

## บทนำ (Introduction)

ในแต่ละปีมีขนสัตว์ปีกเหลือทิ้งและทำให้เกิดมลพิษ ขยะขนสัตว์ที่ถูกทิ้งทับถมอยู่เป็นแหล่งเพาะเชื้อรา dermatophilic fungi สร้างปัญหาการบริหารจัดการ อย่างไรก็ตามขนเป็ด ขนไก่ และขนสัตว์ปีกชนิดอื่น ๆ มีคุณค่าเป็นแหล่งของโปรตีนและกรดอะมิโน ใช้เป็นตัวเพิ่มคุณค่าโภชนาการในอาหารสัตว์ และใช้เป็นปุ๋ยของพืช การกำจัดเคอราตินในขนสัตว์ปีกโดยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ชอบร้อนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและปลอดเชื้อโรค (pathogen free) เนื่องจากเชื้อ *Feridobacterium* spp. ไม่ใช่เป็นเชื้อโรคและไม่สามารถเจริญในอุณหภูมิต่ำกว่า 50 °C ดังนั้นจึงไม่เจริญในร่างกายมนุษย์และสัตว์ (Gupta et al., 2013; Kornikłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011)

keratinase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการประยุกต์ในเทคโนโลยีการหมักของเหลือทิ้ง (waste) จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เอนไซม์นี้ย่อยโปรตีนเคอราติน (keratin) ในขนสัตว์ปีก และขนสัตว์อื่น ๆ ได้กรดอะมิโน และเพปไทด์ที่เป็นประโยชน์ใช้ผสมในอาหารสัตว์เป็นอาหารเสริม เอนไซม์ keratinase ยังสามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้เตรียมหนังสัตว์ ถอนขนในขั้นตอน dehairing process แทนการใช้สารเคมี sodium sulfide และเอนไซม์สามารถกำจัดคราบสกปรกบนผ้าเป็นประโยชน์ช่วยเพิ่มมูลค่าในผงซักฟอก (ผสมเอนไซม์ที่ทนร้อน ในผงซักฟอก สำหรับเครื่องซักผ้า)

ในประเทศไทยมีการค้นพบแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Feridobacterium* sp. FC2004 และ *Feridobacterium* sp. FA004 ซึ่งเจริญที่สภาวะเหมาะสม 75-80 °C, pH 7.5 และสามารถย่อยขนสัตว์ปีก (Keawram and Kanoksilapatham, 2013) ดังนั้นจึงน่าจะมีเอนไซม์ keratinase

## วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

*Fervidobacterium* sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงใน order Thermotogales ที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ค้นหา ยีนผลิตเอนไซม์เคอราติเนสชอบร้อนจากจีโนมของ *Fervidobacterium* sp. และโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย ทำการค้นหายีนจาก genomic DNA ของสายพันธุ์ที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีกด้วยเทคนิค shotgun sequencing ซึ่งได้เลือกใช้ genomic DNA ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 เนื่องจากมีข้อมูล DNA ทำการระบุชนิดยีน และวิเคราะห์ชนิดของเอนไซม์จากลำดับกรดอะมิโนของสายเพปไทด์ ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อจำลองยีนและให้ยีน insert ที่มียีนที่ต้องการสามารถแสดงออกได้ภายใต้ strong promoter เช่น T7 promoter ทำการโคลนยีน DNA insert ที่จำลองได้จาก PCR reaction เพื่อใส่ใน cloning plasmid vector จากนั้นทำการ transformation และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดและยีน insert โดยใช้คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินของพลาสมิด และทำการ screening หา ยีน insert ที่ถูกต้องโดยวิธี colony PCR วิเคราะห์ขนาดของยีน insert โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทำการเก็บโคลนที่ให้ผลบวก และเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดที่ต้องการ เก็บพลาสมิดที่ต้องการและยืนยันความถูกต้องอีกครั้งหนึ่งโดยทำ DNA sequencing ของยีน insert ทุกยีน เก็บโคลนที่มี insert ที่ถูกต้องและมียีนที่ต้องการ เพื่อการประยุกต์ต่อไป

## เนื้อเรื่อง (Main body)

### 1. ตรวจสอบเอกสาร

#### 1.1 Thermotogae

แบคทีเรียในไฟลัม Thermotogae ประกอบด้วยแบคทีเรียชอบร้อนและแบคทีเรียชอบร้อนสูงที่หลากหลายในกลุ่ม strictly anaerobic organotrophs ซึ่งมีถิ่นอาศัยและเจริญได้ดีและพบได้ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง พบได้ตั้งแต่ น้ำพุร้อน บ่อโคลนเดือด บ่อน้ำมันบนบกและนอกชายฝั่ง ภูเขาไฟบนแผ่นดิน และภูเขาไฟและน้ำร้อนตามรอยต่อแผ่นเปลือกโลกในทะเลและมหาสมุทร แต่เดิมาแบคทีเรียในไฟลัมนี้ประกอบด้วยหนึ่งอันดับคือ order Thermotogales และหนึ่งแฟมิลีคือ family Thermotogaceae ปัจจุบันการจัดจำแนกแบคทีเรียในไฟลัมนี้อาศัยรูปร่างและคุณสมบัติของ DNA ยีน 16S rRNA และ conserved signature indels (CSIs) ในโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งจำเพาะต่อแต่ละ clade ที่ประกอบเป็นไฟลัม Thermotogae ได้เป็น 4 อันดับ 5 แฟมิลี คือ (1) order Thermotogales ซึ่งแยกเป็นสองแฟมิลีคือ families Thermotogaceae และ Fervidobacteriaceae (2) order Kosmotogales ord. nov. (Kosmotogaceae) (3) order Petrotogales (Petrotogaceae fam. nov.) และแยกย่อยจีโนม *Thermotoga* เป็นสองจีโนมคือจีโนม *Thermotoga* ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงทั้งหมด (hyperthermophiles) รวมถึง *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, *T. petrophila*, *T. naphrophila* และ hyperthermophilic *Thermotoga* sp. PD524<sup>T</sup> (สายพันธุ์เดียวกันกับ DSM 28089) และแยกจีโนมใหม่และตั้งชื่อใหม่ว่า “*Pseudothermotoga*” ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophiles) ทั้งหมด (ในขณะนั้น) คือ *Thermotoga thermarum*, *T. lettingae*, *T. elfii*, *T. subterranea* และ *T. hypogea* ตั้งชื่อใหม่เป็น *Pseudothermotoga thermarum*, *Pst. lettingae*, *Pst. elfii*, *Pst. subterranea* และ *Pst. hypogea* ตามลำดับ ต่อมารวมแบคทีเรียชอบร้อน *Thermotoga*

*caldifontis* AZM44c09<sup>T</sup> and *T. profunda* AZM34c06<sup>T</sup> ที่ค้นพบโดย Mori et al. (2014) (*Pst. caldifontis* และ *Pst. profunda*) (Bhandari and Gupta, 2014; Kanoksilapatham, 2015) และ (4) order Mesoaciditogales (Mesoaciditogaceae) ซึ่งประกอบด้วยสองจีโนมคือ *Mesoaciditoga lauensis* OCM 1212T and *Athalassotoga saccharophila* NAS-01T (Reysenbach et al., 2013; Itoh et al., 2016) การจัดจำแนกใหม่สรุปได้ดังตารางที่ 1

ภรณ์ แก้วรามและคณะ (Keawram et al., 2016) คำนวณค่า ดัชนีระดับสปีชีส์ (species index) และ ดัชนีระดับจีโนม (generic index) โดยวิเคราะห์พารามิเตอร์ยีน *16S rRNA* ของสมาชิกในไฟลัมนี้ และ เสนอค่า ดัชนีระดับสปีชีส์ เท่ากับ 94.5% similarity {95%-CI limit (92.4, 96.6)} และค่าดัชนีระดับจีโนม เท่ากับ 81.9% similarity {95%-CI limit (81.8, 82.1)} นอกจากนี้พบว่า *Geotoga aestuarianus* T3B<sup>T</sup> มีความใกล้ชิดทาง phylogenetics กับ *Oceanotoga* sp. JC186 และ *O. teriensis* OCT74<sup>T</sup> มากกว่า *Geotoga petraea* ATCC 51226<sup>T</sup> และ *G. subterranea* CC-1<sup>T</sup>

เซลล์ของแบคทีเรียในไฟลัม Thermotogae มีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ที่เรียกว่า “toga” ซึ่งเป็นลักษณะร่วมที่พบได้ในทุก ๆ จีโนม และใช้แยกความแตกต่างของ *Ferrodobacterium* spp. ออกจากจีโนมอื่น ๆ แบคทีเรียไฟลัมนี้มีรูปร่างหลายแบบ สามารถจำแนกตามรูปร่างแยกจีโนม *Thermotoga* และ *Ferrodobacterium* สมาชิกของจีโนม *Thermotoga* มีรูปร่างเป็นแท่งยาว คดเคี้ยว (flexible rod shaped) ที่ปลายทั้งสองข้างมีถุงเยื่อหุ้มคล้ายลูกโป่ง (a balloon-like toga at each cell pole) (Huber et al. 1986; Jannasch et al. 1988; Windberger et al. 1989; Jeanthon et al. 1995; Ravot et al. 1995; Fardeau et al. 1997; Takahata et al. 2001; Balk et al. 2002) *Thermotoga* sp. PD524<sup>T</sup> ซึ่งเป็น hyperthermophile ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนโป่งเดือด มีเซลล์รูปร่างเป็นแท่งยาวและมีโครงสร้างคล้าย สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา (sporangium-like structure) ที่ปลายที่เรียกว่า “golf club structure” (Kanoksilapatham et al., 2015)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ชอบร้อนและแบคทีเรียที่ชอบร้อนสูงในไฟลัม Thermotogae (Bhandari and Gupta, 2014; Ito et al., 2016)

