



การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอร์จากแก่นตะวันและ
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม

โดย

นางสาวจุฑามาศ ทรัพย์มาก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันและ
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม

โดย

นางสาวจุฑามาศ ทรัพย์มาก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**CLONING OF FRUCTOSYLTRANSFERASE GENE FROM JERUSALEM
ARTICHOKE (*HELLANTHUS TUBEROSUS* L.) AND ACTIVITY ANALYSIS OF
RECOMBINANT ENZYME**

By

Miss Jutamat Sapmak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Biotechnology

Department of Biotechnology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2013

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม” เสนอโดยนางสาว จุฑามาศ ทรัพย์มาก เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ชารัตน์วงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.รุจิกาญจน์ นาสินท)

...../...../.....

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อัญชिरา วิบูลย์จันทร์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี)

...../...../.....

53401204 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : แก่นตะวัน/ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ /ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสม

จุฬามาศ ทรัพย์มาก : การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา, ผศ.ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ผศ.ดร.พิทยา หลิวเสรี. 93 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ได้โคลนสายดีเอ็นเอคู่สมที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของแก่นตะวันหรือเจรูชาเล็ม อาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus* L.) โดยยีน *I-sst* และ *I-fft* ที่กำหนดรหัสเป็นเอนไซม์ 1-sucrose: sucrose fructosyl transferase (1-SST, EC: 2.4.1.99) และ 1-fructan: fructan fructosyl transferase (1-FFT, EC: 2.4.1.100) ตามลำดับ ได้ถูกโคลนออกมาจากหัว สะสมอาหารของแก่นตะวันอายุ 105 วันด้วยวิธี RT-PCR และจากการวิเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สมที่โคลน ได้พบว่า มีความเหมือนกับยีน *I-sst* (accession no. AJ009757.1) และ *I-fft* (accession no. AJ009756.1) ของ *Helianthus tuberosus* 99% และ 95- 99% ตามลำดับ จากนั้นได้มีการเชื่อมสายดีเอ็นเอคู่สมของยีน *I-sst* ที่โคลนได้และมีการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเข้ากับพลาสมิด pPICZαA เพื่อให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 เมื่อนำยีสต์ลูกผสมจำนวน 2 โคโลนีที่เจริญบน อาหาร YPD ที่เติมซอร์บิทอลและยาปฏิชีวนะซีโอซินไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่โคลนได้พบว่า มีการแสดงออกของยีน *I-sst* ใน *Pichia pastoris* X-33 โดยพบการสังเคราะห์ FOS (1- kestose (GF2) and nystose (GF3)) อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ลูกผสมที่ได้และเอนไซม์ดังกล่าวยังสามารถ หลั่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ได้ด้วย ยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZα_ *I-sst*_56 และ pPICZα_ *I-sst*_69 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลูกผสมที่หลั่งออกนอกเซลล์เท่ากับ 0.051 และ 0.048 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ การหายไปของแถบโปรตีนลูกผสมที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้ คอลัมน์ His tag บน SDS PAGE แสดงให้เห็นว่า polyhistidine (6xHis) tag ไม่ได้ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และจากการศึกษาการสังเคราะห์ FOS ด้วยเอนไซม์ลูกผสมที่หลั่งออกนอกเซลล์พบว่า สามารถสังเคราะห์ 1- kestose (GF2) ได้ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากการบ่มเอนไซม์ลูกผสมกับน้ำตาลซูโครส 0.46 โมลาร์ที่ใช้ เป็นสับเตรท อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้นจะพบการสังเคราะห์ nystose (GF3) ด้วย

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

53401204 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : KAENTAWAN, FRUCTOOLIGOSACCHARIDES, RECOMBINANT FRUCTOSYLTRANSFERASE

JUTAMAT SAPMAK : CLONING OF FRUCTOSYLTRANSFERASE GENE FROM JERUSALEM ARTICHOKE (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) AND ACTIVITY ANALYSIS OF RECOMBINANT ENZYME. THESIS ADVISORS : ASST.PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D., ASST.PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Ph.D. AND ASST.PROF. PITTAYA LIEWSEREE, Ph.D. 93 pp.

Cloning of cDNAs corresponding to enzymes involved in fructo-oligosaccharides (FOS) synthesis of Kaentawan or Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) was investigated in this research. The *1-sst* and *1-fft* genes encoding for 1-sucrose: sucrose fructosyltransferase (1-SST, EC: 2.4.1.99) and 1-fructan: fructan fructosyltransferase (1-FFT, EC: 2.4.1.100) respectively were cloned from 105 days old tuber of Kaentawan by RT-PCR. The cloned cDNA sequences showed 99% and 95-99% identities to *Helianthus tuberosus 1-sst* (accession no. AJ009757.1) and *1-fft* gene (accession no. AJ009756.1), respectively. The *1-sst* gene was modified by adding the restriction sites for *EcoRI* and *SacII* in order to subclone into pPICZ α vector for further expressed in *Pichia pastoris* X-33. Two yeast transformants grown on YPD medium containing sorbitol and zeocin were selected and analyzed for gene expression. The cDNA showed the expression in *P. pastoris* X-33 by synthesis of FOS (1-kestose (GF2) and nystose (GF3)). Moreover, the 1-SST recombinant enzyme was also secreted into medium. The specific activities of 1-SST recombinant enzyme secreted from *P. pastoris* X-33 containing pPICZ α _1-sst_56 and *P. pastoris* X-33 containing pPICZ α _1-sst_69 were 0.051 and 0.048 U/mg protein, respectively. Disappearance of recombinant protein bands purified by His tag column on SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) indicated that polyhistidine (6xHis) tag was not translated into protein. The 1-kestose was synthesized within 12 h when the recombinant enzyme was incubated with 0.46M sucrose as substrate. However, nystose (GF3) was also synthesized in prolonged period of incubation.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2013
Student's signature
Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2555 และสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนสำเร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.พิทยา หลิวเสรี ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิท และ ดร.อัญชิรา วิบูลย์จันทร์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และขอแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณทุกท่าน และครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับผู้วิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่	

1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์.....	3
ขอบเขตงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
แก่นตะวัน	4
อินนูลิน (inulin) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide (FOS)).....	5
โครงสร้าง	5
การสังเคราะห์.....	8
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	15
สารเคมีและอุปกรณ์.....	15
วิธีการทดลอง	21
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
5 สรุปผลการทดลอง.....	65
เอกสารอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	70
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานและการคำนวณ.....	78
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง.....	86
ประวัติผู้วิจัย.....	93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในพืชต่างๆ.....	6
2 ปริมาณและค่า degree of polymerization ของอินนูลินที่พบใน Dahlia, Jerusalem artichoke และ chicory.....	7
3 ส่วนผสมในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR กับ pGEM [®] -T Easy Vector.....	28
4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสมของยีสต์ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-sst_56 และ pPICZ α _1-sst_69 ทั้งในส่วนของเซลล์และในอาหารเพาะเลี้ยง	59
5 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 1-SST.....	91
6 การผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ 1-SST ส่วนใน อาหารเพาะเลี้ยงของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลเมตรตัน.....	91
7 ความเข้มข้นโปรตีน ในเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56 และ 69 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลเมตรตัน.....	92

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะดอกและหัวของแก่นตะวัน	5
2 โครงสร้างอินซูลิน และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์	7
3 pGEM [®] -T Easy Vector Map	27
4 pPICZQ α -A, B, C Vector Map	31
5 ตำแหน่งของยีน <i>I-sst</i> ที่สับโคลนเข้าไปใน pPICZQ α	31
6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>I-sst</i> (accession number AJ009757.1)	37
7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>I-fft</i> (accession number AJ009756.1)	38
8 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>actin</i>	39
9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>I-sst</i>	39
10 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>I-fft</i>	40
11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony direct PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>I-sst</i>	40
12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony direct PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>I-fft</i>	41
13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7.....	42
14 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank.....	42
15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6.....	42
16 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank.....	43
17 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ไพรเมอร์ T7 (1-sst T7) SP6 (1sst SP6) กับ <i>Helianthus tuberosus I-sst</i> gene (accession number AJ009757.1) (1-sst) โดยใช้โปรแกรม VectorNTI	44
18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7.....	47
19 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank.....	47
20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6.....	48
21 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>I-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank.....	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ไพรเมอร์ T7 (1-fft T7) SP6 (1-fftSP6) กับ <i>Helianthus tuberosus 1-fft gene</i> (accession number AJ009756.1) (1-fft) โดยใช้โปรแกรม VectorNTI	49
23 ผลิตรหัสจากการทำ PCR ที่เพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะของ <i>EcoRI</i> และ <i>SacII</i> บนยีน <i>1-sst</i>	53
24 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ colony direct PCR.....	54
25 ผลิตรหัสที่ได้จากการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis).....	54
26 ลักษณะโคโลนีของทรานสฟอร์มเม้นท์ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst</i> _56 และ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst</i> _69 เปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีของ wild type <i>P. pastoris</i> X-33.....	55
27 HPLC chromatogram ของผลิตรหัสที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ และในอาหารเพาะเลี้ยง ของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst</i> _56 กับซูโครส 0.46 โมลาร์ที่เวลา 0 (ก และ ข) และ 24 ชั่วโมง (ค และ ง).....	57
28 HPLC chromatogram ของผลิตรหัสที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ และในอาหารเพาะเลี้ยง ของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst</i> _69 กับซูโครส 0.46 โมลาร์ที่เวลา 0 (ก และ ข) และ 24 ชั่วโมง (ค และ ง).....	58
29 SDS-PAGE ของแถบโปรตีนที่ได้จากยีสต์ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZα_ <i>1-sst</i> _56.....	60
30 โครมาโตแกรมของการสังเคราะห์ FOS ในสภาวะ <i>in vitro</i> โดยใช้เอนไซม์ 1-SST ส่วนในอาหารเพาะเลี้ยง ของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst</i> _56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเจอร์ชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน บ่มที่ 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	63
31 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford.....	79
32 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลซูโครสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	80
33 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	80
34 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลกลีโคส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	81
35 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลีโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	81
36 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลนิสโทส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	82
37 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลนิสโทสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	82
38 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
39 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	83
40 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	84
41 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุกโตสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	84
42 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>1-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6.....	87
43 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>1-sst</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7.....	88
44 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>1-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6.....	89
45 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน <i>1-fft</i> เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7.....	90

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ หรือ อาหารฟังก์ชัน (functional foods) เป็นอาหารที่เมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกายแล้วจะสามารถทำหน้าที่อื่นให้กับร่างกาย นอกเหนือจากในเรื่องของรสชาติสัมผัส (sensory function) การให้คุณค่าทางอาหารที่จำเป็นแก่ร่างกาย (nutritive function) ยังมีหน้าที่อื่นๆ (non-nutritive physiological functions) คือ ช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและสภาพการทำงานของร่างกาย ชะลอการเสื่อมโทรมของอวัยวะต่างๆจากการสูงอายุ ป้องกันโรคต่างๆที่อาจเกิดขึ้นจากภาวะโภชนาการผิดปกติ และบำบัดหรือลดอาการของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกาย ซึ่งในปัจจุบันได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอย่างมาก (ไพโรจน์ 2552) โดยอินนูลิน (inulin) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) ก็เป็นส่วนผสมเพื่อสุขภาพ (functional ingredient) ที่ได้รับความสนใจในการนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Campbell และคณะ 1997) โดยอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตกลุ่มฟรุกแทน (fructan) ชนิดหนึ่งที่มีดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโตส (degree of polymerization (DP)) ตั้งแต่ 10 ขึ้นไปและอยู่ในช่วงระหว่าง 3 ไปจนถึง 7-10 หน่วย ตามลำดับ และจะมีหน่วยของน้ำตาลกลูโคสต่ออยู่ที่ปลายสาย (Suzuki 1993) จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ แต่สามารถย่อยได้โดยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* จึงช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด ทำให้อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ถูกจัดจำแนกเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) (Alexander และ Lazaro 2006) โดยแหล่งที่สามารถพบฟรุกแทนสะสมอยู่นั้นมีทั้งในแบคทีเรียและพืช โดยฟรุกแทนในแบคทีเรียจะมีชื่อเรียกว่า ลีวาน (levan) ซึ่งมีค่า DP สูง ส่วนฟรุกแทนในพืชจะมีค่า DP ที่ไม่สูงมากนัก (Alexander และ Lazaro 2006; Hans-Jakob Wirz 2005) ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ โดยพืชที่มีการสะสมอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณสูงและมีการส่งเสริมให้ปลูกมากในประเทศไทยก็คือ แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) ซึ่งส่วนหัว (tuber) ของแก่นตะวันประกอบด้วยอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 16-20 และ 10-25% (ของน้ำหนักสด)

ตามลำดับ (Thammarutwasik และคณะ 2009) แต่การสกัดอินนูลินและและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยตรงจากแหล่งของพืชวัตถุดิบที่เพาะปลูกตามสภาพธรรมชาตินั้นมักควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิตได้ยาก เพราะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ทั้งจากพืชวัตถุดิบเองและสภาพแวดล้อมที่อาจแปรผันไปในแต่ละฤดูกาลของการเพาะปลูก ดังนั้น การที่จะผลิตอินนูลินและและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ให้มีความสม่ำเสมอทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพด้วยการใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ คือ ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase (FTase)) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะจะทำให้ได้อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่จำเพาะตามความต้องการและมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้การสังเคราะห์สารโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ยังสามารถควบคุมสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ได้ โดยเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์อินนูลินและและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์คือ 1-sucrose: sucrose fructosyl transferase (1-SST) และ 1-fructan: fructan fructosyl transferase (1-FFT) โดยมียีนควบคุมที่กำหนดรหัส (code) เป็นเอนไซม์คือ *1-sst* และ *1-fft* ตามลำดับ (van der Meer และคณะ 1998) อย่างไรก็ตามการสกัดเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันมาใช้ก็มีก่ประสบปัญหาเช่นเดียวกับการสกัดอินนูลินและและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากแหล่งพืชวัตถุดิบจากธรรมชาติ โดยศรีสุดา (2554) ได้รายงานว่ กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแก่นตะวัน โดยในระยะที่มีการพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหาร (tuberization) อายุ 105-120 วัน จะมีปริมาณอินนูลินและและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสสูงสุด ซึ่งชี้ให้เห็นว่า หากต้องการสกัดเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากหัวสะสมอาหารของแก่นตะวันเพื่อใช้ในการสังเคราะห์อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์นั้นต้องใช้แก่นตะวันที่มีอายุที่เหมาะสม ซึ่งต้องใช้เวลาก่อนขังนาน และเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเอาเทคนิคด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) มาช่วยในการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในรูปแบบของเอนไซม์ลูกผสม (recombinant enzyme) โดยการโคลนยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันและเชื่อมต่อกในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) ที่เหมาะสมและสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ได้ ซึ่งจะทำได้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ในภายหลังจากขั้นตอนการผลิต นอกจากนี้เพื่อให้มีการผลิตได้ดีและมากขึ้นก็จะอาศัยระบบการแสดงออกในยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต ซึ่งยีสต์จัดเป็นยูคาริโอตเช่นเดียวกันกับพืชทำให้มีขบวนการดัดแปลงของโปรตีน (protein modification) ภายหลังการแปลรหัสที่

คล้ายคลึงกัน ผลิตภัณฑ์โปรตีนลูกผสมที่ได้จึงมีคุณสมบัติเหมือนกับโปรตีนดั้งเดิม (native protein) และยีสต์ยังมีคุณสมบัติที่โดดเด่นกว่าพืชในเรื่องของความสามารถในการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง สามารถเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์สูง และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากกว่า 50 % จากโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมดภายในเซลล์ หากงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ก็จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันได้ในปริมาณที่มากขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนยีนในกลุ่มของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน
2. เพื่อศึกษาการผลิตและคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสมจากแก่นตะวัน

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาการโคลนยีนในกลุ่มของฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันโดยวิธี RT-PCR
2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสมโดยใช้ระบบการแสดงออกในยีสต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตเอนไซม์ลูกผสมได้โดยอาศัยระบบการแสดงออกในยีสต์
2. เป็นการเพิ่มช่องทางการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันเพื่อให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นและลดระยะเวลาในการผลิตให้น้อยลง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แแก่นตะวัน (Jerusalem Artichoke)

แแก่นตะวัน (Jerusalem Artichoke) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. จัดอยู่ในวงศ์ *Asteraceae* เป็นพืชล้มลุก มีอายุประมาณ 4-6 เดือน ลักษณะต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน สูงประมาณ 1.5-4.0 เมตร อาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนงก็ได้ โดยพันธุ์ที่แตกแขนงหัวจะมีแขนงมากด้วย แต่พันธุ์ที่ไม่แตกแขนงหัวก็จะเป็นหัวเดี่ยว ใบจะเป็นใบเดี่ยว รูปหอก ขอบใบหยักมีขน ดอกเกิดเป็นช่อ กลีบดอกมีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดอก 4-8 เซนติเมตร มีหัวสะสมอาหาร (tuber) ลักษณะเป็นตะปุ่มตะป่ำ รูปร่างคล้ายจิง ผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีขาว

แแก่นตะวันเป็นพืชผสมตัวเองไม่ได้ (self-incompatible out-crossing) มีโครโมโซม (chromosome) เป็นเฮกซะพรอยด์ (hexaploid) เป็นพืชวันสั้น (short day) มีช่วงแสงวิกฤต (critical day-length) น้อยกว่า 14 ชั่วโมง โดยการเจริญเติบโตของแแก่นตะวันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ slow tuber growth คือนับจากปลูกจนถึงออกดอกแรก และ rapid tuber filling ซึ่งเริ่มจากดอกแรกบานจนถึงเก็บเกี่ยว โดยในช่วงแรกนั้นอาหารที่สร้างได้จะสะสมไว้ที่ใบและลำต้น แต่หลังจากนั้นใบจะเริ่มแก่และหลุดร่วง อาหารที่สร้างและสะสมไว้ที่ใบและลำต้นจะเคลื่อนย้ายไปสู่หัว (นิมิต และ สนั่น 2549) โดยมีรายงานว่าในช่วง 90 วันแรกของการเพาะปลูกมีการสะสมอินนูลิน (วิเคราะห์ในรูปของน้ำตาลนอนรีดิวิซ์) มากในส่วนของลำต้น ซึ่งเป็นช่วงที่แแก่นตะวันมีการพัฒนาของส่วนใบและลำต้น (vegetative parts) ที่สูง คือ มีการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ที่ใบเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งก็คือ น้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ จากนั้นจะมีการลำเลียงน้ำตาลกลูโคสหรือเปลี่ยนรูปไปเป็นน้ำตาลชนิดอื่นๆ รวมทั้งน้ำตาลนอนรีดิวิซ์เพื่อลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืช ทำให้พบปริมาณของน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ที่สูงในส่วนของลำต้น และหลังจาก 90 วันของการปลูกจะเห็นปริมาณของน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ลดลงในส่วนของลำต้น แต่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในส่วนของราก จากนั้นส่วนของรากจะพัฒนาไปเป็นไหล (stolon) และหัวสะสมอาหาร (tuber) ทำให้การสะสมของน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ย้ายจากส่วนรากไปยังหัวสะสมอาหาร (ศรีสุดา 2554)

แแก่นตะวันมีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาเหนือและได้มีการนำมาปลูกในแถบทวีปยุโรปอย่างแพร่หลาย ในเขตหนาว เขตกึ่งหนาว และเขตร้อน ในประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาปลูกพบว่า

สามารถเจริญเติบโตและปรับตัวได้ดีให้ผลผลิตสูงมีต้นทุนในการปลูกและดูแลรักษาน้อย แม้ในบางพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ นอกจากนั้นยังสามารถนำหัวมาปลูกเป็นแปลงไม้ดอกประดับ เพื่อเป็นที่พักผ่อนหย่อนใจ หัวที่ได้เมื่อต้นแก่แล้วสามารถนำหัวมาใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารของคนเราได้หลายอย่าง (สนั่น และคณะ 2549)



ภาพที่ 1 ลักษณะดอกและหัวของแก่นตะวัน

(ที่มา : <http://www.แก่นตะวัน.com/>)

แก่นตะวันเป็นพืชในกลุ่มที่สะสมอาหารในรูปของฟรุกแทน (fructan accumulating plant) โดยส่วนหัวของแก่นตะวันมีการสังเคราะห์และสะสมอินนูลิน (inulin) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) ในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 1) แก่นตะวันจึงเป็นแหล่งของอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ดีและมีการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม นอกเหนือไปจากรากของชิคอรี่ (chicory root) (สนั่น และคณะ 2549)

2. อินนูลิน (inulin) และ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS))

2.1 โครงสร้าง

อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบขึ้นจากน้ำตาลฟรุกโตสเชื่อมต่อกันหลายๆ โมเลกุลเป็นเส้นตรงด้วยพันธะเบต้า 2, 1 ไกลโคซิดิก (β -2,1 glycosidic linkage) โดยโครงสร้างอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จะประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสหนึ่งโมเลกุลอยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของสายโซ่ (ภาพที่ 2) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีทั่วไปเป็น GF_n โดย n แสดงถึงค่า DP ซึ่งหมายถึง จำนวนโมเลกุลของน้ำตาลฟรุกโตสที่เชื่อมต่อกันภายในสายพอลิแซ็กคาไรด์

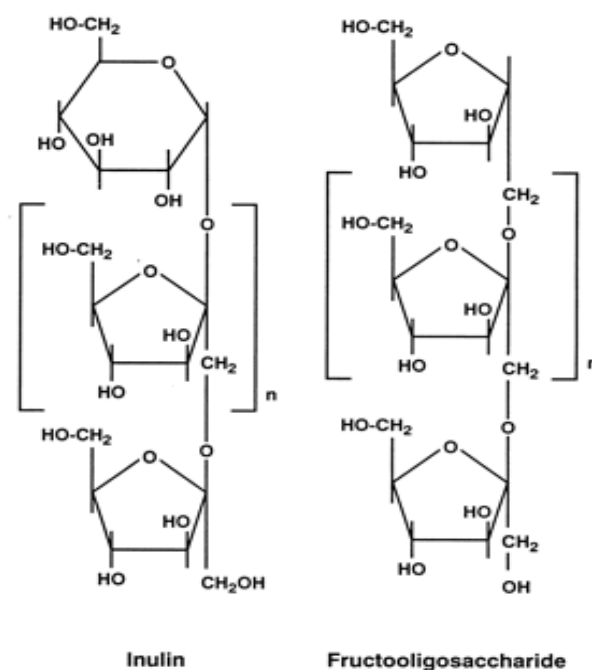
(polysaccharides) สำหรับฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP ต่ำสุดคือ GF₂ เรียกว่า 1-คีโตส (1-ketose) ถัดมาคือ GF₃ เรียกว่า นีสโตส (nystose) และ GF₄ เรียกว่า 1-เบต้า-ฟรุกโตฟูราโนซิลนีสโตส (1- β -fructofuranosylnystose) ตามลำดับ โดยทั่วไปอินนูลินจะมีค่า DP ตั้งแต่ 10 ขึ้นไป (Roberfroid และคณะ 1993; Ninness 1999) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จะมีค่า DP อยู่ในช่วง 2 ถึง 10 (Suzuki 1993) โดยค่า DP ของอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชวัตถุดิบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ปริมาณอินนูลินและ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในพืชต่างๆ

แหล่งพืชวัตถุดิบ	อินนูลิน (% fresh weight)	ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (% fresh weight)
Onion	2-6	6
Jerusalem artichoke	16-20	10-25
Chicory	15-20	5-10
Leek	3-10	2-5
Garlic	9-16	3-6
Artichoke	3-10	<1
Banana	0.3-0.7	0.3-0.7
Rye	0.5-1.0	0.5-1.0
Barley	0.5-1.5	0.5-1.5
Dandelion	12-15	NA
Burdock	3.5-4.0	NA
Camas	12-22	NA
Murnong	8-13	NA
Yacon	3-19	3-19
Salsify	4-11	4-11
Wheat	1-4	1-4
Asparagus	1-30	5-10

NA, data not available.

(Thammarutwasik และคณะ 2009)



ภาพที่ 2 โครงสร้างอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

(ที่มา : <http://www.39kf.com/cooperate/qk/American-Society-for-Nutrition/017302/2008-12-28-549839.shtml>)

ตารางที่ 2 ปริมาณและค่า degree of polymerization ของอินนูลินที่พบใน Dahlia, Jerusalem artichoke และ chicory

ชนิดพืช		Dahlia	Jerusalem artichoke	Chicory
Roots/Tubers	ต้น/เฮกเตอร์	25	42	43.5
	(ช่วงระหว่าง)		35-60	25-75
DM%	เฉลี่ย	18	22	22.4
	(ช่วงระหว่าง)	15-22	19-25	20-25
Inulin (%)	เฉลี่ย	11	16	16.6
	(ช่วงระหว่าง)	10-12	14-18	14.9-18.3
Inulin ต้น/เฮกเตอร์		2.5-3	4.5-8.5	5-11
Mean DPn		13-20	6-10	10-14

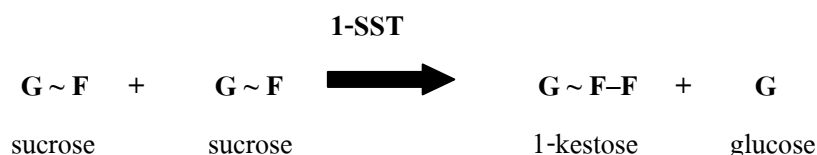
DM คือ dry matter; DPn คือ degree of polymerization.

