+++a	+++	+++b
<u>secondary alcohols</u>							
	0.9	6.9	+	+	+	+	+++a
<i>iso</i> -propanol	5.0	38.3	++	++	++	++	+++b
<i>sec</i> -butanol	0.9	8.3	+	+	+	+	+++a
<u>tertiary alcohols</u>							
<i>tert</i> -butanol	0.9	8.5	-	-	-	-	++a
	5.0*	47.1	-	-	-	-	++b

หมายเหตุ

- = ไม่มีปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์เลย

+ = มีปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์น้อยมาก

++ = มีปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์น้อย

+++ = มีปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์มาก

a = มีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่ใน lane น้อย

b = มีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่ใน lane น้อยมาก

* = มีปริมาณ *p*NP-Glc เหลืออยู่ใน lane

จากภาพที่ 22-25 และตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้ C_1 - C_4 แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวรับกลูโคสนั้นได้ผลดังนี้

1. ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-butanol) ที่มีความเข้มข้น 0.9 M พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติสามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 ซึ่งสามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้ดีกว่าเอนไซม์ดัดโคซินธรรมชาติ H18 และ A454N11 เมื่อพิจารณาเอนไซม์ดัดโคซินธรรมชาติ H18 และ A454N11 จะพบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้ดีพอๆกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (5, 10 M methanol, 5, 10 M ethanol, 5 M *n*-propanol, 5 M *iso*-butanol) พบว่าในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ทุกตัวจะเกิดได้ดีขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณกลูโคสที่เหลือน้อยลง

2. ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (*iso*-propanol, *sec*-butanol) ที่มีความเข้มข้น 0.9 M จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติ สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้ดีที่สุด ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นๆสามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้เท่าๆกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น (5 M *iso*-propanol) พบว่าในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทุกตัวจะเกิดได้ดีขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณกลูโคสที่เหลือน้อยลงและปริมาณอัลคิลกลูโคไซด์ที่เพิ่มมากขึ้น

3. ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ตติยภูมิ (*tert*-butanol) ที่มีความเข้มข้น 0.9 M จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติ สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้ดีที่สุด ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นๆไม่สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ได้เลยแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (5 M *tert*-butanol) ขึ้นแล้วก็ตาม

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติ จะเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้ C_1 - C_4 แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวรับกลูโคสได้ดีที่สุด สำหรับเอนไซม์ H18 สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol) เป็นตัวรับกลูโคสได้ดี และสามารถใช้อัลกอฮอล์ทุติยภูมิ (*iso*-propanol และ *sec*-butanol) เป็นตัวรับกลูโคสได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้อัลกอฮอล์ตติยภูมิ (*tert*-butanol) เป็นตัวรับกลูโคสได้ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ *tert*-butanol คล้ายคลึงกับโครงสร้างของส่วนอะไกล โคนของลินามาริน นั่นคือ มีหมู่แทนที่ (substituent) 3 หมู่ ที่ติดกับคาร์บอนอะตอมที่

สร้างพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ซึ่งผลการทดลองย้ายหมู่กลูโคส สอดคล้องกับการศึกษา จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ H18 ที่พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายลินามาริน ได้ เมื่อพิจารณา จากผลการทดลองในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ของเอนไซม์ H18 กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ พบว่าคล้ายคลึงกับคัลโคซิเนสธรรมชาติ ดังที่เคยมีรายงานมาก่อน (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) ดังนั้นเราสามารถนำเอนไซม์ H18 หรือรีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส มาใช้ในการศึกษาปฏิกิริยา ย้ายหมู่กลูโคสแทนคัลโคซิเนสธรรมชาติได้

สำหรับเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N11 จะเห็นได้ว่ามีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่ กลูโคสกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิที่ความเข้มข้นต่างๆ คล้ายคลึงกับเอนไซม์คัลโคซิเนส ธรรมชาติ และ H18 และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับแอลกอฮอล์ตติยภูมิได้ เช่นเดียวกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18 ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์ A454N11 มีคุณสมบัติใน การเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสคล้ายคลึงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18 หรืออาจจะ กล่าวอีกนัยหนึ่งว่าตำแหน่ง A454 ของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไม่น่าจะเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาย้ายหมู่ กลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ A454N11 ที่พบว่ามีคุณสมบัติ คล้ายคลึงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18

ส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคส ในการ เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18 เนื่องมาจากว่าเมื่อทำ การเปลี่ยนกรดอะมิโนแอสปารจินไปเป็นกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนในเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 ทำให้สภาพแวดล้อมบริเวณจับอะไกลโคโคนมีความเป็น hydrophobic เพิ่มมากขึ้น เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 จึงสามารถใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวรับกลูโคสในปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ได้ดีขึ้น เพราะแอลกอฮอล์เป็นสารที่มีความเป็น hydrophobic เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 สามารถใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้เท่าๆเอนไซม์ คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ H18 อาจเป็นเพราะแอลกอฮอล์ทุติยภูมิมีหมู่เมธิล 2 หมู่ต่อกับ carbinol carbon ซึ่งอาจจะมีส่วนขัดขวางการทำงานของเอนไซม์คัลโคซิเนสในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่ กลูโคสกับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ และการที่เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ เนื่องจากโครงสร้างของ *tert*-butanol คล้ายคลึงกับโครงสร้างของส่วน อะไกลโคโคนของลินามาริน ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของ เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8 ที่พบว่าไม่สามารถย่อยสลายลินามารินได้

ในแอลกอฮอล์บางตัวเช่น *n*-butanol, *iso*-butanol และ *sec*-butanol จะมีข้อจำกัดในการเพิ่มความเข้มข้น เช่นที่ความเข้มข้น 10 M ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่เติมลงไปจะมากกว่าปริมาตรรวมทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา หรือที่ความเข้มข้นสูงๆ ความสามารถในการละลายของแอลกอฮอล์เหล่านี้จะลดลง นอกจากนี้เมื่อสังเกตในปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงเป็นตัวรับกลูโคส จะพบว่ามี *p*NP-Glc หลงเหลืออยู่ อาจเป็นเพราะแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูง จะไปทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ดังนั้นในการเปรียบเทียบปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับกลูโคสควรจะใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (เช่นที่ 0.9 M) หรือการที่นำเอนไซม์มาทำละลายบ่อยๆ (ที่อุณหภูมิสูงกว่า -20 °C) ก็ส่งผลให้เกิดความเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นการวัดปริมาณสารโดยวิธีการสังเกตด้วยตา ผลที่ได้จึงมีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่งและไม่สามารถบอกความแตกต่างในเชิงปริมาณได้ ถ้าจะให้มีความแม่นยำมากขึ้นต้องนำผลของโครมาโตกราฟีบนชั้นบางที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง densitometer และเทียบกับกราฟมาตรฐานของ กลูโคส, methyl glucoside และ *p*NP-Glc หรือตรวจสอบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์โดยวิธีหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยน้ำตาล 2',4'-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoro- β -D-glucopyranoside จากนั้นบ่มเอนไซม์ที่ไม่ทำงานนี้กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แล้วทำการวัดอัตรา reactivation ของเอนไซม์ (Hommalai *et al.*, 2005)

สรุป

จากการโคลนยีนคัดโคชินเนสเข้าสู่ *Pichia pastoris* (GS115) จะพบกิจกรรมของเอนไซม์รีคอมบิแนนต์คัดโคชินเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.5%(v/v) methanol เมื่อนำอาหารที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ดังที่กล่าวมาแล้ว พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป (19.48 U/L) และเมื่อพิจารณาจากรูปเจลในการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่รีคอมบิแนนต์คัดโคชินเนสที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าคัดโคชินเนส ที่พบตามธรรมชาติ อาจเนื่องมาจากกระบวนการเติมน้ำตาลที่แตกต่างกันระหว่างยีสต์กับพืช รีคอมบิแนนต์คัดโคชินเนสที่บริสุทธิ์สามารถย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside, *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) และ dalcocochinin-glucoside ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายลินามารินได้ และสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆคล้ายคลึงกับคัดโคชินเนสที่พบตามธรรมชาติ ดังนั้นเราสามารถนำรีคอมบิแนนต์คัดโคชินเนสที่ได้ไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คัดโคชินเนสในขั้นต่อไปได้

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากข้าวโพด (*ZmGlu1*) กับคัดโคชินเนสและลินามาริน พร้อมกับตรวจสอบตำแหน่งของแขนงข้าง (side chain) ในโครงสร้างจำลองของเอนไซม์คัดโคชินเนส พบว่ากรดอะมิโน N189 และ A454 ของคัดโคชินเนส ซึ่งตรงกับกรดอะมิโน F205 และ N472 ของลินามาริน เป็นตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณจับอะไกลโคโคน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้สร้างเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ A454N ซึ่งเป็นการแทนที่กรดอะมิโนแอสปารากีนที่ตำแหน่ง 189 และกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 454 ของคัดโคชินเนสด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนและแอสปารากีนของลินามาริน ตามลำดับ จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ A454N พบว่าตำแหน่ง N189 และ A454 ของเอนไซม์คัดโคชินเนส ไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลินามาริน แต่ตำแหน่ง N189 น่าจะเป็นตำแหน่งที่สำคัญต่อการย่อยสลาย *p*NP-Glc และ dalcocochinin-glucoside

เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับ แอลกอฮอล์ C_1 - C_4 ที่ความเข้มข้น 0.9 M พบว่าตำแหน่ง N189 ของเอนไซม์คัดโคชินเนส อาจจะเป็นตำแหน่งสำคัญที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิให้ดียิ่งขึ้น ส่วน A454 ของเอนไซม์คัดโคชินเนส ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส และตำแหน่งทั้ง 2 นี้

ของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 2 ตัว ที่ไม่สามารถย่อยสลายลินามารินได้ เนื่องจากโครงสร้างในส่วนอะโกลโคน ของลินามารินคล้ายคลึงกับโครงสร้างของแอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิ

ดังนั้นถ้าจะเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ คัลโคซิเนส ให้สามารถย่อยสลาย ลินามาริน และเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับแอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิได้ ควรทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ คัลโคซิเนส กับ ลินามารเอส และคิดว่ากรดอะมิโนนั้นน่าจะปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับกรดอะมิโนตรงบริเวณบริเวณจับอะโกลโคน แล้วส่งผลให้สามารถย่อยสลายลินามาริน และเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิได้ หรือทำการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งพร้อมกัน (multiple mutation)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จิณณสุวรร สวัสดิวัฒน์, ม.ร.ว., ฤดี สุทธาฤทธิ, เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย, จันทรกานต์ พิภพมงคล และ C. Bucke. 2538. รายงานวิจัยเรื่องการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสจากพืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต. 82-84.
- Barrett, T., C. G. Suresh, S. P. Tolley, E. J. Dodson and M. A. Hughes. 1995. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. **Structure**. 3: 951-960.
- Carlsson, S. R. 1993. Isolation and characterization of glycoproteins, pp.1-26. In M. Fukuda and A. Kobata, eds. **Glycobiology A Practical Approach**. Oxford University Press, New York.
- Cereghino, J.L. and J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**. 24: 45-66.
- Cicek, M., D. Blanchard, D.R. Bevan and A. Esen. 2000. The Aglycone Specificity-determining Sites Are Different in 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize β -Glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -Glucosidase). **J. Biol. Chem**. 275: 20002-20011.
- Cino, J. n.d. High Yield Protein Production from *Pichia pastoris* Yeast: A Protocol for Benchtop Fermentation. *Pichia pastoris* Protocol for Growth in a Fermentor. (Unpublished manuscript)
- Czjzek, M., M. Cicek, V. Zamboni, D. R. Bevan, B. Henrissat and A. Esen. 2000. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. **PNAS**. 97: 13555-13560.