Phylum (Class) Thermotogae				
Thermotogales		Kosmotogales	Petrotogales	Mesoaciditogales
Thermotogaceae	Fervidobacteriaceae	Kosmotogaceae	Petrotogaceae	Mesoaciditogaceae
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8 <sup>T</sup> <i>T. neapolitana</i> NES <sup>T</sup> <i>T. petrophila</i> RKU-1 <sup>T</sup> <i>T. naphthophila</i> RKU-10 <sup>T</sup> <i>Thermotoga</i> sp. RQ2, <i>Thermotoga</i> sp. EMP <i>Thermotoga</i> sp. A7A <i>Thermotoga</i> sp. PD524 <sup>T</sup> (DSM 28089)	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1 <sup>T</sup> <i>F. islandicum</i> H-21 <sup>T</sup> <i>F. gondwanense</i> AB39 <sup>T</sup> <i>F. pennivorans</i> DSM 9078 <sup>T</sup> <i>F. changbaicum</i> CBS-1 <sup>T</sup> <i>F. riparium</i> 1445t <sup>T</sup> <i>Fervidobacterium</i> sp. FC2004 <sup>T</sup>	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1 <sup>T</sup> <i>K. arenicorallina</i> S304 <sup>T</sup> <i>K. pacifica</i> SLHLJ1 <sup>T</sup> <i>K. shengliensis</i> 2SM-2 <sup>T</sup>	<i>Petrotoga halophila</i> MET-B <sup>T</sup> <i>P. mexicana</i> MET12 <sup>T</sup> <i>P. miotherma</i> SJ95t <sup>T</sup> <i>P. mobilis</i> SJ95 <sup>T</sup> <i>P. olearia</i> SL24 <sup>T</sup> <i>P. siberica</i> SL25 <sup>T</sup>	<i>Mesoaciditoga lauensis</i> OCM 1212 <sup>T</sup>
<sup>^</sup> <i>Pseudothermotoga elfii</i> G1 <sup>T</sup> , <i>Pst. thermarum</i> DSM 5069 <sup>T</sup> <i>Pst. subterranea</i> SL1 <sup>T</sup> <i>Pst. lettingae</i> TMO <sup>T</sup> <i>Pst. caldifontis</i> AZM44c09 <sup>T</sup> <i>Pst. profunda</i> AZM34c06 <sup>T</sup>	<i>Thermosipho globiformans</i> DSM 19918 <sup>T</sup> , <i>Tsp. japonicus</i> IHB1 <sup>T</sup> <i>Tsp. africanus</i> Ob7 <sup>T</sup> <i>Tsp. melanesiensis</i> BI429 <sup>T</sup> <i>Tsp. ferriphilus</i> <i>Tsp. geolei</i> DSM 13256 <sup>T</sup> <i>Tsp. atlanticus</i> DV1140 <sup>T</sup>	<i>Meotoga prima</i> MesG1.Ag.4.2 <sup>T</sup> <i>Mesotoga infera</i> VNs100 <sup>T</sup>	<i>Geotoga petraea</i> ATCC 51226 <sup>T</sup> , <i>G. subterranea</i> CC-1 <sup>T</sup> <i>G. aestuarianus</i> T3B <sup>T</sup> <hr/> <i>Oceanotoga teriensis</i> OCT74 <sup>T</sup> <i>Oceanotoga</i> sp. ST186 <sup>T</sup> <hr/> <i>Defluviitoga tunisiensis</i> SulfLac1 <sup>T</sup>	<i>Athalassotoga saccharophila</i> NAS-01 <sup>T</sup>
			<i>Marinitoga camini</i> MV1075 <sup>T</sup> <i>Ma. piezophila</i> KA3 <sup>T</sup> <i>Ma. hydrogenitolerans</i> AT1271 <sup>T</sup> <i>Ma. okinawensis</i> JCM 13303 <sup>T</sup> <i>Ma. litoralis</i>	
<sup>^</sup> ชื่อเดิม <i>Thermotoga</i> (Bhandari and Gupta, 2014)				

แบคทีเรียชอบร้อนสูงกลุ่มนี้เป็นแหล่งเอนไซม์ทนร้อน และมียีนที่เก็บรหัสของโปรตีนและเอนไซม์ทนร้อนมากมาย จึงเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่า มีการค้นพบยีน 16S rRNA ของ thermophiles และ hyperthermophiles ในไฟลัม Thermotogae จากตัวอย่างที่เก็บจากแผ่นตะกอนเชื้อที่อุณหภูมิ 65 – 90 °C ตามลำธารในน้ำพุร้อนฝาง (Cuecas et al. 2014) และมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยง hyperthermophiles จนสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 19 สายพันธุ์ซึ่งแบ่งได้ตามยีน 16S rRNA และรูปร่างของเซลล์ได้เป็น จีโนม *Thermotoga* spp. (7 สายพันธุ์) และ *Feridobacterium* spp. (12 สายพันธุ์) ทั้งสองจีโนมนี้เป็น hyperthermophiles สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม 75-80 °C มียีน 16S rRNA ที่แตกต่างจากแบคทีเรียในจีโนมเดียวกันที่เคยมีรายงานไว้ (90-96 % similarity) ซึ่งสูงในระดับ species index ดังกล่าวแล้วข้างต้น แสดงว่าอาจเป็นสปีชีส์ใหม่ (candidate of sp. nov.) (Keawram et al., 2016; Keawram and Kanoksilapatham, 2013)

## 1.2 เอนไซม์ทนร้อน

ส่วนใหญ่ของสมาชิกในไฟลัม Thermotogae เจริญที่อุณหภูมิเหมาะสม (optimal growth temperatures) ระหว่าง 50 - 90 °C การเจริญโดยการหมักโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีเอนไซม์ทนร้อนในกลุ่ม hydrolases หลายชนิด ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้ hydrolases ในการย่อยแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่เป็นพอลิเมอร์เช่นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ เอนไซม์จากแบคทีเรียชอบร้อนสูง (optimal growth temperature ca. 80 °C) กลุ่มนี้สามารถทนความร้อนที่ >70°C ได้หลายวัน ตัวอย่างของเอนไซม์ทนร้อนที่ค้นพบแล้วจาก *Thermotoga* และ *Feridobacterium* ได้แก่ xylanase A และ xylanase B จาก *Thermotoga maritima* MSB8, trehalose synthase จาก *Thermotoga maritima* DSM3109, cellulase จาก *Feridobacterium nodosum* Rt17-B1, islandisin (keratinolytic enzyme) จาก *Feridobacterium islandicum* AW-1 และ feridolysin (keratinolytic enzyme) จาก *Feridobacterium pennavorans* DSM 9078 เป็นต้น

(Winterhalter and Liebl, 1995; Ryu et al., 2010; Wang et al., 2010; Nam, et al., 2002; Friedrich and Antranikian, 1996)

### 1.3 Keratinolytic enzyme

เคอราติน (keratins) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำย่อยสลายได้ยาก พบเป็นองค์ประกอบหลักของขน สัตว์ปีก ขนสัตว์ (wool) เล็บ เส้นผม ผิวหนัง กีบเท้าสัตว์ อย่างไรก็ตามสามารถถูกย่อยเป็นเปปไทด์ละลายน้ำ และกรดอะมิโนได้โดยเอนไซม์ในกลุ่ม keratinases เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยเคอราตินและมีแหล่งที่มา จากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Cedrola et al., 2012), *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. (Gegeckas et al., 2015), *Streptomyces fradiae* var. k11. (Wu et al., 2010), *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Riessen and Antranikian, 2001), *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 (Kublanov et al., 2009), และแบคทีเรียชอบร้อนในจินัส *Fervidobacterium* (*Fervidobacterium pennivorans* and *F. islandicum* AW-1) (Nam, et al., 2002; Friedrich and Antranikian, 1996) เป็นต้น

Keratinase เป็นเอนไซม์ protease (โปรตีเอส) หรือ peptide hydrolase ชนิดหนึ่ง สามารถย่อย พันธะเปปไทด์ แบ่งประเภทของโปรตีเอสได้เป็น 4 คลาส (classes) ดังนี้คือ cysteine protease, serine protease, metallo protease และ aspartic protease ในบรรดาโปรตีเอสเหล่านี้ serine proteases (ซึ่ง มีกรดอะมิโน serine ในบริเวณ conserved catalytic triad) ถูกแบ่งย่อยตามโครงสร้างได้เป็น “chymotrypsin-like” (หรือ “trypsin-like”) และ “subtilisin-like” (หรือ “subtilase”) เอนไซม์กลุ่ม serine protease เป็นกลุ่มครอบครัวใหญ่ (superfamily) ซึ่งสามารถถูกแบ่งย่อยได้เป็นกลุ่มเล็กลง (clans) ดังนี้ subtilisin, thermitase, proteinase K, lantibiotic peptidase, kexin และ pyrolysin (Siezen and Leunissen, 1997) clan ของ subtilisin ประกอบด้วย S8 subtilase family ซึ่งมี Asp (D), His (H) และ

Ser (S) เป็น catalytic triad และ S53 subtilase family ซึ่งมี Glu (E), Asp (D) และ Ser (S) เป็น catalytic triad

คุณสมบัติทั่วไปของ subtilisins เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแบบไม่จำเพาะ มีขนาดเล็ก (20 - 45 kDa) และในที่นี้จะเรียกกลุ่มนี้ว่า “small S8\_subtilase” เอนไซม์ subtilases อีกพวกหนึ่งมีโมเลกุลใหญ่กว่า เรียกในที่นี้ว่า “large S8\_subtilase” กลุ่มหลังนี้รวมถึง keratinolytic enzymes จาก thermophilic *Fervidobacterium* spp. ซึ่งมีขนาดประมาณ 2 เท่าขึ้นไป เอนไซม์ keratinases (หรือที่รู้จักอีกชื่อหนึ่งว่า fervidolysin) จาก thermophilic *F. pennivorans* เป็น serine protease ชนิดหนึ่ง ที่เป็น cell bound enzyme มีขนาด 130 kDa (Friedrich and Antranikian, 1996)

ยีน *fls* (2.1 kb) ของ *Fervidobacterium pennivorans* เป็นยีน fervidolysin (699 กรดอะมิโน) ซึ่งเป็น prosubtilase (proenzyme) ถูกโคลนนิ่งและให้มีการแสดงออกใน *E. coli* เอนไซม์ที่แสดงออกเป็น subtilase precursor (73 kDa) และเกิดการตัดย่อยตัวเอง (autoproteolysis) ได้เป็นโปรตีน 2 ชั้น ขนาด 58 kDa ของ mature subtilase และ 14 kDa ของ propeptide (Kluskens et al., 2002) เอนไซม์ keratinase (หรือ islandisin) จาก *Fervidobacterium islandicum* เป็น homomultimeric membrane bound keratinase พบที่เยื่อหุ้ม เป็น complex ใหญ่ >200 kDa และประกอบด้วยหน่วยย่อย subunit ชนิดเดียวขนาด 97 kDa มีกิจกรรมเหมาะสมที่ 80 °C และสามารถทนความร้อนได้ดีโดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมหลังจากบ่มที่ 80 °C นาน > 32 h (Nam, et al., 2002; Godde, et al., 2005)