(Franck และ Leenheer 2005)

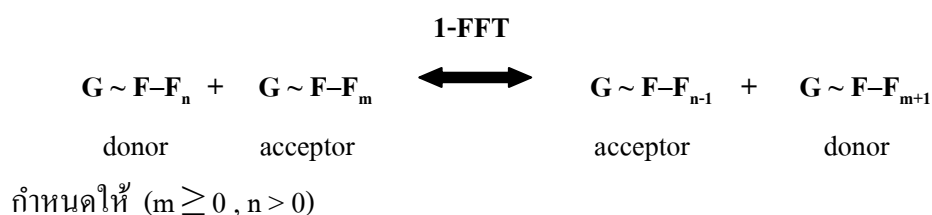
2.2 การสังเคราะห์

อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นฟรุคแทน (fructan) ชนิดหนึ่งของพืชจะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากซูโครสในแวคิวโอลโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์กลุ่มฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase) อย่างน้อย 2 ชนิด คือ sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) และ fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) (Darwen และ John 1989) ซึ่งการสังเคราะห์ฟรุคแทนใน Jerusalem artichoke ตามโมเดลของ Edelman และ Jefford (1968) นั้นแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ เริ่มจาก 1-SST กระตุ้นให้มีการย้ายหน่วยของน้ำตาลฟรุคโตส (fructosyl unit) จากโมเลกุลซูโครสดonor (sucrose donor molecule) ไปต่อกับโมเลกุลซูโครสตัวรับ (sucrose acceptor molecule) ทำให้เกิด trisaccharide kestose ($GF-F$, GF_2) ขึ้นมา จากนั้น 1-FFT จะสังเคราะห์ให้ได้ฟรุคแทนที่มี DP สูงขึ้นโดยการย้ายหน่วยของน้ำตาลฟรุคโตสระหว่าง GF_2 กับฟรุคแทนที่มีขนาดใหญ่กว่าได้เป็น nystose (GF_3), 1F-fructofuranosyl nystose (GF_4) และ raffinose (GF_5) ตามลำดับ ดังสมการต่อไปนี้

สมการที่ 1 การเร่งปฏิกิริยาการสร้างไตรแซคคาไรด์จาก 2 โมเลกุลของซูโครสโดยใช้เอนไซม์ 1-SST



สมการที่ 2 การเร่งปฏิกิริยาการย้ายฟรุคโตสตัวให้ไปยังตัวรับโดยใช้เอนไซม์ 1-FFT



ต่อมา Koops และ Jonker (1996) ได้พิสูจน์โมเดลของ Edelman และ Jefford โดยการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองจากหัว (tuber) ของ Jerusalem artichoke พันธุ์ Colombia แล้วนำมาสังเคราะห์ฟรุคแทนในสภาวะ *in vitro* ที่มีการเติมซูโครสลงไปพบว่า สามารถสังเคราะห์ฟรุคแทนที่มี DP อย่างน้อย 13 ได้ สำหรับเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 และ 70 kDa และในปี 1998 van der Meer และคณะได้โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการ

สังเคราะห์ฟรุคแตนของ Jerusalem artichoke พันธุ์ Colombia ในรูป cDNA clone คือ 1-*sst* (accession no. AJ009757) และ 1-*fft* (accession no. AJ009756) ซึ่งแปลรหัสเป็นเอนไซม์ sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, accession no. CAA08812.1) และ fructan:fructan 1- fructosyltransferase (1-FFT, accession no. CAA088111) ตามลำดับ และ จากรูปแบบการ แสดงออกบ่งชี้ว่า ยีนทั้งสองแสดงออกมากในหัวสะสมอาหารในระยะที่กำลังพัฒนาและมีการ แสดงออกต่ำในส่วนของดอกและลำต้น และไม่พบการแสดงออกของยีนในใบ ราก และหัวสะสม อาหารที่พัฒนาเต็มที่ ซึ่งการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับการสังเคราะห์ฟรุคแตน นอกจากนี้การ ทดสอบหน้าที่ของเอนไซม์โดยถ่ายยีนที่โคลนได้จาก Jerusalem artichoke ไปยังต้นพิทูเนียที่ไม่ใช่ พืชกลุ่มที่สะสมฟรุคแตนพบว่า หากพิทูเนียได้รับยีน 1-*sst* สามารถสร้าง 1-kestose (GF_2), 1-nystose (GF_3) และ 1- fructosyl nystose (GF_4) ได้ แต่พิทูเนียได้รับยีน 1-*fft* ไม่สามารถสะสม ฟรุคแตนได้ ซึ่งน่าจะเป็นเพราะไม่มีสารตั้งต้น (substrate) ที่เหมาะสม (DP มากกว่าหรือเท่ากับ 3) สำหรับ 1- FFT ดังนั้นการสังเคราะห์ให้ได้ฟรุคแตนใน DP ที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเข้าใจขั้นตอน การสังเคราะห์อย่างละเอียด นอกจากการโคลนยีน 1-*sst* และ 1- *fft* ใน Jerusalem artichoke แล้วก็ ยังมีการโคลนยีนกลุ่มนี้ในพืชที่มีการสะสมอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์อื่นอีก เช่น หัวหอม ข้าวบาร์เลย์ หน่อไม้ฝรั่ง และ chicory เป็นต้น (Vijn และคณะ 1997; Spernger และคณะ 1995) โดยในหน่อไม้ฝรั่งจะมียีน 6- *sft* ซึ่งจะสังเคราะห์ฟรุคแตนที่มีลักษณะเป็นกิ่ง (branch) ซึ่ง ความแตกต่างของยีนที่มีในพืชแต่ละชนิดทำให้ประเภทและความยาวของฟรุคแตนในพืชแต่ละ ชนิดจะมีความหลากหลายและแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยค่า DP ของฟรุคแตนในพืช (plant fructan) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10- 250 หน่วยของน้ำตาลฟรุคโตส ซึ่งความแตกต่างในความยาว ของฟรุคแตนไม่เพียงแต่เป็นผลเนื่องมาจากความแปรผันทางอนุกรมวิธานของพืชเท่านั้นแต่ยังรวม ไปถึงอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมที่พืชได้รับด้วย โดยพืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ เปลี่ยนแปลงไปด้วยการปรับเปลี่ยนความยาวเฉลี่ยของฟรุคแตนที่พืชมี โดยพบว่าพืชมีการสะสม ฟรุคแตนมากขึ้นเพื่อปรับค่าออสโมติกเมื่ออยู่ในภาวะแห้งแล้ง (drought) และหนาวเย็น (cold) (Pontis และ del Campillo 1985) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอีกบทบาทหนึ่งของฟรุคแตนในพืช นอกเหนือไปจากการทำหน้าที่เป็นคาร์โบไฮเดรตสำรอง สำหรับข้อแตกต่างของฟรุคแตนจากแป้ง (starch) ก็คือ ฟรุคแตนเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ดีจึงช่วยในการรักษาค่า ออสโมติก (osmotic potential) ในแวคิวโอลของพืช

จากรายงานการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในกลุ่มฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสและ ศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์พบว่า มีคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกันในพืชชนิด เดียวกันและชนิดที่ใกล้เคียงกัน แต่จะมีความแตกต่างกันบ้างเพราะวิธีการสกัดและการทำบริสุทธิ์ที่

แตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์ที่ได้อาจมีกิจกรรมของเอนไซม์อื่นมารบกวนการทำงานได้ หากไม่ได้อยู่ในรูปเอนไซม์บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว (homogenous purified enzyme) (Praznik และคณะ 1990) โดย Praznik และคณะได้รายงานว่า 1-SST ที่แยกจากหัว Jerusalem artichoke ที่เก็บเกี่ยวช่วงเดือนกันยายนใน Leopoldsdorf ใกล้กับเมือง Vienna และนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการแยกเอนไซม์ด้วย 0.007 M potassium phosphate buffer (pH 7) ที่เติม 0.5% Triton X-100 และ 0.5% cysteine และบ่มนาน 24 ชั่วโมงแล้วนำมาทำบริสุทธิ์ต่อด้วย 20-60% ammonium sulfate ตามด้วยการแยกบน hydrophobic interaction chromatography (Fractogel TSK Butyl- 650 column) และ gel filtration (Sephacry S-20 column) และนำเอนไซม์ที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ไปทำให้อยู่รูปผงด้วยความเย็น (lyophilized purified enzyme) แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆ นั้น พบว่า เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 40 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์สกัดหยาบ ประกอบด้วยแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวและไม่ปรากฏลักษณะของ isoenzyme เมื่อแยกด้วย PAGE และนำไปทำ activity staining และเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 กิโลดาลตันเมื่อวิเคราะห์ด้วย gel filtration ซึ่งมีขนาดเดียวกับ 1-SST รูปบริสุทธิ์ (ผ่านการทำบริสุทธิ์ 6 ขั้นตอน มีค่าความบริสุทธิ์ 655 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์สกัดหยาบ) จาก Jerusalem artichoke พันธุ์ Columbia ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ปี 1992 และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียสที่รายงานโดย Koops และ Jonker (1996) แต่ 1-SST ที่แยกได้ประกอบด้วย 2 subunit (27 และ 55 กิโลดาลตัน) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น denaturing นอกจากนี้เอนไซม์ที่แยกโดย Praznik และคณะแสดงคุณลักษณะอื่นๆ เช่น pH อุณหภูมิ ผลของโลหะหนักและสารรีเอเจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ 1-SST ของ Jerusalem artichoke ที่สกัดโดย Scott และคณะ (1966) แต่มีค่า K_m และ V_{max} สำหรับซูโครส เท่ากับ 0.42 มิลลิโมลาร์ และ 0.21 ไมโครโมลของน้ำตาลฟรุกโตสที่ถูกถ่ายโอนในหนึ่งชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่น้อยกว่าค่า K_m ที่รายงานโดย Scott และคณะถึง 10 เท่า (Scott และคณะ 1966) และแตกต่างจากค่าที่รายงานโดย Koops และ Jonker (1996) โดย Praznik และคณะได้ให้เหตุผลว่า สภาวะที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์ของ Scott และคณะอาจแตกต่างกัน เพราะ Scott และคณะไม่ได้ให้รายละเอียดในการสกัดไว้ ส่วน Koops และ Jonker ได้อธิบายว่า ตามปกติค่า K_m ของ 1-SST ของพืชเมื่อใช้ first-order Michaelis-Menten equation นั้นจะมีค่ามากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้จะมาจากความแตกต่างของระยะของหัวที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดเอนไซม์ สำหรับการสกัดและวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันที่ปลูกในประเทศไทยนั้น ได้มีในรายงานวิจัยของศรีสุดา (2554) ที่พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแก่นตะวัน โดยหัวสะสมอาหารของแก่นตะวันอายุ 105-120 วัน มีปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสสูงสุด เท่ากับ 113 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และ 0.098-0.103 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ โครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ และการกรอง โดยใช้เยื่อบางแบบอัลตรา ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสบริสุทธิ์ที่ได้มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 44.402 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 43.275 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุล 75.3 กิโลดาลตันเมื่อแยกด้วย gel filtration และประกอบด้วย 2 subunits (66 และ 25 กิโลดาลตัน) เมื่อแยกบน SDS-PAGE ทำงานได้ดีที่พีเอช 5.4 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า K_m และ V_{max} สำหรับซูโครส เท่ากับ 0.372 โมลาร์ และ 1.218 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยพบการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อมี pyridoxal-HCl ในขณะที่ KI มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากการวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์แล้วยังได้มีการศึกษาการสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยอาศัยเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ด้วย ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ สามารถสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้เมื่อใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ได้น่าจะเป็น 1-SST เพราะสามารถสังเคราะห์ 1-kestose ได้และมีคุณสมบัติอื่นๆ ใกล้เคียงกับ 1-SST ที่รายงานในงานวิจัยอื่น (ศรีสุดา 2554)

จากความสำคัญของอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในด้านต่างๆ จึงมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 1-SST และ 1-FFT รวมไปถึงยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์นี้ในพืชหลากหลายชนิด โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นที่การสกัดแยกเอนไซม์ทั้งสองเพื่อทำบริสุทธิ์ ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ในด้านต่างๆ และนำมาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในหลอดทดลองโดยนำมาบ่มร่วมกับน้ำตาลซูโครส ซึ่งผลที่ได้พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้นั้นสามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ และ ยังมีความสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่แปลรหัสให้เอนไซม์ดังกล่าว เช่นงานวิจัยในปี ค.ศ. 2002 ของ Lidgett และคณะที่ได้แยกและศึกษาคุณลักษณะของยีนที่กำหนดรหัสเป็นเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากหญ้าจำพวก *Lolium* (*Lolium perenne*) โดยการคัดกรองจาก cDNA library และ genomic library พบว่า ยีนดังกล่าวมีส่วนที่แปลรหัส (open reading frame (ORF)) ทั้งหมด 1947 bp ซึ่งกำหนดรหัสเป็นกรดอะมิโน 648 ตัว มีความเหมือนกับเอนไซม์ sucrose: fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) 69% และยังมีโดเมน (domain) ที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสในพืช และจากการดูการแสดงออกของยีน *LpFTI* ก็พบว่า มีการแสดงออกของยีนนี้มากในรากอ่อน ต้นอ่อน และกาบใบที่เจริญเต็มที่ (Lidgett และคณะ 2002) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gallagher และคณะ ซึ่งได้ใช้เทคนิค RT-PCR และ northern

analysis เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัสเป็นเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส และอินเวอร์เตส (invertase) ในหญ้า *Lolium temulentum* L. โดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) และตัวตรวจจับ (probe) ที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นๆ ตามลำดับ และได้แยก water soluble carbohydrate จากพืชตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ควบคู่ไปด้วย ซึ่งจากการทดลองก็พบว่า ผลิตภัณฑ์ water soluble carbohydrate ที่ได้สอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ (Gallagher และคณะ 2004)

ต่อมาได้เริ่มมีการวิเคราะห์บทบาทหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่โคลนได้โดยอาศัยระบบการแสดงออกในยีสต์ ซึ่งเป็นยูคาริโอต โดยในปี ค.ศ. 2004 Nagaraj และคณะได้โคลนยีน *1-sst* จาก barley เข้าไปในยีสต์ *P. pastoris* และใช้เป็นต้นแบบ (model) ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *1-sst* และ *6-sft* โดยการวิเคราะห์จากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณของฟรุกแทนที่เกิดขึ้น จากผลการวิจัยทำให้สามารถระบุบทบาทหน้าที่ของยีน *1-sst* ได้ว่าเป็นยีนที่ code ให้เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ฟรุกแทนในใบของ barley (Nagaraj และคณะ 2004)

ในปี ค.ศ. 2005 Kawakami และคณะ ได้โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟรุกแทน (*1-sst*, *1-fft* และ *6-sft*) จาก winter wheat cultivar (*Triticum aestivum* L. cv. PI173438) และให้มีการแสดงออกใน *P. pastoris* พบว่า recombinant enzyme ที่ผลิตได้สามารถอินนูลินได้ แต่ให้สายโอลิโกเมอร์ที่ไม่ยาวมาก (Kawakami และคณะ 2005)

ในปี ค.ศ. 2006 Van den Ende และคณะ ได้โคลนยีน *hDP 1-fft* จาก *Echinops ritro* เข้าไปใน *P. pastoris* เพื่อดูการแสดงออกของยีนดังกล่าว ซึ่งพบว่า recombinant enzyme และ native enzyme มีความสามารถในการผลิต fructan ได้ทั้งในสถานะ *in vitro* และ *in vivo* เหมือนกัน (Van den Ende และคณะ 2006)

ในปี ค.ศ. 2009 Abe และคณะได้สกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ 1-FFT จาก Edible Burdock โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและนำมาทำโครมาโทกราฟี โดยผ่าน 3 คอลัมน์คือ DEAE-Sepharose CL-6B Toyopearl HW-55S และ Sephadex G-100 โดยเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์สามารถผลิต nystose และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีค่า DP สูงจาก 1-kestose ได้ และจากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์คือ 1-FFTa และ 1-FFTb ด้วยวิธี native และ SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46,000 และ 17,000 ดาลตัน ตามลำดับ และจากการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal sequence ของทั้งสองเอนไซม์พบว่า มีลำดับอะมิโนเหมือนกัน นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้มีการคัดแยก cDNA ของพืชชนิดนี้โดยให้ชื่อว่า *alf1* ซึ่งจะ code ให้ polypeptides จำนวน 617 amino acids

มีค่า M_r และค่า pI เท่ากับ 60,213 และ 4.89 ตามลำดับ และเมื่อโคลนยีน *alft1* เข้าไปใน *P. pastoris* เพื่อการแสดงออกของยีน *alft1* ก็พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่ได้จากพืชชนิดนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *alft1* ที่ code ให้ edible burdock 1-FFT มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Abe และคณะ 2009)

ในปี ค.ศ. 2011 Lasseur และคณะได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 6-SFT ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พันธะ β (2- 6) ของฟรุคแทนใน perennial ryegrass (*Lolium perenne*) โดยการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสโดยใช้วิธี RT- PCR และถ่ายโอนไปยัง *P. pastoris* เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมดังกล่าวกับเอนไซม์ลูกผสมที่ code จากยีน *6-sft* ของ barley พบว่า เอนไซม์ลูกผสม 6- SFT ที่สร้างโดยอาศัยการแสดงออกในระบบของยีสต์สามารถนำมาใช้วิเคราะห์บทบาทหน้าที่ของยีนได้ (Lasseur และคณะ 2011) และในปีเดียวกัน Ueno และคณะได้มีการศึกษาการโคลนยีน fructan 1- exohydrolase (1-FEH) จาก edible burdock (*Arctium lappa* L.) ด้วยวิธี RACE PCR โดยได้ทำการถ่ายโอน *1-feh* gene เข้าไปใน *P. pastoris* เพื่อการแสดงออกของยีนและนำมาวิเคราะห์ว่าสอดคล้องกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในการย่อยอินนูลินหรือไม่ (Ueno และคณะ 2011)

ในปี ค.ศ. 2011 del Viso และคณะได้ศึกษาหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ 6- SFT ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พันธะ β (2- 6) ของฟรุคแทนในหญ้าที่ทนความหนาวเย็นและแห้งแล้ง (*Bromus pictus*) ใน *P. pastoris* พบว่า เอนไซม์ Bp6-SFT ลูกผสมแสดงคุณลักษณะในการทำงานเช่นเดียวกับ barley 6-SFT และมีกิจกรรมของฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสโดยการสังเคราะห์ bifurcose จาก sucrose และ 1-kestotriose ได้อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ Bp6-SFT ลูกผสมที่ผลิตได้ไม่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ยีสต์ได้เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะรูปแบบของการเกิด glycosylation ในยีสต์ที่แตกต่างจากพืชทำให้เกิดการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (del Viso และคณะ 2011)

จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น จะเห็นว่า มีการใช้ระบบการแสดงออกของยีนที่ code ให้เอนไซม์ fructosyltransferase โดยอาศัยยีสต์เป็นหลัก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ยีสต์เป็นยูคาริโอตเช่นเดียวกับพืชทำให้เกิดการดัดแปลงโปรตีน (protein modification) ภายหลังการแปลรหัสเป็นโปรตีนในรูปแบบที่คล้ายหรือใกล้เคียงกัน จึงไม่成为ปัญหาต่อการผลิตเอนไซม์ลูกผสมให้มีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่ผลิตในพืช อย่างไรก็ตาม ก็มีการใช้ระบบของโปรคาริโอตมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ลูกผสมด้วย โดยในปี ค.ศ. 2010 Han และคณะได้ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ 1- SST ในหัวหอมโดยการโคลนยีน *1-sst* เข้าไปใน *Escherichia coli* DH5a และหาสภาวะที่

เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานเอนไซม์ พบว่า ยีน *l-sst* ที่โคลนได้โดยอาศัยเทคนิค RT-PCR มีความเหมือนกับ mRNA fructosyltransferase ของหัวหอม (accession number: AJ006066) ถึง 98% และเมื่อสับโคลนเข้าไปยัง *E. coli* DH5a ก็พบว่า มีการแสดงออกที่ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ลูกผสมได้ และผลจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งให้เห็นว่า เอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมการทำงานที่ดี ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คือ ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารตั้งต้นซูโครส 60 % (Han และคณะ, 2010) ซึ่งงานวิจัยของ Han และคณะชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์ fructosyltransferase ลูกผสมโดยอาศัยแบคทีเรีย *E. coli* นอกเหนือไปจากการใช้พืชและยีสต์

สำหรับการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสมจากถั่วลิสง โดยอาศัยระบบการแสดงออกในยีสต์นั้นยังไม่มีรายงานการวิจัยมากนัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเอาเทคนิคด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) มาช่วยโดยการโคลนยีนในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส จากถั่วลิสงออกมา และเชื่อมต่อลงในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) ที่ทำให้เอนไซม์ลูกผสมสามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เข้าบ้านได้ จะทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ลูกผสมในภายหลังจากขั้นตอนการผลิต นอกจากนี้เพื่อให้มีการผลิตได้ดีและมากขึ้นก็จะอาศัยระบบการแสดงออกในยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต ซึ่งยีสต์เป็นยูคาริโอตเหมือนพืชทำให้มีขบวนการดัดแปลงของโปรตีน ภายหลังการแปลรหัสที่คล้ายคลึงกัน ผลิตภัณฑ์โปรตีนลูกผสมที่ได้จึงมีคุณสมบัติเหมือนกับโปรตีนดั้งเดิม (native protein) และยีสต์ยังมีคุณสมบัติที่โดดเด่นกว่าพืชในเรื่องของความสามารถในการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง สามารถเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์สูง และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จากโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมดภายในเซลล์ หากงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ก็จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสได้ในปริมาณที่มากขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Lab Scan
Agar bacteriological	Lab M
Agarose	Gibco BRL, Vivantis
Albumin from bovine serum	Fluka
Ampicillin	Fluka
Bacto peptone	Lab M
Bacto tryptone	Lab M
Bacto yeast extract	Lab M
Biotin	Fluka
Bradford reagent	Biorad
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride	Fluka
Chloroform	Lab Scan
Cysteine	Sigma
Dipotassium phosphate	Univar
DMSO	Amresco
DNA Ladder 1 kb	Biorad
Ethanol	Alcohol – A
Ethidium bromide	Fluka
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
fructose	Fluka
Glacial acetic acid	Anala R

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Glucose	Sigma
Glycerol	Riedel - De Haen
Glycine	Amresco
Hydrochloric acid	Lab Scan
Imidazole	Bio basic inc.
IPTG	Vivantis
Isopropanol	Carlo Erba
1-Kestose	Fluka
Liquid nitrogen	MSG
Methanol	Lab Scan
Monopotassium phosphate	Univar
Nystose	Fluka
2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid	Sigma
Oligo dT ₍₁₂₋₁₈₎	Fermentas
Phenol	Merck
Primer	Pacific Science
Protein marker	Biorad
Ribonuclease inhibitor	Toyobo
Sorbitol	Fluka
Sodium acetate	Riedel - De Haen
Sodium chloride	Lab Scan
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fluka
Sodium hydroxide	Lab Scan
Sodium phosphate monobasic	Univar
Sucrose	Sigma
TRI Reagent	Molecular Research Center inc.

Triton x-100	Amresco
สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Tris base	Amresco
VC 100bp Plus DNA Ladder (ready-to-use)	Vivantis
X-GAL	Bio basic inc.
Yeast nitrogen base w/o amino acid	Difco
YPD (YEPD) growth medium	Himedia
Zeocin	Invitrogen

2. เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มา

เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารเคมีที่ใช้ศึกษาในระดับ Molecular biology grade

เอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
<i>EcoRI</i> -HF TM	NEB
FastAP TM	Fermentas
<i>SacI</i>	Invitrogen
<i>SacII</i>	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant)	NEB
T4 DNA ligase	Promega
M-MuLV reverse transcriptase	Fermentas

3. ชุดสกัดสำเร็จรูปและแหล่งที่มา

ชุดสกัดสำเร็จรูป	บริษัทผู้ผลิต
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid Biotech
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen

4. เวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มา

เวกเตอร์	บริษัทผู้ผลิต
pGEM [®] -T Easy vector	Promega
pPICZ0A	Invitrogen

5. เครื่องมือ/อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ

เครื่องมือ/อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave	Tomy
Auto pipette	Biohit, Denville, Gilson, Biorad
Amicon [®] ultra-4 centrifugal filter units 30 kDa	Merck Millipore
Balance	Sartorius Basic BA20015 Precisa XT1200C Sartorius Basic BA20015 Precisa XT1200C
Cool-hotter dry bath incubator	Major Science
Cuvette	Starna [®]
Centrifuge	Eppendorf
DNA thermal cycle	PERKIN ELMER:GeneAmp PCR System 2400
Gel document	Syngene
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Shimadzu
HisPur cobalt spin column	Thermo scientific
Hot air oven	Binder
Hot plate	Hot plate (Framo-Geratetechnik D-7821 Eisenbach Hochschwaxwald 1)
Incubator	Wisd
Laminar cabinet	Dwyer mark II
Microcentrifuge	Gyrozen, Wisd
Microplate reader	Tecan
Microwave	Microwave (Tubora TRX248G)
Mini-protein [®] system	Biorad
Nylon syringe filter	Lubitech
pH meter	Ultra basic
Parafilm	Parafilm [®]
Petri dish	Hycon

เครื่องมือ/อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Pump	Rocker 300
Sonicator	Kudos
Spectrophotometer	Biochrom
Vacuum desicator chamber	Kartell
Vial	Microliter
Vortex	Finevortex
Water bath	Memmert
กระดาษกรอง	Whatman
เครื่องเขย่าแบบความคุมอุณหภูมิ	New Brunswick Scientific
เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	ELGA (Maxima LS. Model)
เครื่องผลิตน้ำกลั่น	ELGA (Reservoir75 : LC136)
ตู้เย็น	Mitsubishi electric

6. พืชทดลอง

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) พันธุ์เบอร์ 2

7. เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α และ JM109 ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว

LB medium

เชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ X-33 ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว YPD medium

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมของแบคทีเรีย (transformant bacterial cells) คือ LB medium ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมของยีสต์ (transformant yeast cells) คือ low salt LB medium ที่เติมยาปฏิชีวนะซีโอซิน (zeocin) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ YPD ที่เติมยาปฏิชีวนะ zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส (recombinant fructosyltransferase) โดยใช้ระบบการแสดงออกในยีสต์คือ buffered glycerol complex medium (BMGY) และ buffered methanol complex medium (BMMY)

สำหรับการเก็บเชื้อไว้เป็น stock cultures ใช้สภาวะแช่แข็งโดยนำเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์ที่เจริญถึงขั้น exponential phase ใน 20% glycerol ไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

8. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

7.1 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบความสำเร็จในการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งใช้การแสดงออกของยีน *rice actin* เป็นยีนตรวจสอบ โดย rice actin forward primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

5' CGA GCT TCC TGA TGG ACA 3'

และ rice actin reverse primer ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' TGG GTC AGA CTC GTC GTA C 3'

7.2 ไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *I-sst* (Pan และคณะ 2009)

คือ 1-sst_F (forward primer) ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' ATG ATG GCT TCA TCC ACC AC 3'

และ 1-sst_R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CCA TCA AAG TTC GAA AGT CC 3'

7.3 ไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *I-fft*

คือ 1-fft_F (forward primer) ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' ATG CAA ACC CCT GAA CCC 3'

และ 1-fft_R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' GCC GGT AAT TAA AAAGG GTA 3'

7.4 ไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *I-sst*

คือ *EcoRI*_1-sstF (forward primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CAG GAATTC ATG GCT TCA TCC ACC ACC 3'

และ *SacII*_1-sstR (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CAG CCGCGG AAG TTC GAA AGT CCA CCC A 3'

วิธีการทดลอง

1. พืชทดลอง

หัวแก่่นตะวันอายุ 105 วัน ที่ปลูกในเรือนทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

2. การโคลนยีนในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่่นตะวัน

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA)

นำตัวอย่างหัวของแก่่นตะวันที่อยู่ในระยะที่ต้องการดังรายละเอียดในข้อ 1 มาสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent ตามขั้นตอนต่อไปนี้

Homogenization

ใส่สารละลาย TRI reagent 500 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่บดไว้แล้วด้วยไนโตรเจนเหลว

Phase Separation

เก็บ homogenate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใส่สารละลาย chloroform 100 ไมโครลิตร ปิดฝาเขย่าอย่างแรง 15 วินาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนบนที่เป็นสารละลาย aqueous phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี RNA

RNA Precipitation

ถ่ายส่วนบนที่เป็น aqueous phase ใส่ในหลอดใหม่ ใส่สารละลาย isopropanol 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

RNA Wash

ทิ้งสารละลายส่วนบน เก็บตะกอน RNA ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวัดปริมาณ RNA) ปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทเอาสารละลายเอทานอลออก แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum pump จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2.2 การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (1st strand cDNA)

2.2.1 เตรียมส่วนผสมดังต่อไปนี้ในหลอด sterile eppendorf

total RNA 100 นาโนกรัม – 5 ไมโครกรัม

Oligo (dT)₁₈ 0.5 ไมโครกรัม

เติมน้ำ milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 12.5 ไมโครลิตร

2.2.2 นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง

2.2.3 นำไปเติมสารละลายผสมต่อไปนี้

5x Reaction buffer for M-MuL V RT 4 ไมโครลิตร

ribonuclease Inhibitor 20 ยูนิต 0.5 ไมโครลิตร

สารละลายนิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) 2 ไมโครลิตร

reverse transcriptase M-MuL V RT 200 ยูนิต 1 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวมเป็น 20 ไมโครลิตร

2.3.4 บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

2.3.5 หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจุ่มลงใน

น้ำแข็ง

2.3 การตรวจสอบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้

ตรวจสอบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2 เป็นแม่แบบ (template) และใช้คู่ไพรเมอร์ (primer pair) rice actin forward และ rice actin reverse ของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (house keeping gene) คือ ยีน *rice actin* ในการตรวจสอบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ โดยเตรียม reaction mixture ดังนี้

บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

นิวคลีโอไทด์ผสมที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

rice actin forward ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

rice actin reverse ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

cDNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

เติมน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้วจนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp

PCR System2400

ตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน rice actin ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้อะกาโรสเจล 1 % แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้เทียบกับแถบของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ด้วยเครื่อง gel documentation

2.4 การโคลนยีนในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันด้วยวิธีพีซีอาร์

2.4.1 ไพร์เมอร์สำหรับโคลนยีนในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน

ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับโคลนยีนกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน 2 ยีนคือ *1-sst* (1-sucrose:sucrose fructosyl transferase) ได้ใช้ตามที่มีในรายงานวิจัยของ Pan และคณะ (2009) ส่วน *1-fft* (1-fructan:fructan fructosyl transferase) ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *1-fft* (accession number AJ009756.1) ใน GenBank ซึ่งจากการตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Blastn ผ่าน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *1-sst* (accession number AJ009757.1) และยีน *1-fft* (accession number AJ009756.1) ของ *Helianthus tuberosus* L. 100%

2.4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *1-sst* และ *1-fft* จากแก่นตะวัน

การเพิ่มปริมาณยีน *1-sst* และ *1-fft* ด้วยเทคนิค PCR ได้ใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2 เป็น template สำหรับยีน *1-sst* ใช้ primer 1-sst_F และ 1-sst_R (Pan และคณะ 2009) และยีน *1-fft* ใช้ primer 1-fft_F และ 1-fft_R โดยเตรียม reaction mixture ดังนี้

บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

นิวคลีโอไทด์ผสมที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

forward primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

reverse primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

cDNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

เติมน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้วจนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp

PCR System2400

ตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *I-sst* ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่	53 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่	72 องศาเซลเซียส 2 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	}
	ที่	4 องศาเซลเซียส ∞	

ตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *I-fft* ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่	51 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่	72 องศาเซลเซียส 2 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	}
	ที่	4 องศาเซลเซียส ∞	

หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้อะกาโรสเจล 1 % แล้วนำไปตรวจดูขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้เทียบกับแถบของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ด้วยเครื่อง gel documentation แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบของผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะเป็ยีน *I-sst* และ *I-fft* ออกมาเพื่อแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เริ่มจากการตัดเจลตรงตำแหน่งของแถบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใส่หลอด eppendorf แล้วเติม 500 ไมโครลิตรของ DF buffer ลงในหลอดตัวอย่างผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีหรือจนเจลละลายหมดในระหว่างการบ่มทำการ vortex ทุกๆ 2-3 นาที นำ DF column ใส่ใน collection tube ขนาด

2 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายจากชั้นก่อนหน้านี้เทใส่ใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายที่ผ่านลงมาจาก column ที่จ จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน DE column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายที่ผ่านลงมาจาก column ที่จ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้าย DF column ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่แล้วเติม elution buffer หรือน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 - 30 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอบนเจล) ใส่ตรงกลางของ DF membrane ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ elute ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4.3 การเชื่อมต่อแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้กับเวกเตอร์สำหรับโคลน

นำแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้และผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์จากอะกาโรส-เจลจากข้อ 2.4.2 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับโคลน (cloning vector) ซึ่งในการทดลองได้ใช้ pGEM[®]-T Easy vector (ภาพที่ 3) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตตามตารางที่ 3 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เชื่อมต่อ (ligation product) ถ่ายโอนเข้าสู่ competent *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock

การเตรียม competent *E. coli* strain DH5 α

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* strain DH5 α ลงบนอาหาร LB agar บ่มเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเชื้อจำนวนหนึ่งโคโลนีจากจานเพาะเชื้อนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน ถ่ายเชื้อไปยัง LB broth 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2-0.5 แชน์ flask ที่มีเชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยถ่าย culture ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 X g เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดเท่าที่เป็นไปได้ ล้างตะกอนเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็น ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พยายามให้เซลล์แช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 X g เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง resuspend ตะกอนเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็น ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 X g เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ว resuspend ตะกอนเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็น ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่ eppendorf หลอดละ 100-250 ไมโครลิตร นำไปทดลองในขั้นต่อไป

หมายเหตุ : ในกรณีที่ไม่ได้ทำการทดลองต่อเนื่องทันที ให้ resuspend ตะกอนเซลล์ในชั้นสุดท้ายด้วยแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ + 14 % กลีเซอรอลที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทน แล้วแบ่งใส่ eppendorf เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock

การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation) มีขั้นตอนดังนี้ ผสม ligation products ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมโดยคืดเบาๆ จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วย้ายแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB broth ปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

แล้วคัดเลือกทรานส์ฟอร์มานต์ (transformant) บนอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin, IPTG และ X-Gal โดยเลือกทรานส์ฟอร์มานต์ที่มีโคโลนีสีขาวไปตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นผลิตภัณฑ์บนเวกเตอร์ด้วยเทคนิค colony direct PCR

การตรวจสอบทรานส์ฟอร์มานต์ด้วยวิธี colony direct PCR

เตรียมสารละลายผสมดังนี้

บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร

forward primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร

reverse primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร

เติมน้ำ Milli Q 6.4 ไมโครลิตร

DMSO 1 ไมโครลิตร

เตรียมสารละลายโคโลนีดังนี้

Pick โคโลนีเดี่ยวลงไปละลายในน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่อยู่ใน eppendorf ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

นำสารละลายผสมข้างต้นปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโคโลนีปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 99 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แช่ในน้ำแข็ง แล้ว spin down

เตรียมสารละลายผสมเอนไซม์ดังนี้

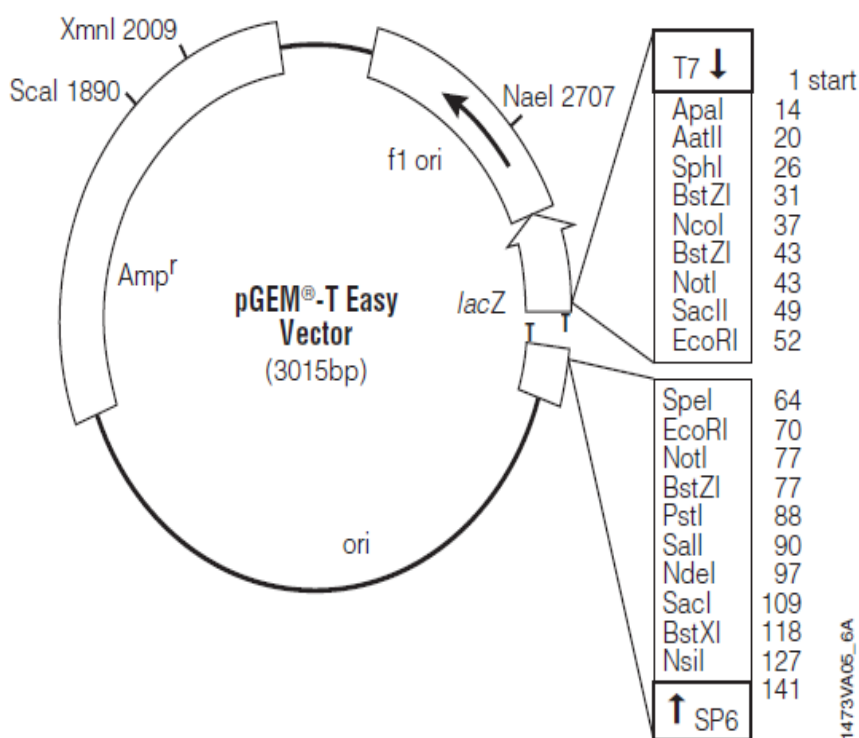
บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

น้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 7.8 ไมโครลิตร

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

เติมสารละลายผสมเอนไซม์ลงไปในการผสมที่ผ่านการบ่มที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น spin down แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ สภาวะที่ใช้ตามยีนที่ต้องการ ตรวจสอบ



ภาพที่ 3 pGEM®-T Easy Vector Map

ที่มา www.promega.com

ตารางที่ 3 ส่วนผสมในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR กับ pGEM[®]-T Easy Vector

reagent	standard reaction	positive reaction	background control
2X rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM [®] -T Easy (50 นาโนกรัม)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR product	X µl	-	-
control insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 weiss units µl)	1 µl	1 µl	1 µl
ปรับปริมาตรด้วย น้ำ Milli Q	10 µl	10 µl	10 µl

ที่มา www.promega.com

หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้อะกาโรสเจล 1 % แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้เทียบกับแถบของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ด้วยเครื่อง gel documentation

2.4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความเหมือนของยีนที่โคลนได้

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จากข้อ 2.4.3 โดยการส่งไปที่หน่วยความร่วมมือการวิจัย MU-OU:CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn ผ่าน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3. การผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน

3.1 การเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ในการตัดจำเพาะบนยีน 1-ssr ที่โคลนได้

เพื่อเชื่อมต่อยีน 1-ssr ที่โคลนได้กับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) ดังนั้นจึงต้องเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ในการตัดจำเพาะที่เหมาะสมบนยีน 1-ssr โดยในการทดลองได้

เพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และ *SacII* เข้าไปในไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ยีนดังนี้ *EcoRI*_1-sstF (5' CAG GAATTC ATG GCT TCA TCC ACC ACC 3') และ *SacII*_1-sstR (5' CAG CCGCGG AAG TTC GAA AGT CCA CCC A 3')

นำพลาสมิด pGEM®-T Easy vector ที่มีการสอดแทรกของยีน *I-sst* มาเป็น template และใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*_1-sstF และ *SacII*_1-sstR จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วย PCR ตามสถานะ ในข้อ 2.4.2 หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้อะกาโรสเจล 1 % แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของ แแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้เทียบกับแถบของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ด้วยเครื่อง gel documentation

ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นส่วนของยีน *I-sst* ออกมาเพื่อแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

3.2 การสับโคลนยีน *I-sst* ไปยังเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector)

นำยีน *I-sst* ที่มีการเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacII* ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) คือ pPICZαA (ภาพที่ 4) โดยการตัดชิ้นยีน *I-sst* ที่ได้จากข้อ 3.1 และ pPICZαA ด้วย *EcoRI* และ *SacII* แล้วนำไปเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และปมที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสม (ภาพที่ 5) เข้าไปใน *E. coli* JM 109 ด้วยวิธี heat shock แล้วคัดแยกทรานสฟอร์มเม้นท์บนอาหารแข็ง low salt LB ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร, รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis) และ colony direct PCR

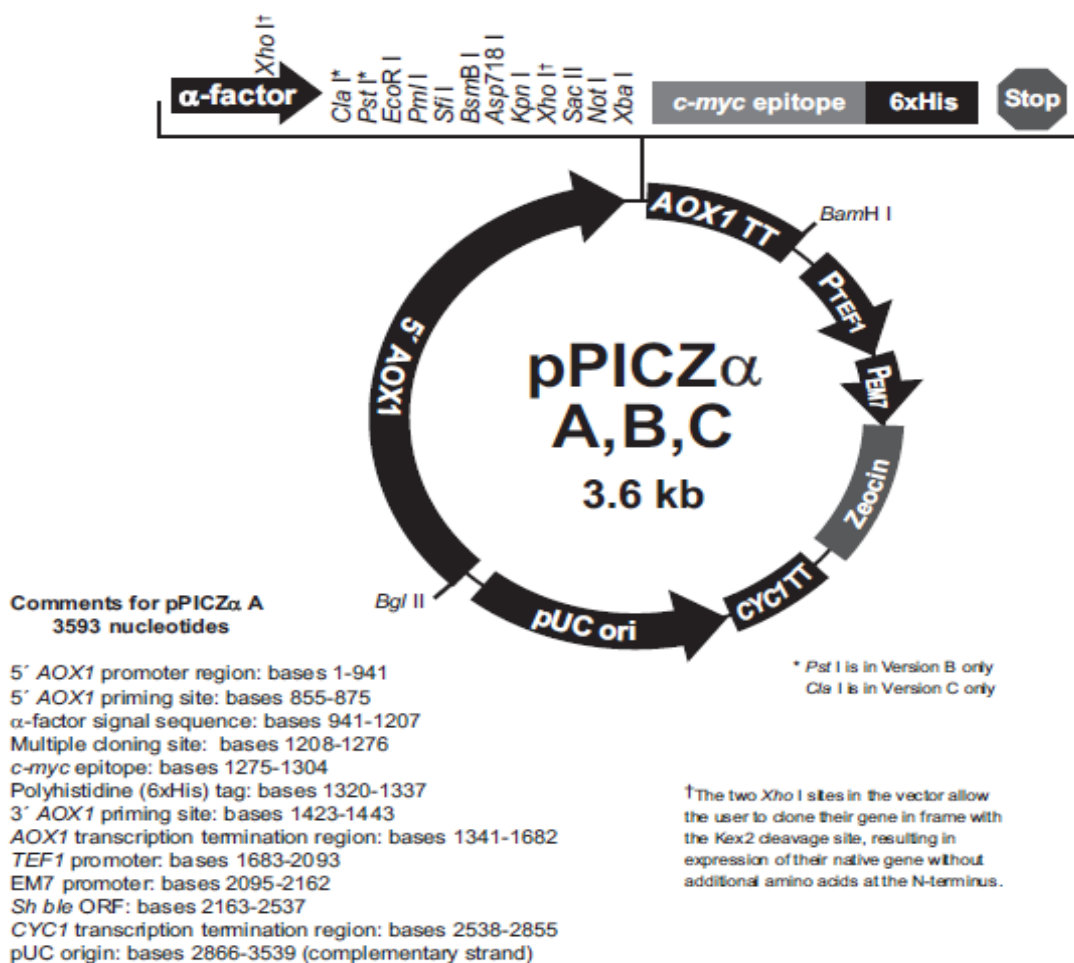
การดูรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacII*

เจียโคโลนีของทรานสฟอร์มเม้นท์ลงในอาหารเหลว low salt LB ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาแยกให้ได้ตะกอนเซลล์ โดยแยกอาหารอย่างระมัดระวังออกจากตะกอนเซลล์ ทำการแยกตะกอนเซลล์ไว้ใน Resuspension Buffer (R3) 250 ไมโครลิตรเติม Lysis Buffer (L7) 250 ไมโครลิตรลงในเซลล์ ผสมโดยการกลบหลอดทดลอง 5 ครั้ง (ห้ามเขย่า) ปมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Precipitation Buffer (N4) 350 ไมโครลิตรผสมทันทีด้วยการกลบหลอดทดลองจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมด้วยความเร็วประมาณ

12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้หลอด eppendorf เก็บส่วนที่ใส นำ supernatant ใส่ใน Spin Column วาง Spin column ที่มี supernatant ใส่หลอด Wash ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม เติม Wash Buffer (W10) 500 ไมโครลิตร ที่มี ethanol ลงใน column ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม เติม Wash Buffer (W9) 700 ไมโครลิตรที่มี ethanol ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด Wash Buffer ที่หลงเหลืออยู่ ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม นำ Spin column วางในหลอด Recovery ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE Buffer ที่ผ่านความร้อน 75 ไมโครลิตรหรือน้ำ milli Q ที่มาเชื้อแล้วลงบนตรงกลางของ column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ภายในหลอด Recovery มี plasmid DNA ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ตรวจสอบความเข้มข้นและขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามลำดับ นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacII* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส 20 นาที

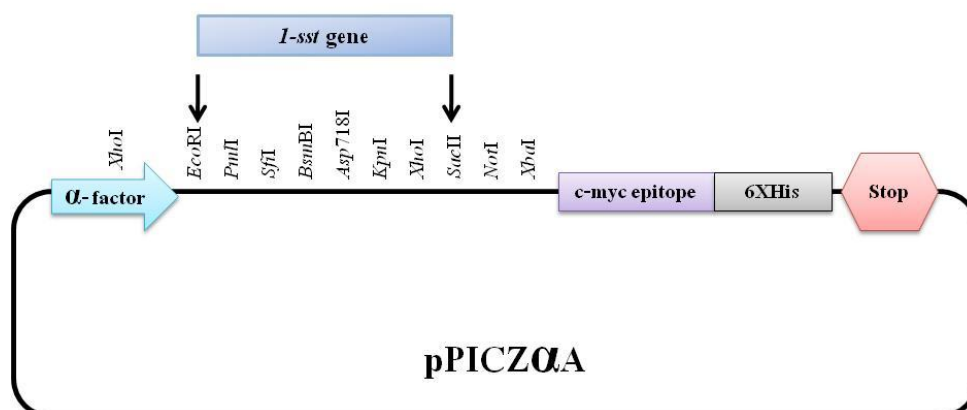
การตรวจสอบทรานสฟอร์มเม้นต์ด้วยวิธี colony direct PCR ทำตามวิธีในข้อ 2.4.3 โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ สภาวะที่ใช้ตามยีนที่ต้องการตรวจสอบ

หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ตัดและที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้อะกาโรสเจล 1 % แล้วนำไปตรวจดูขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้เทียบกับแถบของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ด้วยเครื่อง gel documentation



ภาพที่ 4 pPICZα-A, B, C Vector Map

ที่มา www.invitrogen.com



ภาพที่ 5 ตำแหน่งของยีน *I-sst* ที่สับโคลนเข้าไปใน pPICZαA

3.3 การถ่ายโอนเวกเตอร์สำหรับแสดงออกที่มียีน 1-ssr ไปยังเซลล์ยีสต์

เพาะเลี้ยง *E. coli* JM 109 ที่มีพลาสมิดสำหรับแสดงออกที่มียีน 1-ssr (pPIC_1-ssr) ในอาหารเหลว low salt LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบความเข้มข้นและขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามลำดับ

นำพลาสมิด pPIC_1-ssr มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นถ่ายโอนเข้าไปยัง competent *Pichia pastoris* X-33 ด้วยวิธี electroporation

ในการถ่ายโอนด้วยวิธี electroporation ได้ทำการ vary ความเข้มข้นของพลาสมิด linear pPIC_1-ssr ที่ใช้และการ treat พลาสมิด pPIC_1-ssr ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ด้วยเอนไซม์ FastAP™ เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ไม่ผ่านการ treat โดยความเข้มข้นของพลาสมิด pPIC_1-ssr ที่ใช้ คือ 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 5000 และ 10,000 นาโนกรัม แล้วคัดแยกทรานสฟอร์มแต้นบนอาหารแข็ง yeast extract peptone dextrose ที่มี sorbitol (YPDS) และมี Zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน 1-ssr จากแท่นตะวันใน *Pichia pastoris* X-33

เชื้อ 1 โคลนของ *P. pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPIC_1-ssr ลงในอาหาร buffered glycerol complex (BMGY) 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วขยายขนาดการเลี้ยงเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงในสถานะข้างต้นจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 x g 5 นาที ย้ายตะกอนเซลล์ที่ได้ลงอาหาร buffered methanol complex (BMMY) ที่มีความเข้มข้นเมทานอล 2 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเติมเมทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 % ทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 x g เป็นเวลา 5 นาที

ในส่วนของตะกอนเซลล์นำไปสกัดแยกเอนไซม์ โดยนำไปบดในไนโตรเจนเหลว แล้วเติม extraction buffer (0.007 M potassium phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.5 % triton x-100 และ 0.5 % cysteine) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 x g เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Praznik และคณะ 1990) แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้อัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน ในส่วนของ supernatant ที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้อัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน นำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์

4. การวิเคราะห์กิจกรรมและคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสถูกผสม

4.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสถูกผสม

นำเอนไซม์ตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.46 โมลาร์ ในสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

นำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสโดยวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส (G) ฟรุกโตส (F) และ 1-คีสโตส (1-kestose) ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยนำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 1) ไปกรองด้วย nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร (μm) จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อแยกบน Rezex RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8x300 มิลลิเมตร (Phenomenex) และชะด้วยน้ำ milli Q ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index detector

คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากปริมาณฟรุกโตสที่ถูกถ่ายโอน (F') จากสมการ

$$F' = G - F$$

โดย F คือ น้ำตาลฟรุกโตส และ G คือ น้ำตาลกลูโคส

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit, U) ของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของฟรุกโตสที่ถูกถ่ายโอนจากซูโครส ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากผสม

นำเอนไซม์จากผสมที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน มาผ่าน HisPur cobalt spin column โดยมีขั้นตอนดังนี้ การทำบริสุทธิ์ทำที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 องศาเซลเซียส ถอด bottom tab ของคอลัมน์ออก แล้วนำคอลัมน์ใส่ในหลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด storage buffer ออก จากนั้น equilibrate คอลัมน์ ด้วย equilibration/wash buffer ปริมาตรเป็น 2 เท่าของ resin พลิกคอลัมน์กลับไปที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถอด bottom tab ออก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอด centrifuge ใหม่ จากนั้นเติม equilibration/wash buffer ปริมาตรเป็น 2 เท่าของ resin ลงไปในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอด centrifuge ใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้งหรือมากกว่า จากนั้นทำการชะคอลัมน์ด้วย elution buffer ปริมาตรเป็น 2 เท่าของ resin ลงไปในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอด centrifuge ใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้งหรือมากกว่า นำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ที่ถูกชะด้วย elution buffer ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การ regenerate คอลัมน์ มีขั้นตอนดังนี้ ล้างคอลัมน์ด้วย MES buffer ปริมาตรเป็น 10 เท่าของ resin แล้วล้างด้วยน้ำ milli Q ปริมาตรเป็น 10 เท่าของ resin เก็บคอลัมน์ใน 20 เปอร์เซ็นต์ ethanol และก่อนที่จะนำคอลัมน์มาใช้ในรอบให้ re-equilibrate คอลัมน์ด้วย equilibration/wash buffer

4.3 การหาปริมาณโปรตีน

หาความเข้มข้นโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (Bradford 1976) กราฟมาตรฐานของโปรตีนเตรียมโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin

4.4 การวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำเอนไซม์มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลภายใต้สภาวะที่ทำให้เสียสภาพทางธรรมชาติ (denaturing conditions) โดยการนำโปรตีนตัวอย่างมาแยกบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล 12 % ด้วยกระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมป์ 3-4 ชั่วโมง ย้อมแผ่น

โพลีอะคริลาไมด์เจดด้วย coomassie blue เทียบตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

4.5 การวิเคราะห์การสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากผสม

นำเอนไซม์จากผสมที่ได้มาทดสอบการสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในหลอดทดลอง โดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยนำเอนไซม์ตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายซูโครสความเข้มข้น 0.46 โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.4 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC ทำโดยนำสารสกัดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย Nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร (μm) จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อแยกบน Rezex RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8x300 มิลลิเมตร (Phenomenex) และชะด้วย deionized distilled water ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index detector โดยใช้ standard ชนิดต่างๆ คือ คีโทส นีสโทส ซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน

ในงานวิจัยนี้ได้โคลนยีนกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันคือ ยีน *1-sst* และ *1-fft* ซึ่งทำโดยการสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากหัวของแก่นตะวันอายุ 105 วัน ซึ่งเป็นอวัยวะ (organ) ที่อยู่ในระยะพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหาร (tuber development) ที่มีรายงานว่า มีการแสดงออกของยีนทั้งสองที่สูง (van der Meer และคณะ 1998) และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสและการสะสมของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุด (ศรีสุดา 2554) มาสังเคราะห์ 1st strand cDNA และทดสอบความสำเร็จในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยการใส่คู่ไพรเมอร์ (primer pair) ที่จำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณยีน *actin* ด้วยวิธี PCR ซึ่งจากการนำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ไปแยกบนอะกาโรสเจล 1% พบแถบผลิตภัณฑ์ 1 แถบ ขนาดประมาณ 400 bp ดังแสดงในภาพที่ 8 แสดงว่าสามารถสังเคราะห์ 1st strand cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดจากแก่นตะวันได้

ในการโคลนยีน *1-sst* จากแก่นตะวันนั้นได้ใช้คู่ไพรเมอร์ตามที่ใช้ในงานวิจัยของ Pan และคณะ (2009) ส่วนยีน *1-fft* จากแก่นตะวันใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *1-fft* (accession number AJ009756.1) จาก GenBank โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *1-sst* และ *1-fft* ได้แสดงในภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

เมื่อทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-sst_F และ 1-sst_R ด้วยสภาวะตามที่กำหนดดังรายละเอียดในวิธีการทดลอง แล้วย่นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปแยกขนาดบนอะกาโรสเจล 1% ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ 1 แถบมีขนาดประมาณ 2 kb ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน *1-sst* ที่ประกอบไปด้วย 2156 bp ดังนั้นจึงได้ตัดแถบบ้างกล่าวไปสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจลและทำบริสุทธิ์เพื่อโคลนเข้าสู่ pGEM[®]-T Easy vector เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *1-fft* ก็ได้ดำเนินการในทำนองเดียวกันคือ ทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-fft_F และ 1-fft_R ด้วยสภาวะตามที่กำหนดดังรายละเอียดในวิธีการทดลอง จากการทดลองพบผลิตภัณฑ์ 1 แถบมีขนาดประมาณ 2 kb ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน *1-fft* ที่ประกอบไปด้วย 2036 bp และโคลนเข้าสู่ pGEM[®]-T Easy vector เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไปเช่นเดียวกัน


```

1   GGCACGAGAA AAAACCCCTCC CTCAGGCCAC CACATGATGG CTTTCATCCAC
51  CACCACCACC CCTCTCATTC TCCATGATGA CCCTGAAAAC CTCCCAGAAC
101 TCACCGGTTT TCCGACAAC CTGCGTCTAT CCATCGCAAA AGTGCTTTTCG
151 GGGATCCTTG TTTCGGTTCT GGTATAGGT GCTCTTGTTG CTTTAATCAA
201 CAACCAACA TATGAATCCC CCTCGGCCAC CACATTCGTA ACTCAGTTGC
251 CAAATATTGA TCTGAAGCGG GTTCCAGGAA AGTTGGATTC GAGTGCTGAG
301 GTTGAATGGC AACGATCCAC TTATCATTTT CAACCCGACA AAAATTTTCAT
351 TAGCGATCCT GATGGCCCAA TGTATCACAT GGGATGGTAT CATCTATTTT
401 ATCAGTACAA CCCTCAATCT GCCATCTGGG GCAACATCAC ATGGGGCCAC
451 TCGGTATCGA AAGACATGAT CAACTGGTTC CATCTCCCTT TCGCCATGGT
501 TCCTGACCAT TGGTACGACA TCGAAGGTGT CATGACGGGT TCGGCTACAG
551 TCCTCCCTAA TGGTCAAATC ATCATGCTTT ACTCGGGCAA CGCGTATGAT
601 CTCTCCCAAG TACAATGCTT GGCGTACGCT GTCAACTCGT CGGATCCACT
651 TCTTATAGAG TGGAAAAAAT ATGAAGGTAA CCCTGTCTTA CTCCCACCAC
701 CAGGAGTAGG CTACAAGGAC TTTCGGGACC CATCCACATT GTGGTCGGGC
751 CCTGATGGTG AATATAGAAT GGTAATGGGG TCCAAGCACA ACGAGACTAT
801 TGGCTGTGCT TTGATTTACC ATACCACTAA TTTTACGCAT TTTGAATTGA
851 AAGAGGAGGT GCTTCATGCA GTCCACATA CTGGTATGTG GGAATGTGTT
901 GATCTTTACC CGGTGTCCAC CGTACACACA AACGGGCTGG ACATGGTGA
951 TAACGGGCCA AATGTTAAGT ACGTGTGAA ACAAAGTGGG GATGAAGATC
1001 GCCATGATTG GTATGCAATT GGAAGTTACG ATATAGTGAA TGATAAGTGG
1051 TACCCAGATG ACCCGGAAAA TGATGTGGGT ATCGGATTAA GATATGATTT
1101 TGGAAAATTT TATGCGTCCA AGACGTTTTA TGACCAACAT AAGAAGAGGA
1151 GAGTCCTTTG GGGCTATGTT GGAGAAACCG ATCCCCAAAA GTATGACCTT
1201 TCAAAGGGAT GGGCTAACAT TTTGAATATT CCAAGGACCG TCGTTTTGGA
1251 CCTCGAAACT AAAACCAATT TGATTCAATG GCCAATCGAG GAAACCGAAA
1301 ACCTTAGGTC GAAAAAGTAT GATGAATTTA AAGACGTCGA GCTTCGACCC
1351 GGGGCACTCG TTCCCCTTGA GATAGGCACA GCCACACAGT TGGATATAGT
1401 TGCGACATTC GAAATCGACC AAAAGATGTT GGAATCAACG CTAGAGGCCG
1451 ATGTTCTATT CAATTGCACG ACTAGTGAAG GCTCGGTTGC AAGGAGTGTG
1501 TTGGGACCGT TTGGTGTGGT GGTTCCTAGC GATGCCCAGC GCTCCGAACA
1551 ACTTCTGTGA TACTTCTATA TCGCAAAAGA TATTGATGGA ACCTCACGAA
1601 CTTATTTTTG TGCCGACGAA ACAAGATCAT CCAAGGATGT AAGCGTAGGG
1651 AAATGGGTGT ACGGAAGCAG TGTTCTGTG CTTCCAGGCG AAAAGTACAA
1701 TATGAGGTTA TTGGTGGATC ATTCTGATAGT AGAGGGATTT GCACAAAACG
1751 GGAGAACCGT GGTGACATCA AGAGTGATC CAACAAAGGC GATCTACAAC
1801 GCTGCGAAGG TGTTTTTGTT CAACAACGCG ACTGGAATCA GTGTGAAGGC
1851 GTCGATCAAG ATCTGGAAGA TGGGGGAAGC AGAACTCAAT CCTTCCCTC
1901 TTCCTGGGTG GACTTTCGAA CTTTGATGGT TATATTTTGG ACCCTATATA
1951 TGTGTTATTA TCATGATGGT TATATTTTGG ACCCTATATA TGTGTTATTA
2001 TCATGAAGCA TAAGTTTGGA CTGGAGGGGG TATTATTGTA ATTTTATATG
2051 CATGTTCTAT TACTTGTGAG GTTATAGTAT GTAATTAAAT TATTATATAC
2101 TATATCAATT TCTAATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2151 AAAAAA