Eppendorf North America. 2006. Molecular structure of the Amino Acids. Available Source:

<http://www.eppendorfna.com/applications/practical-mole.asp>, April 18, 2006.

Esen, A. 1993. β -Glucosidases Overview, pp. 1-14. In A. Esen, ed. **β -glucosidases**

Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington, D.C.

Hommalai, G., P. Chaiyen and J. Svasti. 2005. Studies on the transglucosylation reactions of cassava and Thai rosewood β -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. **Arch Biochem Biophys**. 442: 11-20.

Hughes, M. A. 1993. Molecular Genetic of Plant Cyanogenic β -Glucosidases, pp.153-169. In

A. Esen, ed. **β -glucosidases Biochemistry and Molecular Biology**. American Chemical Society, Washington, D.C.

Invitrogen. n.d. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. EasySelectTM *Pichia* Expression Kit. Available Source:

<http://www.invitrogen.com>, March 29, 2002.

Jahn, M., H. Chen, J. Mullegger, J. Marles, R.A.J. Warren and S.G. Withers. 2004.

Thioglycosynthases: double mutant glycosidases that serve as scaffolds for thioglycoside synthesis. **Chem. Commun**. 274-275.

Kemisk Institute of Syddansk University. 2001. Cassanova lever. Available Source:

http://www.sdu.dk/.../kemi_net/LostFast/Cassanova.htm, February 19, 2006.

Keresztessy, Z., K. Brown, M.A. Dunn and M.A. Hughes. 2001. Identification of essential

active-site residues in the cyanogenic β -glucosidase (ลิ้นจี่) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. **J. Biochem**. 353: 199-205.

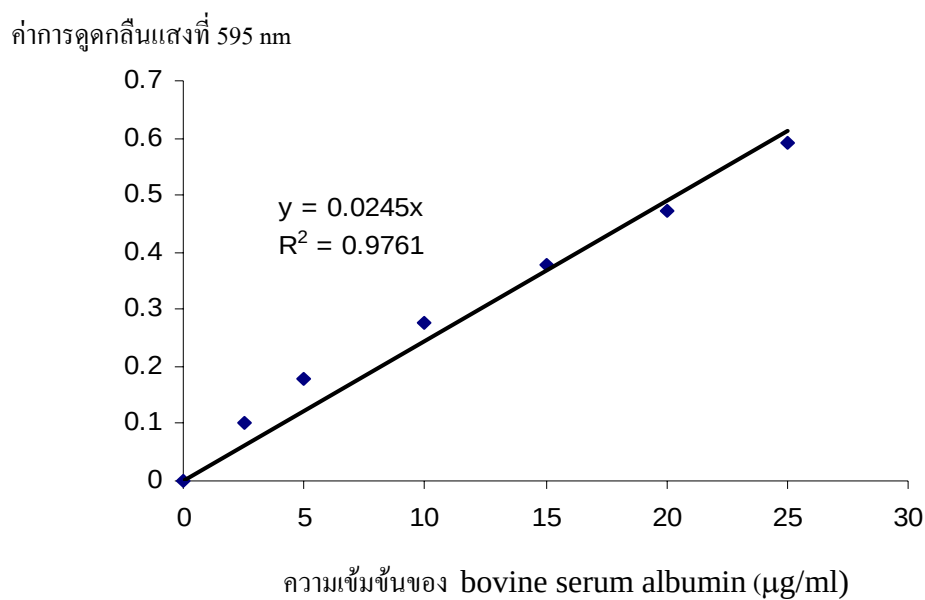
- Ketudat-Cairns, J.R., V. Champattanachai, C. Srisomsap, B. Wittman-Liebold, B. Thiede and J. Svasti. 2000. Sequence and Expression of Thai Rosewood β -Glucosidase/ β -Fucosidase, a Family 1 Glycosyl Hydrolase Glycoprotein. **J. Biol. Chem.** 128: 999-1008.
- Kim, Y. K., S. S. Lee, R. Antony J. Warren and S. G. Withers. 2004. Directed Evolution of a Glycosynthase from *Agrobacterium* sp. Increases Its Catalytic Activity Dramatically and Expands Its Substrate Repertoire. **J. Biol. Chem.** 279: 42787-42793.
- Lirdprapamongkol, K. and J. Svasti. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 22: 1889-1894.
- Mackenzie, L.F., Q. Wang, R.A.J. Warren and S.G. Withers. 1998. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. **J. Am. Chem. Soc.** 120: 5583-5584.
- Mayer, C., D.L. Zechel, S.P. Reid, R.A.J. Warren and S.G. Withers. 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. **FEBS Lett.** 466: 40-44.
- Singh, A. and K. Hayashi. 1995. Construction of Chimeric β -Glucosidases with Improved Enzymatic Properties. **J. Biol. Chem.** 270: 21928-21933.
- Srisomsap, C., P. Subhasitanont, S. Techasakul, R. Surarit and J. Svasti. 1999. Synthesis of homo- and hetero-oligosaccharides by Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 21: 947-951.
- Srisomsap, C., J. Svasti, R. Surarit, V. Champattanachai, P. Sawangareetrakul, K. Boonpuan, P. Subhasitanont and D. Chokchaichamnankit. 1996. Isolation and Characterization of an Enzyme with β -Glucosidase and β -Fucosidase Activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. **J. Biochem.** 119: 585-590.

- Surarit, R., H. Matsui, S. Chiba, J. Svasti and C. Srisomsap. 1997. Evidence for the presence of a single active site in β -D-fucosidase / β -D-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* seeds. **Biosci. Biotech. Biochem.** 61: 93-95.
- Surarit, R., J. Svasti, C. Srisomsap, W. Suginta, S. Khunyoshyeng, S. Nilwarangkoon, P. Harnsakul and E. Benjavongkulchai. 1995. Screening of glycohydrolase enzymes in Thai plant seeds for potential use in oligosaccharide synthesis. **J. Sci. Soc. Thailand.** 21: 293-303.
- Svasti, J., T. Phongsak and R. Sarnthima. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassava β -glucosidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 305: 470-475.
- Svasti, J., C. Srisomsap, S. Techasakul and R. Surarit. 1999. Dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside and its β -glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochem.** 50: 739-743.
- Toonkool, P., J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2003. Beta-Glucosidases from Thai Plants. **Srinakharinwirot University Science Journal.** 19: 1-10.
- Zechel, D. L. and S. G. Withers. 2000. Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18.

ภาคผนวก

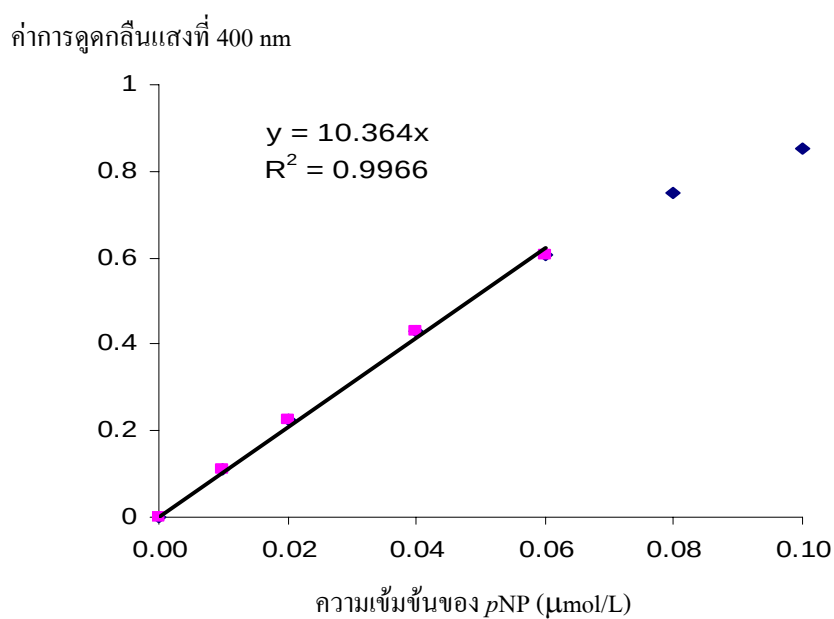
ภาคผนวก ก
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีน



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$

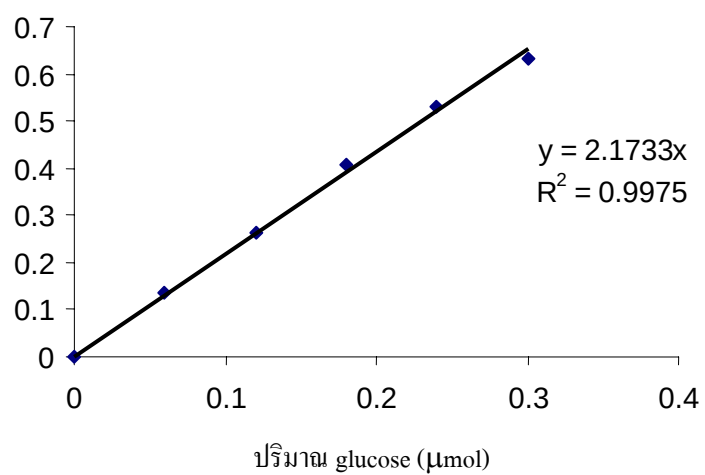
2. กราฟมาตรฐานของ *para*-nitrophenyl



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานของ *pNP* ที่มีความเข้มข้น 0-1 $\mu\text{mol/L}$

3. กราฟมาตรฐานของกลูโคส

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 nm



ภาพผนวกที่ ก3 กราฟมาตรฐานของกลูโคส ที่มีปริมาณ 0-0.3 μmol

ภาคผนวก ข
การเตรียมสาร

1. ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ในการวิเคราะห์หัตถ์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE)

