กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเงินงบประมาณประจำปี 2550 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2549 ถึงเดือนกันยายน 2551

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะรวบรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสาร 2-Acetyl-1-Pyrroline (2-AP) จากรา *Aspergillus terreus* ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟต์ของข้าว และรา *Acremonium nigricans* ที่มีความสามารถในการสร้างสาร 2-AP ในอาหารสังเคราะห์ได้ โดยยีนเป้าหมายหลักที่จะศึกษาคือยีนที่ควบคุมการสร้างสารหอม 2-AP คือยีน Betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*) ผลการวิจัยสามารถค้นพบยีนที่คาดว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับ pathway การสร้างสารหอม 2-AP จำนวนทั้งหมด 2 ชิ้นเป็นชิ้นยีนขนาด 4,673 เบสและขนาด 1,376 เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BlastN) และลำดับของกรดอะมิโนพบว่าชิ้นยีนทั้งสองชิ้นมีความคล้ายคลึงกับบางส่วนของ complete genome (contig) และ hypothetical protein ของรา *Aspergillus niger* มากกว่า 90% ซึ่งในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าส่วนของยีนทั้งสองชิ้นนี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP

Abstract

The objective of this research was to construct partial genomic DNA libraries of the endophytic fungus of rice, *Aspergillus terreus* and a soil fungus, *Acremonium nigricans*, which are capable to produce 2-Acetyl-1-Pyrroline (2-AP) in the synthetic medium. Betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*) was the target gene of this study. This gene has been proved to be a regulatory gene for the biosynthesis of 2-AP in plants and other microbes. Two positive clones with high homology to *badh* were identified in which each clone contained a fragment of 4,673 and 1,376 bp respectively. In-depth analysis of the sequences by BlastN and BlastX showed high similarity and identity (>90%) between these 2 fragments and unidentified contig and a hypothetical protein of *Aspergillus niger*. However, it can not be confirmed at this point whether these genes involve in the biosynthesis of 2-AP or not.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 1

บทคัดย่อ 2

Abstract 3

สารบัญเรื่อง 4

สารบัญตาราง 6

สารบัญรูป 7

บทนำ

- ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 8
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 9
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 9
- ขอบเขตของโครงการวิจัย 9

การทบทวนวรรณกรรม/สารนิเทศที่เกี่ยวข้อง

- การสร้าง DNA library 10
- การหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing) 23
- สาร 2-Acetyl-1-Pyrroline (2-AP) 25
- การศึกษาอณูชีววิทยาของการสังเคราะห์สาร 2-Acetyl-1-Pyrroline 25

วิธีดำเนินงานวิจัย

- เชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อ 29
- การสกัด genomic DNA 30
- การสกัด DNA ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit 31
- การเตรียม template DNA เพื่อทำ genomic DNA library 32
- การทำ Southern Hybridization 32
- การเตรียม DNA เพื่อใช้ในการโคลนนิง 34
- การโคลนนิง 34
- การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis method 36
- การทำ sequencing 36

ผลการวิจัยและวิจารย์ผลการทดลอง

- การเตรียม genomic DNA ที่มีความสมบูรณ์ 37

หน้า

การเตรียม complete genomic DNA library 37
การเตรียม partial DNA library 39
การหาลำดับเบสของยีนที่โคลนได้ 43
สรุปและข้อเสนอแนะ 49
เอกสารอ้างอิง 50
ภาคผนวก ก 55
ภาคผนวก ข 67

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและค่า Purity ของ genomic DNA ที่สกัดได้ 37
ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีที่ได้จากวิธี transformation ของชิ้น DNA ขนาดต่างๆ 42
ตารางที่ 4.3 ผลการทำ BlastN ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ XhoI และ HindIII กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน 45
ตารางที่ 4.4 ผลการทำ BlastN ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ XhoI กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน 46
ตารางที่ 4.5 ผลการทำ BlastX ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ XhoI และ HindIII กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน 47
ตารางที่ 4.6 ผลการทำ BlastX ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ XhoI กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน 47

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แผนที่ของพลาสมิด pZErO™-2 เวคเตอร์ 13

รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline 25

รูปที่ 4.1 Genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่สกัดได้ 37

รูป 4.2 Partial digestion genomic DNA ของรา *A. nigricans* ด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI เทียบกับ marker Lambda/*Hin*dIII/*Eco*RI 38

รูปที่ 4.3 Genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII *Eco*RI *Xho*I *Bam*HI *Eco*RI/*Hin*dIII และ *Xho*I/*Hin*dIII 39

รูปที่ 4.4 Positive signal บน Southern blot analysis จาก genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์แบบสมบูรณ์ชนิดต่างๆ 40

รูปที่ 4.5 ตัวอย่าง DNA ของยีนที่โคลนได้จากชิ้น insert DNA ขนาด 4.5 กิโลเบสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hind*III 42

รูปที่ 6.1 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII กับลำดับเบสของ contig An11c0070 จากรา *A. niger* 62

รูปที่ 6.2 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I กับลำดับเบสของ contig An02c0390 จากรา *A. niger* 64

รูปที่ 6.3 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I กับลำดับเบสของ hypothetical protein ของ *A. niger* CBS 513.88 65

รูปที่ 6.4 ผลการทำ BlastX ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII กับลำดับเบสของ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An11g02230) ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 66

รูปที่ 6.5 ผลการทำ BlastX ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I กับลำดับเบสของ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An02g12290) ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด 66

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) เป็นสารเคมีหลักที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมของข้าวหอมสายพันธุ์ต่างๆ กลิ่นหอมของใบเตย กลิ่นหอมของข้าวโพดคั่วและงาคั่ว เป็นต้น (Buttery และคณะ 1983; Buttery และคณะ 1994 และ Schieberle 1996) คุณลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้ข้าวหอมเป็นที่นิยมสำหรับการบริโภค โดยเฉพาะข้าวหอมมะลิของประเทศไทย ซึ่งทำรายได้เป็นอันดับหนึ่งของสินค้าเกษตรส่งออกของประเทศ แหล่งของสาร 2-AP พบได้ทั้งในพืช เช่น ข้าว แบคทีเรีย และรา โดยในข้าวพบว่าปริมาณของสาร 2-AP ต่อน้ำหนักแห้งมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับที่พบในจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวที่ได้จากข้าวมีความเสถียรต่ำ ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตสาร 2-AP จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตเชิงพาณิชย์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ารา *Acremonium nigricans* สามารถสร้างสาร 2-AP ได้ถึง 3.45 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ SYN18 ที่ประกอบด้วยกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร และ putrescine 2 กรัมต่อลิตร (Apintanapong, 1998) ในขณะที่ *Bacillus cereus* ATCC 27522 สามารถผลิตสารประกอบดังกล่าวได้ถึง 26.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม PCA เมื่อใช้เวลาเลี้ยงเพียง 3 วันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) (Adams A. and Kimpe N. D., 2006) อย่างไรก็ดีปริมาณสาร 2-AP ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ wild type ยังน้อย ไม่เพียงพอต่อการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม การประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อศึกษาและเข้าใจถึงกระบวนการสร้าง 2-AP จุลินทรีย์หรือพืชจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างสาร 2-AP ในระดับโมเลกุล ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการทำ whole genome sequence ของจุลินทรีย์กันมากขึ้น แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายสูง และต้องมีผู้เชี่ยวชาญด้าน Bioinformatics สำหรับจัดเรียงและ identify sequence ให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นข้อจำกัดหลักของคณะผู้วิจัย อย่างไรก็ดีวิธีการทำ genomic library เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะนำไปสู่การค้นหายีนที่มีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP ได้ จากการที่ได้มีรายงานว่าวิถีการสร้างสาร 2-AP ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะข้าวนั้น มียีนหลายยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อวิถีการสร้างสารนี้ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถโคลนยีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมดได้ เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาเป็นงานวิจัยในพืช ซึ่งมีจีโนมที่ใหญ่กว่าแบคทีเรียและรา และมีความซับซ้อนในระดับพันธุกรรมมาก ทำให้การศึกษาเป็นไปได้อย่างช้าๆ ในงานวิจัยนี้จึงจะใช้รา *Acremonium nigricans* เป็นโมเดลในการค้นหายีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP โดยในลำดับแรกจำทำการสร้าง partial genomic DNA library ของราชนิดนี้ขึ้นมาก่อนเพื่อใช้เป็นแหล่งที่จะค้นหายีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อสร้าง libraries ของชิ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมของรา *Acremonium nigricans* และ *Aspergillus terreus* สำหรับค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ collections ของชิ้นส่วนของยีนต่างๆ จาก genome ของรา ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สร้าง genomic DNA library จากราเอนโดไฟต์ *Acremonium nigricans* และ *Aspergillus terreus* โดยการสกัด genomic DNA จากเซลล์ เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ฝาจแลมบ์ดา และนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อให้ได้ genomic library สำหรับการตรวจหายีน

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารนิเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสร้าง DNA library

DNA library หมายถึง กลุ่มของ DNA ที่รวบรวมมาจากสิ่งมีชีวิต เซลล์ หรือสภาวะใดสภาวะหนึ่งของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียหรือเวคเตอร์ชนิดต่างๆ ในการนำเข้าสู่เซลล์ในสภาวะใด สภาวะหนึ่งของเซลล์

DNA library แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ cDNA library และ genomic library

cDNA library คือประชากรของแบคทีเรียหรือประชากรของเฝจที่มีชิ้น DNA ซึ่งเป็นตัวแทนของยีนที่มีการแสดงออกในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งหรือช่วงเวลาหนึ่งขณะที่นำมาสกัดแยก RNA ดังนั้น cDNA library จะไม่คลอบคลุมชิ้น DNA ของยีนทั้งหมดในจีโนม เป็นเพียงตัวแทนของยีนบางยีนที่มีการแสดงออกเท่านั้น ทำให้ขนาดของ cDNA library มีขนาดเล็กกว่า genomic DNA library นอกจากนี้ยีนบางยีนมีการควบคุมการแสดงออกโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเจริญเติบโตและมีการแสดงออกจำกัดเฉพาะในเนื้อเยื่อหรือสภาวะหนึ่ง ดังนั้นถ้าต้องการโคลนยีนที่มีคุณสมบัติแบบจำเพาะ จำเป็นต้องมีข้อมูลของยีนที่สนใจเพื่อจะแยก RNA จากระยะการเจริญเติบโตและเนื้อเยื่อที่ถูกต้อง

Gemonic library คือ ประชากรของแบคทีเรียหรือเฝจที่มีชิ้น DNA ต่างๆ ที่ได้จากเซลล์ทั้งหมดของจีโนมไม่ว่าจะเป็นส่วนของยีนหรือไม่ และเป็นยีนที่มีการแสดงออกหรือไม่ก็ตาม เกิดจากการนำ DNA ที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมดและมีขนาดใหญ่ เมื่อจะนำมาต่อเข้ากับเวคเตอร์จึงต้องนำมาตัดให้มีขนาดเล็กลงก่อนเพื่อให้มีขนาดเหมาะสมสำหรับการโคลน (สุรินทร์, 2543)

การสร้าง genomic DNA library มีความสำคัญต่องานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้นในการคัดแยกและคัดเลือกยีนที่เราสนใจเพื่อมาศึกษา การทำ gene mapping และ sequencing ก็จะทำให้เรามีข้อมูลพื้นฐานที่จะศึกษาในเชิงลึกและทำความเข้าใจกระบวนการของยีนเหล่านั้นมากยิ่งขึ้น ดังนั้นในการสร้าง genomic DNA library จึงจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจรวมถึงเทคนิคเฉพาะในการสร้างเพื่อที่จะได้ library ที่มีคุณภาพดี มียีนที่เราต้องการครบถ้วนสมบูรณ์ โดยขั้นตอนการสร้าง genomic DNA มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1.1 การสกัด DNA และการทำให้บริสุทธิ์

Genomic DNA จะถูกแยกออกจากโปรตีนและเซลล์ด้วยกระบวนการของเอนไซม์หรือโดยการใช้แรงกลต่างๆ เช่น การบด การเขย่าอย่างรุนแรง หรือใช้สารเคมีที่ทำให้เซลล์แตก เช่น sodium dodecyl sulfate tween-20 หรือใช้เอนไซม์ซึ่งช่วยย่อยองค์ประกอบ polysaccharide บริเวณผนังเซลล์ภายนอก เช่น

lysozyme นอกจากนี้ยังมีการใช้ proteinase K เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ และใช้ Dnase-free Rnase เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของ RNA ที่เราไม่ต้องการ จากนั้นทำ DNA ที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยการสกัดด้วย phenol-chloroform ตามด้วยการตกตะกอน DNA ด้วย ethanol ส่วน genomic DNA ที่สกัดได้และถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วควรเก็บไว้ในสารละลาย Tris buffer ที่ปราศจาก nuclease หรือในน้ำสะอาดที่ปราศจาก nuclease เนื่องจากการปนเปื้อน nuclease เป็นปัญหาที่พบบ่อยในการสกัด DNA โดย nuclease จะไปย่อยสลาย DNA วิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของ nuclease ทำได้โดยแบ่ง DNA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA ที่สกัดมาได้ หากพบการปนเปื้อนจะเห็นได้ว่า DNA ที่ผ่านการบ่มจะมีการย่อยสลายไป ต้องกลับไปสู่กระบวนการกำจัดโปรตีนออกอีกครั้งหนึ่ง