*Fervidobacterium* sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็น extreme thermophile ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในประเทศไทย เจริญได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม 75-80 °C, pH 7.5 และสามารถย่อยขนสัตว์ปีก (Keawram and Kanoksilapatham, 2013) จึงอาจมีเอนไซม์ keratinase

## วิธีการศึกษา

### 1. การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อ inoculum เตรียมในอาหาร 480GM5 และบ่มที่ 75 – 80 °C หรืออุณหภูมิอื่นที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย

### 2. วิธีการเตรียมอาหารและวิธีทำการทดลอง

ผสมอาหารตามสูตร (ยกเว้น  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งเตรียมแยก) ไม่ต้องปรับ pH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำอาหารในขวดไปต้มพร้อมทั้งกวนเป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เตรียมหลอด Hungate tube เต็มสารละลาย  $\text{Na}_2\text{S}$  ปริมาตร 0.3 ml/อาหาร 100 ml ตวงอาหารเหลวใส่ในหลอด Hungate tube หลอดละ 10 ml ใส่ชนเปิดที่ผ่านการต้ม 100 °C เป็นเวลา 60 นาทีและทำให้แห้ง ปริมาณ 15-100 mg (1 ช้อน)/หลอด พร้อมทั้งทำการพ่นแก๊ส  $\text{N}_2$  ตลอดเวลา จนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม เพื่อที่จะทำให้อาหารอยู่ในสภาวะ anaerobic ทุกขั้นตอนจะต้องระวังปนเปื้อน  $\text{O}_2$  นิ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 105 °C 60 นาที

เตรียม 1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ในขวด serum ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนปิดฝาขวดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียมนิ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 105 °C เป็นเวลา 60 นาที

ก่อนการเลี้ยงเชื้อดูด 1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ปลอดเชื้อ) 0.1 ml ฉีดใส่ 10 ml ของ FD medium ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้นทำการฉีดหัวเชื้อ 0.1 ml บ่มในตู้บ่ม 80 °C หรืออุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญได้ดี พร้อมบ่ม uninoculated control ที่อุณหภูมิเดียวกัน

### 3. การสกัด genomic DNA

ทำการสกัด genomic DNA จาก FC2004 ในอาหาร 480GM5 อายุ 24 h ปริมาตร 100 ml การตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 min และละลายตะกอนด้วย TNE buffer 400 µl แล้วจึงดูดสารละลายใส่ microcentrifuge tube ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ 20% N-lauroyl sarcosine (50 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และ 10% SDS (100 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ย่อยโปรตีนด้วย 10 mg/ml Proteinase K solution (100 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และบ่มปฏิกิริยาใน water bath 50°C เป็นเวลา 3 h (ในระหว่างการบ่มควรกลับหลอดบ่อยๆ) ตกตะกอนโปรตีนด้วย TE-saturated phenol (750 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลาย (aqueous phase) ด้านบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ ตกตะกอนโปรตีนซ้ำด้วย chloroform : Isoamyl alcohol (750 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายด้านบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ทำการตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20 °C) ดังต่อไปนี้ ปรับ pH เป็นกรดด้วย 3M sodium acetate pH 5.25 (0.1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) แล้วตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็น (-20 °C) (2.5 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ บ่มปฏิกิริยาที่ -20 °C 1 คืนโดยไม่เขย่า หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 20 min ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป โดยเก็บส่วนที่เป็นตะกอน DNA ไว้ ซับปากหลอดด้วยกระดาษทิชชู ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol (500 µl) กลับหลอดไปมาเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป โดยเก็บส่วนที่เป็นตะกอน DNA ไว้ ซับปากหลอดด้วยกระดาษทิชชู ตากตะกอน DNA โดยการเปิดฝาทิ้ง microcentrifuge tube จนแห้ง

(บ่มที่ 37 °C 1 h) ละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 µl) และย่อย RNA ด้วย DNase free RNAase (1 µl) แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 h

เพื่อให้ DNA มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ทำการตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20 °C) ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และล้างด้วย 70% ethanol ตากแห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 µl) เติม chloroform (0.5 µl) ในสารละลาย DNA และเก็บ DNA ที่ 4 °C

#### 4. การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสและค่า Tm ดังสรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และค่า annealing temperature ของไพรเมอร์แต่ละคู่

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm	หมายเหตุ
ProT1AF	<u>CATATG</u> CGTAGACCCGTTAACGTC	54.1	ขีดเส้นใต้ Nde I restriction site
ProT1AR	TTACTATAGTTCAACTTCAATTTGCAC	53.8/50.9	
CD125F	<u>CATATG</u> GTAACCGATGCTGGCA	52.8/53.7	ขีดเส้นใต้ Nde I restriction site
CD421R	<u>GGATC</u> CTAGTCCAAGCCAGGTAATCT	52.7/53.2	ขีดเส้นใต้ BamH I restriction site
ชื่อผลิตภัณฑ์	Primer pairs ที่ใช้	Product (bp)	Annealing temperature
ProA1	ProT1AF/ProT1AR	1575	45 °C
CD125	CD125F/CD421R	905	46 °C
CDS (CD+SD)	CD125F/ProT1AR	1200 bp	46 °C

การจำลองชิ้น DNA ทำโดยใช้วิธี PCR ที่ใช้กันทั่วไปโดยตั้งค่า annealing temperature ที่ 45-46 °C 1 min และ polymerization ที่ 72 °C 1 min ทำซ้ำ 30 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72 °C 10 min

## 5. การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี gel electrophoresis

ทำการแยกชิ้น DNA โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และ TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา เป็นเวลา 40 min ในการทำให้ DNA เคลื่อนที่ นำแผ่น gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide และไปส่องดูด้วยเครื่อง gel document

## 6. การเตรียม competent cell

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ในอาหาร LB broth บ่มที่ 37 °C 250 rpm เป็นเวลา 24 h ดูดหัวเชื้อ อายุ 24 h ข้างต้น (0.5 ml) แล้วใส่ใน 50 ml ของ LB บ่มใน shaker incubator 37 °C, 250 rpm บ่มจนได้ OD600 ประมาณ 0.3-0.5 OD (ประมาณ 3 h) แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ ดูดหัวเชื้อที่มีความขุ่น 0.3-0.5 ใส่ลงในหลอด centrifuge ที่เย็น และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 min ปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 7 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 5 ml ของ CaCl<sub>2</sub> solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) ปั่นเหวี่ยง 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 5 ml ของ CaCl<sub>2</sub> solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) และบ่มในน้ำแข็ง 30 min ปั่นเหวี่ยง 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างอีกครั้งโดยเติม 1.5 ml ของ CaCl<sub>2</sub> solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ที่แช่เย็น หลอดละ 50  $\mu$ l และเก็บที่ -80 °C

ทำการตรวจสอบ competency โดยสุ่มมา เพื่อ transform ด้วย plasmid เช่น pUC 19 หรือ derivative อื่น ๆ

## 7. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติ

การแปลรหัสทำโดยใช้ ExPASy - Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>)

การสร้างโมเดลของโปรตีน ทำผ่าน SWISS\_MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) Swiss Institute of Bioinformatics

## การ cloning gene *proA1*

การโคลนนิ่งยีน ใส่ pGT-19 cloning vector โดยใช้ TA cloning technique และทำการคัดเลือก โคลนที่มี insert ทำโดยใช้เทคนิค colony PCR และไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ขึ้น insert

ทำการเพาะเลี้ยงโคลนที่มี insert ในอาหาร LB ที่มี 100 µg/ml ampicillin

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดของ QIAprep Spin Miniprep Kit

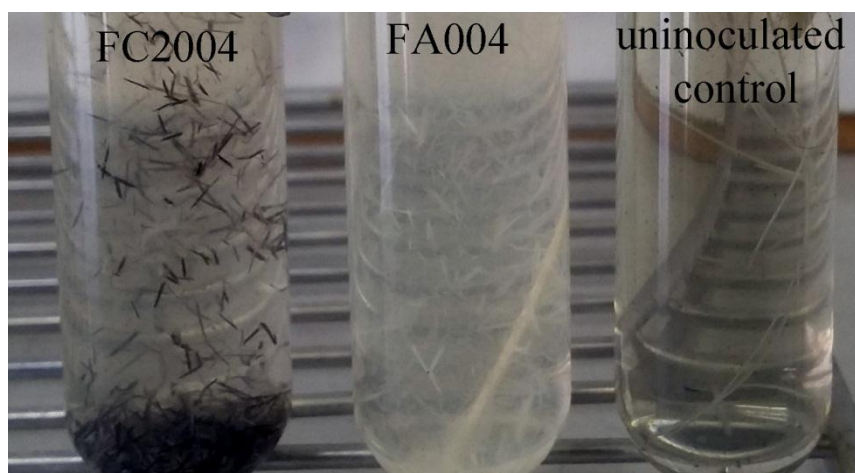
การออกแบบไพรเมอร์มีการเติมเบสตัดจำเพาะ (5' CATATG 3') ของ Nde I restriction endonuclease ที่ 5' ของ forward primer และเบสตัดจำเพาะ (5' GGATCC 3') ของ BamH I restriction endonuclease ที่ 3' ของ reverse primer หรืออาศัย BamH I restriction endonuclease site ของพลาสมิด pGT-19 vector

ก่อนโคลนนิ่ง insert เข้าสู่ pET11a expression vector ทำการตัด insert ออกจาก cloning vector ด้วย restriction enzymes Nde I และ Bam HI แล้วจึงโคลนนิ่งโดย ligation กับ vector เพื่อให้ insert อยู่ภายใต้ T7 promoter จากนั้น transformation เข้าสู่ expression host เช่น *E. coli* BL21(DE3) pLyss หรือ *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLyss

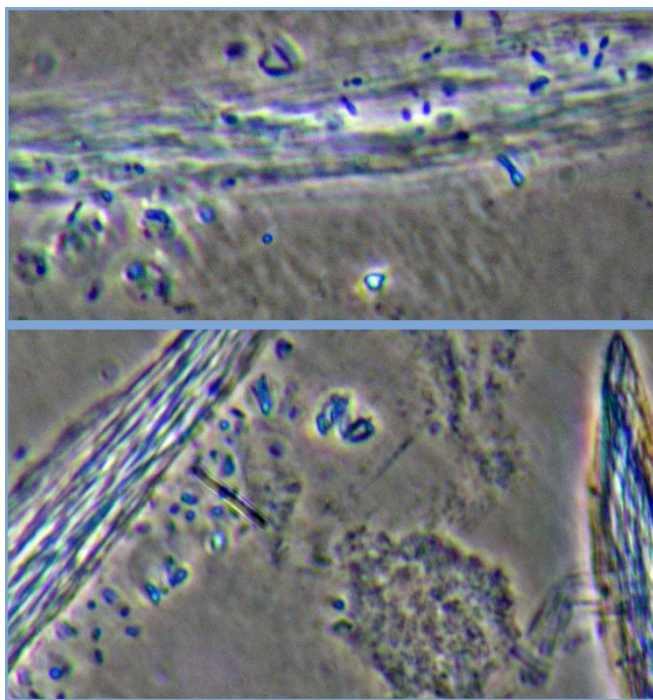
## ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Comment)

### 1. การค้นหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก

ทำการเลี้ยง *Feridobacterium* spp. ที่มีอยู่ใน stock culture collection ในอาหาร FD medium และบ่มที่อุณหภูมิ 75 – 80 °C ตามความเหมาะสม ผลการทดลองพบว่า *Feridobacterium* sp. strain FC2004 และ *Feridobacterium* sp. strain FA004 สามารถย่อยขนเปิดได้ภายใน 1-2 วัน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การย่อยขนเปิดที่ 80 °C โดย *Feridobacterium* sp. strain FC2004 และ *Feridobacterium* sp. strain FA004 เทียบกับ uninoculated control (ขวาสุด)



ภาพที่ 2 เซลล์ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่มีการย่อยสลายจนเปิดหลังจากบ่มไว้ 24 h

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงเซลล์ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ใน culture 24 h (ภาพที่ 2) จากภาพที่ 2 ตัวแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphic shapes) พบทั้งที่เป็นแท่ง (rod shaped) และที่มีลักษณะเป็นถุงเยื่อหุ้มทรงกลมภายในบรรจุเซลล์มากกว่า 2 เซลล์ขึ้นไป ที่เรียกว่า “rotund body” เกาะอยู่กับเศษซากเปิดและภายในโพรงของก้านชนเปิด

## 2. การค้นหายีน protease จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004

การทำ shotgun sequencing สามารถพบชิ้น DNA ที่มี open reading frame (ORF) ขนาด 1569 เบส (ภาพที่ 3) จากภาพที่ 3(A) แสดงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1 ถึง 1969 นิวคลีโอไทด์ 1 – 200 แสดงบริเวณปลาย 5' ของ ORF เบสเริ่มต้นตรง G<sup>(201)</sup>G ของ valine codon (5' GUG 3') ซึ่งแทน methionine codon (5' AUG 3') ยีนมีความยาว 1569 เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 522 หน่วย และพบ putative ribosome binding site (<sup>189</sup>GGAG<sup>192</sup>) ทาง 5' เหนือ valine codon ตัวแรก

```

>Consensus_A1 From 1-1969 (1094926 to 1096894) (±200)

1
AAAGGCCTAGCGGAGAAACGATAAAGCGAGCTTTTAGTAGGCCACCCGTACGAGTGGGGACTTGAACGTATCG
TTGCTGAGTGGCGAGATGAAAGTAATTCGTCCATTTTCGATCTCACTCAACTGTGACTACAATTCTAAGTTTG
ProT1AF →
GAGCTTACCAGATTCCGCCGAAAGGTACTACCTGTTTGTAAACGGAGGGAACGTAGTGCCTAGACCCGTTA
ACGTCTTAATCTTGGTTTTTTTTGGTTTTCCATCGTAGCCACGTTTTCTGCGTGAAGTTTCCAGATACCAAAA
CCGCTGGTGAAGAAGTGTTCCTGAACAGTCTCGATCATCCGCACGAGCAAGGTAACCTCTTGGTTGGATTTT
CCGAAGAAGCTGCGGTTTACGAACTTGCACGCGAACTTGGTGCCTGGTGGTTTTGGGTGTGGATAAGGTTTTAA
AATTTGCGGCACTCGGTGTGCGGAAGAAGTGGATAAGGTTTACGCTAAACTGAAGAATTTAAGAATCGAAG
GTGTGACGTACGTTGAACCGAGTTATGTGAGAACTATTCCATCCGTTCTGGAGCTTCCCACTCCGCGA
CD125F→
GTAACCGATGCTGGCACCGACCTGAAAATTCCTGAGAACGAGAGTAAATACCTTTGGGGCTTGCAAGTAACG
GAAATCAAGAAGGCGTGGGAGCTTGGATTTACCGGTGACGGCGTAATCGTCGCGGTTTTGGACACGGGGGTA
GACGGTACACATCCAGATCTCGCACCAAACGTGATAAAAGGTTACAACGCGGTCAACGGAAGCGAGATTGCA
CCGTCAACTGATAGTTTCGATAGGTGGTGCACACGGAACACATGTGGCCGGTACGATTGCCGCCGTTTTGGAT
GGAAAGGGAGTTGTTGGCGTTGCACCGAAAGCGAAGATCATGCCAGTGGTGATTTTCGGGAGTTGGTACGTC
GGCGATGATAAAGTTGCAGAGGCTATCCGCTGGCGGTACAAAACGGGGCCAAAGTGTGAGCAACTCCTGG
GGTGGGATGGGTTATTTCGATGACGCTAAAACGGGCGATTGACTATGCGTTGGAGAACGGTGTAGTTGTCGTC
GCCGCCGCTGGAACAGTTCGGCTTACCAATCGTCATTGTATCCCGCAATTATCCGGGCGTTATCCAAGTT
GGCGCCGTTGAAAACGGTGAACCTCCGTTCACTACGATTTTTCAAACAGGAGCCCTTTGGTTTTGGTTGGA
GCACCTGGTAGATTGGTGCCTCAACCATGCCGATGCCGGATCGGTTACGAGAGTGGTTTTCGTTGAT
TCTTCCGAGAACGGTGGTTACTACGGGTTTCATGAGTGGTACGTCGATGGCTACACCACATGTTTCCGGAATG
GCTGCGCTTTTGCTTCAAAGTTTCCAGCGCAAAACCTTGGCAAATCAGAAAACGTATCGAAAACGGTGCA
← CD421R
CGGGATATAGATTTACCTGGCTTGGACGAACATTCGGCTACGGTTTACTGAATGCCGTTCCGTGGGGCTT
GAGCTTCCGTGAGAATGGAGCGCAAACGTGGTGGTAAAGGTGAAAGTCAATGGAAAAGTAGTAACCGGTGCC
ATTGTTTTCGTTGTTAGGAAAAACGGGATAAGTTACGCACGTAGGTACTTTGCGTTGACCGATGTGGGAATC
GCGAAGTTCCTGGGAATCGATGTTGGAGAGTACAGAATGATTTTCAAGCCAGGAAAAATGCTTCGAGCAA
←ProT1AR
GAAGTAAACATAAATTCGGACGTGCAAATTTGAAGTTGAAGTATAGTATCCTCCCCGAGATGCCCGAATTATC
TTGTTTTACTCCCAACTCACACGCTCAGTTAGCCATCCCCAGCATTTTTATCGTCAGCGTTTACTCTTTGT
GGGGGTCCCAACTGGTTGATACGCACCGGTGACGATCCTCGGATCGTAAACGTAAGCTTTTTTGTAACTGT
GATAATCTGACCTGTTGACGGATTAAATG 1969

```

(A)

Translated sequence of *proA1* (201 to 1769)

```

1   VRRPVNVLIL VFLVSIVATF SCVKFPDKT AGEEVFLNSL DHPHEQGKLL VGFSEEAAYV 60
61  ELARELGAVV LGVDKVLKFA ALGVREELDK VYAKLKNLRI EGVTYVEPSY VRTIPSVLEL 120
121 PTPRVTDAGT DLKILENESK YLWGLQVTEI KKAWELGFTG DGVIVAVLDT GVDGTHPDLA 180
181 PNVIKGYNAV NGSEIAPSTD SSIGGAHGTH VAGTIAAVLD GKGVVGVAPK AKIMPVVIFG 240
241 SWYVGGDDKVA EAIRWAVQNG AKVLSNSWGG MGYSMTLKRA IDYALENGVV VVAAAGNSSA 300
301 YQSSLYPANY PGVIQVGAVE NGEPPFTTSF SNRSPLVSVG APGRLVLSM PMRGSAGYES 360
361 GSLYSSENGG YYGFMSTSM ATPHVSGMAA LLLQKFPSAK PWQIRKLIEN GARDIDLPLG 420
421 DEHSGYGLLN ARSVGLELPE NGAANVVVKV KVNGKVVTGA IVSLLGKNGI SYARRYFALT 480
481 DVGIAKFLGI DVGEYRMIVS SQEKCFEQEV NINSDVQIEV EL 522

```

(B)

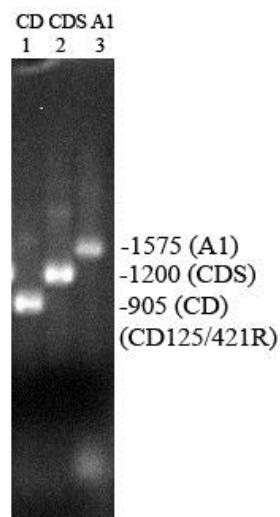
ภาพที่ 3 (A) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative *proA1* บริเวณ 200 เบสก่อนและหลัง open reading

frame (ORF) ยีนเริ่มต้นที่ GTG (โคดอน Val) สัญลักษณ์: บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งเกาะของไรโบ

เมอร์ ตัวหนาแทน ribosome binding site และ (B) translated protein (ProA1) ตั้งแต่ นิวคลี