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE

สาร	7.5% resolving gel	4% stacking gel
น้ำกลั่น	2050 μ l	3050 μ l
30% T, 2.67% C polyacrylamide	1650 μ l	650 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1250 μ l
10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)	50 μ l	50 μ l
10% (w/v) ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	10 μ l

2. ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ในการวิเคราะห์หัตถ์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนซเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis หรือ non-denaturing PAGE)

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม non-denaturing PAGE

สาร	7.5% resolving gel	4% stacking gel
น้ำกลั่น	2248 μ l	2200 μ l
30% T, 2.67% C polyacrylamide	1250 μ l	500 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1250 μ l
0.2 M EDTA, pH 6.9	-	50 μ l
10% (w/v) ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	10 μ l

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนส His6-TRBG

Query: 1482 tgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaatttctcccaacgggtaggg1541
 ||
 Sbjct: 611 tgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaatttctcccaacgggtaggg 670

Query: 1542 ttagtggaggcataaaccacagaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcac1601
 |||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||| |
 Sbjct: 671 ttagtggaggcat-aaccacagaggagttgactactac-acagggtcatc-atgagtc-c 726

Query: 1602 tggccaatggc 1612
 ||||| |||||
 Sbjct: 727 tggccnatggc 737

2. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His6-TRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GNCCTCATGTNTTGGGACAGCATCNTCCNTCGNTACCAGNTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGAT
 AACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCT
 ATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAGTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCT
 CCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTG
 GCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCT
 TCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAA
 GCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGACACAGGTGCGA
 TGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGA
 TCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTTC
 CTTGCACGTAGTTTNGGGTTATACCGCTTTCAATAGCACATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATNTCTGACTTCNA
 TGTGGATGGTTATGGACCCCTTANGCAGNANGNTTCNNATGCTGCATACTANTNGAATCNATGCTANTTCTNNATC
 ANCNANTNNTAGGNTCTTGATTTTGGATANTTNCCTNNTNNNCNATNNTGNTNNNNGCCCNNTCNCNACNNTNCN
 TNNNNNGGGTTNGGCNNCCCGNGTNTTCNAGNCNNTNNTTNGANNNCNNGNCCNNGNNNANNCNNGNNNNNNNTN
 CTNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNCNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNN

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

Query: 1314 ttgggacagcatcctcc-tcg-taccag-tatgaaggtgagggcagagtaccaagtatat1370
 |||||||||||| ||| ||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 12 ttgggacagcatcntccntcgntaccagntatgaaggtgagggcagagtaccaagtatat 71

Query: 1371 gggataacttcacccaccaatattccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttg1430
 ||
 Sbjct: 72 gggataacttcacccaccaatattccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttg 131

Query: 1431 cagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatattgaacttgg1490
 ||
 Sbjct: 132 cagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatattgaacttgg 191

Query: 1491 atgcttatagaatgtccatctcctggcctagaatttctcccaacgggtagggtagtggag1550
 ||
 Sbjct: 192 atgcttatagaatgtccatctcctggcctagaatttctcccaacgggtagggtagtggag 251

Query: 1551 gcataaaccacagaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatg1610
 ||
 Sbjct: 252 gcataaaccacagaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatg 311

```

Query: 1611 gcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatgagt1670
      |||
Sbjct: 312 gcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatgagt 371

Query: 1671 acggtggcttcttaaatacatagcgttgtaaatgattccaagactatgcggatccttgct1730
      |||
Sbjct: 372 acggtggcttcttaaatacatagcgttgtaaatgattccaagactatgcggatccttgct 431

Query: 1731 tccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttca1790
      |||
Sbjct: 432 tccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttca 491

Query: 1791 ccgcgaatgggatgcatacggatgtttgcaccaggctcgatgttctccatcgtaaatc1850
      |||
Sbjct: 492 ccgcgaatgggatgcatacggatgtttgcaccaggctcgatgttctccatcgtaaatc 551

Query: 1851 caacttgcacagggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcc1910
      |||
Sbjct: 552 caacttgcacagggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcc 611

Query: 1911 tttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggta1970
      |||
Sbjct: 612 tttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggta 671

Query: 1971 caataggcatttcccttgcacgtagttt-gggttataaccgctttcaaatagcacatcagat2029
      |||
Sbjct: 672 caataggcatttcccttgcacgtagtttngggttataaccgctttc-aatagcacatcagat 730

Query: 2030 caaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggtttatggacc 2082
      |||
Sbjct: 731 c-aaatgctaccagcgatntc-tgacttc-natgtggtatg-ttatggacc 779

```

3. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His6-TRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

[illegible]

Query: ลำดับเบสของยีนคัดโคชินส His6-TRBG ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัดโคชินส His6-TRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TRF2

```

Query: 1725 tttgcttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaa1784
          |||||      |||||
Sbjct: 4     tttgcttcntttatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaa 63

Query: 1785 tcttcaccgcgaatgggtatgcatacggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgt1844
          |||||      |||||
Sbjct: 64    tcttcaccgcgaatgggtatgcatacggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgt 123

Query: 1845 acaatccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacc1904
          |||||      |||||
Sbjct: 124   acaatccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacc 183

Query: 1905 tgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcaga1964
          |||||      |||||
Sbjct: 184   tgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcaga 243

Query: 1965 aaggtacaataggcatttctcttg-cacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcaca2023
          |||||      |||||
Sbjct: 244   aaggtacaataggcatttctcttgnacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcaca 303

Query: 2024 tcagatcaaaatgctacccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccca2083
          |||||      |||||
Sbjct: 304   tcagatcaaaatgctacccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccca 363

Query: 2084 cttacagcaggaaggatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaag2143
          |||||      |||||
Sbjct: 364   cttacagcaggaaggatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaag 423

Query: 2144 ttactacagatcaagccaaattagtttaaggggttcatttgattttattggactaaactat2203
          |||||      |||||
Sbjct: 424   ttactacagatcaagccaaattagtttaaggggttcatttgattttattggactaaactat 483

Query: 2204 tacaccactaactatgctaccaaactcagatgcgtcaacatgctgccacctagttacctc2263
          |||||      |||||
Sbjct: 484   tacaccactaactatgctaccaaactcagatgcgtcaacatgctgccacctagttacctc 543

Query: 2264 acagatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgact2323
          |||||      |||||
Sbjct: 544   acagatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgact 603

Query: 2324 ccctcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaag2383
          |||||      |||||
Sbjct: 604   ccctcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaag 663

Query: 2384 gaaaagtataacaatcctttggtttacatcactgaaaatgggtatagatgagaagaatgat2443
          |||||      |||||
Sbjct: 664   gaaaagtataacantcctttggttnacatcactgaaaatgggtatanatganaagaatgat 723

Query: 2444 gcatactatcact 2457
          |||||
Sbjct: 724   gcatactatcact 737

```

4. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His6-TRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

ANNNNGNTTACCACAGANTCANGCCAAATTAGTTANGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACT
 AACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTAC
 AGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGA
 TTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAAT
 GATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTAT
 GTTCGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGG
 CTGAGGGTTATACATCAGGATTTGGATTATATTTTGTGAACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGC
 AACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGG
 AGCTTATCAACGATGATCAAGGAAGAAAAGACAAACCCAGTGGGGCATTGAAGGCTTTCCGCGTTGGTCTAGGG
 GTTCTATTCTAGAACAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGCGACATCATCATCATCATGAGTT
 GTANCNTANACNGACNGTCCNCGTTCACTGGGGCTACANANACGGCTGCNAATCTATCAAAGAGTCNAAGCCTTG
 CGNAAGCGNTCNTNGACNNANNGACNAATAGANNNGGNNNGNNNCNNNACGCNANNCNNCCNNAANTNGGGGGGA
 NNNNTGGTNGTCCCCANNAANGACNNGNCCNNNANNCNNNCNNGCNCNCNACNNNNCCGNCNGGAANTNNANN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNN
 NNNNNNNNGNNGGNGNN
 NNNNNNNNNNGNNN

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2155 tcaagccaaattagttgaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa2214
 ||| |||||||||||| ||
 Sbjct: 19 tcanccaaattagttanggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa 78

Query: 2215 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctca2274
 ||
 Sbjct: 79 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctca 138

Query: 2275 agtcactctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatg2334
 ||
 Sbjct: 139 agtcactctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatg 198

Query: 2335 gatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataa2394
 ||
 Sbjct: 199 gatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataa 258

Query: 2395 caatcctttgggtttacatcactgaaaatgggtatagatgagaagaatgatgcatcactatc2454
 ||
 Sbjct: 259 caatcctttgggtttacatcactgaaaatgggtatagatgagaagaatgatgcatcactatc 318

Query: 2455 acttgaggaaatcctt-gatagacacttatagaattgatagttattatcgatcactctctttt2513
 |||||||||||||| ||
 Sbjct: 319 acttgaggaaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcactctctttt 378

Query: 2514 atgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattgt2573
 ||
 Sbjct: 379 atgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattgt 438

Query: 2574 tggacaactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaact2633
 ||
 Sbjct: 439 tggacaactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaact 498

Query: 2634 acactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggttcaagtattttctggcac2693
 ||
 Sbjct: 499 acactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggttcaagtattttctggcac 558

```

Query: 2694 gtgatcaagagagtgctaaattggaaatTTtagcaccaaaggcaagatggagcttatcaa2753
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 559 gtgatcaagagagtgctaaattggaaatTTtagcaccaaaggcaagatggagcttatcaa 618

Query: 2754 cgatgatcaaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggctttccgcggttgg2813
          |||||||||||||||||||||||| || |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 619 cgatgatcaaggaagaaaagacaaa--cccagtggggcattgaaggctttccgcggttgg 676

Query: 2814 ttcctaggggttctattctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccg2873
          |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 677 -tcctaggggttctattctagaac-aaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccg 734

```


ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนส His8-truncTRBG

1. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His8-truncTRBG โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

```

NCTTCTGANTTTNACNGACTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACATAATTATTCGAAACGATGAGATTT
CCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGNTCAACACTACAACAGAAGAT
GAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGC
CATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGG
GGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCCTCCATTC
AACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAG
TACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGT
TGACCAATTTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATC
TCCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTATGTTGGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGC
TCATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTCATTGGGATCTNCNCAAGCCTGGGAGG
ATGAGTACGGNGGCTTCTTAATCATAGCGTGGTAATGATTTCCAGACTATGCGGATCTTNGCTNCCAATTTNTTGG
ANATAGGGTAAANCN