```

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *1-sst* (accession number AJ009757.1)

ตัวอักษรสีแดงที่ขีดเส้นใต้ คือ 1-sst_F (forward) และ 1-sst_R (reverse) primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน

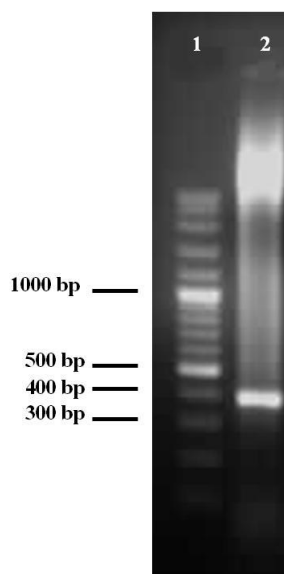
```

1   GGGACGAGTA CCAGTCCAGT CAGTCACCAT GCAAACCCCT GAACCCTTTA
51  CAGACCTTGA ACATGAACCC CACACACCCC TACTGGACCA CCACCACAAC
101 CCACCACCAC AAACCACCAC AAAACCTTTG TTCACCAGGG TTGTGTCCGG
151 TGTCACCTTT GTTTTATTCT TCTTTGGTTT CGCTATCGTA TTCATTGTTC
201 TCAACCAACA GAATTCTTCT GTTCGTATCG TCACCAATTC GGAGAAATCT
251 TTTATAAGGT ATTCGCAGAC CGATCGCTTG TCGTGGGAAC GGACCGCTTT
301 TCATTTTCAG CCTGCCAAGA ATTTTATTTA CGATCCAGAT GGTCAGTTGT
351 TTCACATGGG CTGGTACCAT ATGTTCTATC AATACAACCC ATACGCACCG
401 GTTTGGGGCA ATATGTCATG GGGTCACTCA GTGTCCAAAG ACATGATCAA
451 CTGGTACGAG CTGCCAGTCG CTATGGTCCC GACCGAATGG TATGATATCG
501 AGGGCGTCTT ATCCGGGTCT ACCACGGTCC TTCCAAACGG TCAGATCTTT
551 GCATTGTATA CTGGGAACGC TAATGATTTT TCCCAATTAC AATGCAAAGC
601 TGTACCCGTA AACTTATCTG ACCCGCTTCT TATTGAGTGG GTCAAGTATG
651 AGGATAACCC AATCCTGTAC ACTCCACCAG GGATTGGGTT AAAGGACTAT
701 CGGGACCCGT CAACAGTCTG GACAGGTCCC GATGGAAAGC ATAGGATGAT
751 CATGGGAAC TAAACGTGGCA ATACAGGCAT GGTACTTGTT TACTATACCA
801 CTGATTACAC GAACTACGAG TTGTTGGATG AGCCGTTGCA CTCTGTTCCC
851 AACACCGATA TGTGGGAATG CGTCGACTTT TACCCGGTTT CGTTAACCBA
901 TGATAGTGCA CTTGATATGG CGGCCTATGG GTCGGGTATC AAACACGTTA
951 TTAAAGAAAAG TTGGGAGGGA CATGGAATGG ATTGGTATTC AATCGGGACA
1001 TATGACGCGA TAAATGATAA ATGGACTCCC GATAACCCGG AACTAGATGT
1051 CGGTATCGGG TTACGGTGCG ATTACGGGAG GTTTTTTGCA TCAAAGAGTC
1101 TTTATGACCC ATTGAAGAAA AGGAGGATCA CTTGGGGTTA TGTTGGAGAA
1151 TCAGATAGTG CTGATCAGGA CCTCTCTAGA GGATGGGCTA CTGTTTATAA
1201 TGTTGGAAGA ACAATTGTAC TAGATAGAAA GACCGGGACC CATTTACTTC
1251 ATTGCCCCGT TGAGGAAGTC GAGAGTTTGA GATACAACGG TCAGGAGTTT
1301 AAAGAGATCA AGCTAGAGCC CGGTTCAATC ATTCCAACCG ACATAGGCAC
1351 GGCTACACAG TTGGACATAG TTGCAACATT TGAGGTGGAT CAAGCAGCGT
1401 TGAACGCGAC AAGTGAAACC GATGATATTT ATGGTTGCAC CACTAGCTTA
1451 GGTGCAGCCC AAAGGGGAAG TTTGGGACCA TTTGGTCTTG CGGTTCTAGC
1501 CGATGGAACC CTTTCTGAGT TAACTCCGGT TTATTTCTAT ATAGCTAAAA
1551 AGGCAGATGG AGGTGTGTCG ACACATTTTT GTACCGATAA GCTAAGGTCA
1601 TCACTAGATT ATGATGGGGA GAGAGTGGTG TATGGGGGCA CTGTTCTCTG
1651 GTTAGATGAT GAAGAACTCA CAATGAGGCT ATTGGTGGAT CATTCGATAG
1701 TGGAGGGGTT TGCACAAGGA GGAAGGACGG TTATAACATC AAGGGCGTAT
1751 CCAACAAAAG CGATATACGA ACAAGCGAAG CTGTTCTTGT TCAACAACGC
1801 CACAGGTACG AGTGTGAAAAG CATCTCTCAA GATTTGGCAA ATGGCTTCTG
1851 CACCAATTCA TCAATACCCT TTTTAATTAC CGGCTATCGC TATCCTTTTT
1901 GTTATTGGTA TTTATGTATC TTAATTTTCT TTTAAACCTT TTTATTTGAT
1951 AAATATTAGT TCTTGTTATT GTGCTTCTAG TAATAAATGA ATGGTGTTAT
2001 GGGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *I-fft* (accession number AJ009756.1)

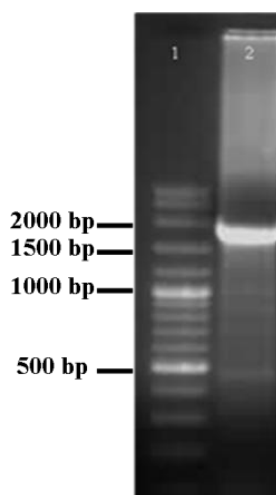
ตัวอักษรสีแดงที่ขีดเส้นใต้ คือ 1-fft_F (forward) และ 1-fft_R (reverse) primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน



ภาพที่ 8 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *actin*

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

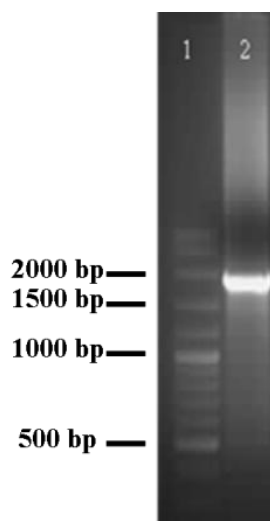
lane 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ rice actin_F และ rice actin_R



ภาพที่ 9 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *I-sst*

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

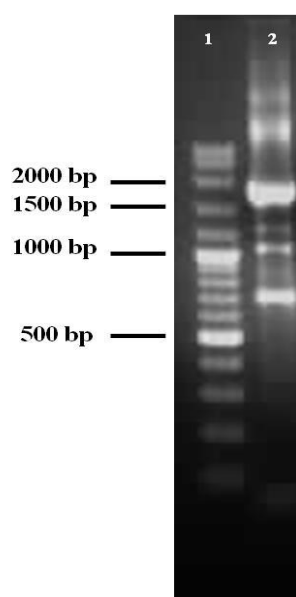
lane 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-sst_F และ 1-sst_R



ภาพที่ 10 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *I-fft*

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

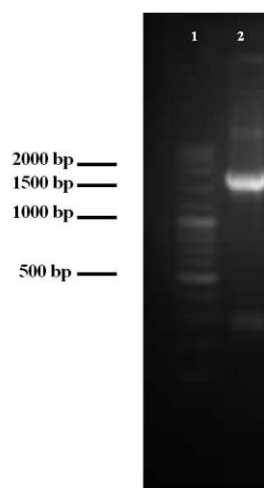
lane 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-fft_F และ 1-fft_R



ภาพที่ 11 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ colony direct PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *I-sst*

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

lane 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ colony direct PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-sst_F และ 1-sst_R



ภาพที่ 12 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ colony direct PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *I-fft*

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

lane 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการทำ colony direct PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-fft_F และ 1-fft_R

เมื่อตัดแถบผลิตรหัสที่คาดว่าจะเป็ยีน *I-sst* และ *I-fft* จากเจลแล้วนำไปสกัดและทำบริสุทธิ์และเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM[®]-T Easy vector แล้วถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformants) ที่เจริญบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin และมีโคลีนีสขาวไปวิเคราะห์การสอดแทรกของยีนบนเวกเตอร์ด้วยเทคนิค colony direct PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 1-sst_F/1-sst_R และ 1-fft_F/1-fft_R เพื่อวิเคราะห์หาทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับยีน *I-sst* และ *I-fft* ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 และ 12 ตามลำดับ จากการทดลองดังกล่าวทำให้ได้ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีการสอดแทรกของผลิตรหัสที่คาดว่าจะเป็ยีน *I-sst* และ *I-fft* จากแท่นตะวัน ซึ่งได้มีการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเหมือนด้วยโปรแกรม Blastn ผ่านเว็บไซต์ NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *I-sst* ที่ใช้ T7 เป็นไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ (ภาพที่ 13) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus I-sst* gene (accession number AJ009757.1) 99% โดยในการวิเคราะห์นั้นครอบคลุมพื้นที่ของสายนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ (query coverage) ถึง 99% ค่า max score 1352 และ E value เท่ากับ 0.0 (ภาพที่ 14) ซึ่งให้เห็นว่า ยีนที่โคลนได้นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Helianthus tuberosus I-sst* gene ซึ่งจะได้นำไปเทียบ (alignment) กันเพื่อวิเคราะห์ในรายละเอียดอีกครั้ง

TTCCATCAAAGTTCGAAAGTCCACCCAGGAAGAGGGAAAGGATTGAGTTCTGCTTCCCCCATCCTCCAG
 ATCTTGATCGACGCCTTCACACTGATTCCAGTCGCGTTGTTGAACAAAAACACCTTCGCAGCGTTGTAG
 ATCGCCTTTGTTGGATACACTCTTGATGTCACCACGGTTCCCCCGTTTGTGCAAATCCCTCTACTATC
 GAATGATCCACCAATAACCTCATATTGTACTTCTCGCCTGGGAGGACAGGAACACTGCTTCCGTACACC
 CATTTCCCTACGCTTACATCCTTGGATGATCTTGTTCGTCGGCACAAAAATAAGTTTCGTGAGGTTCCA
 TCAATATCTTTTGCATATAGAAGTATACAGGAAGTTGTTTCGGAGCGCTGGGCATCGGCTAGAACCACC
 ACACCAAACGGTCCCAACACACCCCTTGCAACCGAGCCTTCACTAGTCGTGCAATTGAATAGAACATCG
 GCCTCTAGCGTTGATTCCAACATCTTTTGGTCGATTTCGAATGTCGCAACTATATCCAACGTGTGTGGCT
 GTGCCTATCTCAAGGGGAACGAGTGCCCCGGGTCGAAGCTCGACGCTTTAAATTCATCATACTTTTTTC
 GACCTAAGGTTTTCGGTTTTCTCGATTGGCCATTGAATCAAATTGGTTTTAGTTTTCGAGGTCCAAAACG
 ACGGTCCTTGGAATATTCAAATGTTAGCCCATCCCTTTGAAAGGTCATACTTTTGGGGA

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *I-sst* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Helianthus tuberosus sst-1 gene	1352	1352	99%	0.0	99%	AJ009757.1
Acinetobacter baylii transgene for double kill gene cassette, strain KH2	604	604	97%	3e-169	82%	AM411028.1
C.scolymus mRNA for sucrose sucrose 1-fructosyltransferase	604	604	97%	3e-169	82%	Y09862.1

ภาพที่ 14 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *I-sst* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *I-sst* ที่ใช้ SP6 เป็นไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ (ภาพที่ 15) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus I-sst gene* (accession number AJ009757.1) 99% โดยในการวิเคราะห์นั้นครอบคลุมพื้นที่ของสายนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ (query coverage) ถึง 94% ค่า max score 1243 และ E value เท่ากับ 0.0 ซึ่งให้เห็นว่า ยีนที่โคลนได้นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Helianthus tuberosus I-sst gene* (ภาพที่ 16) ซึ่งจะได้นำไปเทียบ (alignment) กันเพื่อวิเคราะห์ในรายละเอียดอีกครั้ง

GGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTATGATGGCTTCATCCACCACCACCCCTCT
 CATTCTCCATGATGACCCCTGAAAACCTCCCAGAACTCACCGGTTCTCCGACAACTCGTCTATCCAT
 CGCAAAAGTGCTTTTCGGGGATCCTTGTTTCGGTTCTGGTTATAGGTGCTCTTGTTGCTTTAATCAACAA
 CCAAACATATGAATCCCCCTCGGCCACCACATTCGTAACCTCAGTTGCCAAATATTGATCTGAAGCGGGT
 TCCAGGAAAGTTGGATTTCGAGTGCTGAGGTTGAATGGCAACGATCCACTTTTTCATTTTCAACCCGACAA
 AAATTTTCATTAGCGATCCTGATGGCCCAATGTATCATATGGGATGGTATCATCTATTTTATCAGTACAA
 CCCTCAATCTGCCATCTGGGGCAACATCACATGGGGCCACTCGGTATCGAAAGACATGATCAACTGGTT
 CCATCTCCCTTTTCGCCATGGTTCTGACCATTTGGTACGACATCGAAGGTGTCATGACGGGTTTCGGCTAC
 AGTTCTCCCTAATGGTCAAAATCATCATGCTTTACTCGGGCAACGCGTATGATCTCTCCAAGTACAAT
 GCTTGGCGTACGCTGTCAACTCGTTCGGATCCACTTCTTATAGAGTGGAAGGTAACCCCTG
 TCTTACTCCCACCACCAGGAGTAGGCTACANGGACTTTCGGGGACCCATCCACATTGTGGTTGGGCCCT
 GNAAGGTGAANA

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *I-sst* เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Helianthus tuberosus sst-1 gene	1243	1243	94%	0.0	99%	AJ009757.1
C.scolymus mRNA for sucrose sucrose 1-fructosyltransferase	411	411	59%	6e-111	84%	Y09662.1

ภาพที่ 16 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-sst* เมื่อใช้โปรแกรม SP6 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank

และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ทั้งโปรแกรม T7 และ SP6 ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus 1-sst gene* (accession number AJ009757.1) ด้วยโปรแกรม VectorNTI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้โปรแกรม T7 และ SP6 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมด้านปลาย 3' และ 5' ของ *Helianthus tuberosus 1-sst gene* ตามลำดับ ถึง 99% (ภาพที่ 17) ดังนั้น ยีนที่โคลนได้จากหัวแก่นตะวันอายุ 105 วันจึงเป็นยีน *1-sst*

		1		50
1-sst	(1)	----G G C A C G A G A A A A A A C C C T C C C T C A G G C C A C C A C A T G A T G G C T T C A T		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(1)	GGTC G A C C T G C A G G C G G C C G C G A A T T C A C T A G T G A T T A T G A T G G C T T C A T		
Consensus	(1)	G C G C C T C A A T G A T G G C T T C A T		
		51		100
1-sst	(47)	C C A C C A C C A C C C C T C T C A T T C T C C A T G A T G A C C C T G A A A C C T C C C A		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(51)	C C A C C A C C A C C C C T C T C A T T C T C C A T G A T G A C C C T G A A A C C T C C C A		
Consensus	(51)	C C A C C A C C A C C C C T C T C A T T C T C C A T G A T G A C C C T G A A A C C T C C C A		
		101		150
1-sst	(97)	G A A C T C A C C G G T T C T C C G A C A A C T C G T C G T C T A T C C A T C G C A A A A G T G C T		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(101)	G A A C T C A C C G G T T C T C C G A C A A C T C G T C G T C T A T C C A T C G C A A A A G T G C T		
Consensus	(101)	G A A C T C A C C G G T T C T C C G A C A A C T C G T C G T C T A T C C A T C G C A A A A G T G C T		
		151		200
1-sst	(147)	T T C G G G G A T C C T T G T T T C G G T T C T G G T T A T A G G T G C T C T T G T T G C T T T A A		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(151)	T T C G G G G A T C C T T G T T T C G G T T C T G G T T A T A G G T G C T C T T G T T G C T T T A A		
Consensus	(151)	T T C G G G G A T C C T T G T T T C G G T T C T G G T T A T A G G T G C T C T T G T T G C T T T A A		
		201		250
1-sst	(197)	T C A A C A A C C A A C A T A T G A A T C C C C C T C G G C C A C C A C A T T C G T A A C T C A G		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(201)	T C A A C A A C C A A C A T A T G A A T C C C C C T C G G C C A C C A C A T T C G T A A C T C A G		
Consensus	(201)	T C A A C A A C C A A C A T A T G A A T C C C C C T C G G C C A C C A C A T T C G T A A C T C A G		
		251		300
1-sst	(247)	T T G C C A A T A T T G A T C T G A A G C G G G T T C C A G G A A A G T T G G A T T C G A G T G C		
1-sst T7	(1)	-----		
1-sst SP6	(251)	T T G C C A A T A T T G A T C T G A A G C G G G T T C C A G G A A A G T T G G A T T C G A G T G C		
Consensus	(251)	T T G C C A A T A T T G A T C T G A A G C G G G T T C C A G G A A A G T T G G A T T C G A G T G C		
		301		350
1-sst	(297)	T G A G G T T G A A T G G C A A C G A T C C A C T T A T C A T T T T C A A C C G A C A A A A T T		

```

1-sst T7      (1) -----
1sst SP6     (301) TGAGGTTGAATGGCAACGATCCACTTTCATTTTCAACCCGACAAAAATT
Consensus    (301) TGAGGTTGAATGGCAACGATCCACTT TCATTTTCAACCCGACAAAAATT
                                     351 400

1-sst       (347) TCATTAGCGATCCTGATGGCCCAATGTATCACATGGGATGGTATCATCTA
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (351) TCATTAGCGATCCTGATGGCCCAATGTATCACATGGGATGGTATCATCTA
Consensus   (351) TCATTAGCGATCCTGATGGCCCAATGTATCACATGGGATGGTATCATCTA
                                     401 450

1-sst       (397) TTTTATCAGTACAACCCTCAATCTGCCATCTGGGGCAACATCACATGGGG
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (401) TTTTATCAGTACAACCCTCAATCTGCCATCTGGGGCAACATCACATGGGG
Consensus   (401) TTTTATCAGTACAACCCTCAATCTGCCATCTGGGGCAACATCACATGGGG
                                     451 500

1-sst       (447) CCACTCGGTATCGAAAGACATGATCAACTGGTTCCATCTCCCTTTTCGCCA
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (451) CCACTCGGTATCGAAAGACATGATCAACTGGTTCCATCTCCCTTTTCGCCA
Consensus   (451) CCACTCGGTATCGAAAGACATGATCAACTGGTTCCATCTCCCTTTTCGCCA
                                     501 550

1-sst       (497) TGGTTCCTGACCATTGGTACGACATCGAAGGTGTCATGACGGGTTCGGCT
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (501) TGGTTCCTGACCATTGGTACGACATCGAAGGTGTCATGACGGGTTCGGCT
Consensus   (501) TGGTTCCTGACCATTGGTACGACATCGAAGGTGTCATGACGGGTTCGGCT
                                     551 600

1-sst       (547) ACAGTCTCCCTAATGGTCAAA-TCATCATGCTTTACTCGGGCAACGCGT
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (551) ACAGTCTCCCTAATGGTCAAAATCATCATGCTTTACTCGGGCAACGCGT
Consensus   (551) ACAGTCTCCCTAATGGTCAAA TCATCATGCTTTACTCGGGCAACGCGT
                                     601 650

1-sst       (596) ATGATCTCTCCCAAGTACAATGCTTGGCGTACGCTGTCAACTCGTCGGAT
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (601) ATGATCTCTCCCAAGTACAATGCTTGGCGTACGCTGTCAACTCGTCGGAT
Consensus   (601) ATGATCTCTCCCAAGTACAATGCTTGGCGTACGCTGTCAACTCGTCGGAT
                                     651 700

1-sst       (646) CCACTTCTTATAGAGTGGAATAATGAAGGTAACCCTGTCTTACTCCC
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (651) CCACTTCTTATAGAGTGGAATAATGAAGGTAACCCTGTCTTACTCCC
Consensus   (651) CCACTTCTTATAGAGTGGAATAATGAAGGTAACCCTGTCTTACTCCC
                                     701 750

1-sst       (696) ACCACCAGGAGTAGGCTACAGGACTTTCGGG-ACCCATCCACATTGTGG
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (701) ACCACCAGGAGTAGGCTACAGGACTTTCGGGACCCATCCACATTGTGG
Consensus   (701) ACCACCAGGAGTAGGCTACAGGACTTTCGGG ACCCATCCACATTGTGG
                                     751 800

1-sst       (745) TCGGGCCCTGAT-GGTGAATA-TAGAATGGTAATGGGGTCCAAGCACAACG
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (751) TCGGGCCCTGNAAAGGTGAANA-----
Consensus   (751) TCGGGCCCTG GGTGAA A
                                     801 850

1-sst       (794) AGACTATTGGCTGTGCTTTGATTTACCATAACCACTAATTTTACGCATTTT
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (772) -----
Consensus   (801) -----
                                     851 900

1-sst       (844) GAATTGAAAGAGGAGGTGCTTCATGCAGTCCCACATACTGGTATGTGGGA
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (772) -----
Consensus   (851) -----
                                     901 950

1-sst       (894) ATGTGTTGATCTTTACCCGGTGTCCACCGTACACACAAACGGGCTGGACA
1-sst T7    (1) -----
1sst SP6    (772) -----
Consensus   (901) -----
                                     951 1000

```


1-sst	(944)	TGGTGGATAACGGGCCAAATGTTAAGTACGTGTTGAAACAAAGTGGGGAT	
1-sst T7	(1)	-----	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(951)		
		1001	1050
1-sst	(994)	GAAGATCGCCATGATTGGTATGCAATTGGAAGTTACGATATAGTGAATGA	
1-sst T7	(1)	-----	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1001)		
		1051	1100
1-sst	(1044)	TAAGTGGTACCCAGATGACCCGAAAATGATGTGGGTATCGGATTAAGAT	
1-sst T7	(1)	-----	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1051)		
		1101	1150
1-sst	(1094)	ATGATTTTGGAAAATTTTATGCGTCCAAGACGTTTATGACCAACATAAG	
1-sst T7	(1)	-----	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1101)		
		1151	1200
1-sst	(1144)	AAGAGGAGAGTCCTTTGGGGCTATGTTGGAGAAACCGATCCCCAAAAGTA	
1-sst T7	(1)	-----TCCCCAAAAGTA	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1151)		TCCCCAAAAGTA
		1201	1250
1-sst	(1194)	TGACCTTTCAAAGGGATGGGCTAACATTTTGAATATTCCAAGGACCGTCG	
1-sst T7	(13)	TGACCTTTCAAAGGGATGGGCTAACATTTTGAATATTCCAAGGACCGTCG	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1201)	TGACCTTTCAAAGGGATGGGCTAACATTT GAATATTCCAAGGACCGTCG	
		1251	1300
1-sst	(1244)	TTTTGGACCTCGAAACTAAAACCAATTTGATTCAATGGCCAATCGAGGAA	
1-sst T7	(62)	TTTTGGACCTCGAAACTAAAACCAATTTGATTCAATGGCCAATCGAGGAA	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1251)	TTTTGGACCTCGAAACTAAAACCAATTTGATTCAATGGCCAATCGAGGAA	
		1301	1350
1-sst	(1294)	ACCGAAAACCTTAGGTCGAAAAAGTATGATGAATTTAAAGACGTCGAGCT	
1-sst T7	(112)	ACCGAAAACCTTAGGTCGAAAAAGTATGATGAATTTAAAGACGTCGAGCT	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1301)	ACCGAAAACCTTAGGTCGAAAAAGTATGATGAATTTAAAGACGTCGAGCT	
		1351	1400
1-sst	(1344)	TCGACCCGGGGCACTCGTTCCCCTTGAGATAGGCACAGCCACACAGTTGG	
1-sst T7	(162)	TCGACCCGGGGCACTCGTTCCCCTTGAGATAGGCACAGCCACACAGTTGG	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1351)	TCGACCCGGGGCACTCGTTCCCCTTGAGATAGGCACAGCCACACAGTTGG	
		1401	1450
1-sst	(1394)	ATATAGTTGCGACATTTCGAAATCGACCAAAGATGTTGGAATCAACGCTA	
1-sst T7	(212)	ATATAGTTGCGACATTTCGAAATCGACCAAAGATGTTGGAATCAACGCTA	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1401)	ATATAGTTGCGACATTTCGAAATCGACCAAAGATGTTGGAATCAACGCTA	
		1451	1500
1-sst	(1444)	GAGGCCGATGTTCTATTCAATTGCACGACTAGTGAAGGCTCGGTTGCAAG	
1-sst T7	(262)	GAGGCCGATGTTCTATTCAATTGCACGACTAGTGAAGGCTCGGTTGCAAG	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1451)	GAGGCCGATGTTCTATTCAATTGCACGACTAGTGAAGGCTCGGTTGCAAG	
		1501	1550
1-sst	(1494)	GAGTGTGTTGGGACCGTTTGGTGTGGTGGTTCTAGCCGATGCCAGCGCT	
1-sst T7	(312)	GAGTGTGTTGGGACCGTTTGGTGTGGTGGTTCTAGCCGATGCCAGCGCT	
1sst SP6	(772)	-----	
Consensus	(1501)	G GTGTGTTGGGACCGTTTGGTGTGGTGGTTCTAGCCGATGCCAGCGCT	
		1551	1600
1-sst	(1544)	CCGAACAACCTCCTGTATACTTCTATATCGCAAAAGATATTGATGGAACC	
1-sst T7	(362)	CCGAACAACCTCCTGTATACTTCTATATCGCAAAAGATATTGATGGAACC	
1sst SP6	(772)	-----	

