

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ (Introduction)	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย	2
เนื้อเรื่อง (Main body)	3
1. ตรวจสอบเอกสาร	3
1.1 <u>Thermotogae</u>	3
1.2 <u>เอนไซม์ทนร้อน</u>	6
1.3 <u>Keratinolytic enzyme</u>	7
2. วิธีการศึกษา	9
1. <u>การเตรียมหัวเชื้อ</u>	9
2. <u>วิธีการเตรียมอาหารและวิธีทำลอง</u>	9
3. <u>การสกัด genomic DNA</u>	10
4. <u>การออกแบบไพรเมอร์</u>	11
5. <u>การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี gel electrophoresis</u>	12
6. <u>การเตรียม competent cell</u>	12
7. <u>การวิเคราะห์โมเดลสามมิติ</u>	13
8. <u>การ cloning gene proA1</u>	14
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Comment)	14
1. <u>การค้นหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก</u>	14
2. <u>การค้นหา ยีน protease จาก Fervidobacterium sp. FC2004</u>	15
3. <u>การศึกษา phylogeny ของยีน subtilases</u>	19
4. <u>การศึกษาอัลลีล (allele) ของ large subtilase S8</u>	19
5. <u>การวิเคราะห์โมเดลสามมิติของ ProA1 และการพิสูจน์เอกลักษณ์</u>	23
6. <u>ProA1 เป็น proS8_serine protease</u>	27
7. <u>การ cloning ยีน proA1</u>	29
4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	31
บรรณานุกรม (Bibliography)	35
ภาคผนวก อาหารเลี้ยงเชื้อ	39
ประวัติคณะผู้วิจัย	41

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกแบคทีเรียชอบร้อนและแบคทีเรียชอบร้อนสูงในไฟลัม Thermotogae (Bhandari and Gupta, 2014; Ito et al., 2016)	5
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และค่า annealing temperature ของไพรเมอร์แต่ละคู่	11

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

ภาพที่		หน้า
1	การย่อยขนเป็ดที่ 80 °C โดย <i>Feridobacterium</i> sp. strain FC2004 และ <i>Feridobacterium</i> sp. strain FA004 เทียบกับ uninoculated control (ขวาสุด)	14
2	เซลล์ของ <i>Feridobacterium</i> sp. FC2004 ที่มีการย่อยสลายขนเป็ดหลังจากบ่มไว้ 24 h	15
3	(A) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative <i>proA1</i> บริเวณ 200 เบสก่อนและหลัง open reading frame (ORF) ยีนเริ่มต้นที่ GTG (โคดอน Val) สัญลักษณ์: บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งของไพร์เมอร์ ตัวเอนหนา แทน ribosome binding site และ (B) translated protein (ProA1) ตั้งแต่ นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1095126 ถึง 1099964	16
4	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจำลองด้วยคูไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR สัญลักษณ์: แถวที่ 1 จำลองด้วย ProT1AF/ProT1AR แถวที่ 2 จำลองด้วย CD125F/CD421R และ แถวที่ 3 จำลองด้วย CD125F/ProT1AR	17
5	Phylogenetic analysis ของ proteases ใน super family serine proteases	19
6	แผนผังแสดงตำแหน่งสัมพันธ์ของยีนและ ORFs ...	21-22
7	โมเดล 3 มิติของ feridolysin จาก <i>Feridobacterium pennivorans</i> DSM9078 ^T (Kim et al., 2004)	23
8	โดเมน CD ของ feridolysin (A) บริเวณ active site และ (B) บริเวณ calcium binding site	24

ภาพที่		หน้า
9	แสดงโมเดล 3 มิติ (3D-models) ของ peptidase_S8 family serine proteases จาก <i>Feridobacterium pennivorans</i> , <i>F. islandicum</i> และ <i>F. nodosum</i> (A) - (F) โมเดลของ large S8_subtilase (A) fervidolysin (Ir6v.1.A เป็นแม่พิมพ์), (B) WP_014451869.1 (<i>F. pennivorans</i>), (C) WP_011994230.1 (<i>F. nodosum</i>), (D) WP_011994224.1 (<i>F. nodosum</i>), (E) WP_052107197.1 (<i>F. islandicum</i>), และ (F) WP_033191969.1 (<i>F. islandicum</i>), (G) - (I) แสดงโมเดล 3 มิติของ small_S8 subtilases (G) WP_014451703.1 (<i>F. pennivorans</i>), (H) WP_033191846.1 (<i>F. islandicum</i>) และ (I) WP_011993735.1 (<i>F. nodosum</i>) (H) แสดงโมเดล 3 มิติของ ProA1 จาก <i>Feridobacterium</i> sp. FC2004 สัญลักษณ์: ตัวเลขในวงเล็บแทนจำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุล PD แทน propeptide domain, CD แทน catalytic domain และ SD แทน sandwich หรือ substrate binding domain	25
10	alignment ของ ProA1 amino acid sequences กับ large S8_subtilase, fervidolysin และ islandisin	26
11	(A) alignment บริเวณ C-terminal ของ large S8_subtilases กับ ProA1 (B) 3D-model ของ ProA1 สร้างโดยแม่พิมพ์ 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)	27
12	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	28
13	Colony PCR แสดงโคลนที่มี insert CDS	30