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA มีความสำคัญและจำเป็นมากในการทำ genomic library ซึ่งควรทำการตรวจสอบภายหลังขั้นตอนการทำ DNA ให้บริสุทธิ์เพื่อให้มั่นใจว่าปราศจากการปนเปื้อนซึ่งจะส่งผลยับยั้งประสิทธิภาพการนำไปใช้ในการโคลนนิงต่อไป ความบริสุทธิ์ของ DNA สามารถคำนวณได้จากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยทั่วไปกรดนิวคลิอิกจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรที่สูง และโปรตีนจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่สูง ดังนั้นสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรของ DNA ต้องมีค่าสูง นั่นคือ DNA ที่มีค่าความบริสุทธิ์มากจะมีค่าเข้าใกล้ 2.0 ส่วนที่ยอมรับได้ในการนำไปใช้ในการโคลนนิงต่อได้ต้องมีค่ามากกว่า 1.7 ปริมาณของ DNA สามารถวัดได้จากเครื่อง UV Spectroscopy, Fluorometry หรือโดยการเทียบกับ standard ladder บน agarose gel electrophoresis (Struble และคณะ, 2009)

มีรายงานการศึกษาการสกัด genomic DNA จากรา *Cunninghamella elegans Phanerochaete chrysosporium Fusarium oxysporum* และ *Trichosporon cutaneum* โดยทำการบดตัวอย่างกับน้ำแข็งแห้งและใช้บัฟเฟอร์ที่ใช้ย่อยสลายเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 3 ml ของ 5M $NaCl_2$ และ 2 ml ของสารละลาย 10% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ใน 0.7M NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 45 นาที พร้อมเขย่าเป็นระยะๆ สกัดเอาโปรตีนออกด้วย chloroform : isoamylalcohol (24 : 1 v/v) แล้วตกตะกอน genomic DNA ด้วย isopropanol หลังจากนั้นล้างเกลือที่ปนเปื้อนอยู่ออกด้วย 70% ethanol เมื่อดูความบริสุทธิ์ของ DNA ที่ได้พบว่าอยู่ในเกณฑ์ดี ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 1.8 – 1.9 มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการโคลนนิงต่อได้ (Zhang และคณะ, 1996)

แต่โดยทั่วไปในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาชุด kit ในการสกัด DNA ให้เลือกมากมายตามความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งาน ซึ่งชุด kit นี้จะพยายามหลีกเลี่ยงการใช้ phenol-chloroform ในการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากมีการศึกษามาแล้วว่า phenol-chloroform มีความเป็นพิษและสามารถไปรบกวนปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อๆ ไปได้ โดยจะใช้สาร chaotropic agent เช่น guanidine

hydrochloride เป็นตัวช่วยทำให้ย่อยเซลล์และตกตะกอนโปรตีนด้วยแล้วจึงนำไปผ่านตัว silica column เพื่อทำให้ DNA บริสุทธิ์ การใช้สารดังกล่าวมีการอ้างอิงในรายงานของ Jian-Rong Guo และคณะในปี 2005 ซึ่งใช้ชุดสกัด genomic DNA ที่มี DNAzol reagent ซึ่งมีส่วนประกอบของสาร guanidine hydrochloride ในการสกัด DNA ของกลุ่ม phytopathogenic fungi 25 ชนิดได้ในขั้นตอนเดียว ทำให้ประหยัดเวลาได้เป็นอย่างมาก แต่เมื่อวัดความบริสุทธิ์ของ DNA จากค่าการดูดกลืนแสง 260/280 นาโนเมตร กลับพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.5 – 1.9 ซึ่งค่า ratio ที่น้อยกว่า 1.7 มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอต่อการนำไปทำ genomic library แต่วิธีนี้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็ว มีขั้นตอนการสกัดน้อย จึงทำให้ได้ DNA yield ค่อนข้างสูง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 306 – 1,927 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของไมซีเลียม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการเตรียม DNA เพื่อใช้ในงานด้าน PCR ต่อได้

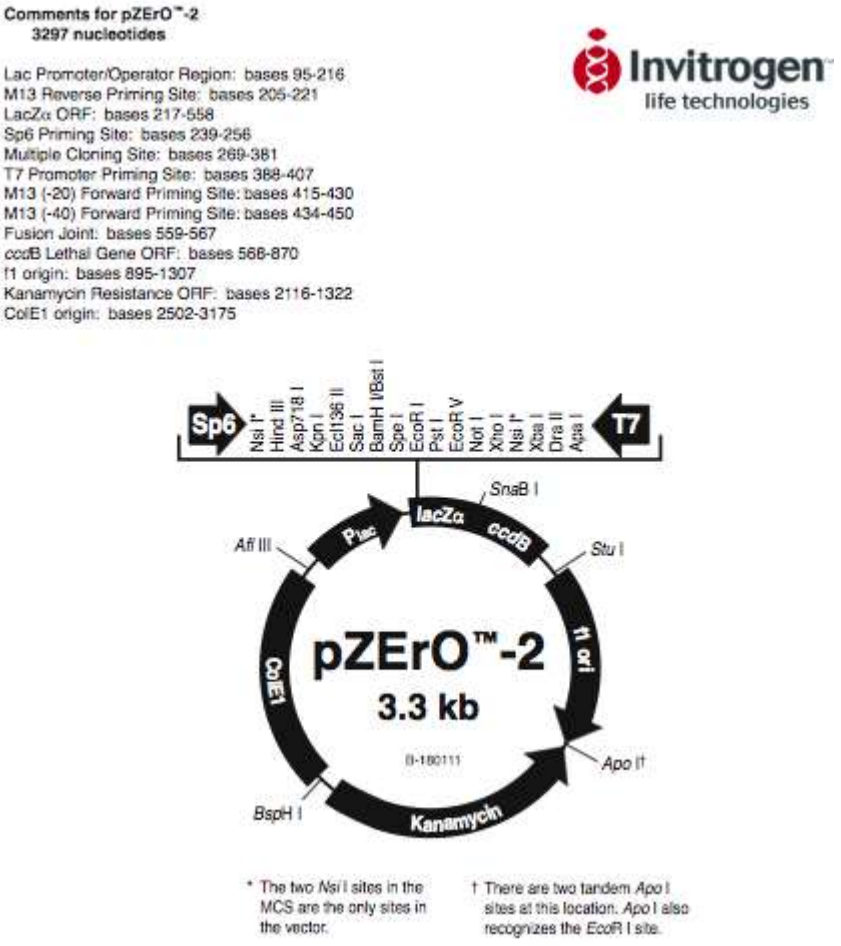
2.1.2 การเลือกและการเตรียมเวคเตอร์ในการสร้าง genomic DNA library

การเลือกเวคเตอร์ให้เหมาะสมกับการใช้งานจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ขนาดของชิ้น insert DNA, ปริมาณ copy number ที่ต้องการ, selective marker และเซลล์เจ้าบ้านที่จะใช้ถ่ายฝาก recombinant DNA อย่างไรก็ตามเวคเตอร์ที่เลือกมาใช้ทำ library ควรมีความคงตัว (stable) สูงภายหลังจากที่ถ่ายฝาก recombinant DNA เข้าไปแล้ว และต้องมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณหรือจำลองตัวเองในเซลล์เจ้าบ้านได้ดี เวคเตอร์ที่นิยมในการนำมาใช้ทำ library ได้แก่ พลาสมิด เนื่องจากมีวิธีการเตรียมและใช้งานที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเท่าการใช้เวคเตอร์ชนิดอื่น และในปัจจุบันมีการดัดแปลง พลาสมิดเพื่อให้เหมาะสมกับงานที่ใช้

2.1.2.1 พลาสมิด

พลาสมิดเป็น DNA ที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีการพันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoiled) มีขนาดตั้งแต่ 1 พันคู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส หรือประมาณ 0.2-4% ของโครโมโซม โดยธรรมชาติการถ่ายทอดพลาสมิดจาก เซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาสมิดนั้น จะเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่คล้ายกับการ conjugation นั่นเอง พลาสมิดบางชนิดก็สามารถส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ เรียกว่า เป็น conjugative หรือ self transmissible plasmid เนื่องจากในพลาสมิดมียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายชิ้นพลาสมิดชนิดนั้น คือ ยีน *tra* (transfer) อยู่ พลาสมิดบางชนิดไม่มียีน *tra* อยู่ในส่วนหนึ่งส่วนใด ทำให้ไม่สามารถส่งพลาสมิดจากเซลล์เดินไปสู่เซลล์ใหม่ได้ จัดเป็น non conjugative plasmid คือ ขาดคุณสมบัติการเป็น self transmissible พลาสมิดกลุ่มหลังนี้จะส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ที่ต้องการได้ในห้องปฏิบัติการ โดยแยกพลาสมิดนี้ออกมาจากเซลล์เดิมก่อน แล้วสั่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่ โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอา DNA จากภายนอกเข้าไปได้โดยกระบวนการ transformation

พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีน นิยมใช้ที่มีขนาดเล็ก และต้องมียีนเครื่องหมาย (maker gene) ที่กำหนดลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้และมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง 1 ตำแหน่ง (unique site) สาเหตุที่ต้องเลือกใช้พลาสมิดที่ขนาดเล็กเพราะพลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะทนต่อการขาดในระหว่างขั้นตอนต่างๆ และเมื่อนำไปเชื่อมต่อกับชิ้น DNA ที่ต้องการโคลนแล้ว ขนาดต้องไม่ใหญ่มากนัก ถ้าขนาดใหญ่มากเมื่อนำไปถ่ายลงในเซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี transformation จะเกิดได้ยาก การสอดใส่ชิ้น DNA (DNA insert) เข้าไปในพลามิด มักจะใส่เข้าไปตรงตำแหน่งภายในยีนใดยีนหนึ่งของพลาสมิด เมื่อมีการสอดใส่ DNA ลงไป กิจกรรมของยีนดังกล่าวก็จะเสียไป ทำให้จำแนกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดดั้งเดิมได้ เรียกว่า insertional inactivation มีประโยชน์ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformant) แต่ถ้ายีนที่ต้องการโคลนมีคุณสมบัติพิเศษอยู่แล้วก็สามารถตรวจสอบได้โดยไม่ต้องใช้ คุณสมบัติข้อนี้ ปัจจุบันการใช้พลาสมิดเป็นเวคเตอร์ที่สามารถรับเอาชิ้น DNA เข้าไปมีให้เลือกใช้หลายชนิดตามผู้ผลิตแต่ละบริษัทจะดัดแปลงออกมาวางจำหน่าย เนื่องจากการทำ genomic DNA library ต้องมีการโคลนด้วยชิ้น insert DNA ที่โดยส่วนมากค่อนข้างมีขนาดใหญ่ ดังนั้นการเลือกพลาสมิดเวคเตอร์ให้รองรับชิ้น insert DNA ได้อย่างเหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงเป็นอันดับแรก พลาสมิด pZErO™-2 (Invitrogen, U.S.A.) เป็นพลาสมิด



รูปที่ 2.1 แผนที่ของพลาสมิด pZErO™-2 เวคเตอร์

(เข้าถึงได้จาก: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pzero2.pdf วันที่ค้นข้อมูล: 16 มีนาคม 2554)

เวคเตอร์แบบ supercoiled ขนาด 3.3 กิโลเบส (รูปที่ 2.1) ที่ออกแบบมาสำหรับโคลนชิ้น DNA ชนิด blunt end และช่วยลด background ของ non-recombinant ได้ด้วย และยังเป็นพลาสมิดที่สามารถรับขนาดของชิ้น DNA ได้ประมาณ 5 กิโลเบส ซึ่ง พลาสมิด pZErO™-2 จะมียีน *ccd*B เชื่อมต่อกับส่วน C-terminus ของ *Lac*Zα ดังนั้นการสอดใส่ชิ้น DNA เข้าไปจะไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *Lac*Zα- *ccd*B ทำให้มีเพียง positive recombinant เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ ส่วนเซลล์ที่มี non-recombinant เวคเตอร์ก็จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ พลาสมิดเวคเตอร์ดังกล่าวมี kanamycin resistance gene สำหรับการคัดเลือกในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* และเป็นเวคเตอร์แบบ multiple cloning site (17 unique sites) มี Sp6 และ T7 เป็นส่วน promoter/priming sites สำหรับกระบวนการ *in vitro* transcription และ sequencing (สุรินทร์ 2543)

2.1.2.2 เฝจแลมบ์ดา (lambda phage)