```

Consensus (1551) CCGAACAACTTCCTGTATACTTCTATATCGCAAAAGATATTGATGGAACC
1601 1650
1-sst (1594) TCACGAACCTATTTTTGTGCCGACGAAACAAGATCATCCAAGGATGTAAG
1-sst T7 (412) TCACGAACCTATTTTTGTGCCGACGAAACAAGATCATCCAAGGATGTAAG
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1601) TCACGAACCTATTTTTGTGCCGACGAAACAAGATCATCCAAGGATGTAAG
1651 1700
1-sst (1644) CGTAGGGAAATGGGTGTACGGAAGCAGTGTTCTGTCTCTCCAGGCGAAA
1-sst T7 (462) CGTAGGGAAATGGGTGTACGGAAGCAGTGTTCTGTCTCTCCAGGCGAGA
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1651) CGTAGGGAAATGGGTGTACGGAAGCAGTGTTCTGTCTCTCCAGGCGA A
1701 1750
1-sst (1694) AGTACAATATGAGGTTATTGGTGGATCATTCGATAGTAGAGGGATTGCA
1-sst T7 (512) AGTACAATATGAGGTTATTGGTGGATCATTCGATAGTAGAGGGATTGCA
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1701) AGTACAATATGAGGTTATTGGTGGATCATTCGATAGTAGAGGGATTGCA
1751 1800
1-sst (1744) CAAAACGGGA GAACCGTGGTGACATCAAGAGTGTATCCAACAAAGGCGAT
1-sst T7 (562) CAAAACGGGG GAACCGTGGTGACATCAAGAGTGTATCCAACAAAGGCGAT
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1751) CAAAACGGG GAACCGTGGTGACATCAAGAGTGTATCCAACAAAGGCGAT
1801 1850
1-sst (1794) CTACAACGCTGCGAAGGTGTTTTGTTCAACAACGCGACTGGAATCAGTG
1-sst T7 (612) CTACAACGCTGCGAAGGTGTTTTGTTCAACAACGCGACTGGAATCAGTG
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1801) CTACAACGCTGCGAAGGTGTTTTGTTCAACAACGCGACTGGAATCAGTG
1851 1900
1-sst (1844) TGAAGGCGTCGATCAAGATCTGGAAGATGGGGGAAGCAGAACTCAATCCT
1-sst T7 (662) TGAAGGCGTCGATCAAGATCTGGAAGATGGGGGAAGCAGAACTCAATCCT
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1851) TGAAGGCGTCGATCAAGATCTGGA GATGGGGGAAGCAGAACTCAATCCT
1901 1950
1-sst (1894) TTCCCTCTTCCTGGGTGGACTTTCGAACTTTGATGGTTATATTTTGACC
1-sst T7 (712) TTCCCTCTTCCTGGGTGGACTTTCGAACTTTGATGGAA-----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1901) TTCCCTCTTCCTGGGTGGACTTTCGAACTTTGATGG
1951 2000
1-sst (1944) CTATATATGTGTTATTATCATGATGGTTATATTTTGACCCTATATATGT
1-sst T7 (750) -----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (1951)
2001 2050
1-sst (1994) GTTATTATCATGAAGCATAAGTTTGGACTGGAGGGGTATTATTGTAATT
1-sst T7 (750) -----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (2001)
2051 2100
1-sst (2044) TTATATGCATGTTCTATTACTTGTGAGGTTATAGTATGTAATTAAATTAT
1-sst T7 (750) -----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (2051)
2101 2150
1-sst (2094) TATATACTATATCAATTTCTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1-sst T7 (750) -----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (2101)
2151 2163
1-sst (2144) AAAAAAAAAAAAAA
1-sst T7 (750) -----
1sst SP6 (772) -----
Consensus (2151)

```

ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ไพรเมอร์ T7 (1-sst T7) และ SP6 (1-sst SP6) กับ *Helianthus tuberosus 1-sst gene* (accession number AJ009757.1) (1-sst) โดยใช้โปรแกรม VectorNTI

ตัวอักษรสีแดงที่ขีดเส้นใต้ คือ 1-sst_F (forward) และ 1-sst_R (reverse) primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนจากหัวแก่ต้นอายุ 105 วัน

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *1-fft* ที่ใช้ T7 เป็นไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ (ภาพที่ 18) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus 1-fft gene* (accession number AJ009756.1) 99% โดยในการวิเคราะห์นั้นครอบคลุมพื้นที่ของสายนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ (query coverage) ถึง 95% ค่า max score 1314 และ E value เท่ากับ 0.0 (ภาพที่ 19) ซึ่งให้เห็นว่า ยีนที่โคลนได้นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Helianthus tuberosus 1-fft gene* ซึ่งจะได้นำไปเทียบ (alignment) กันเพื่อวิเคราะห์ในรายละเอียดอีกครั้ง

```
TGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCCGGTAATTAAAAAGGGTATTGATGAATTGG
TGCAGAAGCCATTTGCCAAATCTTGAGAGATGCTTTACACTCGTACCTGTGGCGTTGTTGAACAAGAA
CAGCTTCGCTTGTTTCGTATATCGCTTTTGTGGATACGCCCTTGATGTTATAACCGTCCTTCCTCCTTG
CGAAACCCCTCCACTATCGAATGATCCACCAATAGCCTCATTGTGAGTTCTTCATCATCTAACACAGG
AACAGTGCTCCCATACCACTCTCTCCCCATCATAATCTAGTGATGACCTTAGCTTATCGGTACAAAA
ATGTGTCGACACACCTCCATCGGCCTTTTGTAGCTATATAGAAATAAACCGGAGTTAACTCAGAAAGGGT
TCCATCGGCTAGAACCGCAAGACCAAATGGTCCCAAACCTCCCTTTGGGCTGCACCTAAGCTAGTGGT
GCAACCATAAATATCATCGGTTTCACATGTCGCGTTCAACGCTGCTTGATCCACCTCAAATGTTGCAAC
TATGTCCAACCTGTGTAGCCGTGCCTATGTGCGAGTGGAATGATTGAACCGGGCTCTAGCTTGATCTCTTT
AAACTCCTGACCGTTGTATCTCAAACCTCTCGACTTCCTCAACGGGCCAATGAAGTAAATGGGTCCCGGT
CTTTCTATCTAGTACAATTGGTTCTTCCAACATTATAAACTACTGCCNATCCTCTAGAGAGGTCTCTGAT
CAACACTATCTGATNCT
```

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Helianthus tuberosus 1-fft gene	1314	1314	95%	0.0	99%	AJ009756.1
☐ Viguiera discolor partial mRNA for 2,1-fructan:2,1-fructan 1-fructosyltransferase precursor (fft gene)	1057	1057	94%	0.0	93%	AJ811625.1
☐ Cichorium intybus fructan-fructan 1-fructosyltransferase (1FFT) mRNA, complete cds	634	634	92%	4e-178	83%	JQ346800.1

ภาพที่ 19 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *1-fft* ที่ใช้ SP6 เป็นไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ (ภาพที่ 20) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus 1-fft gene* (accession number AJ009756.1) 95% โดยในการวิเคราะห์นั้นครอบคลุมพื้นที่ของสายนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ (query coverage) ถึง 92% ค่า max score 1136 และ E value เท่ากับ 0.0 ซึ่งให้เห็นว่า ยีนที่โคลนได้นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Helianthus tuberosus 1-fft gene* (ภาพที่ 21) ซึ่งจะได้นำไปเทียบ (alignment) กันเพื่อวิเคราะห์ในรายละเอียดอีกครั้ง

```
CGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTATGCAAACCCCT
GAACCCCTTTACAGACCTTGAACATGAACCCACACACCCCTACTGGACCACCACCACAACCCACCACCA
CCACCATCACAAACCACCACAAAACCTTTGTTTACCAGGGTGTGTCCGGTGTACCTTTGCTGTATCG
TTCATTACTTTTCGCTATCGTATTCATTGTTCTAACCCAAACAGAATTCTTCTGTTCTGTCGTCACCAAT
TCGGAGAAATCTTTTATAAGGTATTTCGCAGACCGATCGCTTGTCGTGGGAACGGACCGCTTTTCATTTT
CAGCCTGCCAAGAATTTTATTTACGATCCAAATGGTCCGTTGTTTTACATGGGCTGGTACCATTTGTTT
TATCAATACAACCCATACGCACCGGTTTGGGGCAATATGTCATGGGGTCACTCAGTGTCCAAAGACATG
ATCAACTGGTACGAGCTGCCAGTCGCTATGGTCCCGACCGAATGGTATGATATCGAGGGCGTCTTATCC
GGGTCTACCACAGCCCTTCCAAACGGTCAGATCTTTCATTTGATATGATACTGGGAACGCTAATGATTTTTCC
CAATTACAATGCAAAGCTGTACCTGTAACTTATCTGACCCGCTTCTTATTGAGTGGGTCAAGTATGAC
AATAACCCAATCCTGTACACTCCACCGGGGGATTGGGTTAGTGGACTACCGGAACCGTCAACAGTCTG
GNACGGGTCCCGATGGAAAGNATANGATGAT
```

ภาพที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Helianthus tuberosus 1-fft gene	1136	1136	92%	0.0	95%	AJ009756.1
☐	Viguiera discolor partial mRNA for 2,1-fructan:2,1-fructan 1-fructosyltransferase precursor (ff gene)	780	780	91%	0.0	87%	AJ811625.1
☐	Arctium lappa aff1 mRNA for fructan:fructan 1-fructosyltransferase, complete cds	414	414	59%	5e-112	83%	AB479464.1
☐	Taraxacum officinale partial mRNA for 1,2-beta-fructan 1F-fructosyltransferase (ff2 gene)	411	411	57%	7e-111	83%	AJ829550.1
☐	Bactrocera dorsalis clone F19 cytochrome P450 family 4 (CYP4) mRNA, complete cds	111	111	7%	8e-21	100%	GU292427.2

ภาพที่ 21 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6 กับยีนอื่นๆ ใน GenBank

และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากการใช้ทั้งไพรเมอร์ T7 และ SP6 ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Helianthus tuberosus 1-fft* gene (accession number AJ009756.1) ด้วยโปรแกรม VectorNTI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากการใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมด้านปลาย 3' และ 5' ของ *Helianthus tuberosus 1-fft* gene ตามลำดับ ถึง 95-99% (ภาพที่ 22) ดังนั้น ยีนที่โคลนได้จากหัวแก่นตะวันอายุ 105 วันจึงเป็นยีน *1-fft*

		1		50
1-fft	(1)	-----GGGACCGAGTACCAAGTCCAGT		
1-fft SP6	(1)	CGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCACGCGGCCGCGAATTCACT		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(1)		G CG C A T C A T	
		51		100
1-fft	(21)	CAGTCAACCATGCAAACCCCTGAACCCTTTACAGACCTTGAACATGAACCC		
1-fft SP6	(51)	-AGTGATTATGCAAACCCCTGAACCCTTTACAGACCTTGAACATGAACCC		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(51)	AGT A ATGCAAACCCCTGAACCCTTTACAGACCTTGAACATGAACCC		
		101		150
1-fft	(71)	CACACACCCCTACTGGACCACCACCACAACCCACCACCAC-----A		
1-fft SP6	(100)	CACACACCCCTACTGGACCACCACCACAACCCACCACCACCACCATCACA		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(101)	CACACACCCCTACTGGACCACCACCACAACCCACCACCAC		A
		151		200
1-fft	(112)	AACCACCACAAAACCTTTGTTTCACCAGGGTTGTGTCCGGTGTACCTTTG		
1-fft SP6	(150)	AACCACCACAAAACCTTTGTTTCACCAGGGTTGTGTCCGGTGTACCTTTG		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(151)	AACCACCACAAAACCTTTGTTTCACCAGGGTTGTGTCCGGTGTACCTTTG		
		201		250
1-fft	(162)	TTTATTCCTCTTGGTTTCGCTATCGTATTCATTGTTCTCAACCAACAG		
1-fft SP6	(200)	CTGTATCGTTCATTACTTTCGCTATCGTATTCATTGTTCTCAACCAACAG		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(201)	T TAT TTC TT TTTTCGCTATCGTATTCATTGTTCT A CCAACAG		
		251		300
1-fft	(212)	AATTCTTCTGTTTCGTATCGTCACCAATTCGGAGAAATCTTTTATAAGGTA		
1-fft SP6	(250)	AATTCTTCTGTTTCGTATCGTCACCAATTCGGAGAAATCTTTTATAAGGTA		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(251)	AATTCTTCTGTTTCGT TCGTCACCAATTCGGAGAAATCTTTTATAAGGTA		
		301		350
1-fft	(262)	TTTCGACACCGATCGCTTGTCTGTTGGGACGGACCGCTTTTCATTTTCAGC		
1-fft SP6	(300)	TTTCGACACCGATCGCTTGTCTGTTGGGACGGACCGCTTTTCATTTTCAGC		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(301)	TTTCGACACCGATCGCTTGTCTGTTGGGACGGACCGCTTTTCATTTTCAGC		
		351		400
1-fft	(312)	CTGCCAAGAATTTTATTTACGATCCAATGGTCAAGTTGTTTACATGGGC		
1-fft SP6	(350)	CTGCCAAGAATTTTATTTACGATCCAATGGTCAAGTTGTTTACATGGGC		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(351)	CTGCCAAGAATTTTATTTACGATCCA ATGGTCA GTTGTTT ACATGGGC		
		401		450
1-fft	(362)	TGGTACCATATGTTCTATCAATACAACCCATACGCACCGGTTTGGGGCAA		
1-fft SP6	(400)	TGGTACCATATGTTCTATCAATACAACCCATACGCACCGGTTTGGGGCAA		

```

1-fft T7      (1) -----
Consensus    (401) TGGTACCAT TGTTCTATCAATACAACCCATACGCACCGGTTTGGGGCAA
                    451                                     500

1-fft        (412) TATGTCATGGGGTCACTCAGTGTCCAAAGACATGATCAACTGGTACGAGC
1-fft SP6    (450) TATGTCATGGGGTCACTCAGTGTCCAAAGACATGATCAACTGGTACGAGC
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (451) TATGTCATGGGGTCACTCAGTGTCCAAAGACATGATCAACTGGTACGAGC
                    501                                     550

1-fft        (462) TGCCAGTCGCTATGGTCCCGACCGAATGGTATGATATCGAGGGCGTCTTA
1-fft SP6    (500) TGCCAGTCGCTATGGTCCCGACCGAATGGTATGATATCGAGGGCGTCTTA
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (501) TGCCAGTCGCTATGGTCCCGACCGAATGGTATGATATCGAGGGCGTCTTA
                    551                                     600

1-fft        (512) TCCGGGTCTACCACGGTCTCTTCCAAACGGTCAGATCTTTGCATTGTATAC
1-fft SP6    (550) TCCGGGTCTACCACAGCCCTTCCAAACGGTCAGATCTTTGCATTGTATAC
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (551) TCCGGGTCTACCAC G CCTTCCAAACGGTCAGATCTTTGCATTGTATAC
                    601                                     650

1-fft        (562) TGGGAACGCTAATGATTTTTTCCCAATTACAATGCAAAGCTGTACC GTAA
1-fft SP6    (600) TGGGAACGCTAATGATTTTTTCCCAATTACAATGCAAAGCTGTACC GTAA
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (601) TGGGAACGCTAATGATTTTTTCCCAATTACAATGCAAAGCTGTACC GTAA
                    651                                     700

1-fft        (612) ACTTATCTGACCCGCTTCTTATTGAGTGGGTCAAGTATGAGGATAACCCA
1-fft SP6    (650) ACTTATCTGACCCGCTTCTTATTGAGTGGGTCAAGTATGAGCAATAACCCA
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (651) ACTTATCTGACCCGCTTCTTATTGAGTGGGTCAAGTATGA ATAACCCA
                    701                                     750

1-fft        (662) ATCCTGTACACTCCACCAGGG-ATTGGGTAAAGGACTACCGGGAACCGT
1-fft SP6    (700) ATCCTGTACACTCCACCAGGGGATTGGGTAAAGTGGACTACCGGGAACCGT
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (701) ATCCTGTACACTCCACC GGG ATTGGGTAA GGACTA CCGGA CCGT
                    751                                     800

1-fft        (711) CAACAGTCTGGA-CAGGTCCCGATGGAAAGCATAAGATGATCATGGGAAC
1-fft SP6    (750) CAACAGTCTGGNACGGTCCCGATGGAAAGNATANGATGAT-----
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (751) CAACAGTCTGG C GGTCCCGATGGAAAG ATA GATGAT
                    801                                     850

1-fft        (760) TAAACGTGGCAATACAGGCATGGTACTTGTTTACTATACCACTGATTACA
1-fft SP6    (791) -----
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (801) -----
                    851                                     900

1-fft        (810) CGAACTACGAGTTGTTGGATGAGCCGTTGCACTCTGTTCCCAACACCGAT
1-fft SP6    (791) -----
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (851) -----
                    901                                     950

1-fft        (860) ATGTGGGAATGCGTCGACTTTTACCCGGTTTCGTTAACCAATGATAGTGC
1-fft SP6    (791) -----
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (901) -----
                    951                                     1000