```

Query: ลำดับเบสของยีนคัดโคชินีส His8-truncTRBG ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัดโคชินีส His8-truncTRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

```

Query: 893  ttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 952
          |||
Sbjct: 20   ttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 79

Query: 953  tcaatttttactgctgtttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccag-tcaacac1011
          |||
Sbjct: 80   tcaatttttactgctgtttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagntcaacac 139

Query: 1012 tacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagattt1071
          |||
Sbjct: 140  tacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagattt 199

Query: 1072 agaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttatt1131
          |||
Sbjct: 200  agaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttatt 259

Query: 1132 gtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaa1191
          |||
Sbjct: 260  gtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaa 319

Query: 1192 aagagaggctgaagctgca 1210
          |||
Sbjct: 320  aagagaggctgaagctgca 338

Query: 1271 gttcctccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcc1330
          |||
Sbjct: 369  gttcctccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcc 428

Query: 1331 tcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaa1390
          |||
Sbjct: 429  tcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaa 488

```

Query: 1391 tatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgaccaatttcaccgc1450
 |||||
 Sbjct: 489 tatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgaccaatttcaccgc 548

Query: 1451 tataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatc1510
 |||||
 Sbjct: 549 tataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatc 608

Query: 1511 tcctggcctagaattctccaacgggtaggggttagtggaggcataaaccaaacaggagtt1570
 |||||
 Sbjct: 609 tcctggcctagaattctccaacgggtaggggttagtggaggcataaaccaaacaggagtt 668

Query: 1571 gactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaacc1630
 |||||
 Sbjct: 669 gactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaacc 728

Query: 1631 attttccattgggatcttccacaagccttggaggatgagtacgggtggcttcttaaatcat1690
 | |||||
 Sbjct: 729 a-ttttccattgggatc-tncncaagcctgggaggatgagtacggnggcttctt-aatcat 785

Query: 1691 agcgttgtaaataatttccaagactatgcggatcttgcctccaattatttggagatagg1750
 |||||
 Sbjct: 786 agcgtggg-aatgatttcc-agactatgcggatcttngctnccaatttnttgganatagg 843

Query: 1751 gtaaa 1755
 |||||
 Sbjct: 844 gtaaa 848

2. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His8-truncTRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

ANACCTCANTTNTTGGGACAGCATCNTCCCCGNTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATA
 ACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTA
 TAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGNGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCT
 CCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTG
 GCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTTATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGGAGGATGAGTACGGTGGC
 TTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTGTCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAA
 AGCATTGGATTACCTAAATGAGCCATCAATCTTACCAGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAAGGTCG
 ATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTG
 ATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTT
 CCTTGCACGTAGTTGGGGTTATACCGCTTTCAATAGCACATCAGATCAAATGCTACCNGCGATATCTTGACTCCCA
 TGTGGATGGTTATGGACCCCTTNCNGCAGGAAGNTTCCNNATAGCNTGCAATATCTANTNGG

Query: 1311	tttttgggacagcatcctcctcg-taccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtata1369
Sbjct: 10	ttnttgggacagcatcntcccgntaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtata 69
Query: 1370	tgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgtt1429
Sbjct: 70	tgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgtt 129
Query: 1430	gcagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttg1489
Sbjct: 130	gcagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttg 189
Query: 1490	-gatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtaggggttagtgg1548
Sbjct: 190	ngatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtaggggttagtgg 249
Query: 1549	aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaa1608
Sbjct: 250	aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaa 309
Query: 1609	tggcataaacaccatttgttaaccatttttcattgggatcttccacaagccttgg-aggatg1667
Sbjct: 310	tggcataaacaccatttgttaaccatttttcattgggatcttccacaagccttgggaggatg 369
Query: 1668	agtacggtggcttcttaaatacatagcggttgtaaatgatttccaagactatgcggatcttt1727
Sbjct: 370	agtacggtggcttcttaaatacatagcggttgtaaatgatttccaagactatgcggatcttt 429
Query: 1728	gcttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatct1787
Sbjct: 430	gcttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatct 489
Query: 1788	tcaccgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaca1847
Sbjct: 490	tcaccgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaca 549
Query: 1848	atccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctga1907
Sbjct: 550	atccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctga 609
Query: 1908	tccttttctcatgcagcaactgtccaaggttacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaag1967
Sbjct: 610	tccttttctcatgcagcaactgtccaaggttacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaag 669
Query: 1968	gtacaataggcatttccttgcacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcag2027
Sbjct: 670	gtacaataggcatttccttgcacgtagtttgggttataccgctttc-aatagcacatcag 728
Query: 2028	atcaaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccactta2087
Sbjct: 729	atc-aaatgcta-ccngcgatatcttgac-tcccatgtggatgg-ttatggacc-citn 783
Query: 2088	cagcaggaaggatccagatagcatgcaatatctagtgg 2127
Sbjct: 784	cnqcaggaagnt-tccnnatagcntcgaatatctantnq 822

3. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His8-truncTRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

NTNCNNNNNNNNNNNNNNNNCTTCTGCNTNCAANTTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAG
 CCATCAATCTTCACCGCGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAA
 CTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGT
 CCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGNCACGTAGTTTGGGTTAT
 ACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGAC
 CCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATC
 AAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGA
 TGCCTCANCATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAGTCACTCTCCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTT
 ATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCCAAAGGACTNCNANATTGGTGGCTTTACTTCAAGG
 GAAAAGTTTAAACANCCNTTGGTTTACATCCCNCGAAAATGGTTTNNATNANAAAAATGNTGCCNCCNTNCCCN
 TGGGGANNCCCGGANNACCCNTNNTANAANGANNNTTTNNCNCNCCCCCNNTTTNNNTCCNANNGNNANTNNGC
 TNGGCCAANNGTAAAGNNTTTNNNNGGGGCTNGGGGG

Query: ลำดับเบสของยีนตัดโคชีเนส His8-truncTRBG ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนตัดโคชีเนส His8-truncTRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1736 ttatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcg1795
 |||
 Sbjct: 35 ttatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcg 94

Query: 1796 aatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtaaatccaact1855
 |||
 Sbjct: 95 aatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtaaatccaact 154

Query: 1856 tgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttct1915
 |||
 Sbjct: 155 tgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttct 214

Query: 1916 catgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaata1975
 |||
 Sbjct: 215 catgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaata 274

Query: 1976 ggcatttccttg-cacgtagtttgggtataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaa2034
 |||
 Sbjct: 275 ggcatttccttgnacgtagtttgggtataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaa 334

Query: 2035 tgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcagg2094
 |||
 Sbjct: 335 tgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcagg 394

Query: 2095 aaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacaga2154
 |||
 Sbjct: 395 aaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacaga 454

Query: 2155 tcaagccaaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa2214
 |||
 Sbjct: 455 tcaagccaaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa 514

Query: 2215 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctca2274
 |||||
 Sbjct: 515 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctc- 573

Query: 2275 agtcactct-cttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggat2333
 |||||
 Sbjct: 574 agtcactctccttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggat 633

Query: 2334 ggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaa-ggaaaagtat2392
 |||||
 Sbjct: 634 ggatgtgcatttatccaaaaggactncnanattgggtgctttacttcaaagggaaaagttt 693

Query: 2393 aacaatcctttggtttacatcact-gaaaatggatatagatgagaagaatgatgc 2445
 |||||
 Sbjct: 694 aacaanccnttggtttacatcccnggaaaatgggttnnatnanaaaaaatgntgc 747

4. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His8-truncTRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

NGGTCCTACAGANCANGCCAAANTTAGTTANGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTA
 TGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAA
 CGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGT
 TGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGC
 ATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGNATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTTCG
 ATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAG
 GGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAATACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACAT
 GGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTT
 ATCAACGATGATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTNGATCTAGATCTTAATCACTA
 GTGAATTCGCGGCCGCCNACGTACGTANAATCACGTGGNCCAGCCGGCCGNCTCGGATCGGTACCNCNANCCGG
 GGNGGCNGCCANCTTTCTAAAACAAAACCCNTCNCAAAANAGGATCTGAATAGCGCCGNCGACCATCNTCNTNTTN
 TTNTTGG

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคจีนีส His8-truncTRBG ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคจีนีส His8-truncTRBG ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2148 ctacagatcaagccaaa-ttagttaagggttcatttgattttattggactaaactattac2206
 |||||
 Sbjct: 6 ctacagancangccaaanttagttanggggttcatttgattttattggactaaactattac 65

Query: 2207 accactaactatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcaca2266
 |||||
 Sbjct: 66 accactaactatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcaca 125

Query: 2267 gatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccc2326
 |||||
 Sbjct: 126 gatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccc 185

Query: 2327 tcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaaggaa2386
 |||||
 Sbjct: 186 tcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaaggaa 245

Query: 2387 aagtataacaatccttttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgca2446
 |||
 Sbjct: 246 aagtataacaatccttttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgca 305

Query: 2447 tcactatcacttgaggaatccttg-atagacacttatagaattgatagttattatcgtca2505
 |||
 Sbjct: 306 tcactatcacttgaggaatccttgnatagacacttatagaattgatagttattatcgtca 365

Query: 2506 tctcttttatgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatg2565
 |||
 Sbjct: 366 tctcttttatgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatg 425

Query: 2566 gtcattgttggacaactttgaatgggctgaggggtatacatcacgatttggattatattt2625
 |||
 Sbjct: 426 gtcattgttggacaactttgaatgggctgaggggtatacatcacgatttggattatattt 485

Query: 2626 tgtgaactacactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattt2685
 |||
 Sbjct: 486 tgtgaactacactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattt 545

Query: 2686 tctggcacgtgatcaagagagtgcataattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggag2745
 |||
 Sbjct: 546 tctggcacgtgatcaagagagtgcataattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggag 605

Query: 2746 cttatcaacgatgatcaaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttt 2803
 |||
 Sbjct: 606 cttatcaacgatgatcaaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttt 663

Query: 2839 aaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgac 2878
 |||
 Sbjct: 784 aaaaccntcncaaanaggatctgaatagcgccgncgac 823

5. ผลของการหาลำดับเบสของยีน His8-truncTRBG โดยใช้ไพรเมอร์ TRF4

ANTGGCCATTGTTGGACACTTTGAANTGGGCTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAACTACAC
 TACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAA
 TTGGAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCCAAGTGGG
 GCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGTACGTAGAATTCACGTGGC
 CCAGCCGGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAG
 AGGATCTGAATAGCGCCGTGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCCTCAGT
 TCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAG
 AGATGCAGGCTTCATTTTGTACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTGTCAATTTGTTTCT
 TCTCGTACGAGCTNGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTGGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCAT
 TCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAAATTAGTGAGACTTCGTTTGTGCGGAT
 CCCACACACNATAGCTTCAAAANGTTCCTACNCCTTTTTACCCNCCAAATTTCTCGGACTCGGGCATCGCCGTA
 CNCTTCAAANCCCAAGCCCGNNTNCTANTT