เฝจแลมบ์ดามีจีโนมเป็น DNA เกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส เมื่ออยู่ภายในอนุภาค ของเฝจ DNA จะเป็นสายยาว มีปลาย 5’ เป็นสายเดี่ยวยาว 12 เบส เข้าคู่กันได้กับอีกปลายหนึ่ง แต่เมื่อเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* แล้วปลายที่เป็นสายเดี่ยวนี้จะวกกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นเป็น DNA รูปวงแหวน และจะมีการลอกรหัสเป็น RNA หรือจำลองตัวในแบบวงแหวน เฝจแลมบ์ดามีการดำรงชีวิตได้ 2 แบบ คือ (1) lytic pathway โดย DNA ของไวรัสที่เข้าไปในเซลล์จะจับตัวเป็นวงแหวน แล้วลอกรหัสเป็นอาร์เอ็นเอและแปลรหัสเป็นโพลีเพพไทด์ ได้ผลผลิตของยีนต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งมีการจำลองโมเลกุลของ DNA โดยช่วงแรกเกิดแบบ theta แล้วต่อมาเปลี่ยนเป็นแบบ rolling circle ได้ DNA ที่เป็นสายยาวต่อกันมากเกินหว่าความยาว 1 หน่วย โดยไม่มีการตัดออกเป็นหน่วยย่อย เรียกว่า catenated DNA ซึ่งจะเหมาะสำหรับการบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มส่วนหัว (head protein) ของเฝจ และมีการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสออกมา ตรวจสอบได้อย่างง่าย ๆ โดยศึกษาจากการเกิด plaque (2) lysogenic pathway โดย DNAของไวรัสซึ่งจับตัวกันเป็นวงแหวนจะไปเกาะกับโครโมโซมของแบคทีเรียที่ตำแหน่งจำเพาะ (att) แล้วเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA (recombination) ทำให้จีโนมของเฝจแทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย (integration) เป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม เรียกว่า โปรเฝจ (prophage) เมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของโครโมโซมและแบคทีเรียแบ่งเซลล์ ส่วนโปรเฝจนี้จะจำลองโมเลกุลและถูกส่งต่อไปยังเซลล์ลูกด้วยแบคทีเรีย ที่มีโปรเฝจอยู่ด้วย เรียกว่า lysogen บางครั้งโปรเฝจที่อยู่รวมกับโครโมโซมของแบคทีเรียนี้อาจ หลุดออกมา (excision) และเปลี่ยนกลับมาดำเนินชีวิตแบบ lytic ทำให้เซลล์ตายและผลิตอนุภาค ไวรัสอีกครั้งหนึ่ง DNA ของเฝจแลมบ์ดา wild type จะมีตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะไม่เหมาะ สม การใช้เฝจนี้เป็นเวคเตอร์จึงต้องมีการสร้าง mutant ที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์เพียงตำแหน่งเดียว สำหรับสอดใส่ยีนเข้าไปได้ เรียกว่า insertional vector หรือเป็นเฝจที่มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2

ตำแหน่งที่อยู่ห่างกัน เพื่อตัดเอาชิ้นส่วนที่ไม่จำเป็นออกไปและแทนที่ด้วย DNAที่ต้องการโคลน เรียกว่า replacement vector

เฝจแลมบ์ดาประกอบด้วยส่วนหัวเป็นที่บรรจุ DNA ส่วนหัวของเฝจนี้จะมีขนาดที่คงที่ การ บรรจุ DNA ลงไปจึงจำกัด คือ ใส่ได้มากกว่าปกติเพียงประมาณ 5% เท่านั้น และถ้าใส่ DNA น้อยเกินไป คือ ขนาดเล็กเกินไปเฝจที่ได้จะไม่สามารถทำให้เกิด plaque ได้ ปริมาณ DNA ที่สามารถบรรจุ ลงในส่วนหัวของเฝจแล้วยังทำให้อนุภาคนั้นสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์และทำให้เกิด plaque ได้ตามปกติ (infective phage) คือ ช่วงระหว่าง 78-105% ของปริมาณ DNA ปกติเท่านั่น ดังนั้นการใช้เฝจเป็นเวคเตอร์ถ้าตัด DNA ส่วนที่ไม่จำเป็นของเฝจออกไปมาก DNA ที่เหลืออยู่จะไม่สามารถทำให้เกิดอนุภาคที่เป็น infective ได้ จากหลักการนี้เองที่นำมาใช้สร้างเวคเตอร์แบบ replacement โดยตัด DNA บางส่วนของเฝจออกไป ส่วนที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอที่จำทำให้เกิด infective phage ได้ ต้องมีชิ้น DNA อื่นใส่ลงไปด้วย เมื่อตัดต่อชิ้น DNA ที่ต้องการโคลนเข้ากับ DNA ของเฝจที่ใช้เป็น (in vitro packaging) แล้วจึงนำอนุภาคของเฝจนี้เข้าสู่เซลล์โดยวิธี transduction ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี transformation ประมาณ 100 เท่า การบรรจุ DNA ลงในโปรตีนห่อหุ้มของเฝจนั้นที่สำคัญ คือ ต้องมี DNA สายยาวที่มี cos site อยู่ห่างกันตามกำหนด และมีโปรตีนที่เป็นส่วน prehead ส่วนหางและอื่น ๆ อยู่ครบถ้วน (สุรินทร์ 2543)

2.1.2.3 คอสมิด (cosmid)

คอสมิดมีส่วนของ DNA ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวในแบคทีเรีย มียีนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์นี้ และมี cos site ของเฝจแลมบ์ดาเพื่อช่วยให้สามารถบรรจุ DNA ลงในโปรตีนห่อหุ้มของเฝจแลมบ์ดาได้ โดยสอดใส่ชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่ลงในเวคเตอร์นี้เพื่อทำให้ cos site อยู่ห่างกันประมาณ 37-51 กิโลเบส ซึ่งสามารถบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของเฝจแลมบ์ดาได้ เช่น คอสมิด pJB8 มีขนาด 5.4 กิโลเบส จึงสามารถใส่ชิ้น DNA ที่มีขนาดถึง 32-46 กิโลเบส เมื่อตัดต่อ ชิ้น DNA ที่ต้องการเข้ากับคอสมิดแล้วจึงบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของเฝจในหลอดทดลองเช่นเดียวกับเวคเตอร์จากเฝจแลมบ์ดานั่นเอง แล้วจึงนำคอสมิดลูกผสมที่อยู่ในรูปอนุภาคเฝจนี้ใส่ลงในเซลล์โดยวิธี transduction เมื่อ DNA ของคอสมิดเข้าสู่เซลล์แล้วจะไม่สามารถสร้างอนุภาคเฝจได้ แต่จะจำลองโมเลกุลของ DNA และคัดเลือกโดยใช้ยีนเครื่องหมายแบบเดียวกับ พลาสมิด เช่น ในคอสมิด pJB8 นี้จะคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

จากเวคเตอร์ชนิดต่างๆ ที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่า พลาสมิด เป็นเวคเตอร์ที่มีความนิยมใช้ในการทำโคลนนิงมากที่สุด เนื่องจากถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ง่ายที่สุด ตำแหน่งที่ตัดเอนไซม์ไม่ซ้ำซ้อนมาก (unique sites for restriction enzyme) รวมถึงการเพิ่มจำนวนก็ทำได้รวดเร็ว ส่วนเฝจแลมบ์ดาและคอสมิดนั้น มีการใช้งานที่ยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าแม้จะสามารถบรรจุ DNA ที่ต้องการได้ยาวกว่าก็ตามเมื่อเลือกเวคเตอร์ที่เหมาะสมในการทำโคลนนิงแล้ว ต้องมีการเตรียมพลาสมิดเวคเตอร์ให้มีความบริสุทธิ์ก่อนนำมาทำการโคลน เนื่องจากเวคเตอร์ที่มีการปนเปื้อนของ endonuclease หรือสารเคมีกลุ่ม phenol หรือ

EDTA จะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนถัดไป การเตรียมพลาสมิดเวคเตอร์ให้บริสุทธิ์มีทั้งที่เป็น standard protocol และ commercial kit ซึ่งกระบวนการทำให้บริสุทธิ์นี้จะเหมาะสมกับพลาสมิดเวคเตอร์ที่มีขนาดเล็กมากกว่าที่มีขนาดใหญ่ เพราะพลาสมิดเวคเตอร์ขนาดใหญ่ (มากกว่า 15 กิโลเบส) จะเปราะบาง ต้องใช้วิธีที่มีความระมัดระวังมากกว่าพลาสมิดขนาดเล็ก นอกจากนี้ขั้นตอนในการทำพลาสมิดเวคเตอร์ให้บริสุทธิ์ยังช่วยกำจัดโปรตีนหรือองค์ประกอบต่างๆ ที่จะไปลดประสิทธิภาพของกระบวนการ ligation ได้

หลังจากทำพลาสมิดเวคเตอร์ให้มีความบริสุทธิ์แล้วต้องทำให้เป็นเส้นตรง (linear) ก่อนที่จะนำไป ligate โดยการสังเกตส่วน cloning site บน vector map หลังจากทำการตัดด้วย restriction enzyme อาจได้ปลายของเวคเตอร์เป็นแบบ sticky end หรือแบบ blunt end ซึ่งการตัดด้วย restriction enzyme นี้ควรคำนึงถึงส่วนปลายของเวคเตอร์นี้กับส่วนปลายของชิ้น insert DNA ด้วย โดยส่วนปลายที่ตัดเป็นแบบ sticky end สามารถใช้เอนไซม์ T4 DNA polymerase หรือ Klenow เปลี่ยนให้เป็น blunt end ได้ เอนไซม์ดังกล่าวจะดึงปลาย 3’ ออก และเติม dNTP เข้าไปที่บริเวณปลาย 5’ วิธีการลด self-ligation หรือลดจำนวนโคลนที่ไม่มี insert DNA จำเป็นต้องทำ Dephosphorylation โดยดึงส่วนปลาย 5’-phosphate จาก linear vector ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้ส่วนมากในงานด้าน molecular biology ได้แก่ shrimp alkaline phosphatase จาก Arctic shrimp (*Pandalus borealis*) และ Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) ซึ่งเอนไซม์นี้จะจับกับ DNA อย่างแน่นหนา จากนั้นทำให้เสียสภาพโดยใช้เอนไซม์ protinase K จะไปย่อย phosphatase ทำให้สามารถแยก DNA ออกมาได้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย phenol-chloroform และตกตะกอนด้วย ethanol ตรวจสอบพลาสมิดเวคเตอร์ด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งภายหลังการ treat ด้วย alkaline phosphatase แล้ว ไม่ควรเกิดการ self-ligate ของเวคเตอร์ (Struble และคณะ, 2009)

2.1.2.4 การตัดด้วย Restriction enzyme

genomic DNA และเวคเตอร์ที่เลือกมาทำการโคลนนิงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะนำมาตัดด้วย restriction enzyme ที่เหมาะสม ซึ่งควรเป็นชนิดเดียวกันเพื่อให้ปลายทั้งสองด้านของชิ้น insert DNA และเวคเตอร์สามารถเชื่อมต่อกันได้ การตัด DNA ด้วยเอนไซม์มีทั้งชนิด restriction endonuclease และ DnaseI ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์ DnaseI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดภายในโมเลกุลของ DNA ทั้งสายเดี่ยวและเกลียวคู่ (endonuclease) ที่ตัด DNA แบบ nonspecific จะให้ชิ้น DNA ที่ random มากกว่า ถ้ามีแมกนีเซียมไอออนร่วมอยู่ เอนไซม์จะตัด DNA ทั้งสองสายแบบสุ่มที่ตำแหน่งต่างๆ แต่ถ้ามีแมงกานีสไอออนเอนไซม์จะตัด DNA ทั้งสองสายที่ตำแหน่งตรงกันหรือเกือบตรงกัน ทำให้ได้ชิ้น DNA ที่เป็นปลายทู่หรือมีปลายที่สายหนึ่งยาวกว่าอีกสายเพียง 1 หรือ 2 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งทำให้การเชื่อมต่อกับ พลาสมิด DNA ทำได้ยาก โดยอาจต้องมีการเติมเบสเพิ่มลงไปจึงจะสามารถเชื่อมต่อชิ้น DNA ได้ ส่วน restriction enzyme เป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในการตัดต่อยีน โดยเฉพาะ restriction enzyme type II ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปป

ไทด์เพียงชนิดเดียว มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การตัด DNA จะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะ ในบริเวณจดจำ (recognition site) หรือจุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นขนาด DNA ที่มีขนาดแน่นอน การใช้ restriction endonuclease จะง่ายต่อการวางแผนการทำงานและควบคุม เนื่องจากสามารถเปรียบเทียบกับส่วน cloning site บนแผนที่ของเวคเตอร์ได้ ดังนั้นความถี่ในการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ในจีโนมสามารถทำนายได้หากรู้ลำดับของ DNA restriction endonuclease มีตำแหน่งจดจำตั้งแต่ 4 – 30 คู่เบส โดยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำน้อย (4 คู่เบส) จะมีโอกาสในการตัดชิ้น genomic DNA ได้ถี่และได้ชิ้น DNA แบบ partial digestion โดยทั่วไป restriction enzyme ที่ดีจะต้องสามารถทำงานได้ดีในบัฟเฟอร์ที่ใช้งานกันโดยทั่วไปและต้องถูกทำให้เสียสภาพได้ด้วยวิธีที่ไม่ยุ่งยากซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนให้น้อยลงในการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ การตัดด้วย restriction endonuclease นั้นมีความสำคัญต่อการออกแบบวิธีการที่จะทำการโคลนนิง เนื่องจาก restriction endonuclease หลายชนิดสามารถตัด double-stranded DNA ได้ที่ตำแหน่งตรงกันทั้งสองสาย ทำให้ได้ปลายทั้งสองที่ยาวเท่ากัน เรียกว่า blunt end เช่น *Pvu*II และ *Alu*I อย่างไรก็ดี restriction endonuclease อีกแบบจะตัด double-stranded DNA ในแบบที่แตกต่างออกไป โดย DNA ทั้งสองสายจะถูกตัดในตำแหน่งที่แตกต่างกันทำให้ได้สาย DNA ที่เหลื่อมกัน แต่ละสายจะมีส่วนของ nucleotides เหลืออยู่ เรียกปลายเช่นนี้ว่า sticky end หรือ cohesive end ซึ่งทำให้การเชื่อมต่อของ DNA สามารถเชื่อมต่อกันได้ง่าย ส่วนใหญ่การทำโคลนนิงจะเลือก restriction enzyme ที่ตัดได้ปลาย DNA แบบ sticky end เนื่องจากการใช้งานที่ไม่ยุ่งยากและเชื่อมต่อ DNA ได้ง่ายกว่าแบบที่ตัด DNA แล้วได้ปลายแบบ blunt end