โอไทด์ลำดับที่ 201 ถึง 1769 บริเวณขีดเส้นใต้แทน catalytic amino acid triad

การจำลองด้วยเทคนิค PCR และใช้คู่มือไพรเมอร์ ProT1AF/ProT1AR จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1575 bp ซึ่งมี ORF ของ ProA1 (522 กรดอะมิโน) การจำลองด้วยคู่มือไพรเมอร์ CD125F/CD421R จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 905 bp ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์บริเวณ CD (ตั้งแต่ V125 ถึง D421, 296) เรียกเพปไทด์สายนี้ว่า “CD125” หรือ “CD” และการจำลองด้วยคู่มือไพรเมอร์ CD125F/ProT1AR จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1200 เบส ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์บริเวณ CD และ SD เรียกเพปไทด์สายนี้ว่า “CDS” (ภาพที่ 4) จากภาพที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ ขนาด 1575 bp, 905 bp และ 1200 bp ที่ถูกจำลองด้วยคู่มือไพรเมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR ตามลำดับ



ภาพที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจำลองด้วยคู่มือไพรเมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR สัญลักษณ์: แถวที่ 1 จำลองด้วย ProT1AF/ProT1AR แถวที่ 2 จำลองด้วย CD125F/CD421R และ แถวที่ 3 จำลองด้วย CD125F/ProT1AR

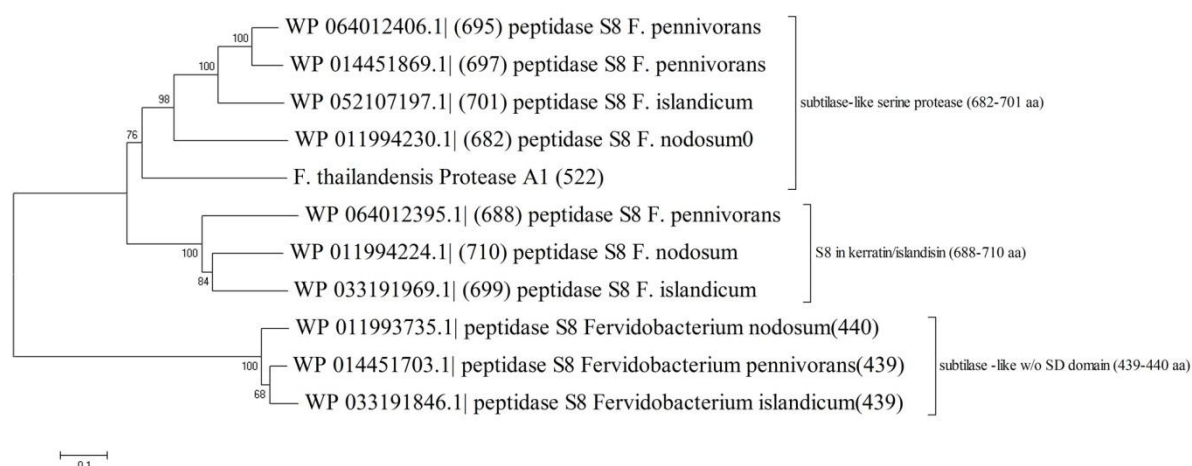
การ BlastP กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าโปรตีน ProA1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์ peptidase S8 จาก *Feridobacterium pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (WP\_064012406.1; 52 %), *F. islandicum* AW-1 (WP\_052107197.1; 48 %) และ *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (WP\_011994230.1; 48 %) และคล้ายกับ subtilase จาก *Thermosiphon africanus* (WP\_004102466.1; 47%) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดังกล่าวมีขนาดประมาณ 700 กรดอะมิโน (ในที่นี้เรียกว่า “large S8\_family serine protease” ซึ่งหมายถึง subtilase ที่มีขนาดใหญ่กว่า 650 กรดอะมิโน) และไม่พบว่ามีโปรตีนขนาด 522 กรดอะมิโนหรือใกล้เคียงอยู่ใน complete genomes ของแบคทีเรียชอบร้อนที่เป็นญาติกันคือ *Feridobacterium pennivorans*, *F. islandicum* AW-1 และ *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> อย่างไรก็ตาม มีขนาดใหญ่กว่า subtilysin อีกกลุ่มหนึ่ง (ในที่นี้เรียกว่า “small S8\_subtilase” ขนาดประมาณ 440 กรดอะมิโน) กลุ่มแรก (large S8\_subtilase) รวมถึง keratinolytic enzymes จาก thermophilic *Feridobacterium* spp. ซึ่งรวม feridolysin จาก *Feridobacterium pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (WP\_064012395.1) และ islandisin จาก *F. islandicum* AW-1 (WP\_033191969.1) โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ สามารถย่อยเคอราตินได้ (Godde et al., 2005; Kluskens et al., 2002)

การค้นหาโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Feridobacterium pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (CP003260.1), *Feridobacterium islandicum* AW-1 (CP014334.1) และ *Feridobacterium nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (CP000771.1) มีโปรตีนที่เป็น large S8\_subtilases (ขนาด 682-710 กรดอะมิโน) ใน complete genome sequences สายละ 2 ชนิด ดังต่อไปนี้ WP\_104451857.1 และ WP\_014451869 จาก *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup>, WP\_011994230.1 และ WP\_011994224.1 จาก *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> และ WP\_052107197.1 และ WP\_033191969.1 จาก *F. islandicum* AW-1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ small S8\_subtilase อีก 1 ชนิด อยู่ใน complete genome คือ WP\_014451703.1 (439 กรดอะมิโน)

โน), WP\_033191846.1 (439 กรดอะมิโน) และ WP\_011993735.1 (440 กรดอะมิโน) จาก CP003260.1, CP014334.1 และ CP000771.1 ตามลำดับ

### 3. การศึกษา phylogeny ของยีน subtilases

การศึกษาเปรียบเทียบทาง phylogenetic analysis พบว่า ProA1 (522 กรดอะมิโน) อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ large S8\_subtilases และแตกต่างจากกลุ่ม small S\_8 subtilase (ภาพที่ 5) แสดงว่า ProA1 อาจเป็น intermediate isoform ระหว่าง large กับ small\_S8 หรืออาจเป็น truncated mutant S8\_subtilase ของ large homolog



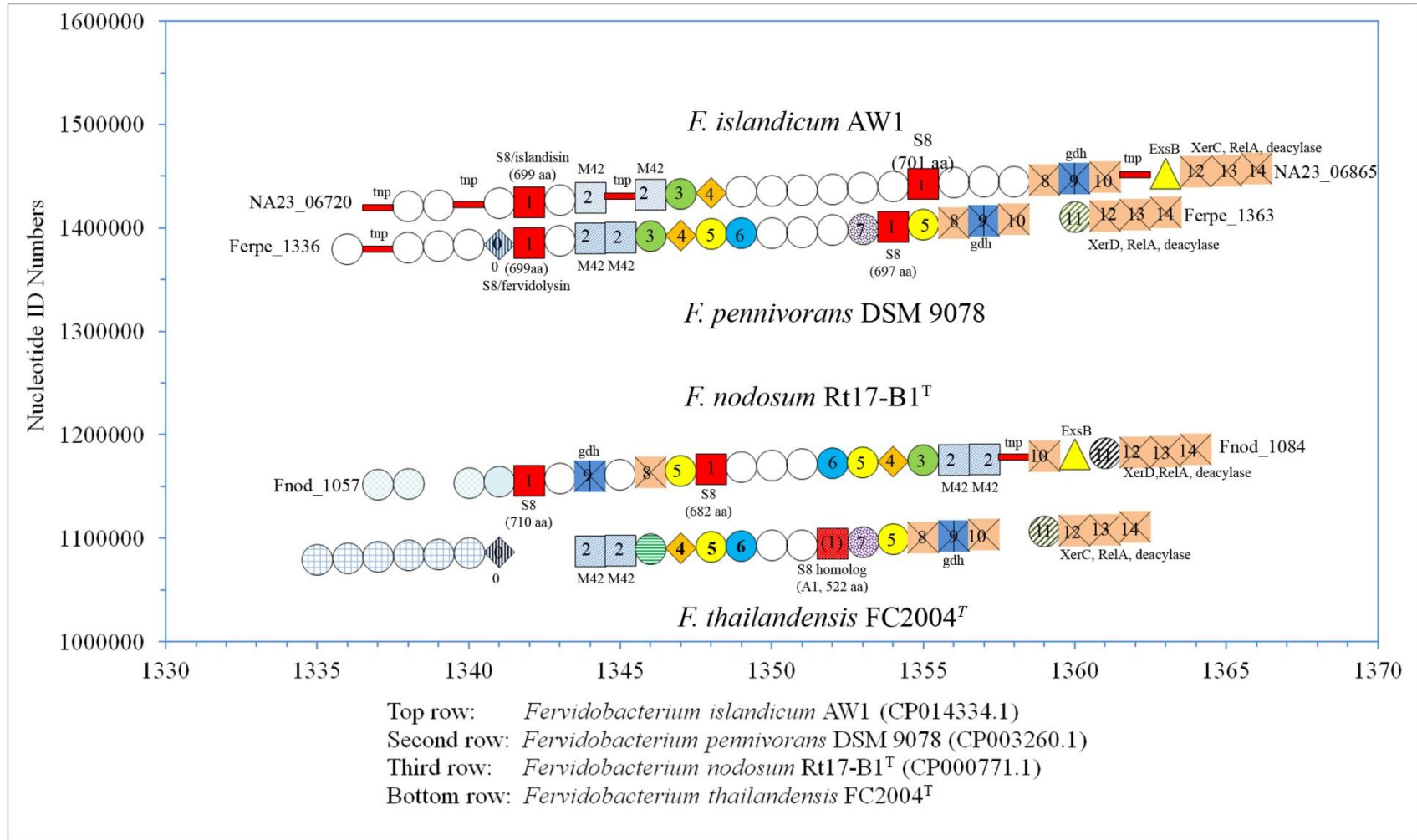
ภาพที่ 5 Phylogenetic analysis ของ proteases ใน super family serine proteases

### 4. การศึกษาอัลลีล (allele) ของ large subtilase S8

การ mapping บริเวณอัลลีล (alleles) ระหว่าง large S8\_subtilases ทั้งสอง loci (รวม fervidolysin และ islandisin) ใน complete genome sequences ทั้งสาม Accession Numbers CP0143341.1 (*F. islandicum* AW-1), CP003260.1 (*F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup>) และ CP000771.1 (*F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup>) และฐานข้อมูลของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ผลการทดลองแสดงดังภาพ