1-fft        (910) ACTTGATATGGCGGCCTATGGGTCGGGTATCAAACACGTTATTAAAGAAA
1-fft SP6    (791) -----
1-fft T7      (1) -----
Consensus    (951) -----

```

		1001		1050
1-fft	(960)	GTTGGGAGGGACATGGAATGGATTGGTATTCAATCGGGACATATGACGCG		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(1001)			
		1051		1100
1-fft	(1010)	ATAAATGATAAATGGACTCCCGATAACCCGGAAGTAGATGTCGGTATCGG		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(1051)			
		1101		1150
1-fft	(1060)	GTTACGGTGCGATTACGGGAGGTTTTTGCATCAAAGAGTCTTTATGACC		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(1)	-----		
Consensus	(1101)			
		1151		1200
1-fft	(1110)	CATTGAAGAAAAGGAGGATCACTTGGGGTTATGTTGGAGAAATCAGATAGT		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(1)	-----AGNATCAGATAGT		
Consensus	(1151)		AG ATCAGATAGT	
		1201		1250
1-fft	(1160)	GCTGATCAGGACCTCTCTAGAGGATGGGTACTGTTTATAATGTTGGAAG		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(14)	GTGATCAGGACCTCTCTAGAGGATNGGCAGTAGTTTATAATGTTGGAAG		
Consensus	(1201)	G TGATCAGGACCTCTCTAGAGGAT GGC GTTTATAATGTTGGAAG		
		1251		1300
1-fft	(1210)	AAC-AATTGTACTAGATAGAAAAGACCGGGACCCATTACTTCATTGGCCC		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(64)	AACCAATTGTACTAGATAGAAAAGACCGGGACCCATTACTTCATTGGCCC		
Consensus	(1251)	AAC AATTGTACTAGATAGAAAAGACCGGGACCCATTACTTCATTGGCCC		
		1301		1350
1-fft	(1259)	GTTGAGGAAGTCGAGAGTTTGAGATACAACGGTCAGGAGTTTAAAGAGAT		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(114)	GTTGAGGAAGTCGAGAGTTTGAGATACAACGGTCAGGAGTTTAAAGAGAT		
Consensus	(1301)	GTTGAGGAAGTCGAGAGTTTGAGATACAACGGTCAGGAGTTTAAAGAGAT		
		1351		1400
1-fft	(1309)	CAAGCTAGAGCCCGGTTCAATCATTCCTCGACATAGGCACGGCTACAC		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(164)	CAAGCTAGAGCCCGGTTCAATCATTCCTCGACATAGGCACGGCTACAC		
Consensus	(1351)	CAAGCTAGAGCCCGGTTCAATCATTCCTCGACATAGGCACGGCTACAC		
		1401		1450
1-fft	(1359)	AGTTGGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGCAGCGTTGAACGCG		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(214)	AGTTGGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGCAGCGTTGAACGCG		
Consensus	(1401)	AGTTGGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGCAGCGTTGAACGCG		
		1451		1500
1-fft	(1409)	ACAAGTGAAACCGATGATATTTATGGTTGCACCACTAGCTTAGGTGCAGC		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(264)	ACATGTGAAACCGATGATATTTATGGTTGCACCACTAGCTTAGGTGCAGC		
Consensus	(1451)	ACA GTGAAACCGATGATATTTATGGTTGCACCACTAGCTTAGGTGCAGC		
		1501		1550
1-fft	(1459)	CCAAAGGGGAAGTTTGGGACCATTGGTCTTGCGGTTCTAGCCGATGGAA		
1-fft SP6	(791)	-----		
1-fft T7	(314)	CCAAAGGGGAAGTTTGGGACCATTGGTCTTGCGGTTCTAGCCGATGGAA		
Consensus	(1501)	CCAAAGGGGAAGTTTGGGACCATTGGTCTTGCGGTTCTAGCCGATGGAA		

		1551		1600
1-fft	(1509)	CCCTTTCTGAGTTAACTCCGGTTTATTTCTATATAGCTAAAAAGGC	AGAT	
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(364)	CCCTTTCTGAGTTAACTCCGGTTTATTTCTATATAGCTAAAAAGGC	CCGAT	
Consensus	(1551)	CCCTTTCTGAGTTAACTCCGGTTTATTTCTATATAGCTAAAAAGGC	GAT	
		1601		1650
1-fft	(1559)	GGAGGTGTGTCGACACATTTTTGTACCGATAAGCTAAGGTCATCACTAGA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(414)	GGAGGTGTGTCGACACATTTTTGTACCGATAAGCTAAGGTCATCACTAGA		
Consensus	(1601)	GGAGGTGTGTCGACACATTTTTGTACCGATAAGCTAAGGTCATCACTAGA		
		1651		1700
1-fft	(1609)	TTATGATGGGGAGAGAGTGGTGTATGGG	GCACTGTTCCCTGTGTTAGATG	
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(464)	TTATGATGGGGAGAGAGTGGTGTATGGG	GCACTGTTCCCTGTGTTAGATG	
Consensus	(1651)	TTATGATGGGGAGAGAGTGGTGTATGGG	GCACTGTTCCCTGTGTTAGATG	
		1701		1750
1-fft	(1659)	ATGAAGAACTCACAATGAGGCTATTGGTGGATCATTCGATAGTGGAGGGG		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(514)	ATGAAGAACTCACAATGAGGCTATTGGTGGATCATTCGATAGTGGAGGGG		
Consensus	(1701)	ATGAAGAACTCACAATGAGGCTATTGGTGGATCATTCGATAGTGGAGGGG		
		1751		1800
1-fft	(1709)	TTTGCGCAAGGAGGAAGGACGGTTATAACATCAAGGGCGTATCCAACAAA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(564)	TTTGCGCAAGGAGGAAGGACGGTTATAACATCAAGGGCGTATCCAACAAA		
Consensus	(1751)	TTTGCGCAAGGAGGAAGGACGGTTATAACATCAAGGGCGTATCCAACAAA		
		1801		1850
1-fft	(1759)	AGCGATATACGAACAAGCGAAGCTGTTCTTGTTCAACAACGCCACAGGTA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(614)	AGCGATATACGAACAAGCGAAGCTGTTCTTGTTCAACAACGCCACAGGTA		
Consensus	(1801)	AGCGATATACGAACAAGCGAAGCTGTTCTTGTTCAACAACGCCACAGGTA		
		1851		1900
1-fft	(1809)	CGAGTGTGAAAGCATCTCTCAAGATTTGGCAAATGGCTTCTGCACCAATT		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(664)	CGAGTGTGAAAGCATCTCTCAAGATTTGGCAAATGGCTTCTGCACCAATT		
Consensus	(1851)	CGAGTGTGAAAGCATCTCTCAAGATTTGGCAAATGGCTTCTGCACCAATT		
		1901		1950
1-fft	(1859)	CATCAATACCCCTTTTAAATTACCGGC	ATCGCTATCC	TTTTTGTATTGG
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(714)	CATCAATACCCCTTTTAAATTACCGGC	AATCGAAT	TCCCGCGGCCGCCATG
Consensus	(1901)	CATCAATACCCCTTTTAAATTACCGGC	ATCG	TCC
		1951		2000
1-fft	(1909)	TATTTATGTATCTTAATTTTCTTTTAAACCTTTTATTTGATAAATATTA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(764)	GCGGCCGGAGCA		
Consensus	(1951)	G A C		
		2001		2050
1-fft	(1959)	GTTCTTGTTATTGTGCTTCTAGTAATAAATGAATGGTGTATGGGAAAAA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(777)	-----	-----	
Consensus	(2001)			
		2051		2078
1-fft	(2009)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		
1-fft SP6	(791)	-----	-----	
1-fft T7	(777)	-----	-----	
Consensus	(2051)			

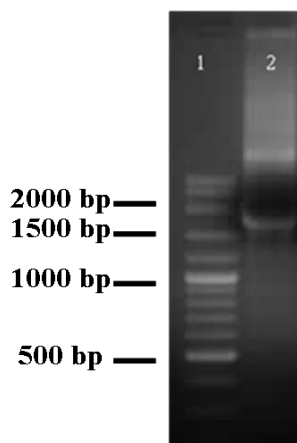
ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ไพรเมอร์ T7 (1-fft T7) และ SP6 (1-fft SP6) กับ *Helianthus tuberosus 1-fft* gene (accession number AJ009756.1) (1-fft) โดยใช้โปรแกรม VectorNTI

ตัวอักษรสีแดงที่ขีดเส้นใต้ คือ 1-fft_F (forward) และ 1-fft_R (reverse) primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนจากหัวแก่่นะวันอายุ 105 วัน

2. การผลิตเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน

2.1 การเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ในการตัดจำเพาะบนยีน 1-sst ที่โคลนได้

จากการเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ในการตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacII* บนยีน 1-sst ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนคือ *EcoRI*_1-sstF (5' CAG GAATTC ATG GCT TCA TCC ACC ACC 3') และ *SacII*_1-sstR (5' CAG CCGCGG AAG TTC GAA AGT CCA CCC A 3') เพื่อเชื่อมต่อยีน 1-sst ที่โคลนได้กับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) ต่อไปนี้ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 23 คือ ได้ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มปริมาณ (amplified product) ขนาดประมาณ 2 kb ซึ่งจะถูกแยกออกจากเจลและนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออกที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของ *EcoRI* และ *SacII* ต่อไป



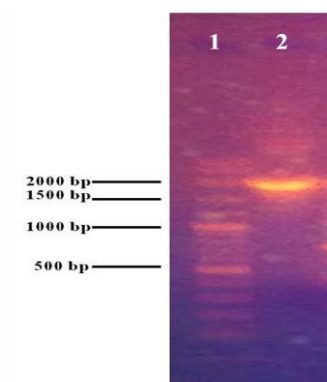
ภาพที่ 23 ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะของ *EcoRI* และ *SacII* บนยีน 1-sst

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

lane 2 คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*_1-sstF และ *SacII*_1-sstR

2.2 การสับโคลนยีน *1-sst* ไปยังเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector)

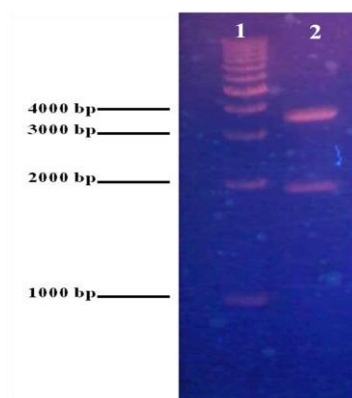
จากการนำยีน *1-sst* ที่มีการเพิ่มตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacII* ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก (expression vector) คือ pPICZαA โดยการตัดชิ้นยีน *1-sst* ที่ได้และ pPICZαA ด้วย *EcoRI* และ *SacII* แล้วนำไปเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปใน *E. coli* JM 109 ด้วยวิธี heat shock แล้วคัดแยกทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารแข็ง low salt LB ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่า ได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการ (pPIC-*1-sst*) ซึ่งทราบได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *1-sst* ด้วยการทำ colony direct PCR และ การตรวจสอบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis) ดังแสดงในภาพที่ 24 และ 25 ตามลำดับ



ภาพที่ 24 ผลิตรหัสที่ 1 ได้จากการทำ colony direct PCR

lane 1 คือ 100 bp DNA ladder

lane 2 คือ ทรานสฟอร์แมนท์ (pPIC-*1-sst*) ที่นำมาตรวจสอบยีน *1-sst*



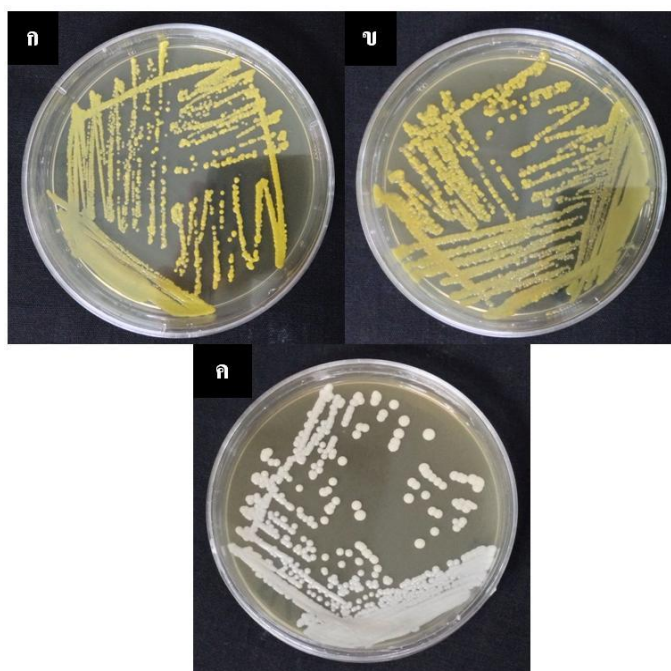
ภาพที่ 25 ผลิตรหัสที่ 1 ได้จากการตรวจสอบรูปแบบการตัด *EcoRI* และ *SacII*

lane 1 คือ 1 kb DNA ladder

lane 2 คือ ทรานสฟอร์แมนท์ (pPIC-*1-sst*) ที่นำมาตรวจสอบยีน *1-sst*

2.3 การถ่ายโอนเวกเตอร์สำหรับแสดงออกที่มียีน 1-ssr ไปยังเซลล์ยีสต์

จากการนำพลาสมิด pPIC_*I-ssr* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และถ่ายโอนเข้าไปยัง competent *P. pastoris* X-33 ด้วยวิธี electroporation แล้วคัดแยกทรานสฟอร์มแตนต์บนอาหารแข็ง yeast extract peptone dextrose ที่มี sorbital (YPDS) และมี Zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรพบว่า ได้ทรานสฟอร์มแตนต์ที่คาดว่าจะมีพลาสมิด pPIC_*I-ssr* จำนวน 83 โคลนี และเมื่อเจียโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract peptone ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่ามีทรานสฟอร์มแตนต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้จำนวน 2 โคลนี คือ pPIC_*I-ssr*_56 และ pPIC_*I-ssr*_69 ทรานสฟอร์มแตนต์ทั้งสองได้มาจากการถ่ายโอน linear pPIC_*I-ssr* ที่ความเข้มข้น 10 และ 10,000 นาโนกรัมตามลำดับ ซึ่งเป็น linear pPIC_*I-ssr* ถูก treat ด้วย FastAP™ ทั้งสองความเข้มข้น โดยยีสต์ทรานสฟอร์มแตนต์ที่ได้ทั้งสองมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีของ wild type *P. pastoris* X-33 ซึ่งมีสีขาว ดังแสดงในภาพที่ 26



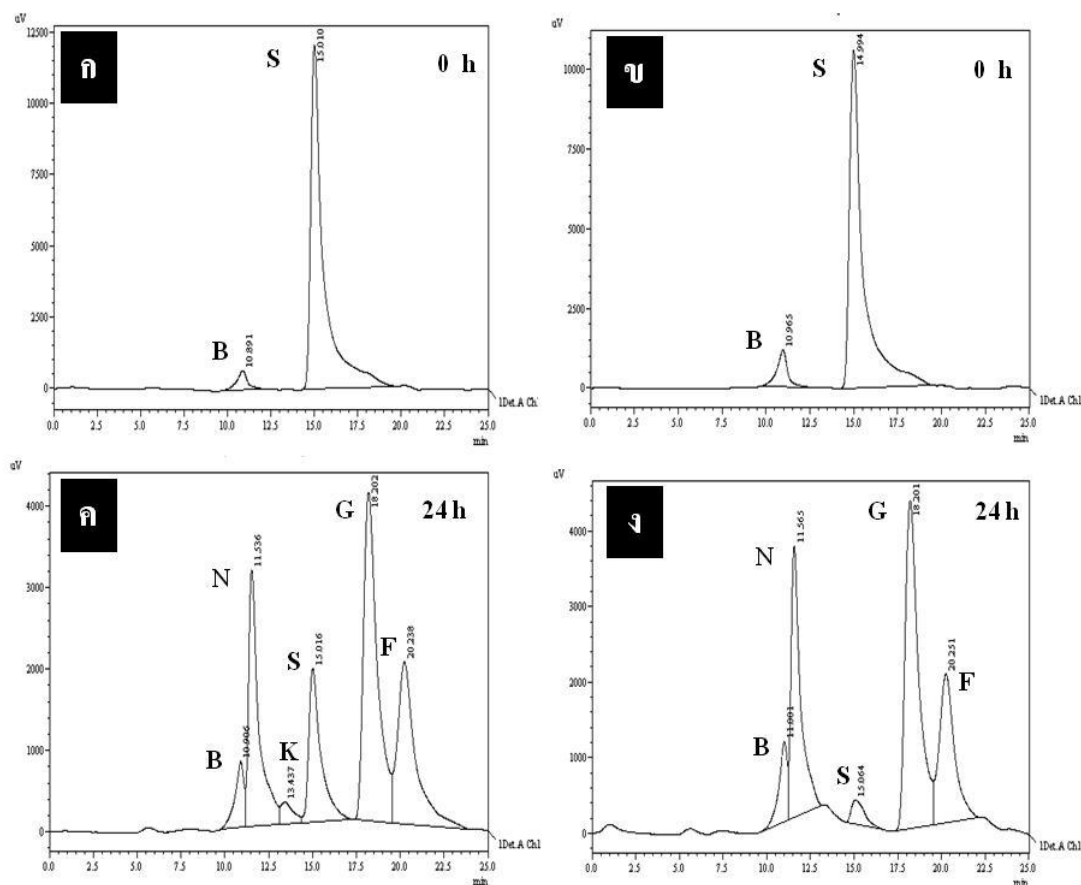
ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีของทรานสฟอร์มแตนต์ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-ssr*_56 และ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-ssr*_69 (ภาพ ก และ ข ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีของ wild type *P. pastoris* X-33 (ภาพ ค)

2.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *I-sst* จากแท่นตะวันใน *Pichia pastoris* X-33

จากการนำ *P. pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPIC_*I-sst* (pPIC_*I-sst*_56 และ pPIC_*I-sst*_69) ลงในอาหาร buffered glycerol complex (BMGY) 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วขยายขนาดการเลี้ยงเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงในสภาวะข้างต้นจนครบเวลา แล้วย้ายตะกอนเซลล์ที่ได้ลงอาหาร buffered methanol complex (BMMY) ที่มีความเข้มข้นเมทานอล 2 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเติมเมทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 % ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนตะกอนเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงไปวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีน *I-sst* โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสพบว่า *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_56 และ pPIC_*I-sst*_69 มีการแสดงออกของยีน *I-sst* ซึ่งทราบได้จากการวิเคราะห์ที่พบว่ามีสารสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโอแซคาไรด์ชนิด 1-kestose (GF2) และ Nystose (GF3) ขึ้นเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงกับซูโครสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นนาน 24 ชั่วโมงดังภาพที่ 27 และ 28 โดยทรานสฟอร์แมนที่ยีสต์ทั้งสองมีการแสดงออกของยีนทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ แสดงให้เห็นว่าแม้พลาสมิด pPICZαA จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ α-factor (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็น signal sequence ที่ทำให้มีการหลั่งโปรตีนออกภายนอกเซลล์ แต่รูปแบบการเกิดขบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (post translation modification) ของพืชกับยีสต์แม้จะเกิดได้เหมือนกัน แต่ก็อาจมีรูปแบบที่อาจแตกต่างกันได้ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ทั้งหมด ซึ่งเคยมีในรายงานการวิจัยของ del Viso และคณะ (2011) ที่ได้ศึกษาหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ 6-SFT ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พันธะ β (2- 6) ของฟรุคแทนในหญ้าที่ทนความหนาวเย็นและแห้งแล้ง (*Bromus pictus*) ใน *P. pastoris* พบว่า เอนไซม์ Bp6-SFT ถูกผสมแสดงคุณลักษณะในการทำงานเช่นเดียวกับ barley 6-SFT และมีกิจกรรมของฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสโดยการสังเคราะห์ bifurcose จาก sucrose และ 1-kestotriose ได้ แต่เอนไซม์ Bp6-SFT ถูกผสมที่ผลิตได้ไม่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ยีสต์ได้เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ทั้งนี้ del Viso และคณะได้เสนอความเห็นว่าเป็นเพราะรูปแบบของการเกิด glycosylation ในยีสต์ที่แตกต่างจากพืชทำให้เกิดการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ (del Viso และคณะ 2011)

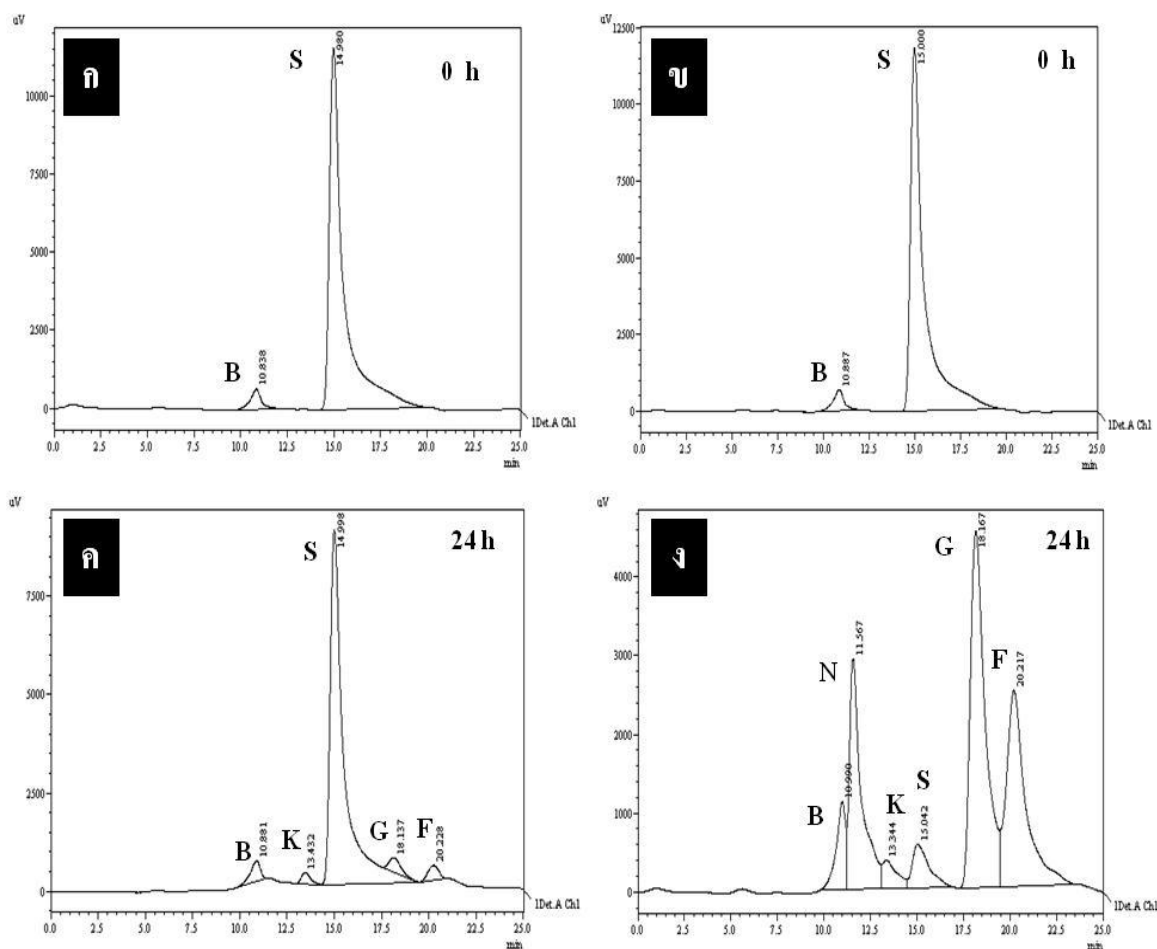
จากการเปรียบเทียบเทียบการสังเคราะห์สังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโอแซคาไรด์ใน *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_56 และ pPIC_*I-sst*_69 พบว่า มีเอนไซม์การหลั่งออกนอกเซลล์มากกว่า เพราะพบการสังเคราะห์ 1-kestose (GF2) และ Nystose (GF3) ในปริมาณที่สูงกว่า

เอนไซม์ที่อยู่ภายในและอัตราการเปลี่ยนไปของซูโครสที่เป็นสารตั้งต้นที่สูงกว่าด้วย (ภาพที่ 27 ง และภาพที่ 28 ง)



ภาพที่ 27 HPLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (ก และ ค) และในอาหารเพาะเลี้ยง (ข และ ง) ของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*1-sst*_56 กับซูโครส 0.46 โมลาร์ที่เวลา 0 (ก และ ข) และ 24 ชั่วโมง (ค และ ง)

B: buffer; S: sucrose; G: glucose; F: fructose; K: 1-kestose; N: nystose



ภาพที่ 28 HPLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (ก และ ค) และในอาหารเพาะเลี้ยง (ข และ ง) ของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_69 กับซูโครส 0.46 โมลาร์ที่เวลา 0 (ก และ ข) และ 24 ชั่วโมง (ค และ ง)

B: buffer; S: sucrose; G: glucose; F: fructose; K: 1-kestose; N: nystose

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสม

3.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสม

จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสม โดยการนำสารสกัดเอนไซม์ของยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-*sst*_56 และ pPICZ α _1-*sst*_69 ทั้งในส่วน of เซลล์และในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเทรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน

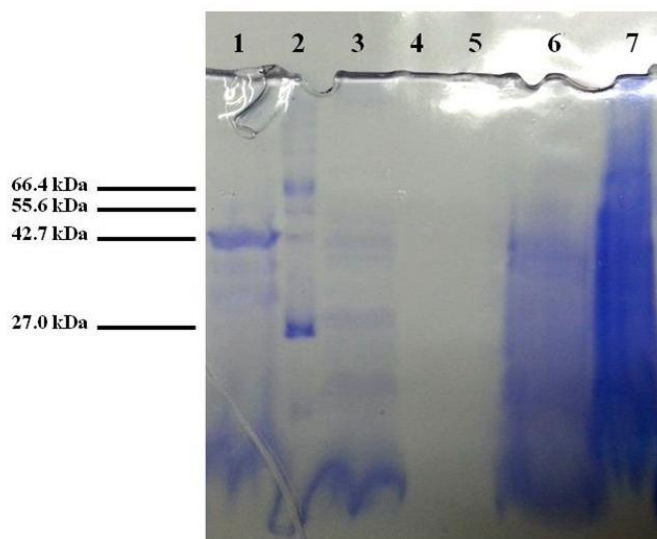
(30K) มาทดสอบในสภาวะ *in vitro* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นพบว่า สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงของ *Pichia pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-sst_56 มีความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่ฟรุกโตซิลจากซูโครสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสมส่วนอื่นๆ โดยพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST รวม (total activity) เท่ากับ 1.078 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST ลูกผสมของยีสต์ *P. pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-sst_56 และ pPICZ α _1-sst_69 ทั้งในส่วนของเซลล์และในอาหารเพาะเลี้ยง

sample	Activity (U/ml)	Total activity (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ใน ภายในเซลล์ของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56	0.379	0.758	7.243	14.486	0.052
สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ใน อาหารเพาะเลี้ยงของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56	0.539	1.078	10.496	20.992	0.051
สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ใน ภายในเซลล์ของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_69	0.138	0.267	6.049	12.098	0.023
สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ใน อาหารเพาะเลี้ยงของ <i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_1-sst_69	0.423	0.846	8.796	17.592	0.048

3.2 การวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เนื่องจากพลาสมิด pPICZ α ที่นำมาใช้เป็น expression vector สำหรับงานวิจัยนี้มีส่วนของ polyhistidine (6xHis) อยู่ด้วย (ภาพที่ 4) ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ในภายหลังโดยการใช้ His tag column ดังนั้น จึงได้มีการนำเอาสารสกัดจากภายในเซลล์และถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ *Pichia pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-sst_56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเจอรัชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตันมาทำบริสุทธิ์ต่อด้วย His tag column ซึ่งจากการวิเคราะห์แถบโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 29 พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนของสารสกัดจากภายในเซลล์และที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ยีสต์ pPICZ α _1-sst_56 แต่เมื่อพิจารณาใน Lane 4 และ 5 พบการหายไปของแถบโปรตีนลูกผสมที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ His tag บน SDS PAGE แสดงให้เห็นว่า polyhistidine (6xHis) ไม่ได้ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การแปลรหัสของยีนสิ้นสุดก่อนที่จะถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ polyhistidine ที่จะถูกแปลรหัสในรูปของ fusion protein ดังนั้น ในกรณีจึงจำเป็นต้องทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลูกผสมที่ได้โดยแนวทางดั้งเดิมที่มีรายงานไว้แทนการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ His tag สำหรับการประมาณขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ลูกผสมนั้นยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้ยังไม่อยู่ในรูปบริสุทธิ์พอ