ปฏิกริยาการตัด DNA ด้วย restriction enzyme โดยทั่วไปจะมี Tris-HCl buffer แมกนีเซียมไอออน โซเดียมคลอไรด์ และ 2-mercaptoethanol pH อยู่ในช่วง 7.2 – 7.6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ทำปฏิกริยาไม่ควรทิ้งไว้นานเกินไป แต่อาจมีบางเอนไซม์ที่ใช้อุณหภูมิหรือสภาพที่แตกต่างออกไป มักบอกไว้โดยบริษัทผู้ผลิต ในการทดลองจึงควรปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปอาจเกิด star activity ซึ่งเกิดได้กับ restriction enzyme ส่วนมาก ทำให้บริเวณจดจำเปลี่ยนแปลง ทำให้เอนไซม์ตัด DNA ได้มากกว่าที่ควรจะเป็น และตัดได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้ขนาด DNA ที่ไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเอนไซม์มักอยู่ในสารละลายกลีเซอรอล ซึ่งกลีเซอรอลความเข้มข้นสูงเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด star activity (Sambrook และคณะ 1989)

2.1.2.5 การตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

วิธี Agarose Gel Electrophoresis เป็นวิธีการแยกขนาดของ DNA โดยใช้สนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำ DNA ซึ่งเป็นขั้วลบ ไปยังขั้วบวก ผ่านรูพรุนของ Agarose gel ในการสร้าง genomic library มีการใช้ประโยชน์จากวิธีนี้ทั้งในด้านการเตรียมเวคเตอร์และและ genomic DNA โดยในส่วนของเวคเตอร์นั้น เวคเตอร์ที่มีรูปร่างเป็นวงกลม (circular vector) จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ Agarose gel ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าเวคเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรง (linearized vector) ในมวลโมเลกุลที่เท่ากัน ดังนั้นจึงสามารถใช้

แยกเวคเตอร์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ได้ และยังสามารถใช้แยกเวคเตอร์ที่ ligate แล้วออกจากเวคเตอร์ที่ยังไม่มีการ ligate ได้อีกด้วย ในส่วนของ genomic DNA ชิ้นของ DNA จะแยกออกมาได้ตามมวลโมเลกุล โดย DNA ที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ Agarose gel ในสนามไฟฟ้าได้ดีกว่า DNA ที่มีมวลโมเลกุลใหญ่

การเลือกใช้ความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ Agarose gel ในการนำมาใช้แยกขนาดของเวคเตอร์และ DNA ต้องเลือกให้เหมาะสม โดย DNA ที่มีขนาดน้อยกว่า 20 กิโลเบสควรใช้ความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ Agarose gel ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ในการแยกขนาด หากขนาด DNA ที่ต้องการแยก มีขนาดเล็กกว่านี้ก็ควรเพิ่มความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ Agarose gel ให้มากขึ้น ในขณะที่หาก DNA ที่ต้องการแยกเป็น DNA ที่มีขนาดใหญ่ (high molecular weight DNA) ก็ควรใช้ความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ Agarose gel ให้น้อยลง โดยทั่วไปที่นิยมใช้อยู่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ หากเป็น genomic DNA ที่มีโอกาสฉีกขาดได้ง่าย ควรใช้เจลที่เป็น low melting point agarose gel ซึ่งขั้นตอนในการสกัด DNA ออกจากเจลชนิดนี้จะไม่ใช้ความรุนแรงจากการเขย่าอย่างรุนแรง (vortex) หรือจากการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แต่จะใช้วิธีการอุ่นเจลให้ละลายร่วมกับการย่อยเจลด้วยเอนไซม์ beta-agaraseI

การตรวจสอบ DNA ที่แยกได้ด้วยสายตา ต้องทำให้ DNA จับกับสีย้อม (dye) ซึ่งในกรณีทั่วไปนิยมใช้ Ethidium Bromide (EtBr) ซึ่งเป็นสีย้อมแบบ fluorescent สามารถถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี และปลดปล่อยพลังงานที่ 590 นาโนเมตร ให้สีส้มแดง โดยสีย้อมชนิดนี้ที่จับกับ DNA จะเพิ่มประสิทธิภาพ fluorescent yield ได้สูงขึ้นถึง 20 เท่าเมื่อถูกกระตุ้น ดังนั้นหากมี DNA แม้ในปริมาณน้อยเพียง 10 นาโนกรัมก็สามารถทำให้มองเห็นได้ แต่การใช้สีย้อมชนิดนี้แม้จะมีความสะดวกในการใช้งานและให้ประสิทธิภาพดี แต่สีย้อมชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงสามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ จึงควรมีความระมัดระวังในการใช้งานเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันมีการพัฒนาสีย้อมที่ไม่มีความเป็นพิษออกมาใช้งาน แต่ยังมีราคาสูงทำให้เป็นข้อจำกัดในการเลือกใช้งาน เช่น สีย้อม SYBR Safe (Invitrogen, U.S.A.) (Struble และคณะ, 2009)

2.1.3 การเชื่อมต่อชิ้น DNA กับเวคเตอร์ (DNA ligation)

การเชื่อมต่อชิ้น DNA กับเวคเตอร์เป็นการเชื่อมต่อระหว่างชิ้น DNA ที่ต้องการ (insert DNA) กับเวคเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรง (linearized vector) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้งานมากที่สุด มีหน้าที่สร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5’ ฟอสเฟตและ 3’ ไฮดรอกซิลของ DNA ใช้เชื่อมรอยขาด (nick) ในโมเลกุลของ DNA หรือเชื่อมต่อ DNA สองโมเลกุลที่มีปลายเป็น cohesive end ซึ่ง T4 DNA ligase ยังสามารถเชื่อมต่อ DNA ที่เป็นปลายทู่ได้ด้วย ในการกำหนดสัดส่วนปริมาณการใช้ DNA ที่ต้องการกับเวคเตอร์ในกระบวนการ ligation เป็นสัดส่วนระหว่างจำนวนโมลของชิ้น DNA ที่ต้องการต่อโมลของเวคเตอร์และลองแปรผันค่าดังกล่าวหลายๆ ค่า จนกว่าจะได้ค่าที่เหมาะสม

โดยทั่วไปจะแปรผันค่าดังกล่าวจาก 1:1 ถึง 5:1 หากเป็นการ ligate ของชิ้น DNA และเวคเตอร์ที่เป็นแบบ blunt end จะใช้ high ratio

การเชื่อมต่อ DNA แบบ cohesive end ที่เกิดจากการตัดด้วย restriction enzyme โดยใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันตัดทั้งชิ้น DNA และเวคเตอร์ จะได้ปลายที่เป็น complementary กันนำมาเชื่อมต่อกันได้ทันที แต่มีข้อจำกัดคือเวคเตอร์อาจเชื่อมต่อกันเองเป็น dimer หรือเชื่อมปลายของโมเลกุลเดียวกัน (self ligation) จึงนิยมดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5’ ของเวคเตอร์ออกโดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายของเวคเตอร์กลับมาเชื่อมกันเองได้ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวจะสร้างพันธะ phosphodiester bond ได้ต่อเมื่อปลาย 5’ มีหมู่ฟอสเฟต และปลาย 3’ เป็นหมูไฮดรอกซีเท่านั้น

การเชื่อมต่อ DNA แบบ blunt end ทำได้ยากกว่า ต้องใช้เอนไซม์ ligase ที่มีความเข้มข้นมากกว่าปลาย DNA แบบ cohesive end หลายเท่า โดยทั่วไปนิยมนำชิ้น DNA ที่มีปลายแบบ blunt end มาต่อกับ oligonucleotides สั้นๆ มีความยาวประมาณ 8-10 bp ที่มีลำดับเบสบริเวณจดจำของ restriction enzyme ชนิดหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า linker การนำชิ้น DNA มาต่อเข้ากับ linker นี้จะใส่ linker มากเกินพอเพื่อให้มีโอกาสต่อ linker เข้าที่ปลายทั้งสองของ DNA ทุกโมเลกุล แล้วจึงนำ DNA ดังกล่าวมาตัดด้วย restriction enzyme ชนิดนั้น นำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์โดยการเชื่อม DNA แบบ cohesive end อีกทีหนึ่ง ถ้าใช้ restriction enzyme ที่ตัดได้ปลายแบบ blunt end ตัดเวคเตอร์ แล้วนำมาต่อกับชิ้น DNA ปลายแบบ blunt end โดยตรง ประสิทธิภาพจะต่ำและต้องใช้ปริมาณ DNA มาก (Struble และคณะ, 2009)

2.1.4 การนำ recombinant เวคเตอร์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) (Transformation)

การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของเวคเตอร์ที่ใช้ ถ้าเป็นพลาสมิดจะเรียกว่า transformation แบคทีเรียที่มีความสามารถในการรับเอา DNA จากภายนอกได้เรียกว่า competent cell ซึ่งเกิดจากการ treat เซลล์ของแบคทีเรียในช่วง early log phase ด้วย calcium chloride ทำให้ลักษณะของ cell membrane ของแบคทีเรียสามารถให้ chloride ions ผ่านเข้าออกได้ เมื่อ chloride ions ผ่านเข้าสู่เซลล์ โมเลกุลของน้ำที่ผ่านเข้ามาด้วยจะทำให้เซลล์บวมขึ้นและสามารถรับเอา DNA จากภายนอกเข้าไปได้ ซึ่งกระบวนการที่แท้จริงในการรับเอา DNA นี้ก็ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการ treat ด้วย calcium chloride ตามด้วยให้ความร้อนในแบคทีเรีย *E. coli* ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เมื่อเติม DNA plasmid ลงไปจะเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของ hydroxyl calcium phosphate ที่ทนต่อ DNase บริเวณผนังเซลล์ทำให้ recombinant DNA สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของ competent ได้ เมื่อเซลล์แบคทีเรียที่รับ recombinant DNA นี้มีการเจริญและแบ่งตัว พลาสมิดนั้นจะถ่ายแบบ (replicate) และแสดงลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ตามชนิดของยีนที่อยู่บนพลาสมิดนั้น ซึ่งมีผลให้ฟีโนไทป์ของแบคทีเรียให้อาศัยเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมักนำมาใช้ในการตรวจหา transformant หรือแบคทีเรียให้อาศัยที่รับพลาสมิด เนื่องจากพลาสมิดส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการทดลองมักมียีนต้านยา

ปฏิชีวนะบางชนิด ดังนั้นลักษณะฟีโนไทป์ที่ใช้ตรวจหา transformant จึงมักเป็นคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ

ประสิทธิภาพของการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี transformation นี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น รูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีที่ทำให้เซลล์เป็น competent เป็นต้น พลาสมิดที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อน (supercoil) จะเข้าเซลล์ได้ดีกว่าพลาสมิดแบบเส้นตรงหรือวงแหวนปลายปิด และให้ประสิทธิภาพในการ transform สูงกว่ารูปร่างแบบอื่นทั้งนี้เพราะในช่วงที่ DNA เข้าไปจับกับผนังเซลล์ของ competent cell ก่อนท่าจะเคลื่อนข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและช่วงที่ DNA เคลื่อนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้วแต่ยังไม่รวมกับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน จะเป็นช่วงที่เอนไซม์ DNase ของเซลล์เจ้าบ้านจะเข้ามาทำลาย recombinant DNA ได้ พลาสมิดที่อยู่ในรูป supercoil จะเป็นรูปแบบที่ทนต่อ DNase ได้มากที่สุด พลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ถ้าพลาสมิดขนาดใหญ่กว่า 15 กิโลเบสจะมีประสิทธิภาพต่ำมาก ดังนั้นในการโคลน DNA ถ้า DNA ที่ต้องการโคลนมีขนาดใหญ่ (มากกว่า 10 กิโลเบส) มักหลีกเลี่ยงการใช้พลาสมิดเป็นเวคเตอร์ ระยะของเซลล์ที่ดีที่สุดในการทำเป็น competent คือเซลล์ที่เจริญถึงระยะ log phase เนื่องจากเซลล์ในระยะนี้แข็งแรงและเป็นระยะที่เซลล์มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างชีวโมเลกุลต่างๆ ดังนั้นเมื่อ competent cell รับเอา recombinant DNA ไปแล้ว จะมีการปรับตัวให้กลับคืนสู่สภาวะปกติได้ง่าย

อีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการนำDNAเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* คือใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ เพื่อให้ DNA มีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้เรียกว่า electroporation ซึ่งจะต้องใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสม DNA จะมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยขนาดของ DNA ที่ต้องการนำเข้าเซลล์ไม่จำกัดเหมือนวิธี transformation แบบเดิม ซึ่งการทำ electroporation ต้องมีการแปรผันค่าที่เหมาะสม เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายได้

2.1.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

ผลที่ได้จากการตัดต่อชิ้น DNA เข้ากับเวคเตอร์แล้วนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับคือ ประชากรของเซลล์หรือประชากรของเฝจที่มีชิ้น DNA ต่างๆ กันเป็น library วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการจากประชากรของเซลล์ทั้งหมดนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวคเตอร์ที่ใช้

2.1.5.1 การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotype selection)

ถ้ายีนที่สอดใส่เข้าไปในเวคเตอร์สามารถแสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับนั้นและลักษณะที่ปรากฏต่างไปจากลักษณะของเซลล์ผู้รับเดิมก็สามารถคัดเลือกโดยวิธีนี้ได้ ทั้งนี้ในการโคลนยีนต้องเลือกใช้เวคเตอร์ที่เอื้ออำนวยให้ยีนสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับ คือมีส่วนของ DNA ที่จำเป็นในการลอกรหัสและแปลรหัสของยีนดังกล่าวที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการ ภายในเซลล์ผู้รับ เรียกว่า expression vector

2.1.5.2 การตรวจหาด้วยวิธีทางอิมมูโนเคมี (immunochemical screening)

การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการแสดงออกได้โดยผลิต polypeptide หรือโปรตีนที่ถูกต้องคล้ายกับวิธีแรก แต่กรณีนี้โปรตีนดังกล่าวไม่แสดงฟีโนไทป์ที่เด่นชัด ไม่สามารถคัดเลือกโดยตรงได้ ต้องมี antibody ต่อโปรตีนนี้เตรียมพร้อมอยู่ก่อนและตรวจสอบโปรตีนที่เซลล์ผลิตขึ้นโดยใช้ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการนั้น

วิธีทำคือนำเอาเซลล์ที่รับเอาพลาสมิดเข้าไปมาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีหรือ plaque แล้วจึงย้ายโคโลนีหรือ plaque นี้มาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ เช่น ไนลอน หรือไนโตรเซลลูโลส ทำให้เซลล์แตกด้วยคลอโรฟอร์มแล้วจึงทำปฏิกริยากับ antibody จำเพาะที่ติด ฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ตรวจสอบโดยทำ autoradiograph ถ้าเกิดปฏิกริยาระหว่างโปรตีนกับเซลล์ และ antibody จะได้จุดสีดำบนแผ่นฟิล์ม เมื่อนำไปเทียบตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อจะสามารถแยก โคโลนีหรือ plaque ออกมาได้

2.1.5.3 การตรวจหาโดยวิธี Nucleic acid hybridization

การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ใช้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงลักษณะใดๆและอยู่ในเวคเตอร์ใดก็ได้ โดยใช้ DNA หรือ RNA ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม กับส่วนหนึ่งส่วนใดของชิ้น DNA ที่ต้องการแยก นั้นเป็นตัวตรวจสอบ ซึ่งเรียก DNA หรือ RNA ที่ใช้ ตรวจสอบนี้ว่า probe หลักสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียม probe คือ ชนิดของกรดนิวคลิอิกว่าเป็น DNA หรือ RNA เป็นเส้นเดี่ยวหรือเส้นคู่และสิ่งที่จะใช้ติดฉลากเข้าไปในสายของ probe และวิธีการติดฉลากที่ใช้มีหลายวิธี วิธีการสังเคราะห์ probe ก็มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับความยาวของ probe ที่ต้องการสังเคราะห์ เช่น การเตรียม DNA probe สายเดี่ยว (Single-stranded DNA probe) นั้นสามารถทำได้โดยใช้ primer ในการสร้าง DNA สายใหม่จาก DNA เริ่มต้นที่เป็นเส้นเดี่ยวโดยวิธี PCR หรือการสังเคราะห์ DNA สายสั้นโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical synthesis of oligonucleotide) แต่กระบวนการทำยุ่งยากและต้องมีการแยก probe และ template ออกจากกัน ในปัจจุบันจึงใช้น้อยในงาน in situ hybridization แต่สำหรับการใช้เทคนิค PCR นั้นจะง่ายกว่าและสามารถเตรียม probe สายเดี่ยว ได้จาก DNA เริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยๆ นอกจากนั้นแล้ววิธีนี้สามารถเลือกตำแหน่งของ probe และลำดับเบสของ probe ได้จากการเลือก primer ที่เหมาะสม หรือการเตรียม probe สายสั้น (Oligonucleotide) ปกติแล้วมีความยาวในช่วง 20-30 base ซึ่งอาจทำการติดฉลาก โดยการสำสารติดฉลากเข้าไปในสาย nucleotide ก็ได้ข้อด้อยของการใช้ probe ชนิดนี้ก็คือมีจำนวนของสารที่นำมาติดฉลากเข้าไปในสาย nucleotide ได้น้อยต่อหนึ่งโมเลกุลของ probe จึงทำให้ sensitivity น้อยกว่าการใช้ probe สายยาว ในแง่ของ sensitivity ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยใช้ probe มากกว่า 1 ชนิดจับกับ target ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน ส่วนความยาวที่เหมาะสมของ probe มีการศึกษาทดลองจำนวนมากที่แสดงว่า probe ที่

มีความยาวมากจะให้สัญญาณต่ำ (weak signal) ซึ่งเนื่องมาจากทำให้การแทรกเข้าไปในเซลล์ได้ไม่ดี ความยาว probe ที่เหมาะสมในงาน *in situ* hybridization อยู่ในช่วง 50-150 เบส แต่ในงานบางอย่างความยาวของ probe ที่ใช้ ปรับเปลี่ยนไปตามความเหมาะสม เช่น การใช้ RNA probe ในการทำ *in situ* hybridization ใน mouse embryos จะให้สัญญาณที่ดีที่สุดเมื่อใช้ความยาว 1 kb การที่ probe (Chantratita, W. และคณะ, 1989)

วิธีการตรวจหาด้วยวิธี Nucleic acid hybridization นำแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ ลูกผสมมาเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีหรือ plaque บนจานเลี้ยงเชื้อแล้วจึงย้ายมาบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์แบบเดียวกับวิธีอิมมูโนเคมี แล้วนำมาทำให้เซลล์แตก ออกและทำให้ DNA เสียสภาพด้วยด่าง เพื่อให้ DNA สายเดี่ยวเกาะกับแผ่นฟิลเตอร์ได้ ตรึง DNA ให้อยู่บนแผ่นฟิลเตอร์โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้สูญญากาศ แล้วทำมา hybridize กับ probe ซึ่งเป็น DNA หรือ RNA ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี บางชนิดแล้วนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการจับตัวระหว่าง probe กับ DNA ที่ต้องการ ถ้าติดฉลาก probe โดยใช้สารกัมมันตรังสีก็นำไปทำ autoradiograph จะเกิดเป็นจุดสีดำขึ้นตรงจุดที่มีการจับคู่หรือเกิด hybridization นำฟิล์มกับไปเทียบตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อเดิมและแยกโคโลนีหรือ probe ที่อยู่บริเวณนั้นออกมา อาจตรวจซ้ำจนกว่าจะได้โคลนที่บริสุทธิ์ โดย Radioimmunoassay (RIA) มีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ เนื่องจากมีความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ระดับความเข้มข้น 10^{-12} กรัมต่อมิลลิลิตร ได้แต่ก็มีข้อจำกัด คือ สารกัมมันตรังสีเป็นอันตรายต่อสุขภาพ และทำลายยาก ค่าใช้จ่ายในการกำจัดสูง และสารกลุ่มนี้สลายตัวง่าย ไม่เสถียร ต่อมามีการพัฒนามีการใช้ Enzyme immunoassay (EIA) แทน RIA อย่างแพร่หลาย เนื่องจากไม่มีปัญหาเรื่องสารกัมมันตรังสีและสามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับ 10^{-9} กรัมต่อมิลลิลิตร แต่ก็มีปัญหาคือ EIA ต้องใช้ substrate ไปทำปฏิกิริยากับ enzyme เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสี โดย substrateส่วนใหญ่มีพิษและบางตัวเช่น o-phenylenediamine เป็นสารก่อมะเร็ง ตัว substrate เองต้องเตรียมขึ้นใหม่เพื่อใช้ทันที ส่วน enzyme ก็ไม่เสถียร ไวต่ออุณหภูมิและ pH

เทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการพัฒนาขึ้นมาทดแทนวิธี Radioimmunoassay คือ Chemiluminescence immunoassay (CLIA) ใช้หลักการตรวจวัดแสงที่เปล่งออกมาจากปฏิกิริยาเคมี มีความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารในระดับ 10^{-15} กรัมต่อมิลลิลิตรได้ ดังนั้นหาก probe ที่ใช้ติดฉลากด้วยสารเคมีนั้นสามารถตรวจสอบโดยทำปฏิกริยาให้เกิดสี (colorimetric) หรือทำปฏิกริยาให้เกิดการเปล่งแสงทางเคมี (chemiluminescent) และตรวจสอบแสงที่เปล่งออกมาด้วยฟิล์มที่มีความไวแสงดังกล่าวจะทำให้เกิดจุด สีดำบนแผ่นฟิล์มแบบเดียวกับการทำ autoradiograph จะเห็นได้ว่าวิธีนี้ใช้ตรวจหายีนหรือชิ้น DNA อะไรก็ได้โดยโคลนดังกล่าวไม่จำเป็นต้องมีการแสดงออกซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ตรวจได้ครั้งละมากๆ

การติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (hapten) ซึ่งตรวจหาสัญญาณโดยวิธี imonocytochemistry มีข้อดีหลายประการคือในด้านความปลอดภัย มีความคงตัวสูงให้ผลรวดเร็ว และให้ความละเอียดในระดับ

(single-cell resolution) ซึ่งวิธีการติดฉลากส่วนใหญ่จะติดฉลากสารปลอดรังสีนั้นเข้าไปในสายนิวคลิโอไทด์ซึ่งสามารถใช้ antibody ที่จำเพาะหรือโปรตีนที่จำเพาะมาจับได้ โดย antibody หรือโปรตีนเหล่านั้นจะเชื่อมต่อกับเอนไซม์และเมื่อผ่านขั้นตอนการล้างแล้วสามารถตรวจหาสัญญาณได้โดยการเติม substrate ที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้น ทำการย่อยแล้วเกิดตะกอนสีที่ไม่ละลายน้ำให้ตรวจพบได้ ส่วนการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorochrome) จะมีความไว (sensitivity) น้อยกว่าวิธี colorimetric detection ซึ่งใช้ antibody ที่เชื่อมติดด้วยเอ็นไซม์ แต่ถึงกระนั้นการใช้ fluorocrome labeled probe ได้รับความนิยมมาก ในงาน *in situ* hybridization บนโครโมโซม และยังสามารถใช้สารเรืองแสงต่างชนิดกันติดฉลากเพื่อตรวจสัญญาณจาก probe ต่างชนิดกันได้พร้อมกันส่วนวิธีการติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีอีกวิธีหนึ่งก็คือการใช้เม็ดทอง (gold particle) ติดเข้ากับ antibody ซึ่งสามารถตรวจหาสัญญาณที่เกิดจาก hybrid ของ DNA เป้าหมายและ probe ได้ด้วยการเติม antibody ที่จำเพาะกับ probe ซึ่งติดฉลากด้วย gold particle ลงไปทำให้เห็นเป็นจุดสีดำเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความมากน้อยของสารปลอดรังสี (hapten) ที่นำเข้าไปติดฉลากในสายนิวคลิโอไทด์นั้นไม่มีผลโดยตรงต่อสัญญาณแต่จำกัดโดย antibodies หรือโปรตีนจำเพาะที่นำเข้าไปจับกับ hapten นั้น สำหรับ probe ที่ติดฉลากด้วย biotin จะตรวจหาโดยใช้ streptavidin ส่วน probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ก็ตรวจหาโดยใช้ antibodies มาตรวจจับหรืออาจจะใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรงหรืออาจติดฉลาก probe เข้ากับเอนไซม์ B-galactosidase และเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความคงตัวดีสามารถตรวจหาการขยายสัญญาณได้เป็นเวลานานหลายวัน ส่วนเอนไซม์ peroxidase จะมีความคงตัวน้อยกว่า (Roche instruction manual)

หลังจากคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้แล้ว ต้องนำมาตรวจสอบว่าชิ้นส่วน DNA ที่สอกแทรกอยู่ในโคลนนั้นอยู่ในสภาพอย่างไร ตรงตามที่ต้องการหรือไม่เป็นชิ้นส่วนที่สมบูรณ์ หรือมีเพียงบางส่วนทำงานได้หรือไม่ โคลนที่เลือกได้นั้นเป็นตัวแทนของยีนต้นตอในจีโนมจริงหรือไม่ โดยเริ่มจากแยกชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ ไม่มีการปะปนจาก DNA RNA และโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้าน (host) เช่นพลาสมิด ต้องแยกออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียแล้วจึง สกัด DNA ออกมา