ที่ 6 จากภาพที่ 6 พบว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 มี large S8\_subtilase เพียง 1 homolog และ ไม่พบ homolog ที่เป็น fervidolysin (WP\_014451857.1) และ islandisin (WP\_033191969.1) การเปรียบเทียบกับ CP003260.1 (*F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup>) พบว่ามีการจัดเรียงของยีนอื่น ๆ คล้ายกัน แต่ยีน *proA1* สลับตำแหน่งกับยีน carboxypeptidase regulatory-like domain (CarboxypepD\_reg) (หมายเลข 7 ในภาพที่ 6) และไม่พบ large S8\_subtilase ที่อยู่ระหว่าง ribokinase (sugar kinase) (หมายเลข 0 ในภาพที่ 7) กับ M42 Peptidase/ Endoglucanases/M42 glutamyl aminopeptidase (หมายเลข 2 ในภาพที่ 7) ผลการทดลองแสดงว่า ในบริเวณ homologous ชิ้นนี้ของแบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์ของจีนัส *Fervidobacterium* มี large S8\_subtilase อยู่ 2 ชุด แต่ใน *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่พบในประเทศไทยพบ ProA1 เพียง 1 ชุดและมีขนาดสั้นกว่า (522 กรดอะมิโน) แสดงว่าอาจเกิด recombination และทำให้การจัดเรียงองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงจีโนมเกิดขึ้นในสายพันธุ์ FC2004 เพราะฉะนั้น ProA1 อาจเป็น truncated mutant ของ large S8\_subtilase ที่บริเวณ SD2 ขาดหายไป อย่างไรก็ตามในจีโนมของสายพันธุ์ FC2004 อาจมี large S8\_subtilase อีกหนึ่ง homolog นอกบริเวณดังกล่าว

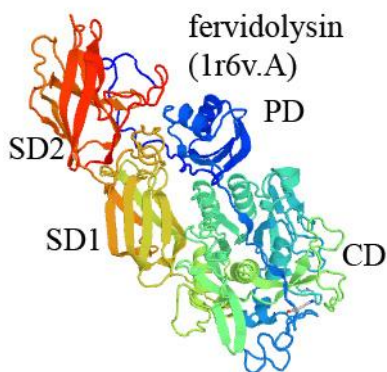
ภาพที่ 6 แผนผังแสดงตำแหน่งสัมพัทธ์ของยีนและ ORFs บริเวณ large S8\_subtilases ของ *Feridobacterium pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (CP003260.1: 1379255 to 1379581), *Feridobacterium islandicum* AW-1 (CP014334.1: 1419430 to 1457824), *Feridobacterium nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (CP000771.1: 1151958 to 1166477) และ *Feridobacterium thailandense* FC2004<sup>T</sup> (1079770 to 1080543) สัญลักษณ์: สีเหลี่ยม สีเหลี่ยมและกากบาท วงกลม และ สามเหลี่ยม แทนยีนหรือ open reading frame เครื่องหมาย ขีดสีแดง (red dash line) แทน transposase (tnp) ขั้วหลามตัดลายและ “0” แทน ribokinase (sugar kinase) สีเหลี่ยมสีแดงและ “1” แทน Peptidases\_S8\_serine protease (Feridolysin/subtilisin\_like protease) สีเหลี่ยมลาย และ “2” แทน M42 Peptidase/Endoglucanases/M42 glutamyl aminopeptidase วงกลมเขียว และ “3” แทน Septum formation inhibitor MinC ขั้วหลามตัดและ “4” แทน phosphohydrolases วงกลมทึบสีเหลืองและ “5” แทน diguanylate-cyclase (GGDEF domain) วงกลมทึบสีฟ้าและ “6” แทน prepilin-type N-terminal cleavage วงกลมลายจุดและ “7” แทน carboxypeptidase regulatory-like domain (CarboxypepD\_reg) สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “8” แทน ABC-type multidrug transport system สีเหลี่ยมสีน้ำเงินพร้อมเส้นทะแยงมุมและเส้นแบ่งและ “9” แทน glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “10” แทน formyltetrahydrofolate synthetase/formate--tetrahydrofolate ligase สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “11” แทน Ribonuclease III C terminal domain สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “12” แทน site-specific recombinase XerD /Phage integrase family, N-terminal SAM-like domain/recombinase XerC สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “13” แทน (p)ppGpp synthetase, RelA/SpoT family สีเหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “14” แทน (p)ppGpp synthetase, RelA/SpoT family สามเหลี่ยมสีเหลืองแทน ExsB family regulator Ferpe\_1336 ถึง Ferpe\_1363 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. pennivorans* (35986 nt), NA23\_06720 ถึง NA23\_06865 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. islandicum* (38394 nt), Fnod\_1057 ถึง Fnod\_1084 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. nodosum* (34497 nt) และ locus ID ของ *F. thailandensis* FC2004 (31557 nt) แกน Y แทน coordinates ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แกน X แทน locus ID ของ *F. pennivoran* (Ferpe\_1336 ถึง Ferpe\_1363) ส่วน locus IDs ของสปีชีส์อื่น เพื่อการนำเสนอได้แปลงหมายเลขให้สอดคล้องกับ Ferpe ID 13642 (แทน S8\_feridolysin) เทียบเท่าตำแหน่งสัมพัทธ์ของ Fnod\_1062 และ NA23\_06725



ภาพที่ 6

### 5. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติของ ProA1 และการพิสูจน์เอกลักษณ์

โมเลกุล large S8 และ small S8\_subtilases ของ *Fervidobacterium pennivorans*, *F. nodosum* และ *F. islandicum* และ ProA1 จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 682 – 710 กรดอะมิโน, 439-440 กรดอะมิโน และ 522 กรดอะมิโน ตามลำดับ ในจำนวนนี้ fervidolysin เป็น large S8\_subtilase ที่มีกิจกรรม keratinase (ขนาด 699 กรดอะมิโน) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยใช้ข้อมูล X-ray crystal structure (Kim et al., 2004) ซึ่งศึกษาจาก mutant fervidolysin (A200/H200) ที่เปลี่ยน active residue H200 เป็น A200และตัดส่วนของ signal peptide ออก โมเดลสามมิติของ fervidolysin (SWISS PORT no. 1r6v.1.A) ประกอบด้วย 4 โดเมน ดังต่อไปนี้ propeptide domain (PD), catalytic domain (CD), sandwich domain 1 (SD1) และ sandwich domain 1 (SD1) (ภาพที่ 7) sandwich domain เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า substrate binding domain



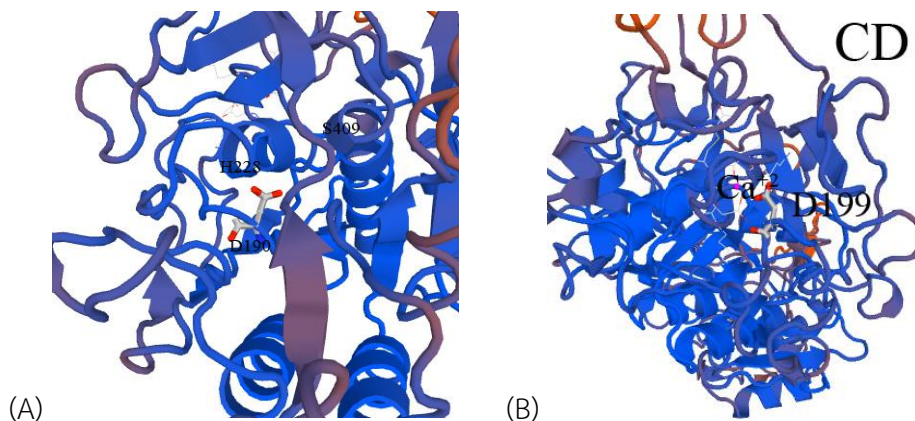
ภาพที่ 7 โมเดล 3 มิติของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM9078<sup>T</sup> (Kim et al., 2004)

โดเมน PD เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า prepeptide หรือ precursor domain อาจทำหน้าที่ช่วยในการขดของเอนไซม์ (folding) และมีบทบาทยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ถูกสังเคราะห์เป็น

propeptidase (ไม่มีกิจกรรม) ซึ่งแบคทีเรียจำเป็นต้องตัดส่วนของ PD ออกโมเลกุลเอนไซม์ตั้งต้น (peptidase precursor) เพื่อให้ได้โมเลกุล mature peptidase

โดเมน CD หรือ catalytic domain (ภาพที่ 8A) มี active amino acid residues คือ aspartic acid (D190) histidine (H228) และ serine (S409) และมี calcium binding site ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน glutamic acid (E157) aspartic acid (D199) lysine (K239) aspartic acid (D241) lysine (K243) และ isoleucine (I245) (ใช้ประจุลบของหมู่ carbonyl เพื่อยึดไอออนแคลเซียม) (ภาพที่ 8B)

โดเมน SD1 และ SD2 อยู่ทาง C-terminal ของโมเลกุลเอนไซม์ พบเฉพาะใน large S8\_subtilase เท่านั้นเชื่อว่าเป็นโดเมนที่มีบทบาทจับกับ สับสเตรทของเอนไซม์ เช่น เคอราตินและไม่พบใน small S8\_subtilase (ภาพที่ 9G, H, I) ผลการศึกษาแสดงว่า small S8\_subtilase อาจไม่สามารถ ย่อยเคอราตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากเอนไซม์เข้าถึงสับสเตรทได้ยาก

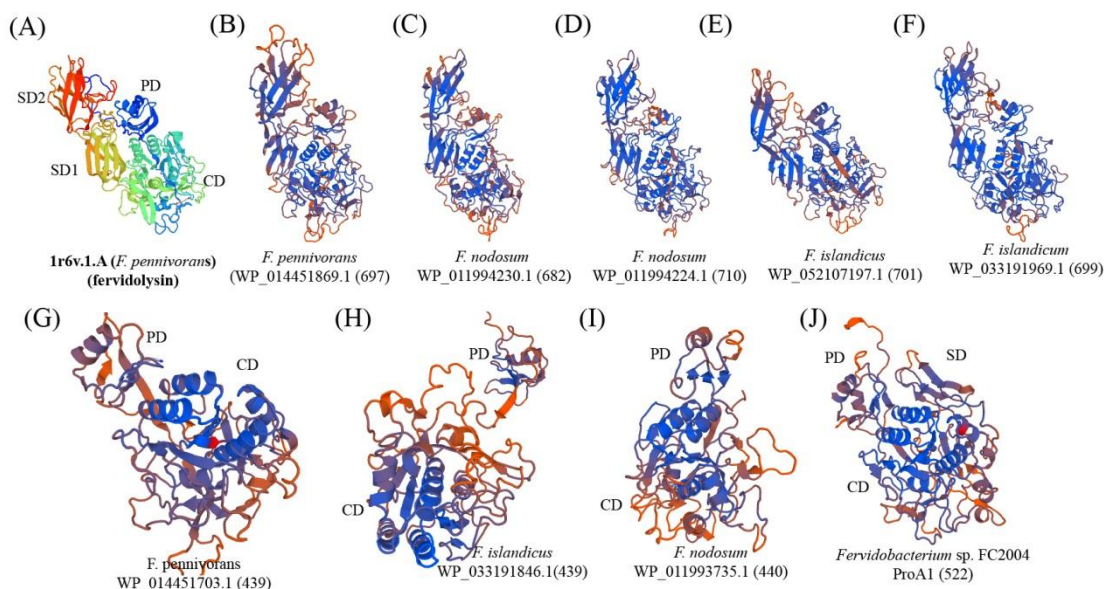


ภาพที่ 8 โดเมน CD ของ ferdidolysin (A) บริเวณ active site และ (B) บริเวณ calcium binding site