ภาพที่ 29 SDS-PAGE ของแถบโปรตีนที่ได้จากยีสต์ *P. pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZ α _1-sst_56

Lane 1: สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ผ่านการทำอัลตราฟิวเจอรัชันที่มีขนาดรูพรุน 30K

Lane 2: protein standard marker

Lane 3: สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30K
 Lane 4 และ 5: สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงผ่าน His tag column และ
 Lane 6 และ 7: สารสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์และในอาหารเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ผ่านการ
 ทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30K

3.3 การวิเคราะห์การสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยอาศัยเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสถูกผสม

จากการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ 1-SST ส่วนใน อาหารเพาะเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*1-sst_56* ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน โดยใช้ น้ำตาลซูโครสที่ละลายในสารละลาย potassium phosphate buffer pH 5.4 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.46 โมลาร์ หรือเท่ากับ 145.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ FTase ความเข้มข้น 0.539 หน่วยต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC พบว่า มีการสังเคราะห์ FOS ขึ้นมาจำนวน 2 ชนิด คือ 1- kestose (DP2) และ nystose (DP3) ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ (retention time) ที่เวลาประมาณ 13.4 และ 11.6 นาที ซึ่งให้ค่า retention time เท่ากับ สารละลายมาตรฐาน 1- kestose และ nystose

จากภาพที่ 30 สามารถอธิบายได้ว่า เอนไซม์ 1-SST ส่วนใน อาหารเพาะเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*1-sst_56* ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตันมีบทบาทของการย่อย (hydrolysis) และการโอนย้ายหมู่ฟรุคโตซิล (fructosyl transfer) โดยเมื่อเวลาเริ่มต้นของการทำปฏิกิริยา (0 h) จะพบเพียงพิกของน้ำตาลซูโครส (retention time) ประมาณ 15 นาที) และบัพเฟออร์ (retention time ประมาณ 10.9 นาที) เท่านั้น

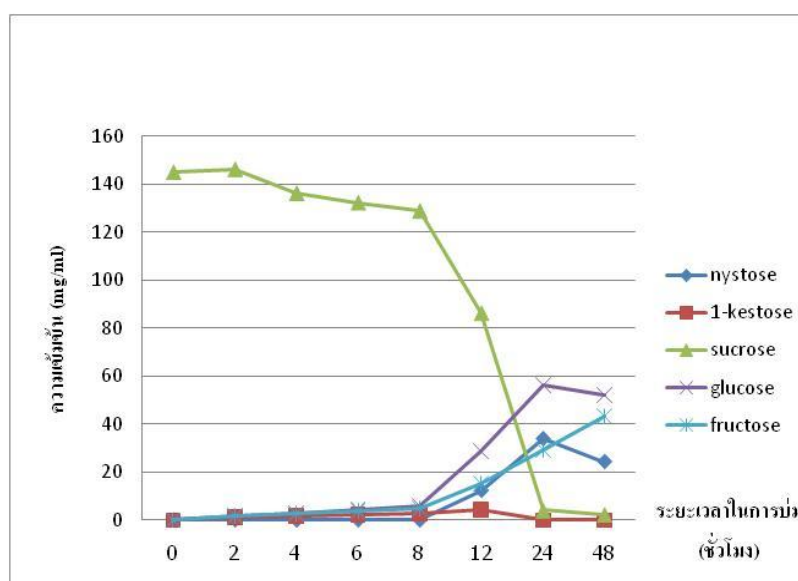
เมื่อทำปฏิกิริยาได้ 2 ชั่วโมง (2h) จะพบว่า เอนไซม์จะย่อยซูโครสไปเป็นกลูโคส (retention time ประมาณ 18 นาที) และฟรุคโตส (retention time ประมาณ 20.2 นาที) ซึ่งสัดส่วนของน้ำตาลฟรุคโตสที่ต่ำกว่าน้ำตาลกลูโคส เป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่า เอนไซม์ 1-SST ที่ใช้มีการย้ายหน่วยน้ำตาลฟรุคโตส (fructosyl unit) จากโมเลกุลซูโครสตัวให้ (sucrose donor molecule) ไปต่อกับโมเลกุลซูโครสตัวรับ (sucrose acceptor molecule) ทำให้เกิดคิสโตสขึ้นมา และจะเห็นได้ว่า มีพิกของคิสโตสเกิดขึ้นเช่นเดียวกันที่ระยะเวลาในการบ่ม 4, 6 และ 8 ชั่วโมง (4, 6, 8 h) โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มมากขึ้นจะมีปริมาณของกลูโคส, ฟรุคโตสและคิสโตสเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการบ่ม 12 ชั่วโมง (12h) พบว่ามีพิกของนิสโตสเกิดขึ้น (retention time ประมาณ 11.6 นาที) ซึ่งมีสัดส่วนมากกว่าคิสโตส โดยมีคิสโตส 4.315 มิลลิกรัมต่อ

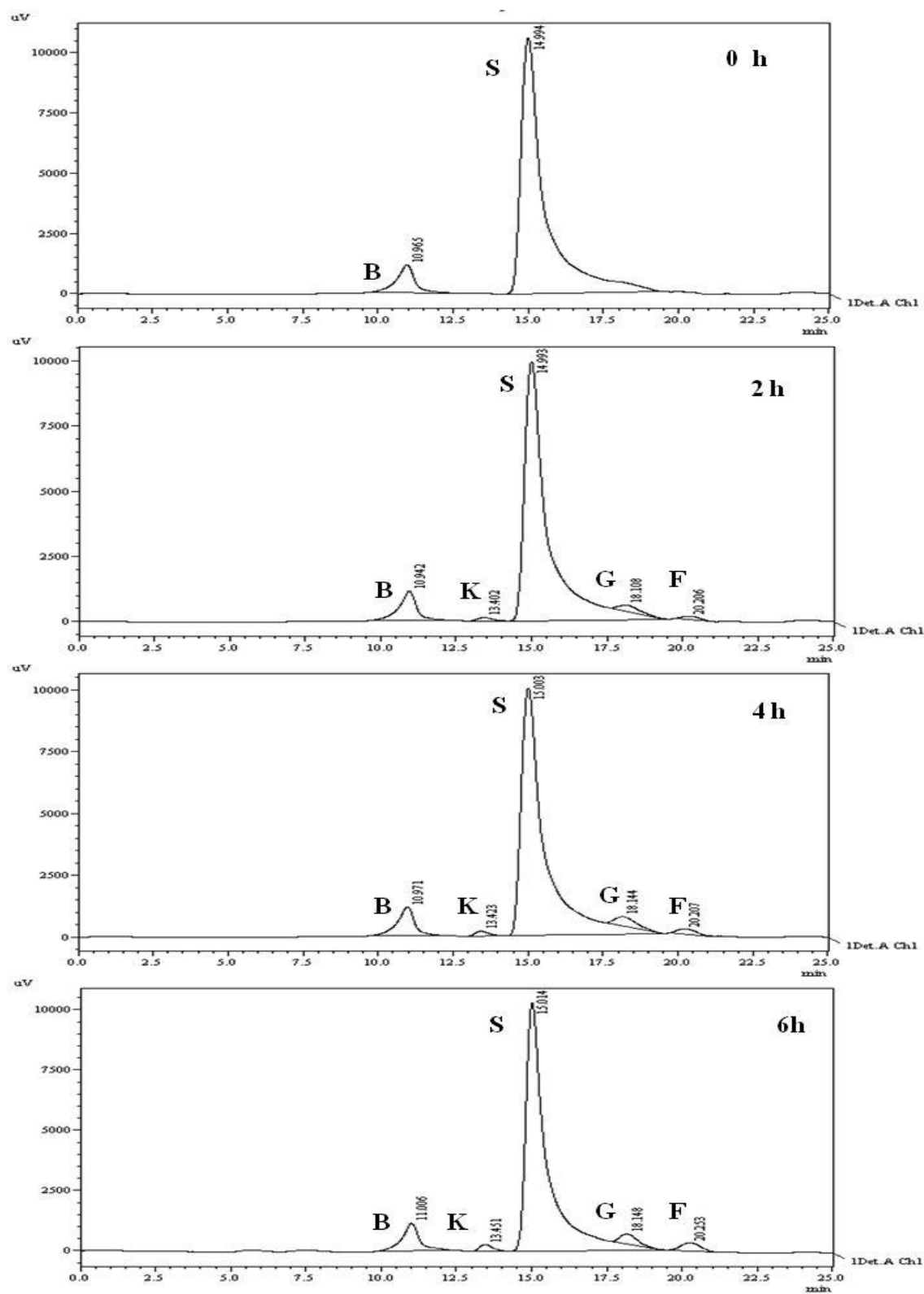
มิลลิลิตร และมีนิสโตส 12.314 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่งชี้ว่าเอนไซม์ 1-SST ที่ใช้มีการย้ายหน่วยน้ำตาลฟรุกโตสจากโมเลกุลซูโครสตัวให้ไปต่อกับโมเลกุลของกีสโตสได้ ทำให้เกิดนิสโตส

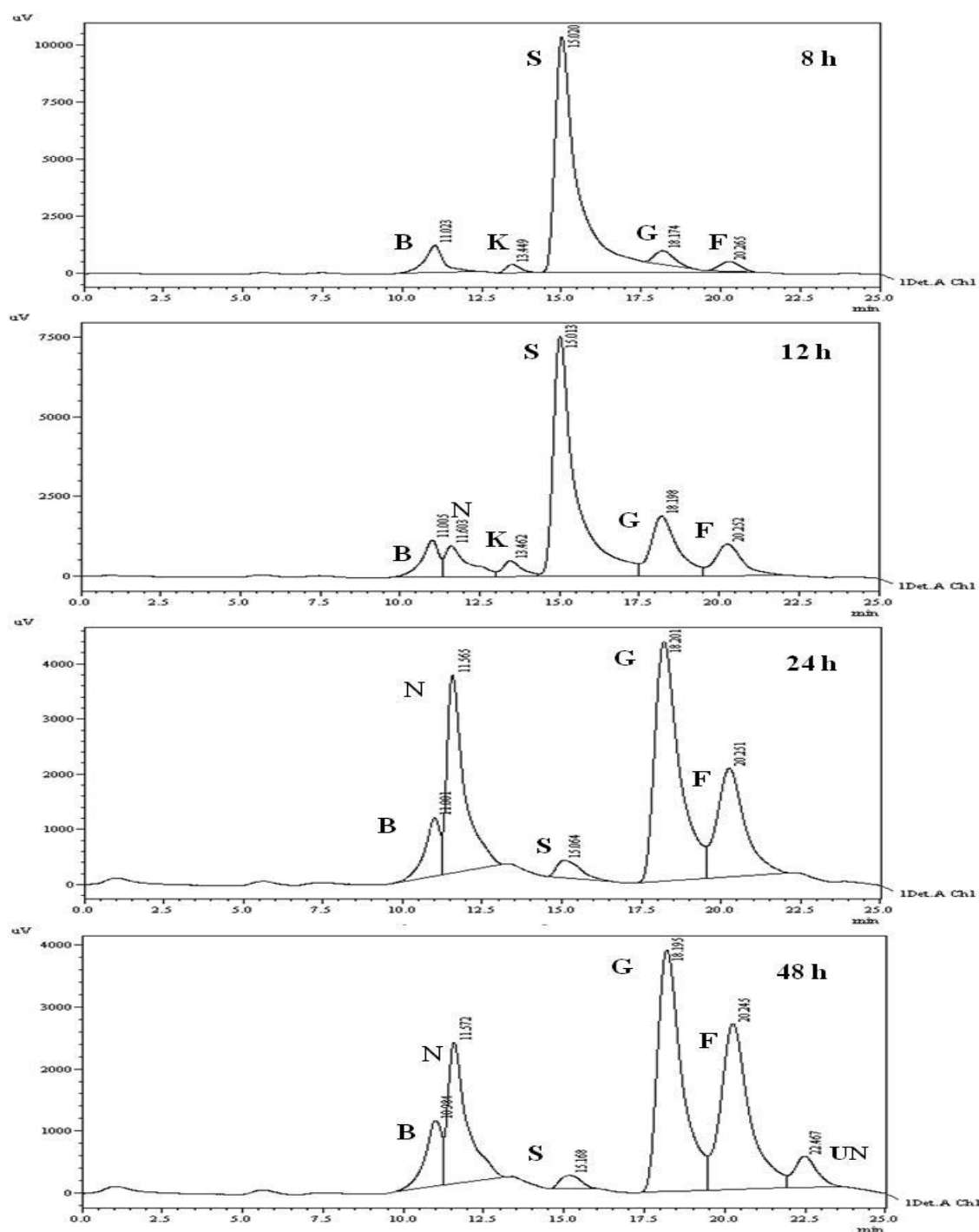
เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง (24, 48 h) พบว่าไม่มีฟิคของกีสโตสแล้ว โดยมีนิสโตส 33.817 และ 24.265 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และพบว่าที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมงมีฟิค unknow เกิดขึ้น (retention time ที่ 22.467 นาที) ไม่สามารถระบุชนิดได้ เพราะไม่มีสารละลายมาตรฐานมาเปรียบเทียบ แต่สันนิษฐานว่า ฟิคดังกล่าวน่าจะเป็นสารที่ขนาดโมเลกุลเล็กกว่าน้ำตาลฟรุกโตส เพราะถูกชะออกมาหลังสุด

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือในการทำปฏิกิริยาหลังจากบ่มไป 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าเหลือประมาณ 86.340, 4.096 และ 2.363 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (59.525, 2.824 และ 1.629 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) จากปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือชี้ให้เห็นว่าที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ FOS เกิดเกือบสมบูรณ์แล้วเพราะเหลือปริมาณน้ำตาลซูโครสในปฏิกิริยาน้อยมากดังแสดงในกราฟที่ 1 และ FOS ที่สังเคราะห์ได้ล้วนเป็น FOS ที่มีค่า DP ต่ำ จึงเหมาะต่อการนำไปใช้ต่อยอดในอุตสาหกรรมได้ โดยใช้เป็นสารทดแทนความหวานและสารฟรีไบโอติก



กราฟที่ 1 แสดง kinetic profile ของการบ่มเอนไซม์ 1-SST ลูกผสมส่วนในอาหารเพาะเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตันกับน้ำตาลซูโครสที่ละลายในสารละลาย potassium phosphate buffer พีเอช 5.4 โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 0.46 โมลาร์ ที่เวลา 0, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง





ภาพที่ 30 โครมาโตแกรมของการสังเคราะห์ FOS ในสภาวะ *in vitro* โดยใช้เอนไซม์ 1-SST ส่วนในอาหารเพาะเลี้ยง ของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_1-sst_56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิเตรชั่นที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน บ่มที่ 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

B: buffer; S: sucrose; G: glucose; F: fructose; K: 1-kestose; N: nystose; UN: unknown

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการโคลนยีนในกลุ่มของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน การผลิตและคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันจากการทดลองพบว่า

1. ยีน 1-sucrose: sucrose fructosyl transferase (*I-sst*) และ 1-fructan: fructan fructosyl transferase (*I-fft*) สามารถโคลนได้จากหัวแก่นตะวันอายุ 105 วัน
2. ยีน *I-sst* และ *I-fft* มีความเหมือนกับ *Helianthus tuberosus I-sst* gene (accession number AJ009757.1) 99% และ *Helianthus tuberosus I-fft* gene (accession number AJ009756.1) 95-99% ตามลำดับ
3. ยีสต์ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_56 และ pPIC_*I-sst*_69 มีการแสดงออกของยีน *I-sst*
4. ยีสต์ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_56 และ pPIC_*I-sst*_69 สามารถผลิต recombinant 1- sucrose: sucrose fructosyl transferase (1-SST) ได้และเอนไซม์ลูกผสมที่ผลิตได้มีการหลั่งออกนอกเซลล์มากกว่าเหลืออยู่ภายในเซลล์ และพบว่าการสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิด 1- kestose (GF2) และ Nystose (GF3) ขึ้นเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงกับซูโครสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นนาน 24 ชั่วโมง
5. เอนไซม์ลูกผสมที่ได้ไม่สามารถทำให้อยู่ในรูปบริสุทธิ์ได้ด้วยคอลัมน์ His tag
6. เอนไซม์ 1-SST ลูกผสมที่ได้สามารถสังเคราะห์ FOS ชนิด 1- kestose (GF2) ได้ภายใน 12 ชั่วโมงเมื่อบ่มร่วมกับน้ำตาลซูโครสและสามารถสังเคราะห์ FOS ที่มีค่าความยาวสายโซ่ฟรุกโตสมากรู้ขึ้นเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- นิมิต วรสูตร และสนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน : สารสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน .
 แก่นเกษตร ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 (เมษายน – มิถุนายน 2549) . น. 85 – 91.
- ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2552. ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ (Functional Foods). ภาควิชาเทคโนโลยี-
 ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ศรีสุดา เคยอาสา. 2554. การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน
 เพื่อนำไปผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชา
 เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สนั่น จอกลอย วีรยา ลาตบัวขาว และรัชนก มีแก้ว. 2549. แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) พืช
 ชนิดใหม่ใช้เป็นพลังงานทดแทน. แก่นเกษตร. 34; 104-111.
- Abe, M., Ueno, K., Ishiguro, Y., Omori, T., Onodera, S. and Shiomi, N. (2009). Purification,
 Cloning and Functional Characterization of Fructan: Fructan 1-Fructosyltransferase from
 Edible Burdock (*Arctium lappa* L.). *J. Appl. Glycosci*, 56, 239-246.
- Banguela, A. and Hernandez, L. (2006). Fructan: from natural sources to transgenic plants.
Biotechnologia Aplicada, 23, 202-210.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Campbell, J., Bauer, L., Fahey, G. and Hogarth, A. (1997). Selected Fructooligosaccharide
 (1-Kestose, Nystose, and 1^F- β -Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds.
J. Agric. Food Chem, 45, 3076-3082.
- Darwen, C. W. E. and John, P. (1989). Localization of the enzymes of fructan metabolism in
 vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of jerusalem artichoke (*Helianthus
 tuberosus* L.). *J. Plant Physiol*, 89, 658-663.
- Del Viso, F., Casabuono, A.C., Couto, A.S., Hopp, H.E., Puebla, A.F. and Heinz, R.A. (2011).
 Functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase of the cold-resistant
 grass *Bromus pictus* by heterologous expression in *Pichia pastoris* and *Nicotiana
 tabacum* and its involvement in freezing tolerance. *J. Plant Physiol*, 168, 493-499.

- Edelman, J. and Jefford, T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus Tuberosus*. *New Phytologist*, 67, 517-531.
- Ende, W.V.D., Clerens, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Roy, K.L., Arckens, L. and Laere, A.V. (2006). Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *J. Exp Bot*, 57, 775–789.
- Franck, A. and Leenheer, L.D. (2005). Inulin. *Polysaccharides and polyamides in the food industry*, 1, 281-322.
- Gallagher, J., Cairns, A. and Pollock, C. (2004). Cloning and characterization of a putative fructosyltransferase and two putative invertase genes from the temperate grass *Lolium temulentum* L. *J. Exp Bot*, 55, 557-569.
- Han, Y., Chen, L., Mao, D., Tang, L. and Guan, L. (2010). Expression and activity analysis of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion. *New Biotechnology*, 27, 324-329.
- Kawakami, A., Yoshida, M. and Van den Ende, W. (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene*, 358, 93-101.
- Koops, A.J. and Jonker, H.H. (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus fuberbsus* Colombia. II. purification of sucrose:sucrose 1 -fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in Vitro with purified sucrose:sucrose 1 -fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *J.Plant Physiol*, 110, 1167-1175.
- Lidgett, A., Jennings, K., Johnson, X., Guthridge, K., Jones, E. and Spangenberg, G. (2002). Isolation and characterisation of a fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Plant Physiol*, 159, 1037–1043.
- Lasseur, B., Lothier, J., Wiemken, A., Laere, A.V., Morvan-Bertrand, A., Ende, W.V.D. and Prud'homme, M. (2011). Towards a better understanding of the generation of fructan structure diversity in plants: molecular and functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Exp Bot*, 62, 1871–1885.

- Nagaraj, V.J., Altenbach, D., Galati, V., Lüscher, M., Meyer, A.D., Boller, T. and Wiemken, A. (2004). Distinct regulation of sucrose: sucrose-1- fructosyltransferase (1-SST) and sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist*, 161, 735–748.
- Niness, K. (1999). Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World*, 44, 79-81.
- Pan, W., Sunayam, Y., Nagata, Y., Taniguchi, M., Takano, M., Inoue, E., Tamagake, H. and Anzai, H. (2009). Cloning of a cDNA encoding the sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from yacon and its expression in transgenic rice. *BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL.*, 23(4):1479-1484.
- Pontis, H.G. and del Campillo, E. (1985). Fructans. In: Dey PM, Dixon RA, eds. Biochemistry of storage carbohydrates in greenplants. *Academic Press*, 205-227.
- Praznik, W., Beck, R. H. F. and Spies, Th. (1990). Isolation and characterisation of sucrose:sucrose 1^F- β -D-fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus* L.. *Agricultural Biology and Chemistry*, 54(9), 2429-2431.
- Robertfroid, M. B., Gibson, G. R. and Delzenne, N. (1993). The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to caloric value. *Nutr Rev*, 51, 137-146.
- Scott, R.W., Jefford, T. and Edelman, J. (1966). Sucrose fructosyltransferase from higher plant tissue. *Biochem.J*, 100, 23P.
- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T. and Wiemken, A. (1995). Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11652–11656.
- Suzuki, M. (1993). Fructans in crop production and preservation, In Science and Technology of Fructans (Suzuki, M. and Chatterton, N. J, eds). *CRC Press*, 227- 255.
- Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W., Tewtrakul, S. and Ooraikul, B., (2009). Prebiotics – A Review. Songklanakarin. *Journal Science Technology*. 31 (4): 401-408.
- Ueno, K., Ishiguro, Y., Yoshida, M., Onodera, S. and Shiomi, N. (2011). Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chem Cent J*, 5, 1-9.

- van der Meer, I. M., Koops, A. J. And Hakkert, J. C. (1998). Cloning of fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *Plant J*, 15, 489- 500.
- Vijn, I., van Dijken, A., Sprenger, N., van Dun, K., Weisbeek, P., Wiemken, A. and Smeekens, S. (1997). Fructan of the inulin neoseriosis synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6Gfructosyltransferase. *Plant J*, 11, 387–398.
- Wirz, H.J. (2005). Structure-function analysis of plant fructosyltransferases., 8-11.

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลายที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์

1.1 สารละลาย K_2HPO_4 (MW. 174.18) ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย K_2HPO_4 0.129 กรัม ในน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย KH_2PO_4 (MW. 136.08) ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย KH_2PO_4 0.095 กรัม ในน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย K_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ ปริมาตร 61.5 มิลลิลิตร ร่วมกับสารละลาย KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ ปริมาตร 38.5 มิลลิลิตร

1.4 Enzyme extraction buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลายซิสเตอีน (cysteine) 0.5 กรัม และ Triton X-100 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.007 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์

2.1 สารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย KH_2PO_4 1.3608 กรัม ในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.4 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.575 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ละลายน้ำตาลซูโครส 4.92 กรัม ในสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารที่ใช้ในการทำรีซูธเอนไซม์โดยใช้ HisPur cobalt spin column

3.1 MES buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

20 mM 2-(*N*-morpholine)-ethanesulfonic acid

0.1 M sodium chloride

pH 5.0

ชั่ง 2-(*N*-morpholine)-ethanesulfonic acid 3.904 กรัม, sodium chloride 5.844 กรัม
ละลายในน้ำ milli Q 900 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 5.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 Equilibration/Wash buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

50 mM sodium phosphate

300 mM sodium chloride

10 mM imidazole

pH 7.4

ชั่ง sodium phosphate 7.8005 กรัม, sodium chloride 17.532 กรัม และ imidazole 0.6808 กรัม ละลายในน้ำ milli Q 900 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.3 Elution buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

50 mM sodium phosphate

300 mM sodium chloride

150 mM imidazole

pH 7.4

ชั่ง sodium phosphate 7.8005 กรัม, sodium chloride 17.532 กรัม และ imidazole 10.212 กรัม ละลายในน้ำ milli Q 900 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารสำหรับใช้ในการทำ SDS-PAGE