2.2 การหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing)

ในปี 1977 Frederick Sanger ได้พัฒนาเทคนิค dideoxy-chain termination ขึ้นมา และถูกนำมาใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ มากมายมาจนถึงปัจจุบัน อีกทั้งมีการพัฒนาให้กระบวนการเป็นระบบอัตโนมัติ ทำให้แพร่หลายไปในกลุ่มนักวิจัยโดยทั่วไป ส่วน วิธี chemical degradation ที่ Gilbert พัฒนาขึ้นมา ก็มีความสำคัญ และมีการใช้ประโยชน์ในช่วงต้นปี 1980 แต่มีการนำไปใช้ประโยชน์น้อย เนื่องจากมีวิธีการยุ่งยากกว่า และมี ความสามารถในการหาลำดับเบส (throughput) ต่ำกว่า หลังจากนั้น Kary Mullis (1983) ได้พัฒนาเทคโนโลยี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยใช้ primer 2

สายที่จับกับ DNA ต่างเส้นกันและมีทิศทางด้าน 3’ เข้าหากัน และใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ในการต่อสาย DNA โดยมีการทำปฏิกิริยาหลายรอบและได้จำนวน DNA โมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ก็มีการนำเอา PCR มาใช้ในการหาลำดับเบส DNA โดยใช้ primer เพียงข้างเดียวและอาศัยเอ็นไซม์ *Taq* Polymerase ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดี แทน DNA polymerase ทั่วไป ที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร่วมกับวิธี dideoxynucleotide chain termination ของ Sangerโดยมีข้อได้เปรียบคือสามารถใช้กับตัวอย่าง DNA ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ดี อีกทั้งลดขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเป็นเพียงขั้นเดียว เรียกวิธีการนี้ว่า Cycle sequencing ต่อมา Leroy Hood ได้พัฒนาเครื่องหาลำดับเบส DNA อัตโนมัติ (Automate sequencer หรือ Autosequencer) ที่ใช้ลำแสงเลเซอร์ในการตรวจการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ที่ติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสง ในแผ่น acrylamide ขึ้นในปี 1986 ทำให้ลดขั้นตอนการอ่านผลซึ่งเป็นงานที่หนักและผิดพลาดได้ง่าย หลังจากนั้นได้มีพัฒนาการเครื่อง Autosequencer และสารเคมีที่ใช้สำหรับเครื่อง Autosequencer มาโดยตลอดจนถึงปัจจุบันจนมีประสิทธิภาพสูง สามารถหาลำดับเบสได้จำนวนมากภายในเวลาสั้นๆ เครื่อง Autosequencer ที่มีใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็น ของบริษัท Applied Biosystem ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่

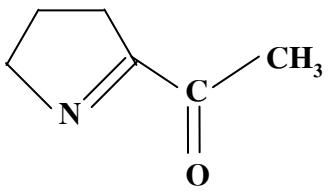
1. แบบ Slab gel เช่น ABI373 และ ABI377
2. แบบหลอด Capillary เช่น ABI3100 และ ABI3700

แบบ slab gel จะต้องใช้ความชำนาญในการเทเจลและหยอดเจล ในขณะที่ แบบ capillary ใช้ระบบอัตโนมัติในการเติมเจล และดูดตัวอย่างทำให้สามารถทำงานได้ต่อเนื่องและวิเคราะห์ลำดับเบสได้จำนวนมาก อีกทั้งไม่ต้องอาศัยประสบการณ์ในการดำเนินการมากนักทำให้เป็นที่นิยมใช้ทั่วไป นอกจากเครื่องของบริษัท Applied Biosystem แล้วก็ยังมี Magabace 4000 ของบริษัท Amersham Bioscience ที่มีหลอด capillary 384 หลอดทำให้สามารถหาลำดับเบสของตัวอย่าง 384 ตัวอย่างพร้อมๆกัน หรือคิดเป็น กว่า 1 ล้านเบสใน 8 ชั่วโมง นอกจากเทคนิคการหาลำดับเบสที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่มีการพัฒนาขึ้นมาในปัจจุบันหรือกำลังพัฒนาอยู่เพื่อเป็นการเสริมหรือพัฒนาการหา ลำดับเบสที่รวดเร็วและแม่นยำขึ้น อีกทั้งมีต้นทุนในการดำเนินการที่ต่ำลง เช่น Pyrosequencing โดยในปฏิกิริยา sequencing ที่มี primer, DNA template, DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase และ apyrase และ substrate APS (adenosine 5’ phosphosulfate และ luciferin เติม dNTP ทีละ 1 ตัว ถ้า dNTP นั้นสามารถจับคู่กับ DNA template ได้ DNA polymerase จะนำเอา dNTP นั้นๆ เข้าต่อกับสาย DNA และปลดปล่อย pyrophosphate (PPi) ในปริมาณที่เท่ากับจำนวน nucleotide ที่ต่อเข้าไป เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi เป็น ATP โดยจะรวมเข้ากับ APS ซึ่ง ATP ก็จะไปช่วย luciferase ในการเปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin และปล่อยแสงออกมาในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ ATP สามารถตรวจจับแสงที่ปลดปล่อยออกมาโดยใช้กล้อง CCD โดยแสดงออกมาเป็น peak (Pyrogram) ความสูงของ peak ก็เป็นสัดส่วนกับ

จำนวน nucleotide ที่ DNA polymerase ต่อสาย DNA เอนไซม์ apyrase จะย่อย ATP และ nucleotide ที่ไม่ถูกนำไปต่อสาย ทำให้หยุดปฏิกิริยาปลดปล่อยแสง จากนั้นก็จะเริ่มการเติม dNTP ชุดถัดไป การเติม dNTPs จะเติมทีละ 1 ตัว และในระหว่างที่ปฏิกิริยาดำเนินต่อเนื่อง ก็จะมีการสร้าง DNA สายคู่สม (complementary strand) พร้อมกับการอ่านลำดับเบสจาก Pyrogram (www.pyrosequencing.com)

2.3 สาร 2-Acetyl-1-Pyrroline

สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) เป็นสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่ม nitrogen heterocyclic (รูปที่ 2.2) เป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมของใบเตย (*Pandanus amaryllifolius*) ดอกชมนาด (*Vallaris glabra* Ktze) (สุกัญญา, 2540) ข้าวหอม เช่น ข้าวบาสมาติ และข้าวหอมมะลิของไทย ซึ่งพบว่าข้าวหอมมะลิของไทยมีปริมาณสาร 2-AP สูงกว่าในข้าวบาสมาติของอินเดีย ทำให้ข้าวหอมมะลิมีรสสัมผัสที่ดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั่วโลก (Buttery, 1988) นอกจากนี้เมื่อสาร 2-AP ได้รับความร้อนที่เกิดจากกระบวนการทำอาหาร จะทำให้เกิดกลิ่นหอม ทำให้อาหารมีรสสัมผัสที่น่ารับประทาน เช่น กลิ่นข้าวโพดคั่ว (popcorn-like flavor) และกลิ่นหอมของขนมปังอบ ซึ่งกลิ่นที่เกิดจากสาร 2-AP จัดเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่มีความต้องการในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากช่วยเพิ่มรสสัมผัสที่ดีให้แก่ผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆมากมาย นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาพบพืชและจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างสาร 2-AP ได้โดยธรรมชาติ ได้แก่ ใบเตย ดอกชมนาด ข้าวหอม ในจุลินทรีย์ได้แก่ *Bacillus cereus* (Romanzyck และคณะ, 1995) lactic acid bacteria และราบางชนิด เช่น *Acremonium nigricans* และ *Aspergillus awamori* (Rungsardthong and Noomhom, 2005) และพบว่านอกจากจะเป็นสารที่ทำให้พืชดังกล่าวข้างต้นมีความหอมแล้ว สาร 2-AP ยังมีบทบาทที่สำคัญต่อความสามารถในการทนต่อสภาวะ osmotic stress ของพืชและจุลินทรีย์อีกด้วย (Fitzgerald และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

2.4 การศึกษาอณูชีววิทยาของการสังเคราะห์สาร 2-Acetyl-1-Pyrroline

เนื่องจากความหอมเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของข้าวหอมมะลิของไทย ซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้ข้าวหอมมะลิเป็นข้าวที่มีความต้องการในการบริโภคสูงสุดในโลก จึงมีผู้ให้ความสนใจในการศึกษาถึงกลไกและกระบวนการการสร้างสาร 2-AP ในข้าว เพื่อที่จะนำความรู้ที่ได้ไปช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวให้

มีความสามารถในการสร้างสารหอมได้มากสายพันธุ์ขึ้น รวมถึงการปรับปรุงประสิทธิภาพการสร้างสารนี้ ในข้าวหอมมะลิเดิมด้วย Yoshihashi และคณะ (2002) ได้รายงานกระบวนการสังเคราะห์สาร 2-AP ในข้าวหอมดอกมะลิ 105 โดยการทดลองปลูกข้าวหอมและติดตามสารตั้งต้นที่ปิดฉลากด้วย isotope บนเมล็ดข้าวก่อนนำไปปลูก สารตั้งต้นดังกล่าวได้แก่ ^{15}N-proline, ^{15}N-glycine และ Proline-1-^{13}C จากการติดตามกระบวนการสังเคราะห์สาร พบว่าที่มาของไนโตรเจนใน pyrroline ring ของสาร 2-AP คือ proline แต่ไม่ใช่แหล่งคาร์บอนของ acetyl group ดังนั้น การเกิด 2-AP จึงมีความสัมพันธ์กับการสะสม Proline ซึ่งเป็นผลให้เกิดกลิ่นหอมที่รุนแรงของสายพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่แห้งแล้งของทุ่งกุลาร้องไห้ในประเทศไทย (Yoshihashi และคณะ, 1999) มีการศึกษาพบว่า 2AP ถูกสังเคราะห์ผ่านทาง polyamine pathway ซึ่งมี 1-pyrroline เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักใน 2-AP นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าวหอมที่มีปริมาณสาร 2-AP สูงจะมีปริมาณของ 4-aminobutyric acid (GABA) ต่ำ แต่เนื่องจาก 4-aminobutyraldehyde เป็นสารตั้งต้นโดยตรงของทั้ง 1-pyrroline และ GABA จึงมีความเป็นไปได้ที่ยีน Os2AP จะเป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมการสร้างสาร 2-AP โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ 1-pyrroline pool สอดคล้องกับการทดลองของ Chen และคณะ (2008) ที่พบว่า ยีน *Badh2* บนโครโมโซมที่ 8 ที่สมบูรณ์ จะ encode ให้เอ็นไซม์ BADH2 ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 503 กรดอะมิโน สามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์ 2-AP โดยการเปลี่ยน AB-ald (4-aminobutyraldehyde) ไปเป็น GABA (4-aminobutyric acid) ในขณะที่การหายไปของ BADH2 อันเนื่องมาจาก nonfunctional *badh2* allele ส่งผลให้เกิดการสะสม AB-ald และนำไปสู่ pathway ในการสังเคราะห์ 2-AP

จากการศึกษาของ Wanchana และคณะ (2003) โดยการทำ linkage map ของยีนบนโครโมโซม 8 ของข้าวหอมและข้าวไม่หอมสายพันธุ์ต่างๆของไทย พบยีน candidate 3 ยีนที่เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสร้างสารหอมในข้าว ได้แก่ ยีน betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*) ยีน 3-methyl-crotonyl CoA carboxylase (MCCase) และยีนที่ควบคุมการสร้าง hypothetical protein โดยเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *badh* ในข้าวหอมและไม่หอม พบว่า ในข้าวหอมทุกสายพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *badh* น้อยมากเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในข้าวไม่หอม และจากการทำ positional cloning ของยีนนี้ พบว่าประกอบด้วย 15 exon และ encode ให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 503 กรดอะมิโน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในข้าวหอมและข้าวไม่หอม พบว่ามีการเกิด deletion ของเบสจำนวน 8 เบส บน exon 7 ของยีนทำให้เกิด premature termination codon ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนลดลงยีนในข้าวหอมอย่างเห็นได้ชัด และทำให้เอ็นไซม์ที่สร้างขึ้นไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ต่อมา Vanavichit และคณะ (2006) ได้ตั้งชื่อยีนที่พบในข้าวนี้ว่ายีน Os2AP ส่วนของยีน MCCase ในพืชทำหน้าที่อยู่ในขบวนการ Leucine catabolic pathway ซึ่งสารตัวสุดท้ายจากขบวนการนี้คือ acetoacetate และ acetyl-CoA ดังนั้นเป็นไปได้ว่ายีน MCCase อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการเติมหมู่ acetyl ในขบวนการเปลี่ยน 1-pyrroline เป็น 2-AP (Chen และคณะ, 2006) และการเพิ่มขึ้นของ *badh*2 transcript ที่ตรวจสอบได้จากข้าวสายพันธุ์ไม่หอมสนับสนุนแนวคิดที่ว่า *badh*2 เป็น physiologically active ในข้าวสายพันธุ์ไม่หอม