การสร้างโมเดลจาก large S8\_subtilases ชนิดอื่น ๆ จาก *Feridobacterium pennivorans* *F. islandicum* และ *F. nodosum* โดยใช้ Ir6v.1.A เป็นแบบแม่พิมพ์ พบว่าโมเดลของ large S8\_subtilases ทุกชนิด มีรูปร่างคล้ายกับ ferdidolysin คือประกอบด้วยโดเมน PD, CD และ SD สองชุด (ภาพที่ 9A, B, C,

D, E, F) จากภาพที่ 9G-J แสดงโมเลกุลของ small peptidase ซึ่งประกอบด้วย PD และ CD โดยไม่พบ SD การสร้าง 3D-model ของ ProA1 ว่า ProA1 ประกอบด้วยโดเมน PD CD และโดเมนที่คล้ายกับ SD (SD-like)

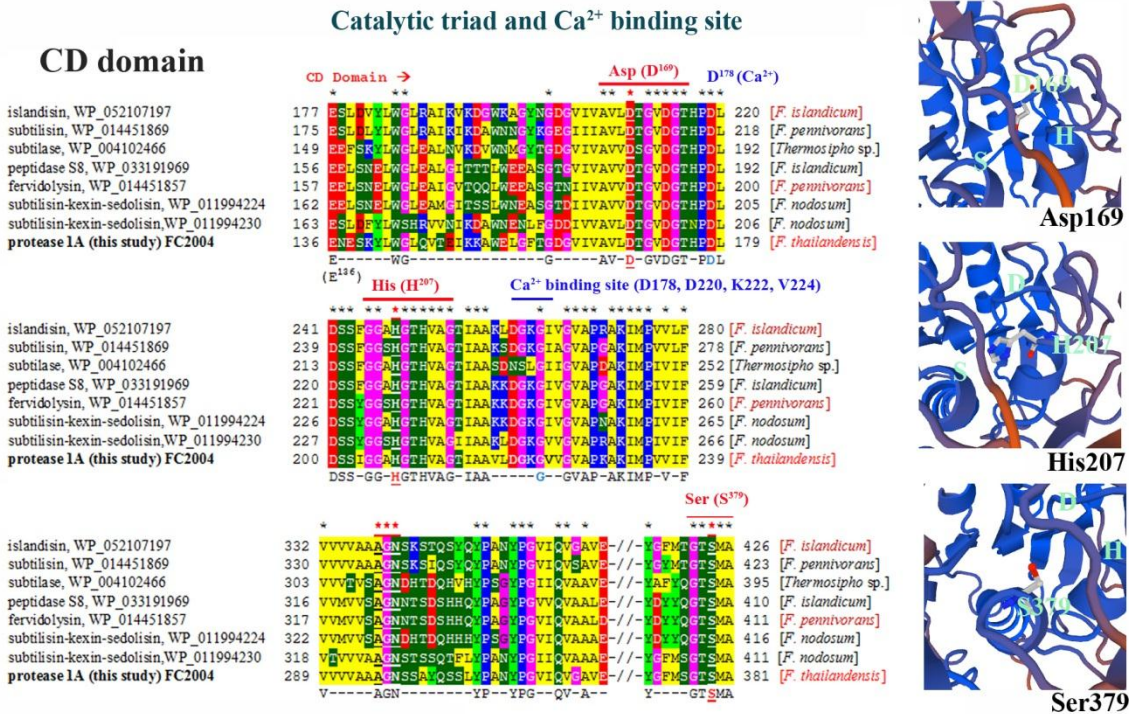
1 ชุดโดยไม่พบชุด SD2



ภาพที่ 9 แสดงโมเดล 3 มิติ (3D-models) ของ peptidase\_S8 family serine proteases จาก *Fervidobacterium pennivorans*, *F. islandicum* และ *F. nodosum* (A) - (F) โมเดลของ large S8\_subtilase (A) fervidolysin (1r6v.1.A เป็นแม่พิมพ์), (B) WP\_014451869.1 (*F. pennivorans*), (C) WP\_011994230.1 (*F. nodosum*), (D) WP\_011994224.1 (*F. nodosum*), (E) WP\_052107197.1 (*F. islandicum*), และ (F) WP\_033191969.1 (*F. islandicum*), (G) - (I) แสดงโมเดล 3 มิติของ small\_S8 subtilases (G) WP\_014451703.1 (*F. pennivorans*), (H) WP\_033191846.1 (*F. islandicum*) และ (I) WP\_011993735.1 (*F. nodosum*) (H) แสดงโมเดล 3 มิติของ ProA1 จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 สัญลักษณ์: ตัวเลขในวงเล็บแทนจำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุล PD แทน propeptide domain, CD แทน catalytic domain และ SD แทน sandwich หรือ substrate binding domain

alignment sequences บริเวณ CD ของ ProA แสดงดังภาพที่ 10 จากภาพที่ 10 พบว่า CD มี highly conserved amino acid sequences และพบ catalytic triad ของ ProA1 ประกอบด้วย aspartic acid (D169) histidine (H207) และ serine (S379) แสดงว่า ProA1 คือ serine protease นอกจากนี้ยังพบ

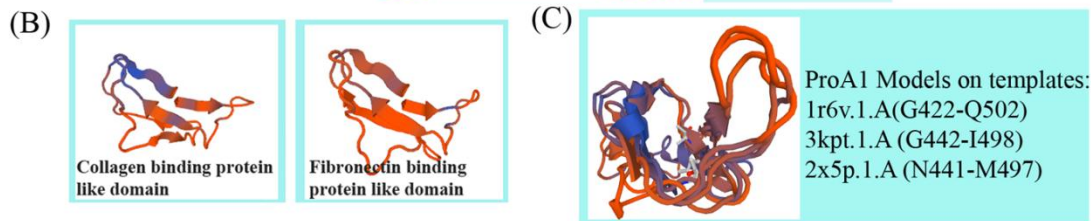
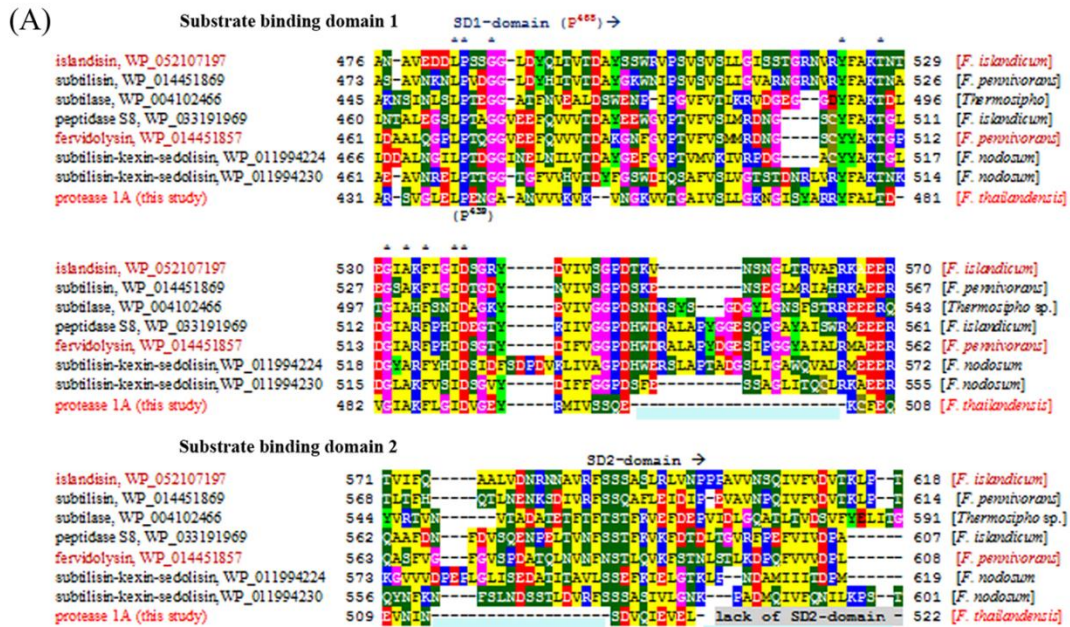
calcium binding site ในโดเมน CD ของ ProA1 (E136, D178, D220, K222, และ V224) แสดงว่า calcium อาจมีผลต่อกิจกรรมของ ProA1



ภาพที่ 10 alignment ของ ProA1 amino acid sequences กับ large S8\_subtilase, fervidolysin และ islandisin

การ alignment บริเวณ C-terminal sequences ของ ProA1 (A431 - Y495 segment) กับ large S8\_subtilases แสดงดังภาพที่ 11 จากภาพที่ 11A พบว่า กรดอะมิโนที่ 431 (A431) ถึง 514 (N514) มี homologous กับบริเวณ SD1 ของ large S8\_subtilases เรียกบริเวณนี้ของ ProA1 ว่า “SD-like” การสร้างโมเดลใช้บริเวณ SD-like region (G422 - Q502) เทียบกับแม่พิมพ์ที่เป็น peotein-protein binding proteins (ภาพที่ 11B, C) ผลการทดลองพบว่า บริเวณ G442 ถึง I498 และ N441 ถึง M497 คล้ายกับ บางส่วนของ collagen adhesion protein (3kpt.1) และ fibronectin binding protein (2x5p.1.A) ตามลำดับ และภาพที่นำมาซ้อนกัน (superimposed) ของบริเวณดังกล่าวกับแม่พิมพ์ทั้งสอง สามารถซ้อนทับกันได้ดี (ภาพที่ 11B, C) ผลการทดลองสนับสนุนว่า SD-like อาจมีคุณสมบัติ protein binding protein คล้ายกับ SD1 ของ fervidolysin อย่างไรก็ตาม ProA1 ไม่มีโดเมน SD2 และความสามารถในการ