4.1 สารละลาย 0.5 M Tris-HCL pH 6.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris-base 6.06 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายด้วย conc. HCL ให้ได้ pH 6.8 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย 1.5 M Tris-HCL pH 8.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris-base 18.17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายด้วย conc. HCL ให้ได้ pH 8.8 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย 30% bis-acrylamide ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติมน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ก่อน จากนั้นชั่ง acrylamide 29 กรัม และชั่ง bis-acrylamide 1 กรัม คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4.4 สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4.5 สารละลาย 10% ammonium persulphate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง ammonium persulphate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

4.6 สารละลาย SDS-PAGE running buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris-base 30.2 กรัม, glycine 144 กรัม ละลายในน้ำ milli Q 600 มิลลิลิตร จากนั้นเติม SDS 10 กรัม คนให้ละลายประมาณ 10 นาที แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ milli Q ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ตรวจวัด pH ให้อยู่ในช่วง 8.1-8.5 (ห้ามปรับ pH ด้วยกรดหรือเบส)

4.7 สารละลาย protein staining

ชั่ง comassie brilliant blue R-250 0.5 กรัม เติม methanol 200 มิลลิลิตร, acetic acid 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4.8 Destain solution I ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตวง methanol 250 มิลลิลิตร, acetic acid 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4.9 Destain solution II ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตวง methanol 25 มิลลิลิตร, acetic acid 35 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4.10 สารละลาย sample buffer

0.6 M Tris-HCl pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
SDS	0.05	กรัม
sucrose	0.5	กรัม
β -Mercaptoethanol	0.025	มิลลิลิตร

Bromophenol blue, 0.5% stock solution	0.5	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรของ sample buffer ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 5 มิลลิลิตร		
4.11 สารละลาย 12% resolving gel ปริมาตร	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.3	มิลลิลิตร
30% bis-acrylamide	4.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร
4.12 สารละลาย 5% stacking gel ปริมาตร	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.4	มิลลิลิตร
30% bis-acrylamide	0.33	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCL pH 6.8	0.25	มิลลิลิตร
10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการเตรียมอาหารสูตรต่างๆ

5.1 20% dextrose (glucose) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง dextrose 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือกรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

5.2 10X YNB (13.4% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง YNB 134 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนกับสารละลายเล็กน้อย เพื่อให้เกิดการละลายที่สมบูรณ์ แล้วนำไปกรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

ในกรณีที่ใช้ YNB without ammonium sulfate and amino acids ชั่ง YNB 34 กรัม ammonium sulfate 100 กรัม

5.3 500X B (0.02% biotin) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง biotin 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

5.4 10X M (20% methanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง methanol 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาประมาณ 2 เดือน

5.5 10X GY (10% glycerol) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวง glycerol 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือกรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

5.6 1 M potassium phosphate, pH 6.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ผสม 132 มิลลิลิตร ของ 1 M K_2HPO_4 กับ 868 มิลลิลิตร 1 M KH_2PO_4 แล้ววัด pH = 6.0 ± 0.1 (ถ้าจำเป็นต้องปรับ pH ให้ปรับด้วย phosphoric acid หรือ KOH) นำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

6. การเตรียมอาหารเลี้ยง

6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria Bertani (LB) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1% Tryptone	10 กรัม
0.5 % Yeast extract	5 กรัม
1 % Sodium chloride	10 กรัม

1.4% agar 14 กรัม (ในกรณีเตรียมอาหารแข็ง)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในกรณีที่ต้องเติม ampicillin หลังนำไป autoclave ต้องรอให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียสก่อน

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร low salt LB (Luria Bertani) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1% Tryptone	10 กรัม
0.5 % Yeast extract	5 กรัม
0.5 % Sodium chloride	10 กรัม

1.4% agar 14 กรัม (ในกรณีเตรียมอาหารแข็ง)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ในกรณีที่เติม zeocin หลังนำไป autoclave ต้องรอให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียสก่อน อาหารที่เติม zeocin แล้ว ต้องเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract peptone dextrose (YPD) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1% yeast extract	10 กรัม
2% peptone	20 กรัม
2% dextrose (glucose)	20 กรัม
2% agar 20 กรัม (ในกรณีเตรียมอาหารแข็ง)	

ละลาย yeast extract และ peptone ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเติม 100 มิลลิลิตร ของ 20% dextrose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อาหารเหลวเก็บที่อุณหภูมิห้อง ส่วนอาหารแข็งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในกรณีที่เติม zeocin หลังนำไป autoclave ต้องรอให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียสก่อน อาหารที่เติม zeocin แล้ว ต้องเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract peptone dextrose sorbitol (YPDS) + zeocin ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1% yeast extract	10 กรัม
2% peptone	20 กรัม
2% dextrose (glucose)	20 กรัม
1 M sorbitol	182.2 กรัม
2% agar	20 กรัม

ละลาย yeast extract, peptone และ sorbitol ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติม agar แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเติม 100 มิลลิลิตร ของ 20% dextrose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รอให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเติม zeocin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2 อาทิตย์

6.5 อาหารสูตร buffered glycerol complex medium (BMGY) หรือ

buffered methanol complex medium (BMMY) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1% yeast extract 10 กรัม

2% peptone 20 กรัม

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

1.34% yeast nitrogen base

4×10^{-5} % biotin (500X B)

1% glycerol หรือ 2% methanol

ละลาย yeast extract และ peptone ในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอให้อาหารมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วเติม 100 มิลลิลิตร 1 M potassium phosphate, pH 6.0, 100 มิลลิลิตร ของ 10X YNB, 2 มิลลิลิตร ของ 500X B และ 100 มิลลิลิตร 10X GY สำหรับอาหาร BMMY เติม 10X M แทน glycerol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2 เดือน

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

1. การวิเคราะห์ด้วยวิธี โปรตีนด้วยวิธี Bradford

1.1 การเตรียม Bradford dye reagent

เจือจาง Bradford dye reagent เข้มข้น 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 4 ส่วน นำไปกรองและเก็บในขวดสีชา

1.2 วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford dye reagent 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรคำนวณหาปริมาณของโปรตีนทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

1.3 การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

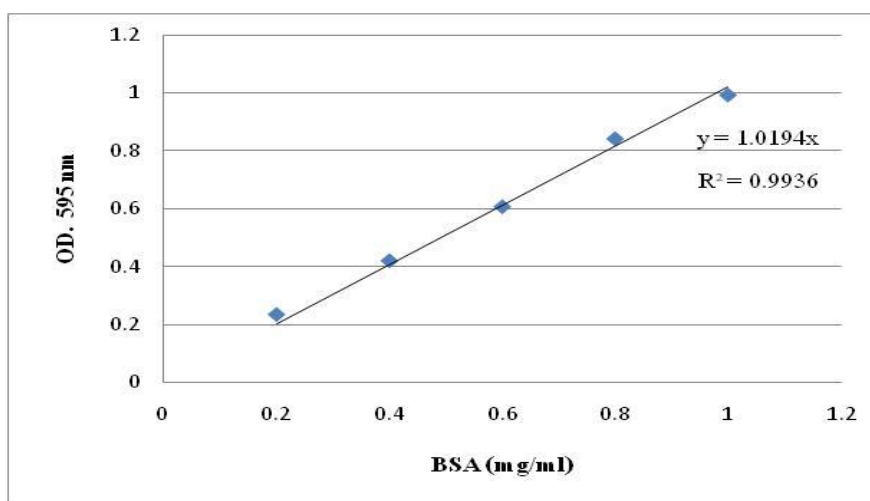
จากกราฟมาตรฐานของ BSA จะได้สมการ $y = 1.0194x$

โดย y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

x คือความเข้มข้นของ BSA (mg/ml)

สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังนี้

$$\text{โปรตีน (mg/ml)} = \frac{\text{OD.595}}{1.0194} \times \text{dilution factor}$$

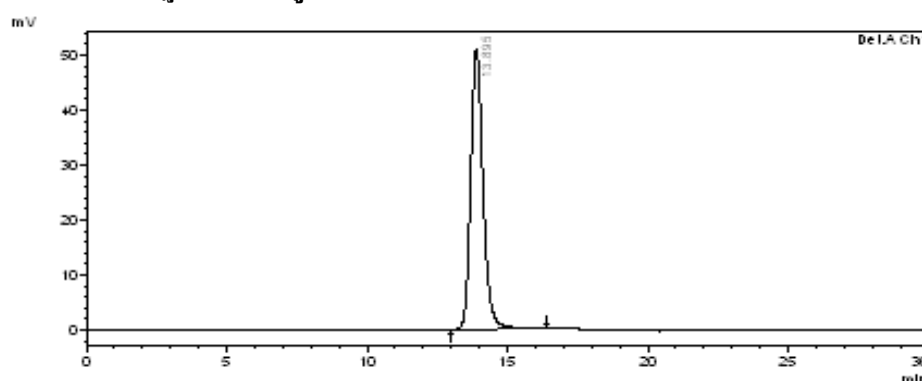


ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford

3. การวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้เทคนิค HPLC

การวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Rezex RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8x300 มิลลิเมตร (Phenomenex) ใช้น้ำ milli Q ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index detector

3.1 สารมาตรฐานน้ำตาลซูโครส มี retention time ประมาณ 13.90 นาที



ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลซูโครสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในสารตัวอย่าง

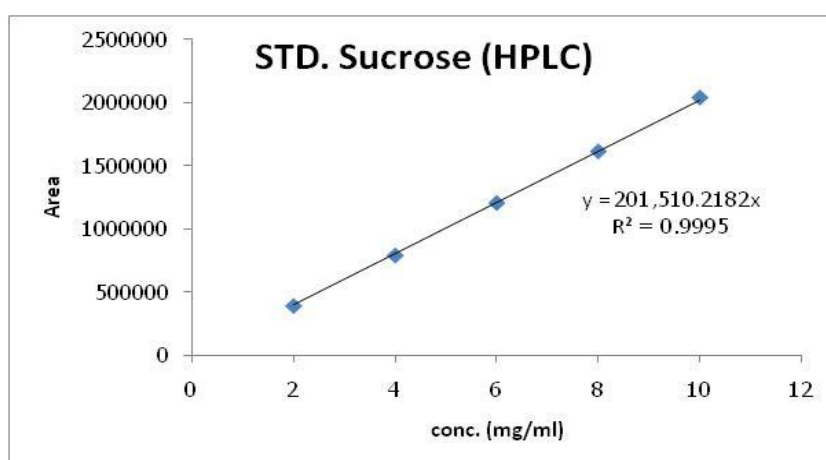
จากกราฟมาตรฐานของซูโครสจะได้สมการ $y = 201,510.2182x$

โดย y คือพื้นที่ที่ retention time ประมาณ 13.90 นาที

x คือความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

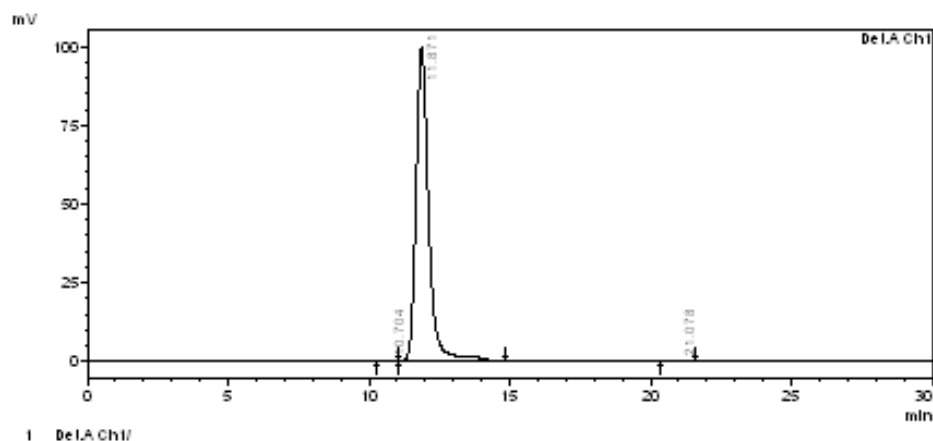
สามารถคำนวณหาปริมาณซูโครสได้ดังนี้

$$\text{ซูโครส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{Area}}{201,510.2182} \times \text{dilution factor}$$



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3.2 สารมาตรฐาน คีสโทส มี retention time ประมาณ 11.86 นาที



ภาพที่ 34 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลคีสโทส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC การหาปริมาณน้ำตาลคีสโทส ในสารตัวอย่าง

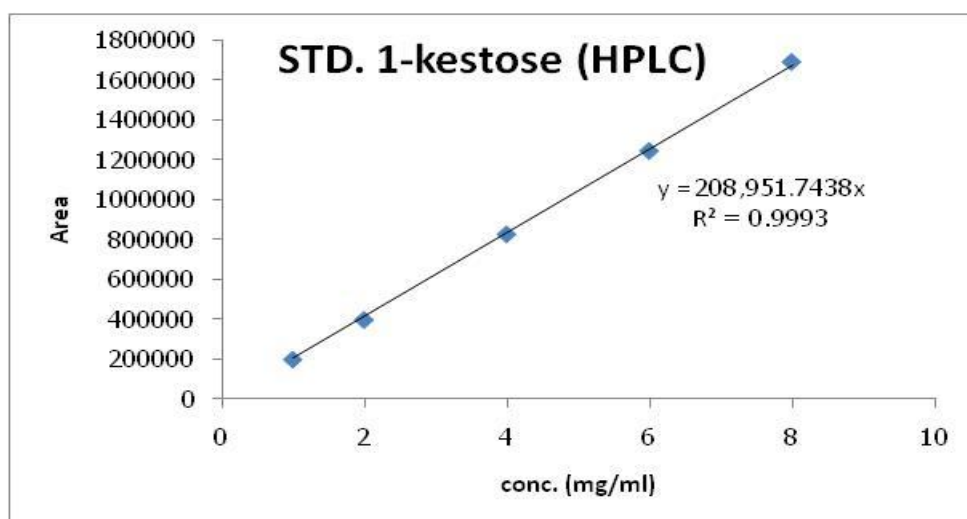
จากกราฟมาตรฐานของคีสโทส จะได้สมการ $y = 208,951.7438x$

โดย y คือพื้นที่ที่ retention time ประมาณ 11.86 นาที

x คือความเข้มข้นของคีสโทส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

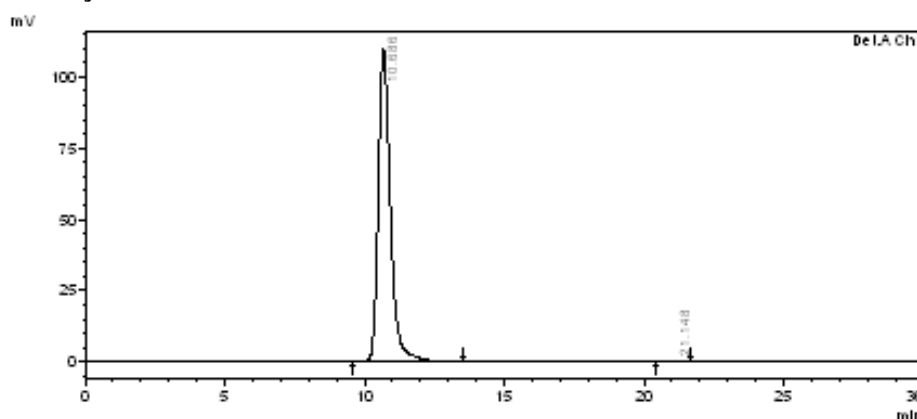
สามารถคำนวณหาปริมาณคีสโทส ได้ดังนี้

$$\text{คีสโทส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{Area}}{208,951.7438} \times \text{dilution factor}$$



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลคีสโทส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3.3 สารมาตรฐานนีสโทส มี retention time ประมาณ 10.68 นาที



ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลนีสโทส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC
การหาปริมาณน้ำตาลนีสโทส ในสารตัวอย่าง

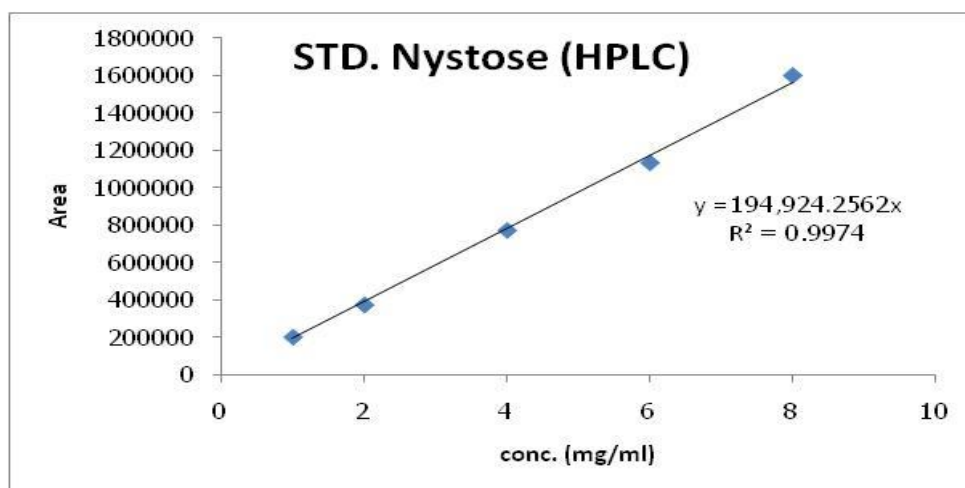
จากกราฟมาตรฐานของนีสโทส จะได้สมการ $y = 194,924.2562x$

โดย y คือพื้นที่ที่ retention time ประมาณ 10.68 นาที

x คือความเข้มข้นของนีสโทส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

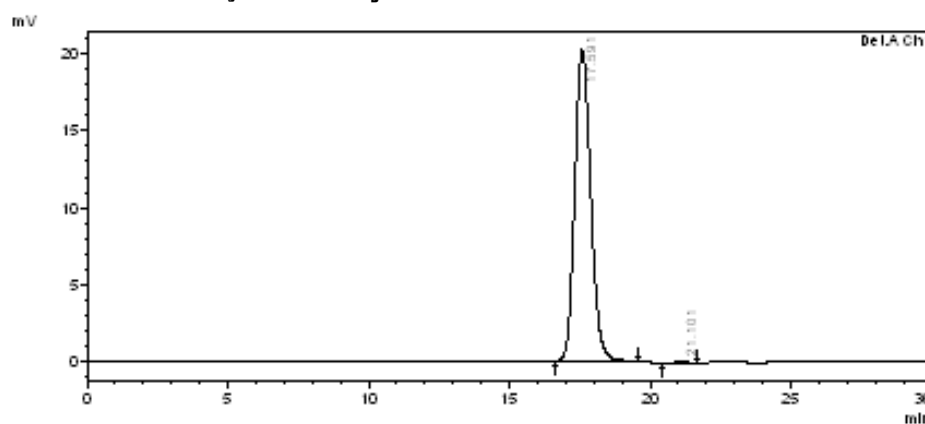
สามารถคำนวณหาปริมาณนีสโทสได้ดังนี้

$$\text{นีสโทส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{Area}}{194,924.2562} \times \text{dilution factor}$$



ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลนีสโทส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3.4 สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส มี retention time ประมาณ 17.59 นาที



ภาพที่ 38 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC
การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่าง

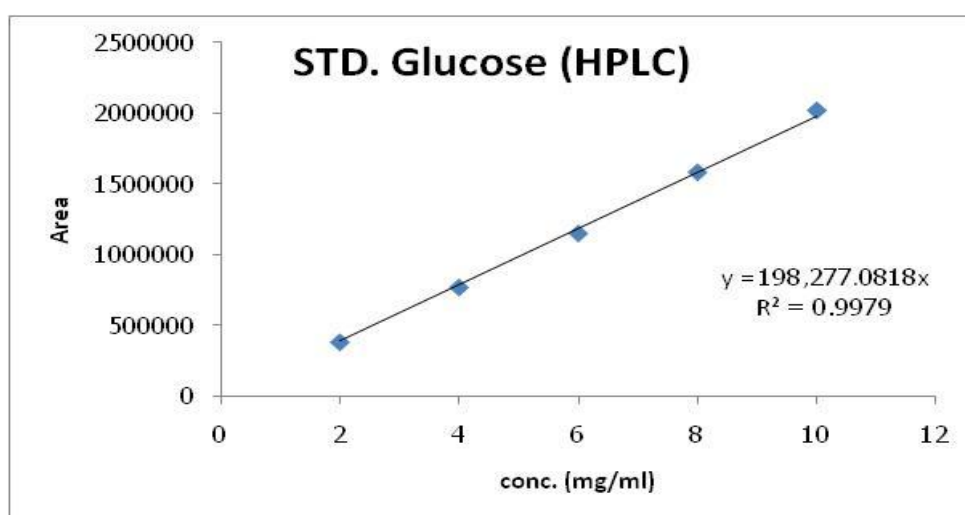
จากกราฟมาตรฐานของกลูโคสจะได้สมการ $y = 198,277.0818x$

โดย y คือพื้นที่ที่ retention time ประมาณ 17.59 นาที

x คือความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

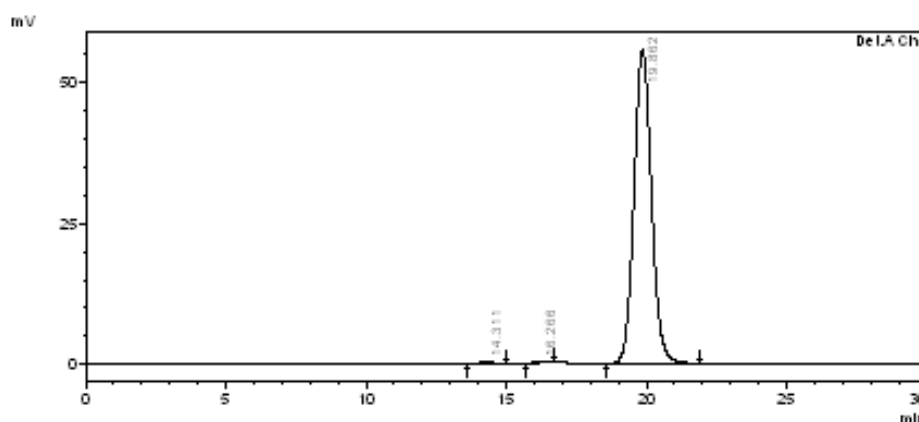
สามารถคำนวณหาปริมาณกลูโคสได้ดังนี้

$$\text{กลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{Area}}{198,277.0818} \times \text{dilution factor}$$



ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3.5 สารมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส มี retention time ประมาณ 19.88 นาที



ภาพที่ 40 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC
การหาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสในสารตัวอย่าง

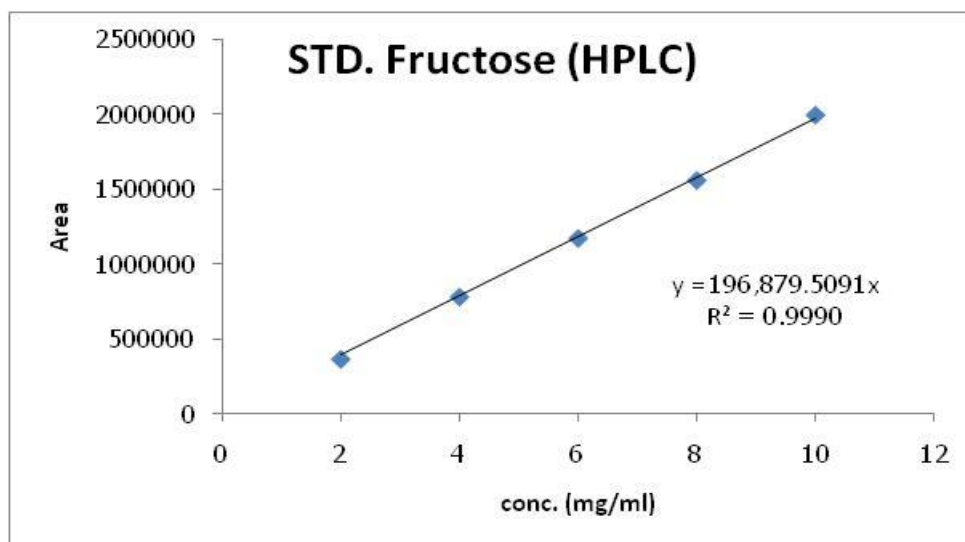
จากกราฟมาตรฐานของฟรุคโตสจะได้สมการ $y = 196,879.5091x$

โดย y คือพื้นที่ที่ retention time ประมาณ 19.88 นาที

x คือความเข้มข้นของฟรุคโตส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณฟรุคโตสได้ดังนี้

$$\text{ฟรุคโตส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{Area}}{196,879.5091} \times \text{dilution factor}$$



ภาพที่ 41 กราฟมาตรฐานของน้ำตาล ฟรุคโตสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

4. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FTase

4.1 คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากปริมาณฟรุกโตสที่ถูกถ่ายโอน (F') จากสมการ

$$F' = G - F$$

โดย F คือ น้ำตาลฟรุกโตส และ G คือ น้ำตาลกลูโคส

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit, U) ของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของฟรุกโตสที่ถูกถ่ายโอนจากซูโครส ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{F'}{1000} \times \frac{1}{180} \times 10^6 \times \frac{1}{h} \times \frac{1}{min} \times 0.5 \times 10 \times \text{dilution factor}$$

$$4.2 \text{ Specific activity (U/mg protein)} = \frac{\text{activity (U/mg)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

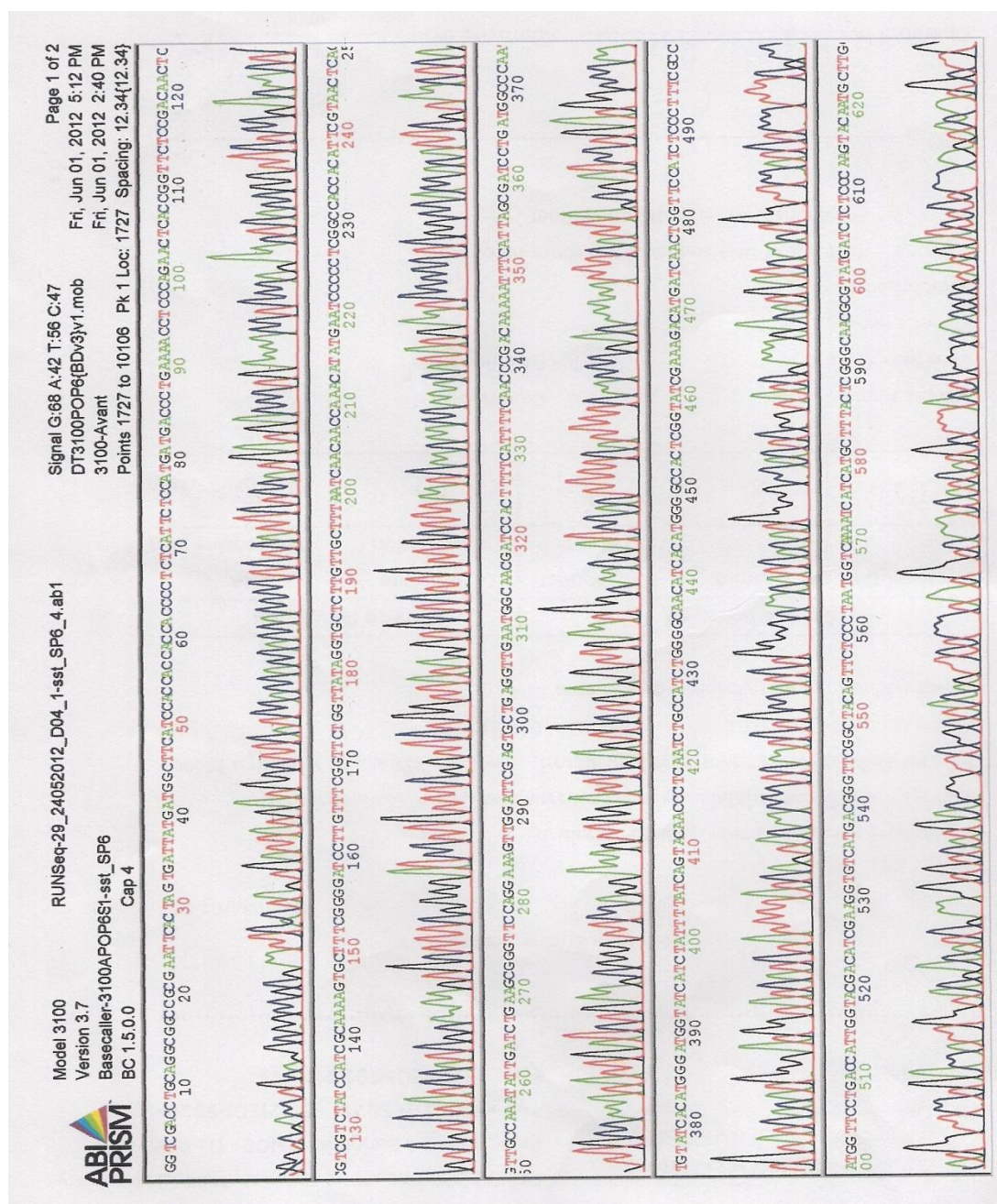
$$4.3 \text{ Total activity (U)} = \text{activity (U/ml)} \times \text{volume (ml)}$$

$$4.4 \text{ Total protein (mg)} = \text{protein (mg/ml)} \times \text{volume (ml)}$$

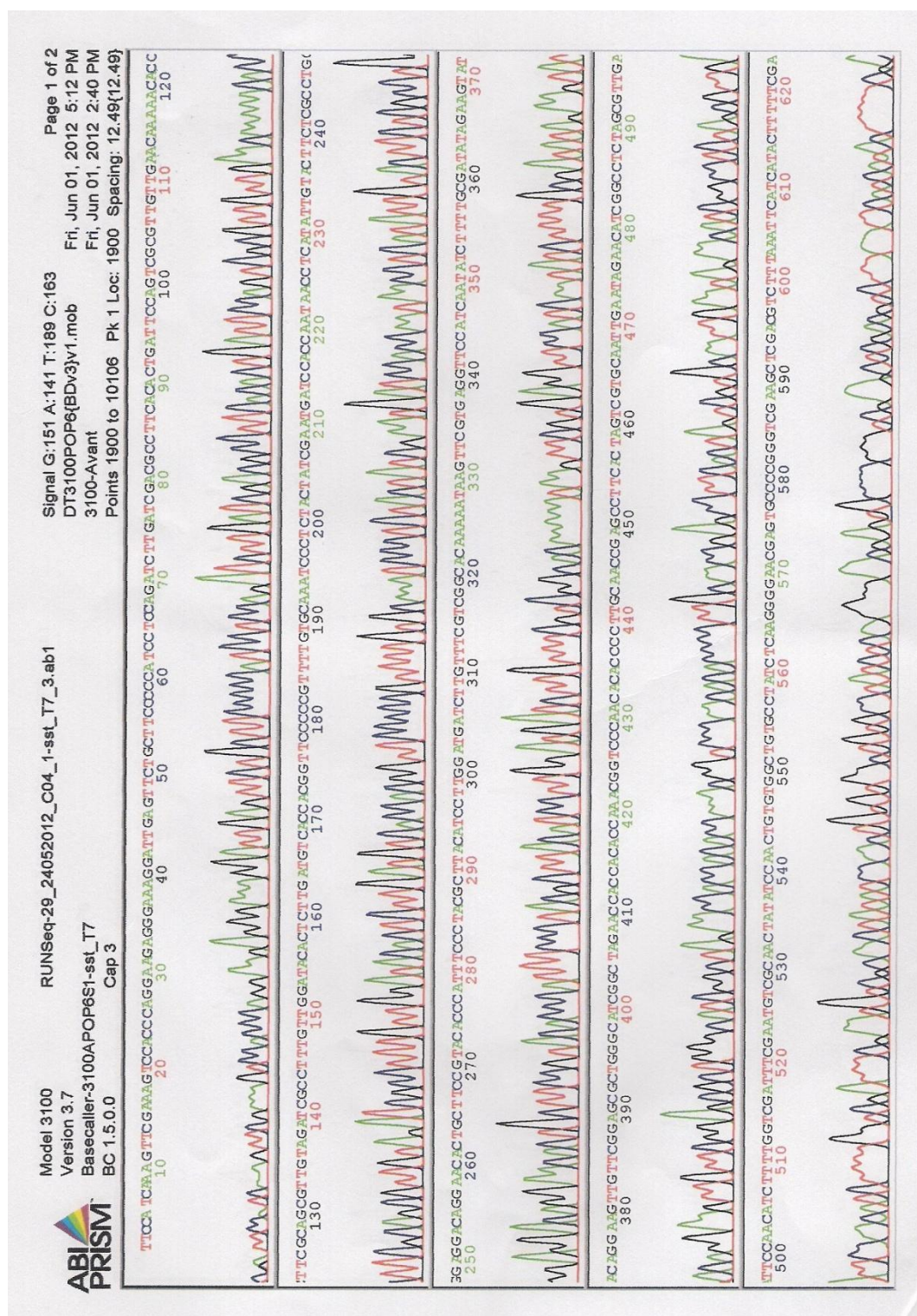
ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

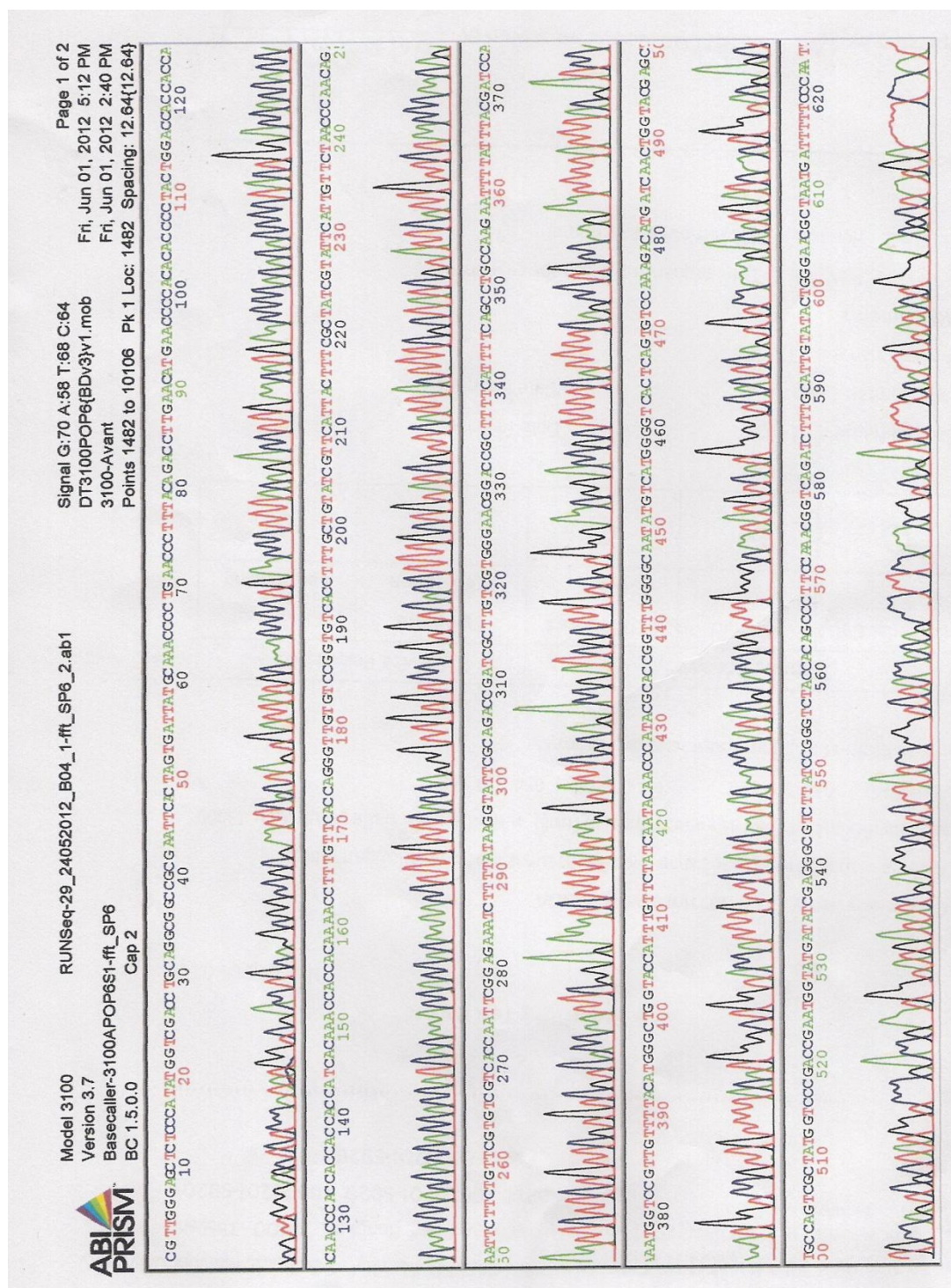
ข้อมูลผลการทดลอง



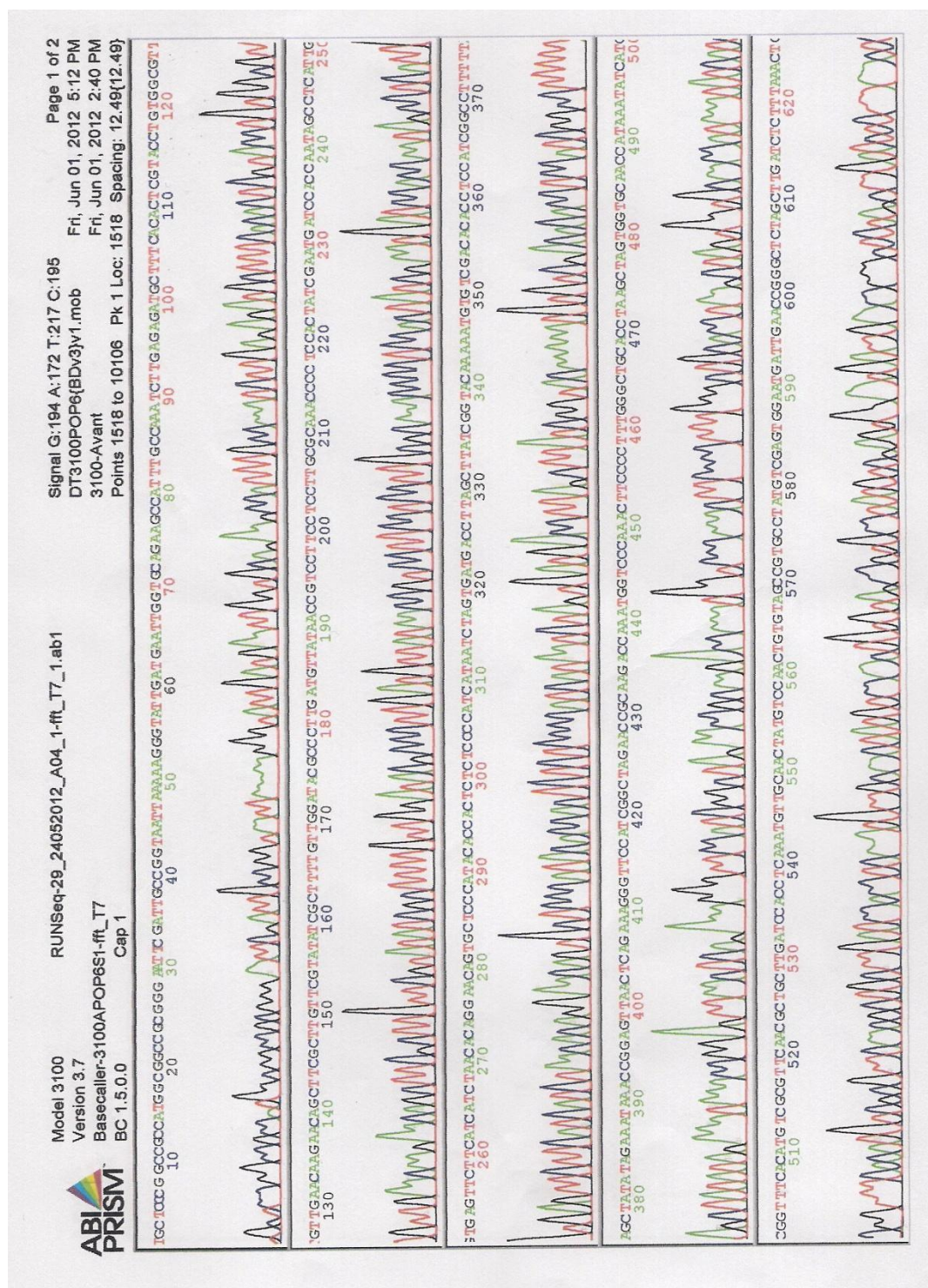
ภาพที่ 42 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *l-sst* เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6



ภาพที่ 43 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *I-sst* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7



ภาพที่ 44 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ SP6



ภาพที่ 45 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่คาดว่าเป็นยีน *1-fft* เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7

ตารางที่ 5 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 1-SST

ตัวอย่าง	กิจกรรมของเอนไซม์ 1-SST (U/ml)*	
	ภายในเซลล์	ในอาหารเพาะเลี้ยง
<i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>I-sst</i> _56	0.379 ± 0.061	0.539 ± 0.032
<i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>I-sst</i> _69	0.138 ± 0.096	0.423 ± 0.050

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ตารางที่ 6 การผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ 1-SST ส่วนใน อาหารเพาะเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*I-sst*_56 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิวเตรชั่นที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ชั่วโมง	ความเข้มข้น (mg/ml)				
	nystose	1-kestose	sucrose	glucose	fructose
0	-	-	145.049±8.276	-	-
2	-	1.081±0.046	146.242±3.227	1.608±0.113	1.682±0.110
4	-	1.685±0.036	136.323±4.066	2.731±0.853	2.761±0.015
6	-	2.199±0.069	132.370±5.461	4.504±0.376	3.662±0.116
8	-	2.706±0.108	128.911±7.085	5.915±0.657	4.757±0.135
12	12.314±7.051	4.315±1.252	86.341±9.734	28.866±4.143	15.216±1.689
24	33.817±1.931	-	4.096±0.466	56.307±3.504	29.181±1.815
48	24.265±0.179	-	2.363±0.051	52.252±1.341	43.302±1.008

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นโปรตีน ในเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงของ *P. pastoris* X-33 ที่มี pPIC_*1-sst_56* และ 69 ที่ผ่านการทำอัลตราฟิเตรชันที่มีขนาดรูพรุน 30 กิโลดาลตัน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	
	ในเซลล์	ในอาหารเพาะเลี้ยง
<i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst_56</i>	7.243±0.150	10.496±0.825
<i>P. pastoris</i> X-33 ที่มี pPIC_ <i>1-sst_69</i>	6.049±0.956	8.796±0.890

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	จุฑามาศ ทรัพย์มาก
	Miss Jutamat Sapmak
วัน เดือน ปีเกิด	26 กุมภาพันธ์ 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	41/1 หมู่ 2 ต.ราษฎร์พัฒนา อ.สามโก้ จ.อ่างทอง 14160
E-mail	jutamatsapmak@gmail.com
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนอ่างทองปัทมโรจน์ วิทยาคม จ.อ่างทอง
พ.ศ. 2552	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2553	ศึกษาต่อระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม
การนำเสนอผลงาน	
พ.ศ. 2555	Cloning of 1-Sucrose: Sucrose Fructosyltransferase (<i>1-sst</i>) and 1-Fructan: Fructan Fructosyltransferase (<i>1-fft</i>) Genes from Tuber of Kaentawan (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) (Oral presentation) The 24 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology International Conference on Green Biotechnology: Renewable Energy and Global Care November 29-30, 2012 Sunee Grand Hotel, Ubon Ratchathani, Thailand.