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F

1. ผลของการหาลำดับเบสของยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์ N189F โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

CNTCTTGAGTTTACNGACNTTTAACNGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTGAAACGATGAGAT
TTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTGCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGNTCAACACTACAACAGAAG
ATGAAACGGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTT
GCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAA
GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCCTCCAT
TCAACCGAAGCTGTTTTCTTTCAGATTTCAATTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAG
AGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCA
GTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAGTGGATGCTTATAGAATGTCCA
TCTCCTGGCCTAGAATTCTCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCTTAACCAAACAGGAGTTGACTACTACACNGGC
TCNTCANGAGTCTGGCCANGGGCTAACNCCNTTGTANCNTTTTCATGGGATCTNCCNANCCTGGGGGNTGAGTCG
GGGGTTTTAATCNTANNGTGNAANGNTCCCAAANTNGNGGNTTTGGTNCANTNTTGGGAN

Query: ลำดับเบสของยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์ N189F ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์ N189F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

Query: 889 gacttttaac-gacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagat 947
||| ||||| ||
Sbjct: 17 gacntttaacngacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagat 76

Query: 948 ttcttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccag-tc1006
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 77 ttcttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagntc 136

Query: 1007 aacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactca1066
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 137 aacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactca 196

Query: 1067 gatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgcattttccaacagcacaaataacggg1126
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 197 gatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgcattttccaacagcacaaataacggg 256

Query: 1127 ttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctc1186
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 257 ttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctc 316

Query: 1187 gagaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcct1246
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 317 gagaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcct 376

Query: 1247 ccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtag1306
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 377 ccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtag 436

Query: 1307 cagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcaccaccaaataatcca1366
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 437 cagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcaccaccaaataatcca 496

Query: 1367 gaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataag1426
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 497 gaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataag 556

Query: 1427 aaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctgg1486
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||
Sbjct: 557 aaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctgg 616

Query: 1487 cctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaaacaggagttgactac1546
 |||
 Sbjct: 617 cctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggc-ttaaccaaacaggagttgactac 675

2. ผลของการหาลำดับเบสของยีนคัดโคจีนในสกลายพันธุ์ N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGGAGGACTTCANTGTTTTGNGGACAGCNTCNTCCCTCGNTACCAGNTATGAACGGTGAGGGCAGAGTACCAAGNT
ATATGGGATAACTTCACCCACCAANTATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAA
TTTCACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAC TTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGC
CTAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAA
TGAGTCACTGGCCAATTGGCATAACACGTTTGTAACCAATTTTTCTATTGGGATCTTCCCAACGCTTGGGAGGATGA
TGACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTTCCAAGACATTCGCGATCTTTTGCTTCAATTATTGGA
GATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTACC CGCTTTGGGTATGCATACGGTATGTTTG
CACCAGGTGATGTNCTCCATCGTACAATCCAAC TTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACANAGACTTATCTGGTTGC
GCNCAACCTGATCCTTTCTCATGACGAAC TGCCAAGTGTCCAAAGGAAGTTNCNGGACCTCNNAANGNTCNANN
NGGCTTTCNTGNCCNTNNTTTGGGGTTNNCCCC TTCCAATTGCCNTNNNATCNAANGNNGNNCCCCNNNANTTT
TGANTCCNNNTNNGGGNGGNTTTNGGGCCCCNTNCCNNNGGGGGGGNTNCCCNANNNCNNCCNANTNNNNNN
GGGANNCCNN

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ N189F ที่คาดว่าจะจะเป็น
Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ N189F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

```

Query: 1316 ggtgagggcagagtaccaag-tatatgggataaacttcacccaccaa-tatccagaaaaga1373
Sbjct: 55 ggtgagggcagagtaccaagntatatgggataaacttcacccaccaantatccagaaaaga 114

Query: 1374 tagcggatagaagcaacgggagatgttgcagttgaccaatttcaccgctataagaaggata1433
Sbjct: 115 tagcggatagaagcaacgggagatgttgcagttgaccaatttcaccgctataagaaggata 174

Query: 1434 ttgcaatcatgaaggatatgaacttggtatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaa1493
Sbjct: 175 ttgcaatcatgaaggatatgaacttggtatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaa 234

Query: 1494 ttctcccaacgggtagggtagtgagggcataaaccaaacaggagttgactactacaaca1553
Sbjct: 235 ttctcccaacgggtagggtagtgagggcataaaccaaacaggagttgactactacaaca 294

Query: 1554 ggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccattttgtaaccatttttcattggg1613
Sbjct: 295 ggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccattttgtaaccatttttcattggg 354

Query: 1614 atcttccacaagccttgg-aggatgagtagcgggtgcttctttaatcatagcggttgtaaat1672
Sbjct: 355 atcttccacaagccttgggaggatgagtagcgggtgcttctttaatcatagcggttgtaaat 414

Query: 1673 gatttccaagactatgcggtatcttgccttccaattatttggagatagggtaaagcattgg1732
Sbjct: 415 gatttccaagactatgcggtatcttgccttccaattatttggagatagggtaaagcattgg 474

Query: 1733 attacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgtttgggtatgcatacgggtatgtttgca1792
Sbjct: 475 attacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgtttgggtatgcatacgggtatgtttgca 534

Query: 1793 ccagggtcgatgttctccatcgtaacaatccaacttgcacagggtggggatgcaggaacagag1852
Sbjct: 535 ccagggtcgatgttctccatcgtaacaatccaacttgcacagggtggggatgcaggaacanaq 594

```

Query: 1853 acttatctggttgcgcacaaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaa1912
 |||
 Sbjct: 595 acttatctggttgcgcncaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgtccaaa 654

3. ผลของการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

C
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTTCTGCNTNCAANTTATTTGGACGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAACTGA
 GCCATCAANTCTTACC GCGNTNTGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATC
 CAACTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGTTTGC GCAACCTGATCCTTTCTCATGACGAAC
 TGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCCCTTGNCACGTAGTTTGGGT
 TATACCGCTTTCAAATAGCATCATGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTTCATGTGGATGGTTTATG
 GACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAG
 ATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACCCACTAACTATGCTACCAAATC
 AGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCANCGCAATGGGGTC
 TTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCNAAAGGACTCCANATTTGGTNGCTTTACTTCA
 NGGAAAGTATAACAANCCTTTGGNTTNCATCCCTGAAAAATGGTNTAANTGAAAANAATGATGCCTCCCNNTCCCTG
 GNGGAATCCTNGANNAACCCCTTTTNAATNGNANGNTNTNCCNCCCCCCTTTTNGTNGCAANNNGNNAATAGGNT
 NGGNC AAA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ N189F ที่คาดว่าจะจะเป็น
Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ N189F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1706 ttattttgga-gatagggtaaagcattggattacactaaa-tgagccatcaa-tcttcacc1762
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 34 ttattttggacgatagggtaaagcattggattacactaaactgagccatcaantcttcacc 93

Query: 1763 gcggtt-tgggatatgcatacgggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtagaatcc1821
||| | ||
Sbjct: 94 qcgntntgggatatgcatacgggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtagaatcc 153

Query: 1822 aacttgacaggtggggatgcaggaaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcct1881
 |||
 Sbict: 154 aacttgacaggtggggatgcaggaaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcct 213

Query: 1882 ttctcatgcagcaactgtccaagtgacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtagc1941
 |||
 Sbict: 214 ttctcatgcagcaactgtccaagtgacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtagc 273

Query: 1942 aataggcatttccttg-cacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatc2000
 |||
 Sbict: 274 aataggcatttccttgcacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatc 333

Query: 2001 aaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacag2060
 |||||
 Sbict: 334 aaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacag 393

Query: 2061 caggaaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttacta2120
 |||
 Sbict: 394 caggaaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttacta 453

Query: 2121 cagatcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacacca2180
 |||
 Sbjct: 454 cagatcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacacca 513

Query: 2181 ctaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatc2240
 |||||
 Sbjct: 514 ctaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatc 573

Query: 2241 ctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcag2300
 |||||
 Sbjct: 574 ctcaagtcactctcttacagcancgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcag 633

Query: 2301 gatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagt2360
 |||||
 Sbjct: 634 gatggatgtgcatttatccnaaaggactccanatttggtngctttacttcangg-aaagt 692

Query: 2361 ataacaatcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcacac2420
 |||||
 Sbjct: 693 ataacaancctttggtntncatccctgaaaatggtntaantgaaaanaatgatgcctccc 752

Query: 2421 tatcacttgaggaatccttga 2441
 || || |||||
 Sbjct: 753 nntccctggnggaatcctnga 773

4. ผลของการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

NNNNNGCCNTACAGANCANGCCAACTTAGTTANGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTA
 ACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGNTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTAC
 AGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGA
 TTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAAT
 GATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGNATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTAT
 GTTCGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGG
 CTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAAGTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGC
 AACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATNGGAAATTTAGCACAAAAGGCAAGATGGGC
 TTATCAACGATGATCAGGAAGAAAGACAAACCCAGTGGGGCATGAAGNCTTNGANNAATCTNANCNCTANTGATT
 CCNGGCNCTGCNNACGTAAATCCCGTGNCCANCGGGCNCCTCGGATCGNNCCCAACCCGGGGGCCCANNTTNTAA
 AAAAACCTTCCNAAAAGGNTTNNANNNNNCNCNNANNTNNNNNNNT

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F ที่คาดว่าจะเป็

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2119 tacagatcaagccaaa-ttagttaagggttcatttgattttattggactaaactattaca2177
 |||||
 Sbjct: 11 tacagancangccaaacttagttanggggttcatttgattttattggactaaactattaca 70

Query: 2178 ccactaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctag-ttacctcaca2236
 |||||
 Sbjct: 71 ccactaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctagnttacctcaca 130

Query: 2237 gatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccc2296
 |||||
 Sbjct: 131 gatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccc 190

Query: 2297 tcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaa2356
 |||||
 Sbjct: 191 tcaggatggatgtgcatttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaa 250

Query: 2357 aagtataacaatcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgca2416
 |||||
 Sbjct: 251 aagtataacaatcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgca 310

```

Query: 2417 tcactatcacttgaggaatccttg-atagacacttatagaattgatagttattatcgtca2475
          |||
Sbjct: 311 tcactatcacttgaggaatccttgnatagacacttatagaattgatagttattatcgtca 370
Query: 2476 tctcttttatgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattg2535
          |||
Sbjct: 371 tctcttttatgttcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattg 430

Query: 2536 gtcattgttggacaactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattt2595
          |||
Sbjct: 431 gtcattgttggacaactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattt 490

Query: 2596 tgtgaactacactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattt2655
          |||
Sbjct: 491 tgtgaactacactactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattt 550

Query: 2656 tctggcacgtgatcaagagagtgcataatggaaatttttagcaccaaaggcaagatggag2715
          |||
Sbjct: 551 tctggcacgtgatcaagagagtgcataatnggaaa-ttttagca-caaaggcaagatgg-g 607

Query: 2716 cttatcaacgatgatcaaggaagaaa 2741
          |||
Sbjct: 608 cttatcaacgatgatc-aggaagaaa 632