และการสูญเสียหน้าที่ของเอนไซม์ดังกล่าวนี้นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น 2-AP และเป็นการเพิ่มความหอมในข้าว (Bradbury และคณะ, 2005; Fitzgerald และคณะ, 2008) และในทางกลับกัน โปรตีน BADH2 ที่ถูก encode โดย *Badh2* ที่ถูกสร้างขึ้นจะทำให้ไม่เกิดกลิ่นในข้าว เนื่องจากการที่มันไปยับยั้งการสังเคราะห์ 2-AP

ต่อมา Bradbury และคณะ (2005) Fitzgerald และคณะ (2008) และ Chen และคณะ (2008) ได้รายงานการค้นพบยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นหอมของข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศในลักษณะเดียวกันกับของ Wanchana และคณะ (2003) คือพบ betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*) encoding gene homolog, *badh2* ในข้าวรวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ มี betaine aldehyde dehydrogenase 2 homologs คือ *badh1* และ *badh2* โดยที่ยีน *badh*1 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ส่วนยีน *badh*2 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 (Bradbury และคณะ, 2005; Cordeiro และคณะ, 2002; Jin และคณะ, 2003) โดยที่ในข้าว ยีนทั้ง 2 homologs นี้มี identity ที่ระดับ amino acid level ที่ 75% และมี catalytic domain similarity ร่วมกันที่ 95% ทั้ง *badh*1 และ *badh*2 มี target ไปยัง peroxisome เนื่องจากโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มี SKL signal ที่ C-terminal (Nakamura และคณะ, 2001)

นอกจากนี้บทบาทที่สำคัญของ betaine aldehyde dehydrogenase ในพืชที่ได้มีการศึกษากันมากในอดีตคือเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง glycinebetaine ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ โดยเฉพาะความเค็ม (salt tolerance) ได้ (Rudulier และคณะ, 1984; Harinasut และคณะ, 1996) โดย glycinebetaine ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการ oxidation ของ choline ไปเป็น betaine aldehyde และสุดท้ายจึงเปลี่ยนไปเป็น glycinebetaine เอนไซม์ที่ไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนแรก คือ choline monooxygenase (CMO) (Burnet และคณะ,1995) และในขั้นตอนสุดท้าย สารจะถูก catalyze โดย betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*) (Arakawa และคณะ, 1987, 1990, 1992; Nakamura และคณะ, 1997) จากการศึกษายีนที่ encode *badh* จากข้าว พบว่า ยีนนี้ประกอบด้วย 14 introns (Nakamura และคณะ, 1997) เอนไซม์ BADH2 ประกอบด้วย 3 domain อันได้แก่ NAD binding, substrate binding และ oligomerization domains (Chen และคณะ, 2008) ในพวกธัญพืชชนิดต่างๆ พบว่า เอนไซม์ BADH มีบทบาทสำคัญต่อการทนความแห้งแล้งและความเค็ม (Ishitani และคณะ, 1995) แต่ข้าวมีความแตกต่างจากธัญพืชชนิดต่างๆตรงที่มันเป็น semi-aquatic และไม่สะสม glycinebetaine (Rathinasabapathi และคณะ, 1993) ซึ่งเกิดมาจากการขาด functional *CMO* gene ในข้าวนั่นเอง (Shirasawa และคณะ, 2006)

นอกจากในพืชแล้วยังสามารถพบเอนไซม์ BADH ในแบคทีเรียด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่นใน *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่ Betaine aldehyde dehydrogenase (betaine aldehyde: $NAD(P)^+$ oxidoreductase, E.C. 1.2.1.8, BADH) เป็นเอนไซม์ที่ไป catalyze กระบวนการ irreversible $NAD(P)^+$ - dependent oxidation ของ betaine aldehyde ให้กลายเป็น glycine betaine ที่เกิดไปควบคู่กับการเกิด

reduction ของ $NAD(P)^+$ ให้กลายเป็น NAD(P)H โดย glycine betaine ที่ถูกสร้างขึ้นจัดว่าเป็น osmoprotectant ให้แก่แบคทีเรีย (Gonzalez-Segura และคณะ, 2008)

$$\text{betaine aldehyde} + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons \text{betaine} + NADH + 2\,H^+$$

จากการศึกษาโดย Oliver และคณะ (2000) คาดว่า *badh* ที่สร้างจาก *P. aeruginosa* มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อนี้ในสภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากกระบวนการป้องกันตัวเองของเซลเจ้าบ้าน และยังจัดเป็นเป้าหมายสำคัญในการที่จะผลิต antimicrobial agent ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวด้วย (Velasco-Garcia และคณะ, 2006)

นอกจากนี้ยังพบการสร้าง BADH ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* โดย alcohol dehydrogenase pathway และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Synorhizobium meliloti* โดยใช้ choline dehydrogenase pathway โดยเป้าหมายหลักของการสร้าง BADH เพื่อใช้ในการเปลี่ยน betaine aldehydeให้กลายเป็น glycine betaine เพื่อตอบสนองต่อสภาวะ osmotic stress ของแบคทีเรียทุกชนิดเหมือนกัน เพียงแต่อาจมี pathway ในการสร้างที่ต่างกัน ส่วนในรานั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีน *badh* แต่อย่างไรก็ตามได้มีการค้นพบยีนดังกล่าวในเชื้อราหลายๆชนิดด้วยเช่นกัน อาทิเช่น *Aspergillus fumigatus Aspergillus terreus Penicillium marneffei Aspergillus clavatus Aspergillus oryzae Pyrenophora tritici-repentis Neosartorya fischeri Magnaporthe grisea Schizosaccharomyces pombe* เป็นต้น (เข้าถึงได้จาก :www.ncbi.nlm.nih.gov วันที่ค้นข้อมูล: 16 มีนาคม 2554)

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 ราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์ที่ใช้ตลอดการทดลองนี้เป็นรา *Aspergillus terreus* และรา *Acremonium nigricans* ซึ่งเป็นราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว ฟู สร้างสปอร์เป็นจุดสีดำ มีความสามารถในการสร้างสารหอม 2-AP ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn18 (Apintanapong, 1998) ได้ดี

การเลี้ยงราดังกล่าว เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (Potato Dextrose Broth) (HIMEDIA, India) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ไว้สำหรับเตรียม genomic DNA ของ *A. nigricans* เพื่อใช้ในการทำ Southern Hybridization ในขั้นตอนต่อไป

3.1.2 พลาสมิด

พลาสมิดที่เลือกมาใช้ในการทดลองนี้เป็นพลาสมิด pZErO^{TM}-2 vector จากชุดโคลนนิง Zero BackgroundTM/Kan Cloning Kit (Invitrogen, U.S.A.)

3.1.3 DNA marker

DNA marker ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น Lambda DNA (Fermentas, Canada) λ/*Hin*dIII/*Eco*RI marker ซึ่งเตรียมมาจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ เอนไซม์ *Eco*RI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย 6X loading dye ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้เป็น molecไมโครลิตรar weight marker ที่ช่วงขนาด 560 bp จนถึงขนาด 21.23 kb

3.1.4 การเตรียม DNA Probe สำหรับยีน Betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*)

DNA Probe ที่ใช้ ในงานวิจัยนี้ คือ ชิ้น PCR product ของยีน *badh* ของรา *A. nigricans* ขนาด 596 bp เตรียมได้จากการ amplify ชิ้นส่วนของยีน *badh* ด้วยไพร์เมอร์ *badh* 23(F) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-CCC ACG ATT GCC AAG GTT TC-3' และ *badh* 24(R) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-AGT GGT GTT TGC CCG CTT CA-3' ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ DNA ปริมาณ 100 ng 10X buffer 2.5 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 10 mM 0.5 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ ความเข้มข้น 10 pmol ไพร์เมอร์ ละ 1

ไมโครลิตร และ DNA *Taq* polymerase 1.25 ยูนิต เติมน้ำจนครบ 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ : 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ *badh* 23 (F) กับ *badh* 24 (R) ของรา *A. nigricans* แยกขนาด DNA ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบน 1% อะกาโรส ตัดแถบดีเอ็นเอของ PCR Product ขนาด 582 คู่เบสใส่หลอด microcentrifuge นำไปแยก DNA ออกจากอะกาโรสเจลด้วย QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำแถบ DNA ที่ตัดมาจากเจลไปชั่งน้ำหนัก สกัด DNA ออกมาตามวิธีของผู้ผลิต (QIAGEN)

<u>ลำดับเบสของ Probe ขนาด 596 คู่เบส</u>

CCCACGATTGCCAAGGTTTCCTTCACAGGCCAGGTGTCCACCGGAATGAAGGTTGCTGGTT
CTGCCGCCGGCAACATGAAATACGTGACCATGGAGCTTGGAGGCAAGAGTCCCCTCATCG
TTCTTCCTGACGCCGATTTGGATAATGCCGTGGATGGTGCGATGATGGCCAACTTCTACAG
CACTGGCCAGGTCTGTACCAACGGTACCCGTGTTTTTGTTCCCTCGAGCATGAGGGCTGCT
TTCGAGAAGCGCCTCTTGGAGAAGATGCAGTACATCCGCCCCGGACCTTTGTTCGACGAAG
CCACAAACATGGGGCCCCTGAGCTCAGCCGTCCACATGGAGAAGGTGGCCTCCTATATCC
GCCACGGAATCGAGACGGACAAGGCCACCCTTCTATATGGTGGGCTGGGCAAGCCGCAAG
TCCCCAAGGACTTGGAAAGCGGATACTGGGTCCGTCCTACTGTCTTCACTGACTGCACGGA
TGACATGCGCATCGTCAAGGAGGAGATTTTCGGTCCTGTGATGTCTATCCTCTCTTACGAG
ACGGTCGAGGAGGCGGTGAAGCGGGCAAACACCACTGAGCTGGGCCTGGC

3.2 การสกัด genomic DNA (Sambrook และคณะ, 1989)

สกัด DNA จากเซลล์ของ *A. nigricans* ที่เจริญในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) (HiMedia, India) เพาะเลี้ยงโดยเขย่าภายใต้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองแยกไมซีเลียมออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้แห้งและแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวเพื่อป้องกันการ lysis ของเซลล์ บดเซลล์ที่แช่แข็งให้ละเอียด จากนั้น เติม extraction buffer (ภาคผนวก ก) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าด้วยความแรง เติม proteinase K (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายใสชั้นบนมาใส่หลอดพลาสติกใหม่ เติม RNaseA (50 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 1

เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายใสชั้นบนมาใส่หลอดพลาสติกใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบนมาตกตะกอน DNA ด้วย Isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol จากนั้นทิ้งตะกอนให้แห้ง ค่อยๆ ละลายตะกอนด้วยน้ำ Deionized จนตะกอนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน วัดความเข้มข้นของ genomic DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer รุ่น NANODROP1000 (Thermo Scientific, U.S.A.) หากยังไม่ใช้งานโดยทันที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การสกัด DNA ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN, U.S.A)

ชุดสกัดดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการสกัดชิ้น DNA ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 40-50 กิโลเบส ซึ่งการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดังกล่าวมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 ตัดแถบ DNA ที่ต้องการออกจากเจลด้วยมีดผ่าตัดที่สะอาด ใส่ลงในหลอด microfuge และชั่งน้ำหนักเจล

3.3.2 เติมบัฟเฟอร์ QX1 ปริมาตร 3 เท่าต่อเจล 1 เท่า

3.3.3 เติมสาร QIAEXII ลงไปในเจลที่ละลายในบัฟเฟอร์แล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

3.3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เจลละลายและจับ DNA ได้ดี ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex ทุกๆ 2 นาที เช็คสีของสารละลาย หากสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีม่วง ให้เติม 3 M Sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมในการจับ DNA

3.3.5 ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเป็นเวลา 30 วินาที แยกเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

3.3.6 ล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ QX1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่ออีกสองรอบ ปล่อยให้ตะกอนแห้งประมาณ 10-15 นาที

3.3.7 เติมน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ละลายตะกอนจนหมด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสประมาณ 5-10 นาที

3.3.8 ปั่นเหวี่ยงสารละลายดังกล่าวประมาณ 30 วินาที แยกเอาเฉพาะ DNA (สารละลายใสส่วนบน) อย่างระมัดระวัง แล้วจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การเตรียม template DNA เพื่อทำ Genomic DNA library

3.4.1 นำ genomic DNA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ให้เป็น complete digestion ดังต่อไปนี้ *Bam*HI *Hin*dIII *Xho*I *Eco*RI และแบบ combination enzymes ได้แก่ *Xho*I/*Hin*dIII และ *Eco*RI/*Hin*dIII ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์รวม 100 ยูนิต ในปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกริยาตามความเหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้

3.4.2 นำตัวอย่าง genomic DNA ที่ถูกตัดจากทั้ง 6 ตัวอย่าง ไปตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ genomic DNA ที่ยังไม่ตัด เพื่อให้มั่นใจว่าการตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวเกิดขึ้นสมบูรณ์จริง