ย่อยเคอราตินของ mature ProA1 กับ phenotype ในการย่อยขนเปิดของ *Feravidobacterium* sp. FC2004 จะเกี่ยวข้องกันหรือไม่ ยังไม่ทราบแน่ชัด และจากหลักฐานทาง genome organization (ภาพที่ 6) อาจเป็นไปได้ว่า *Feravidobacterium* sp. FC2004 มี large S8\_subtilase อีกหนึ่งชนิด

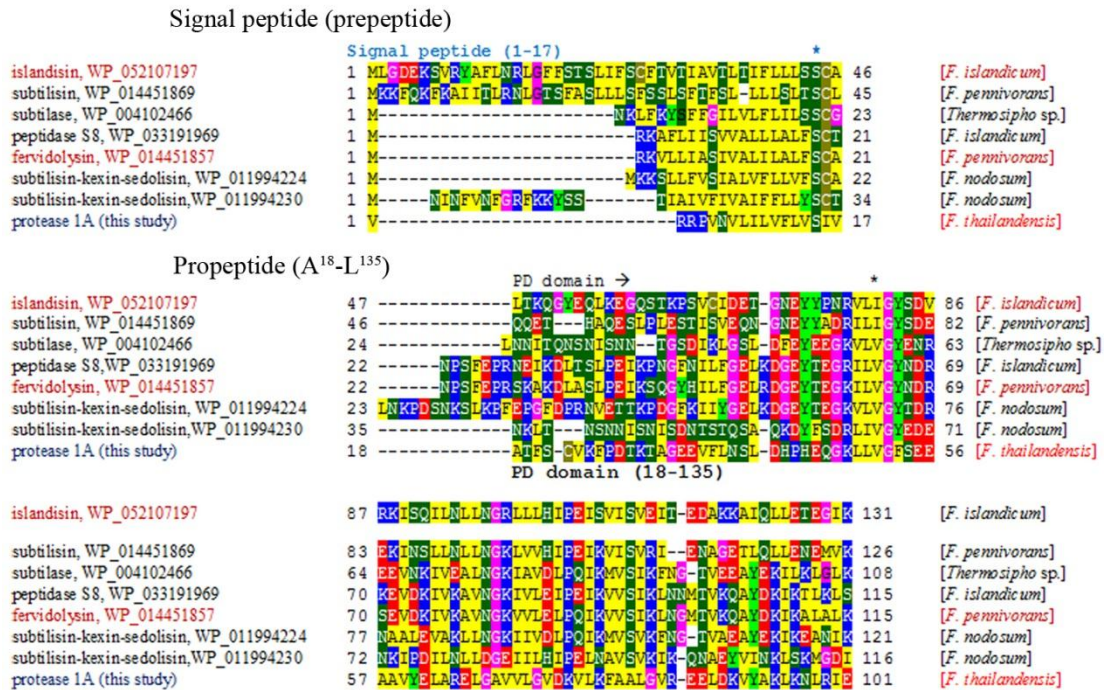


ภาพที่ 11 (A) alignment บริเวณ C-terminal ของ large S8\_subtilases กับ ProA1 (B) 3D-model ของ ProA1 สร้างโดยใช้แม่พิมพ์ 3kpt.1.A (collagen binding protein) และ 2x5p.1.A (fibronectin binding protein like domain) (C) ภาพ superimposed images สร้างจากแม่พิมพ์ที่บริเวณโดเมน SD กับ protein binding domains (1r6v.1.A, 3kpt.1.A and 2x5p.1.A)

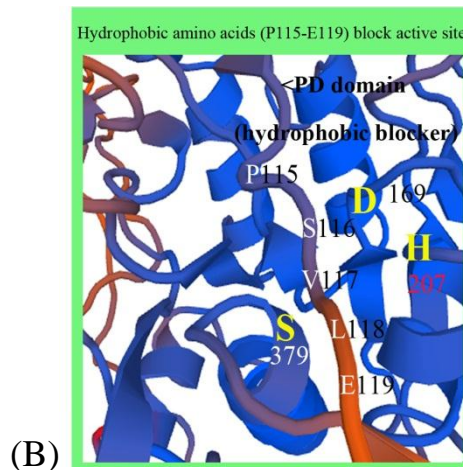
### 6. ProA1 เป็น proS8\_serine protease

การ alignment บริเวณกรดอะมิโนที่ 1-101 (PD) ของ ProA1 กับบริเวณ N-terminal ของ large S8\_subtilases แสดงดังภาพที่ 12 จากภาพที่ 12 บริเวณ N-terminal มีมี homologous ของ nonpolar amino acid sequence (ประมาณ 20 กรดอะมิโน) ตรงกับบริเวณ nonpolar amino acid rich signal peptides ของ peptidases แสดงว่า ProA1 น่าจะมี signal peptide ก่อนหน้าบริเวณ PD signal

peptide เป็นสัญญาณให้แบคทีเรียส่งออก ProA1 ดังนั้นคาดว่า ProA1 ถูกสังเคราะห์เป็น extracellular หรือ membrane bound proProA1 precursor (inactive)



(A)



ภาพที่ 12 (A) alignment บริเวณ signal peptide และ propeptide (B) บริเวณ active groove และ C-terminal ของ PD จากภาพ P115 ถึง L118 พาดขวาง active site (D169, H207 และ S379) ช่วยป้องกันการย่อย substrate

ถัดจาก signal peptide sequence เป็นบริเวณ PD คาดว่า PD อาจเริ่มต้นที่บริเวณใกล้เคียงกับ D27 จนถึงบริเวณใกล้เคียงกับ E136 หรือก่อนหน้านั้นเล็กน้อย PD เป็น homologous sequence ที่มี

conserved hydrophobic regions ภาพที่ 12B แสดงบริเวณ C-terminal ของ PD (P115-E119) ที่พาดผ่าน active groove ของ CD ซึ่งเป็นลักษณะการขดของโปรตีนที่พบตรงกันใน fervidolysin และ small S8\_subtilase (WP\_014451703.1) ทุกชนิด Kim et al. (2004) รายงานว่าบริเวณ homologous C-terminal ของ PD ใน fervidolysin (ภาพที่ 8A) ที่พาดขวางบริเวณ active groove ทำให้ block การเข้าถึงของ substrate (ยับยั้งกิจกรรม ทำให้เอนไซม์ inactive) ทั้งนี้อาจเพื่อป้องกันเกิด mature ProA1 ภายในเซลล์ ป้องกันการย่อยทำลายตัวเอง (protease ทุกชนิดมี PD ช่วยขัดขวางกิจกรรมของ proenzyme) ผลการศึกษาสอดคล้องกับเอนไซม์ fervidolysin และ islandisin (Kluskens et al., 2002; Nam, et al., 2002; Godde, et al., 2005)

ผลการวิเคราะห์แสดงว่า ProA1 จำเป็นต้องตัดส่วนของ PD ออกจากโมเลกุล เพื่อเปลี่ยน ProA1 precursor เป็น mature ProA1

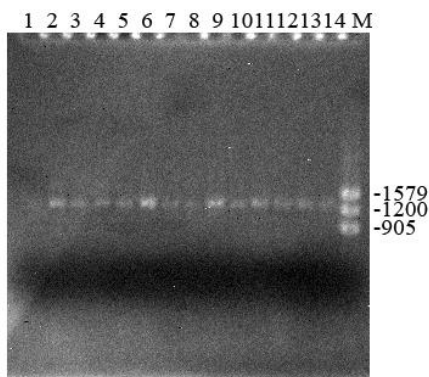
### 7. การ cloning ยีน *proA1*

การจำลองยีน *proA1* ด้วยคู่มือ ProT1AF/ProT1AR ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1579 bp (ภาพที่ 4) และมี ORF ที่แปลรหัสได้ 522 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) ซึ่งประกอบด้วย N-terminal segment ที่เป็น signal peptide (ประมาณ 20 กรดอะมิโน) ถัดมาคือส่วนของ PD (ประมาณ 120 กรดอะมิโน) CD และ SD-like ตามลำดับ (ภาพที่ 10, 11, 12) ซึ่งเป็น proProA1 และน่าจะเป็น inactive peptidase

การจำลองยีน *proA1* ด้วยคู่มือ CD125F/CD421R สามารถจำลองขึ้น DNA ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 905 bp (ภาพที่ 4) ที่มี ORF ที่แปลรหัสได้ 297 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) และเป็นบริเวณที่ครอบคลุม catalytic triad และไม่รวมบริเวณ SD-like (ภาพที่ 10)

การจำลองยีน *proA1* ด้วยคู่มือ CD125F/ProT1AR สามารถจำลองขึ้น DNA ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1200 bp (ภาพที่ 4) ที่มี ORF ที่แปลรหัสได้ 398 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) และเป็นบริเวณที่ครอบคลุม catalytic triad (ภาพที่ 10) และ SD-like (ภาพที่ 11)

ก่อนการโคลนนิ่ง ได้กำจัดนิวคลีโอไทด์และ dNTP ด้วย PCR clean kit ขั้นแรกทำการ cloning โดยวิธี TA cloning ใส่ insert DNA ที่ได้ใน pTG-19 vector และ transform *E. coli* DH5 $\alpha$  การทดลอง cloning ขึ้น DNA ขนาด 1200 bp ซึ่งมีรหัสครอบคลุม บริเวณ CD และ SD-like และเรียกแทนในที่นี้ว่า CDS โปรตีนที่คาดว่าจะได้รับจะเป็น (putative) mature ProA1 ที่มี SD-like domain ในโมเลกุล ผลการทดลองและการ screening หาโคลนที่มี insert (จำลองจากคู่มือ CD125F/ProT1AR) โดยใช้ colony PCR สามารถได้โคลนที่มี plasmid และ insert ที่ต้องการ รูปที่ 13 แสดงผลของ colony PCR จากรูปที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์ของ positive clones ที่ถูกจำลองโดยเทคนิค colony PCR และใช้คู่มือ CD125F/ProT1AR



ภาพที่ 13 Colony PCR แสดงโคลนที่มี insert CDS

ทำการสกัด plasmid 10 โคลน เพื่อทำ sequencing ยืนยันลำดับเบสต่อไป