```

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ A454N

GGGGCCTCANGTTTTGGACAGCANCNTCCCCGNTACCTGNTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGA
TAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAANTTTTACCG
CTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATT
CTCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCAC
TGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTTATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTG
CTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTA
AAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCAACGCGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGACCAAGGTC
GATGTTCTCCATCGTACANCCAACNGCACAGGTGGGGATGCAGGAACANANACTTATCTGTTGCGCCCAACCTG
ATCCTTTCTCTGACAGNAACGGNCNAGTGTCAAANGGANTTTTCNGNACCTCNNAAGGNNCATNGGCNTTCCCTGNC
CNTNTNTTGGGNTTNNCNTTTCAANNCCCNCCNATCAAANGCNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNGGGCCCCNTNCCNGGGGGGGNCCCAANNCCGNCNNNNNNNTGGNANCNNNNCCNA

```

Query: 1282 ttttgggacagcatcctcctcg-taccag-tatgaaggtgagggcagagtaccaagtata1339
          |||
Sbjct: 12 ttttgggacagcancntccccgntacctgntatgaaggtgagggcagagtaccaagtata 71

Query: 1340 tgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgtt1399
          |||
Sbjct: 72 tgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgtt 131

Query: 1400 gcagttgaccaa-tttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaactt1458
          |||
Sbjct: 132 gcagttgaccaantttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaactt 191

Query: 1459 ggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtaggggttagtg1518
          |||
Sbjct: 192 ggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtaggggttagtg 251

Query: 1519 aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaa1578
          |||
Sbjct: 252 aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaa 311

Query: 1579 tggcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatga1638
          |||
Sbjct: 312 tggcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatga 371

Query: 1639 gtacgggtggccttcttaaatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggtatctttg1698
          |||
Sbjct: 372 gtacgggtggccttcttaaatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggtatctttg 431

Query: 1699 cttccaattatttggagatagggtaaacgattggattacactaaatgagccatcaatctt1758
          |||
Sbjct: 432 cttccaattatttggagatagggtaaacgattggattacactaaatgagccatcaatctt 491

```

GNNNNNCTTCTGCNTTCAANTTATTTGGACGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAANTCTTC
ACCGCGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAAGTCGATGTTCTCCATCGTACATCCAACCTTGACAGGTC
GGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGTTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGACAA
AAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAAT
AGCATATCAGATCAAATGCTACCGAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAG
GAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAGT
TAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGC
TGCCACCTNGTTNCCTCACANATCCTCAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTNTNGGTCGNGACNC
CCCNGGATGGATNGGCTTTNTCCAAAGGACTCCAAATTNTNGNTTNCNCCAGGNAANGNTANNANCTTGGNTTNC
NCCCNAAANGNTNNANNAANNAANNNNNCNCNNCCNNNGGACCNCNNNNNNANCNNNTNNAANNNNNNNNNNNCN
CNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNCCNANNANNNNTTNNNNN

```
Query: 1700  ttccaattatttggga-gataggggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaa-tct1757
           ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 15    ttcaanttatttggacgatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaantct 74

Query: 1758  tcaccgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaca1817
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 75    tcaccgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaca 134

Query: 1818  atccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctga1877
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 135   atccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctga 194

Query: 1878  tccttttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaag1937
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 195   tccttttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaag 254

Query: 1938  gtacaataggcatttccttgcacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcag1997
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 255   gtacaataggcatttccttgcacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcag 314

Query: 1998  atcaaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccactta2057
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 315   atcaaaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccactta 374

Query: 2058  cagcaggaaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagttta2117
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 375   cagcaggaaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagttta 434
```

Query: 2118 ctacagatcaagccaaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattaca2177
 |||
 Sbjct: 435 ctacagatcaagccaaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattaca 494

Query: 2178 ccactaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgccacctagttacctcacag2237
 |||
 Sbjct: 495 ccactaactatgctaccaaatacagatgctgcaacatgctgccacctngttnctcacan 554

Query: 2238 atcctcaagtcactctcttacagcaacgcaatgggggtcctt 2277
 |||
 Sbjct: 555 atcctc-agtcactctcttacagcaacgcaatgggggtcctt 593

4. ผลของการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ A454N โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

NNNNNGTCTCNTACTNANNANGCCAAANTTAGTTANGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACT
 AACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGNTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTA
 CAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAG
 ATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAA
 TGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGNATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTA
 TGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGG
 AATGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTGTGAACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTG
 CAACATGGTTCAAGTATTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATNGGAANTTTAGCACCAAAGGCAAGATGG
 AGCTNTCACCGATGATCAGGAAGAAAGACAAAACCCANGNGGGGCATGGANGNTTNGANCTAAATCTAACCCNAN
 NGATCCNGNCCCCTNCNNCNTNAANTCCNTGGCCNCCGGCGNCCGGATCGGNCCCAANCCGGGGGGCNCCCN
 NTTTTAAAAAAAACCCNCCCNAAANGGNNNGANNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNGGNNNGGGCCCNAA

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ A454N ที่คาดว่าจะจะเป็น
 Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ A454N ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2132 aaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct2191
 ||
 Sbjct: 26 aanttagttanggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct 85

Query: 2192 accaaatcagatgctgcaacatgctgccacctag-ttacctcacagatcctcaagtcac2250
 |||
 Sbjct: 86 accaaatcagatgctgcaacatgctgccacctagnttacctcacagatcctcaagtcac 145

Query: 2251 tctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtg2310
 |||
 Sbjct: 146 tctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtg 205

Query: 2311 catttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcc2370
 |||
 Sbjct: 206 catttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcc 265

Query: 2371 tttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttga2430
 |||
 Sbjct: 266 tttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttga 325

Query: 2431 ggaatccttg-atagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttc2489
 |||
 Sbjct: 326 ggaatccttgnatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttc 385

Query: 2490 gatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatggtcattggtggaca2549
 |||
 Sbjct: 386 gatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatggtcattggtggaca 445

```

Query: 2550 actttgaatggaatgaggggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacacta2609
          |||
Sbjct: 446 actttgaatggaatgaggggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacacta 505

Query: 2610 ctttgaatagatatccaagctctctgcaacatgggtcaagtattttctggcacgtgatc2669
          |||
Sbjct: 506 ctttgaatagatatccaagctctctgcaacatgggtcaagtattttctggcacgtgatc 565

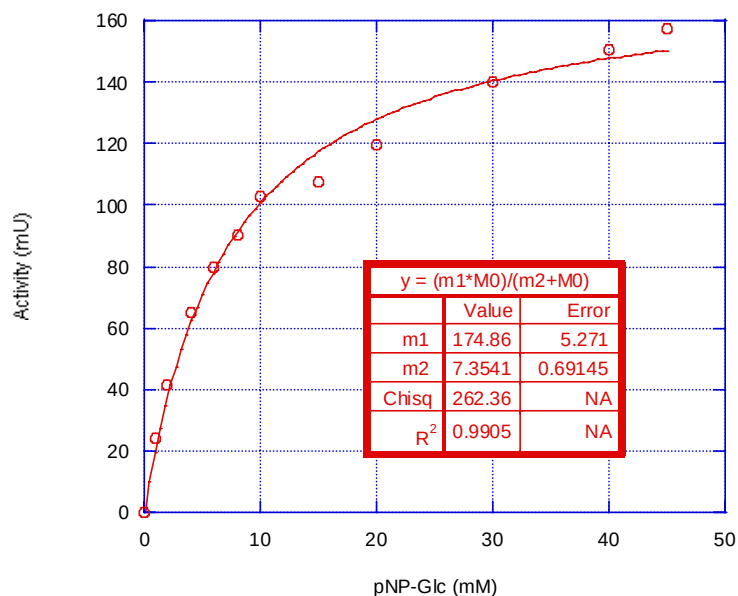
Query: 2670 aagagagtgcataaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatga2729
          |||
Sbjct: 566 aagagagtgcataaattngg-aanttttagcaccaaaggcaagatggagc-tntcaccgatga 623

Query: 2730 tcaaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcat 2763
          ||
Sbjct: 624 tc-aggaag-aaagacaaaaccangnggggcat 655

```

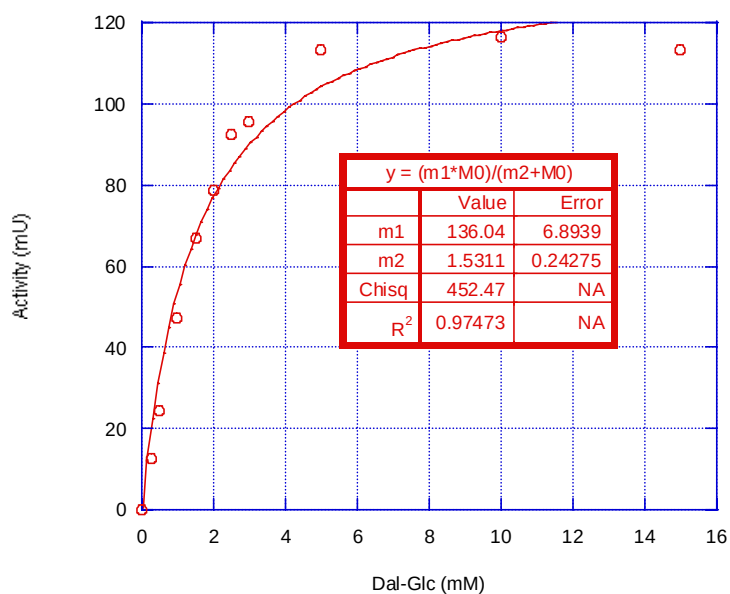
ภาคผนวก ข
กราฟ Michaelis-Menten

1. กราฟ Michaelis-Menten ของคัลโคอินเนสธรรมชาติต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



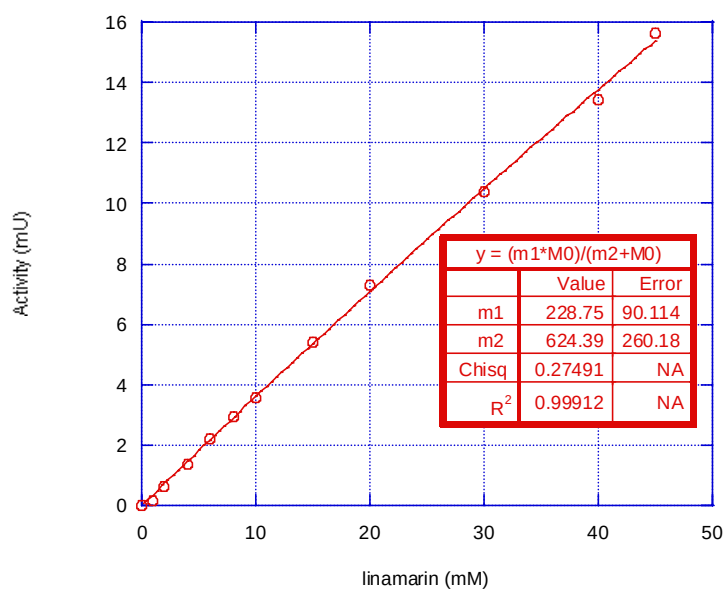
ภาพผนวกที่ ข1 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ คัลโคอินเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

2. กราฟ Michaelis-Menten ของ คัลโคอินเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside



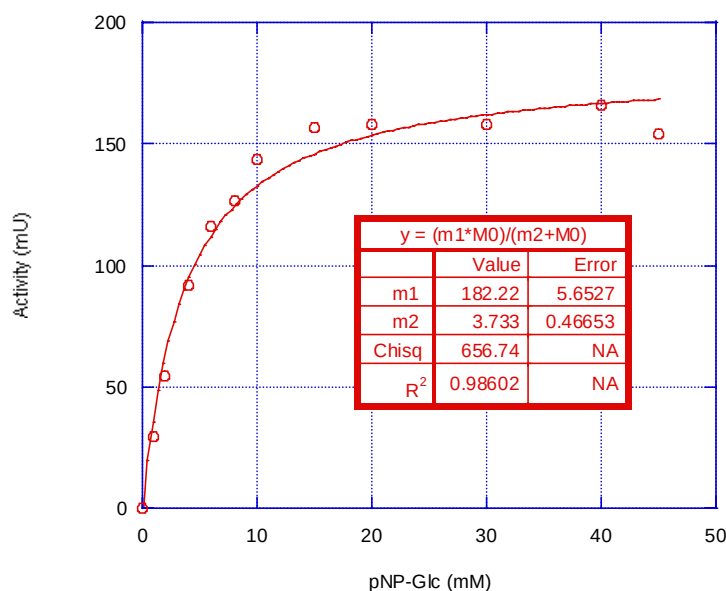
ภาพผนวกที่ ข2 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ คัลโคอินเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside ตามสมการของ Michaelis-Menten

3. กราฟ Michaelis-Menten ของ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท ลินามาริน



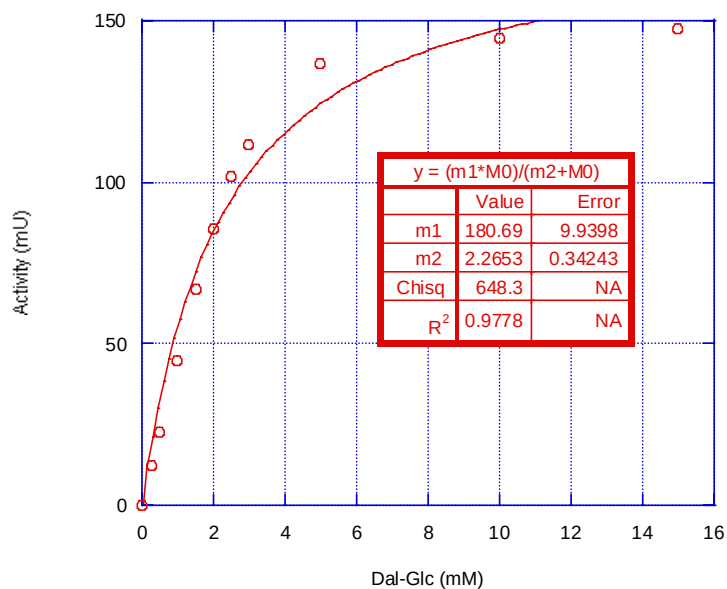
ภาพผนวกที่ ๓3 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท ลินามาริน ตามสมการของ Michaelis-Menten

4. กราฟ Michaelis-Menten ของ H18 ต่อสับสเตรท pNP-Glc



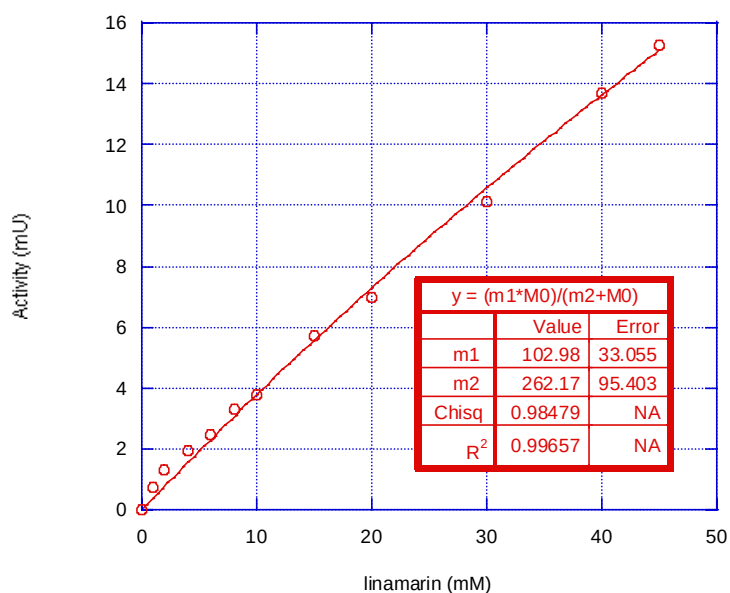
ภาพผนวกที่ ๓4 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ H18 ต่อสับสเตรท pNP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

5. กราฟ Michaelis-Menten ของ H18 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside



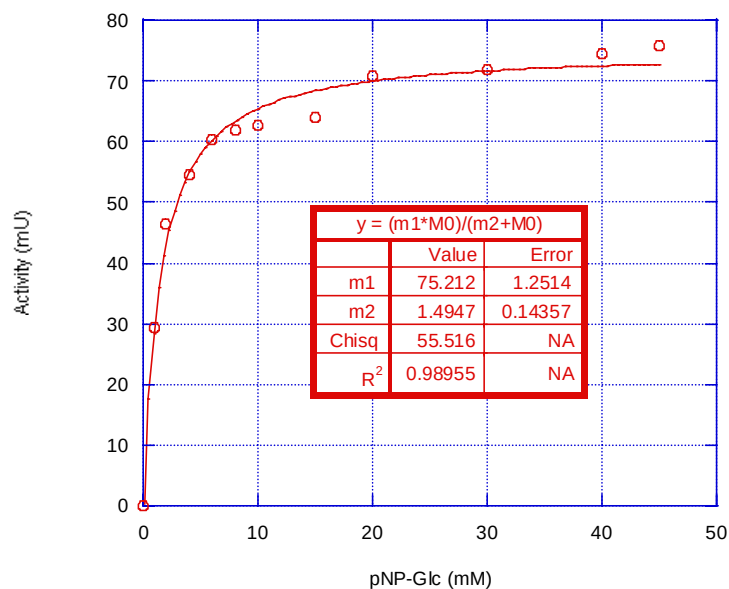
ภาพผนวกที่ ข5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ H18 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside ตามสมการของ Michaelis-Menten

6. กราฟ Michaelis-Menten ของ H18 ต่อสับสเตรท ลินามาริน



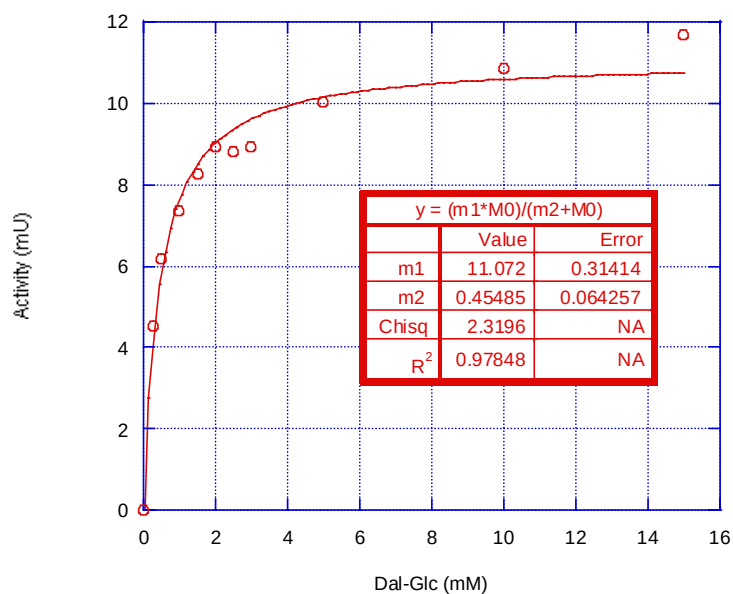
ภาพผนวกที่ ข6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ H18 ต่อสับสเตรท ลินามาริน ตามสมการของ Michaelis-Menten

7. กราฟ Michaelis-Menten ของ N189F8 ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



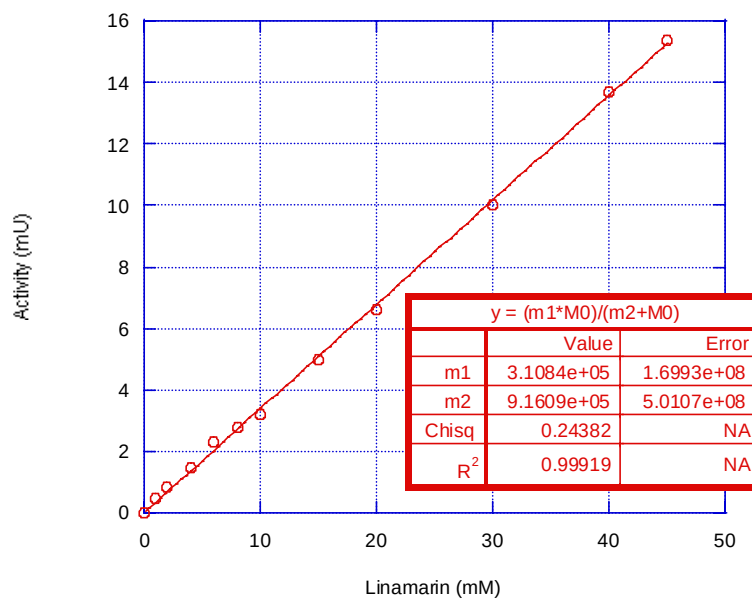
ภาพผนวกที่ ข7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ N189F8 ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

8. กราฟ Michaelis-Menten ของ N189F8 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside



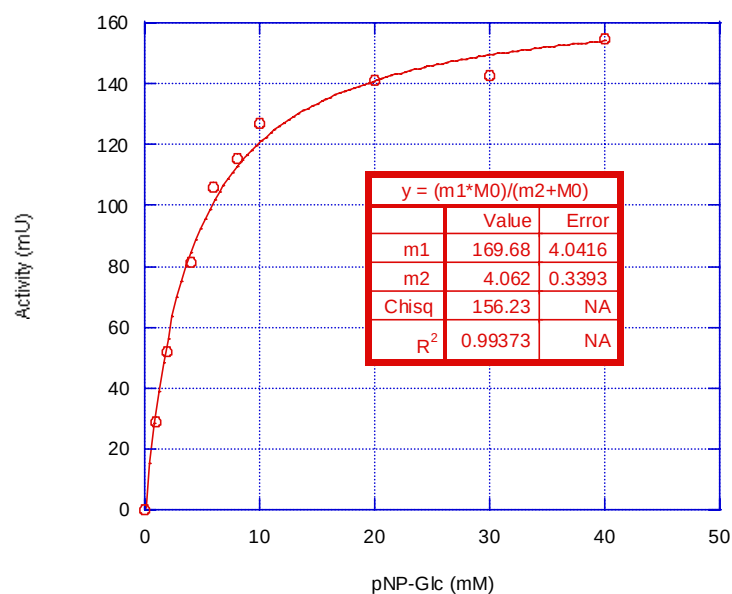
ภาพผนวกที่ ข8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ N189F8 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside ตามสมการของ Michaelis-Menten

9. กราฟ Michaelis-Menten ของ N189F8 ต่อสับสเตรท ลินามาริน



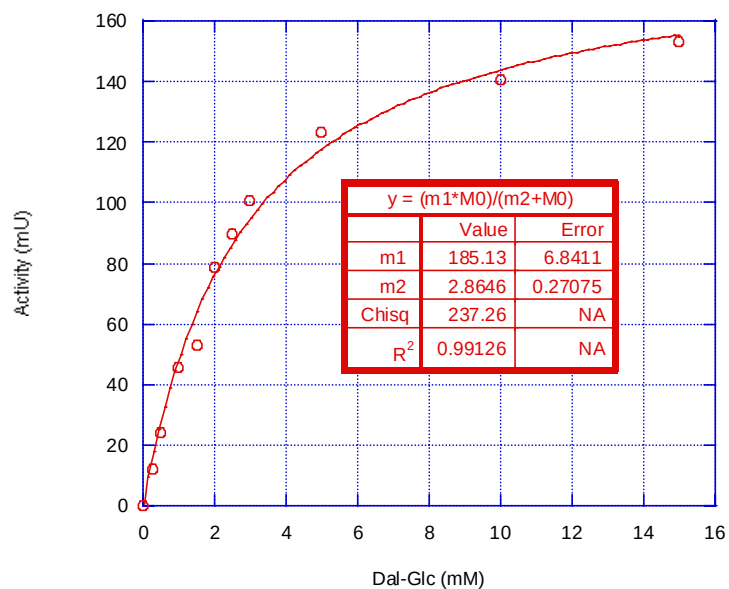
ภาพผนวกที่ ข9 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ N189F8 ต่อสับสเตรทลินามาริน ตามสมการของ Michaelis-Menten

10. กราฟ Michaelis-Menten ของ A454N11 ต่อสับสเตรท pNP-Glc



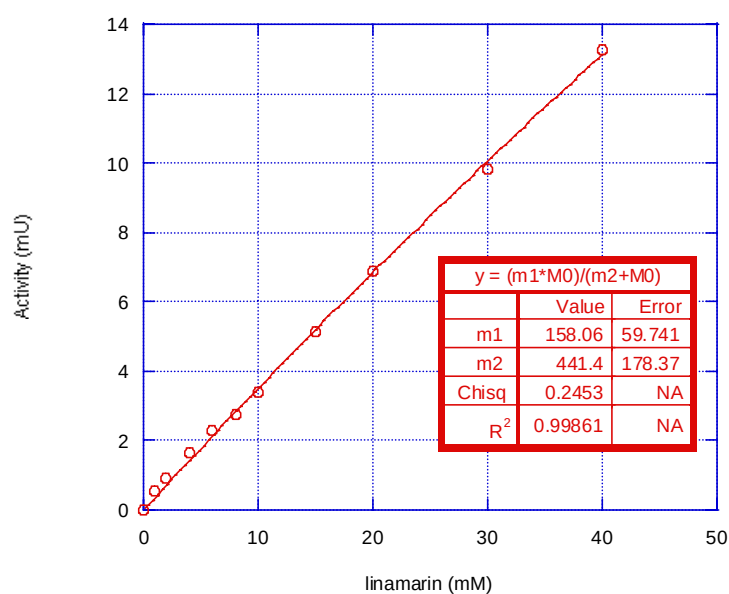
ภาพผนวกที่ ข10 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ A454N11 ต่อสับสเตรท pNP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

11. กราฟ Michaelis-Menten ของ A454N11 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside



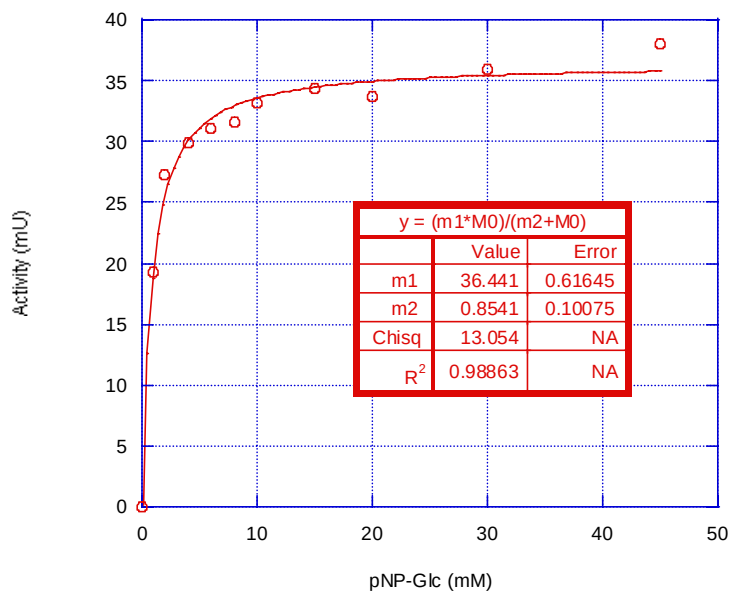
ภาพผนวกที่ ข11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ A454N11 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside ตามสมการของ Michaelis-Menten

12. กราฟ Michaelis-Menten ของ A454N11 ต่อสับสเตรท ลินามาริน



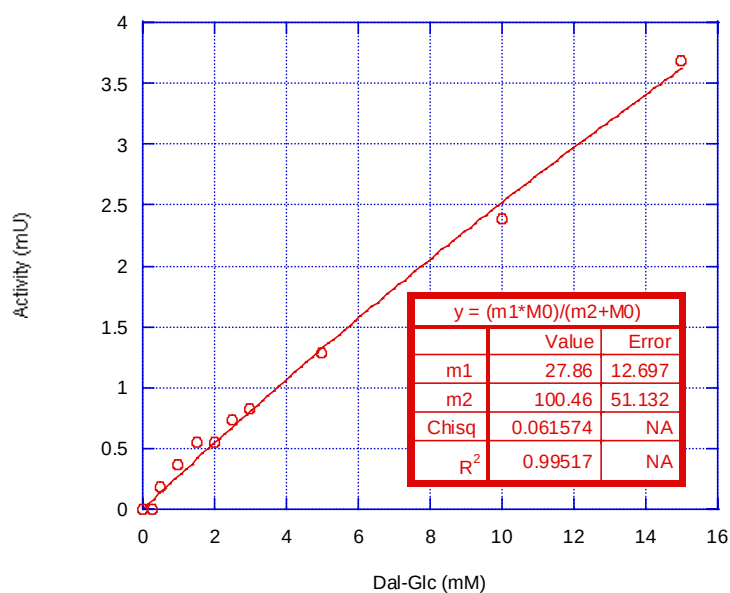
ภาพผนวกที่ ข12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ A454N11 ต่อสับสเตรท ลินามาริน ตามสมการของ Michaelis-Menten

13. กราฟ Michaelis-Menten ของ ลิ้นจี่มาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท pNP-Glc



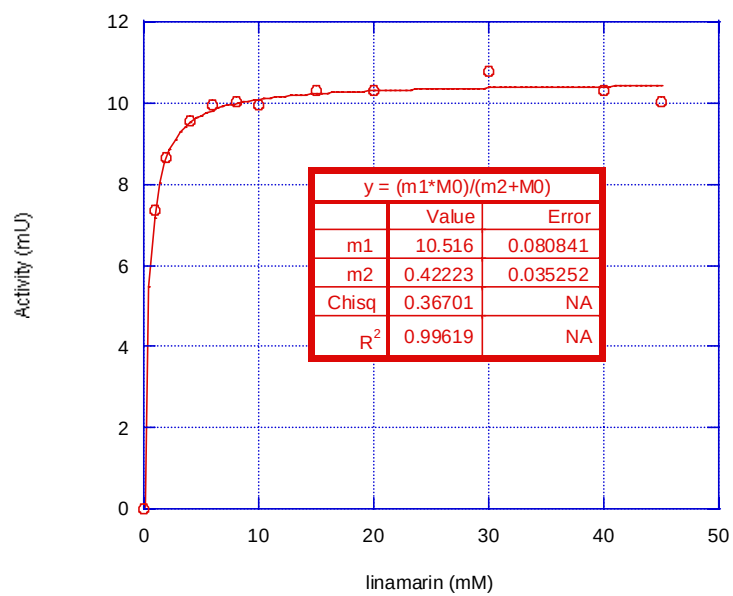
ภาพผนวกที่ ข13 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ ลิ้นจี่มาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท pNP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

14. กราฟ Michaelis-Menten ของลิ้นจี่มาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside



ภาพผนวกที่ ข14 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ ลิ้นจี่มาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside ตามสมการของ Michaelis-Menten

15. กราฟ Michaelis-Menten ของลินามาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท ลินามาริน



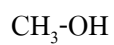
ภาพผนวกที่ ข15 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของ ลินามาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท ลินามาริน ตามสมการของ Michaelis-Menten

ภาคผนวก ข

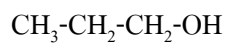
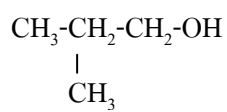
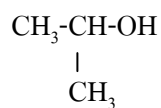
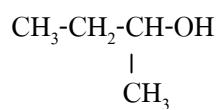
โครงสร้างของแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นตัวรับกัญโคส

แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ

methanol



ethanol

*n*-Propanol*n*-Butanol*iso*-Butanolแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ*iso*-Propanol*sec*-Butanolแอลกอฮอล์ตติยภูมิ*tert*-Butanol