3.4.3 นำ genomic DNA ที่ได้ผ่านการตัดด้วย restriction enzyme ต่างๆ (ความเข้มข้น 10 ยูนิต) อย่างสมบูรณ์ที่กล่าวมาข้างต้นมาตกตะกอนเพื่อให้มีความเข้มข้นมากขึ้น และแยกขนาดด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.6% Agarose gel (GenePure LE Agarose, Spain) ขนาด 12x16 เซนติเมตร ด้วยความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจดูการแยกชิ้นของ DNA ที่ได้ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ภาพ (Gel Documentation) (Syngene, U.S.A.) ประกบเจลที่ได้ด้วยพลาสติกใส ทำสัญญลักษณ์ตามตำแหน่งของ lambda DNA/*Hin*dIII/*Eco*RI marker และส่วนของ DNA ที่แยกเป็นชิ้นในแต่ละช่อง เพื่อใช้เป็นต้นแบบของแถบ DNA ที่ต้องการ

3.5 การทำ Southern Hybridization

การทำ Southern Hybridization ด้วยวิธี DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II ของบริษัท Roche ประเทศเยอรมัน ซึ่งเป็นชนิด Random primed DNA ซึ่งติดฉลากด้วย dioxigenin-dUTP, alkaline-labile และตรวจสอบด้วยน้ำยา CSPD ซึ่งเป็น chemiluminescence substrate สารเคมีที่ใช้ในการทำ hybridization บอกวิธีเตรียมไว้ในภาคผนวก ก ขั้นตอนการทำ southern hybridization มีดังนี้

3.5.1 การติดฉลากบน DNA

Template DNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 16 ไมโครลิตร แล้วต้มสารละลายดังกล่าวในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งโดยทันที เติม DIG-High Prime ลงไปปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงอย่างเบา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.5.2 การถ่ายโอน DNA ลงบนแผ่นเมมเบรน

เจลที่ได้จากข้อ 4.1.3 นำมาทำ Depurification ด้วย 0.25 M HCl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำสองครั้งโดยเปลี่ยนสารละลาย 0.25 M HCl พร้อมเขย่าเบาๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่อง horizontal shaking plate เมื่อครบเวลาล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด ต่อด้วย Denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่าอย่างเบาตลอดเวลา หลังจากนั้นล้างเจลที่ตรึง DNA อยู่ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำ DNA ที่ตรึงอยู่ด้วยเจลที่ได้มาทาบลงบนแผ่นเมมเบรน ชนิด N positive (+) charge nitrocellulose membrane (Amersham, UK) ที่ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย 10X SSC transfer DNA จากเจลไปยังแผ่นเมมเบรนด้วยวิธี Vacuum blot จนกว่า DNA จะถูกถ่ายไปยังแผ่นเมมเบรนทั้งหมด นำแผ่นเมมเบรนที่มี DNA อยู่ไปทำ cross link ด้วยรังสี UV เพื่อตรึง DNA ให้อยู่บนแผ่นเมมเบรน

3.5.3 การทำ Hybridization

การทำ Hybridization ทำได้โดยเริ่มจากการทำ prehybridize เมมเบรนโดยการอุ่น DIG Easy Hyb (granule) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงบนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำ DIG-labeled probe ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 ให้เสียสภาพที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มที่ 0 องศาเซลเซียสโดยทันที เติม DIG-labeled probe ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ของ DIG Easy Hyb (DIG Easy Hyb 3.5 มิลลิลิตรต่อเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร) ผสมให้เข้ากัน ระวังไม่ให้เกิดฟอง เติมส่วนผสมดังกล่าวลงไปแทนส่วนที่เป็น prehybridize หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ได้จากการคำนวณตามสูตรด้านล่าง) ซึ่งเท่ากับ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ Hybridization สามารถคำนวณได้จาก

Hybridization temperature (Tm) = 49.82 + 0.41 (% GC content) - (600/ความยาว probe (bp))

3.5.4 การตรวจสอบการทำ Hybridization

หลังจากทำ Hybridize ครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย 2X SSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สองครั้ง แล้วล้างต่อด้วย 0.5X SSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สองครั้ง หลังจากนั้นล้างเมมเบรนด้วย washing buffer (1X) 5 นาที ต่อด้วย blocking solution (1X) 30 นาที แช่เมมเบรนใน antibody solution (1X) 30 นาที ล้างด้วย washing buffer เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง แช่ครั้งสุดท้ายใน detection buffer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นประกบแผ่นเมมเบรนด้วยพลาสติกใส หยดสารละลาย CSPD ให้ทั่วแผ่น อย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

บ่มแผ่นเมมเบรนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีไม่ให้มีแสงสว่าง ประกบฟิล์มใช้เวลาประมาณ 15 นาที แล้วทำการล้างฟิล์ม

3.6 การเตรียม DNA เพื่อใช้ในการโคลนนิง

หลังจากการตรวจสอบการทำ Hybridization ด้วยการวิเคราะห์ฟิล์มที่ได้จากข้อ 5.4 แล้ว จะพบตำแหน่งของชิ้นยีนบน genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับยีนที่สร้างสารหอมได้ปรากฏอยู่ จากนั้นทำการเตรียม DNA ตั้งแต่ข้อ 2 จนถึงหัวข้อ 4.3 อีกครั้ง ทาบเจลให้พอดีกับฟิล์มที่ผ่านการทำ southern hybridization ตัดเจลบริเวณที่พบแถบ DNA ที่คาดว่าจะมีชิ้นยีนที่ต้องการ สกัด DNA ออกจากเจลโดยใช้ชุด สกัด QIAEXII Gel Extraction Kit และวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ด้วย Spectrophotometer รุ่น NANODROP1000 (Thermo Scientific, U.S.A.)

3.7 การโคลนนิง

3.7.1 การเตรียมเวคเตอร์

นำพลาสมิด pZEro™-2 ซึ่งใช้เป็นเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดเดียวกับที่ต้องการนำไปเชื่อมต่อกับ insert DNA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาตามความเหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้

3.7.2 การเตรียม competent cell

1. เลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, U.S.A.) จำนวน 1 โคโลนีในอาหาร Luria Bertani Broth (LB) (Biomark, India) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์ให้อยู่ในช่วง OD_{560} ประมาณ 0.3-0.4

3. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน

4. เติมสารละลาย TFB (I) ที่เย็นจัดปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปละลายตะกอนที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน

5. เติมสารละลาย TFB (II) ที่เย็นจัดปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปละลายตะกอนที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที

แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ที่แช่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในทันที

3.7.3 การเชื่อมต่อเวคเตอร์และ insert DNA (ligation)

การเชื่อมต่อระหว่างชิ้น insert DNA และพลาสมิดเวคเตอร์แบบ sticky end ใช้อัตราส่วน insert DNA : พลาสมิดเวคเตอร์ เป็น 2 : 1 โดยสามารถคำนวณความเข้มข้นของชิ้น insert DNA ที่นำมาใช้ ligate ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้น insert DNA ได้จากสูตรต่อไปนี้

ความเข้มข้น (ng) = 2 x (ความยาวของชิ้น insert DNA (bp)) x 100 / 3297

ผสม digested pZErO^{TM}-2 vector 1 ไมโครลิตร กับ digested insert DNA ที่ได้จากสูตรการคำนวณด้านบน และ10X ligation buffer 1 ไมโครลิตร เติม T4 DNA ligase (4000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Deionized water ให้ครบปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสม ligation solution ทั้งหมดโดยการปิเปต (pipette) ขึ้นลงอย่างช้าๆ บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการ purified ligation solution ตามวิธีของชุดสกัด QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN, U.S.A)

3.7.4 การ transformation

1. ผสม ligation solution ลงใน *Escherichia coli* TOP10 competent cell competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ปลายปิเปต กวนให้เข้ากันอย่างช้าๆ บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. ทำ heat shock โดยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

3. เติมอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที

4. ถ่าย transformation solution ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการทำ spread plate technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.7.5 ตรวจสอบโคลนที่ได้

คัดเลือกโคโลนีที่เกิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 5.4.4 โดยเลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร LB agar มาสกัด พลาสมิดและตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นโคลนที่ต้องการที่แท้จริง

3.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis method

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pZErO™-2 vector บนอาหาร Luria Bertani Agar (LA) (Biomark, India) ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ใส่อาหาร Luria Bertani Broth ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบน เติม solution I (ภาคผนวก ก) ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม solution II (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาอย่างเบา แช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที เติม solution III (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา แช่ในถังน้ำแข็งประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอน DNA ที่ได้ด้วย isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ ที่แช่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนครั้งที่สองด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 100% ที่แช่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนประมาณ 50 ไมโครลิตร เติมด้วย RNase A (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อกำจัด RNA ที่ไม่ต้องการออกไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เช็ค พลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้

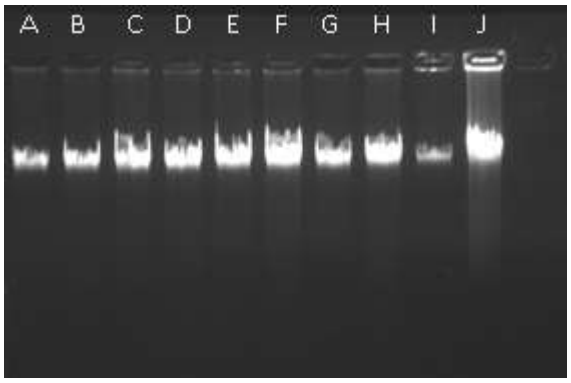
3.9 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

เตรียมพลาสมิดที่มีชิ้น insert DNA เช่นเดียวกับการสกัดพลาสมิดตามข้อ 8 ทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์เพื่อยืนยันขนาดของชิ้น insert DNA และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis โดยเตรียมพลาสมิดที่มีชิ้น insert DNA ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร หาลำดับเบส และวิเคราะห์ผลลำดับเบสดังกล่าวโดยการเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสจากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียม genomic DNA ที่มีความสมบูรณ์



รูปที่ 4.1 Genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่สกัดได้ (A-J)

เลนที่	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	Purity $OD_{260/280}$
A	1.06	1.82
B	1.08	1.81
C	1.21	1.74
D	1.26	1.86
E	1.30	1.73
F	1.39	1.88
G	1.24	1.76
H	1.32	1.95
I	0.83	1.70
J	1.48	1.72

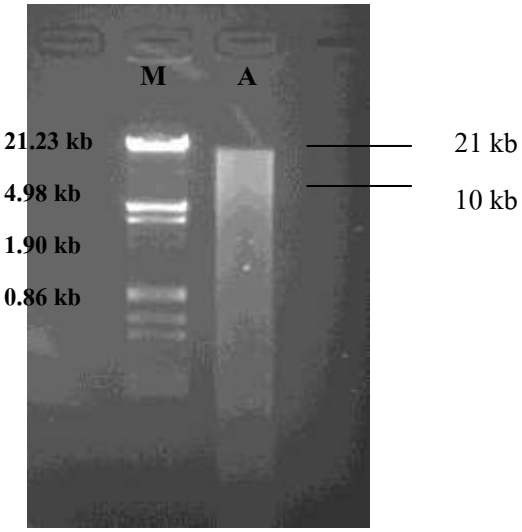
ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและค่า Purity ของ genomic DNA ที่สกัดได้

เตรียม genomic DNA ที่มีความสมบูรณ์จากรา *Acremonium nigricans* ได้ genomic DNA ตามรูปที่ 4.1 (เลน A –J) โดยการวิเคราะห์ DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบค่าความเข้มข้นและค่า purity ดังแสดงในตารางที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ที่ได้จากการทดลองนี้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ในงานในขั้นต่อไป ($OD_{260/280}$ อยู่ในช่วง 1.7-2.0) ซึ่งจากตัวอย่าง A-J นั้นสามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้ทุกตัวอย่าง

4.2 การเตรียม complete genomic DNA library

ทำ DNA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit จากนั้น DNA ที่บริสุทธิ์แล้วจะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) เพื่อคัดเลือกขนาดด้วย

เอนไซม์ ให้มีขนาดของ DNA ประมาณ 10-21 กิโลเบส (รูปที่ 4.2) เพื่อให้สามารถบรรจุลงไปในเฟจที่เลือกไว้ในขั้นตอนต่อไปได้ ในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์ *Bfu*CI ความเข้มข้น 0.8 ยูนิต ต่อ genomic DNA 100 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งให้ส่วนปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมีนิวคลีโอไทด์เป็น GATC จากนั้นเตรียมชิ้น partial genomic DNA ที่ได้ด้วยการเติมเบส A และ G (partial fill-in) โดยใช้ Klenow Fill-in Kit (Stratagene, U.S.A.) (ภาคผนวก ข) เพื่อที่จะใช้จับกับส่วนปลายที่เป็น A และ G ให้เหลือส่วนที่เป็น T และ C ไว้ในการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ Lambda phage จากชุด Lambda Fix® II/*Xho*I partial fill-in vector kit (*Xho*I/Gigapack® III XL Packaging Extract) (Stratagene, U.S.A.) ซึ่งเฟจดังกล่าวถูก predigested ด้วยเอนไซม์ *Xho*I มาก่อนทำให้ส่วนปลายของเฟจมีนิวคลีโอไทด์เป็น C และ T เหลืออยู่



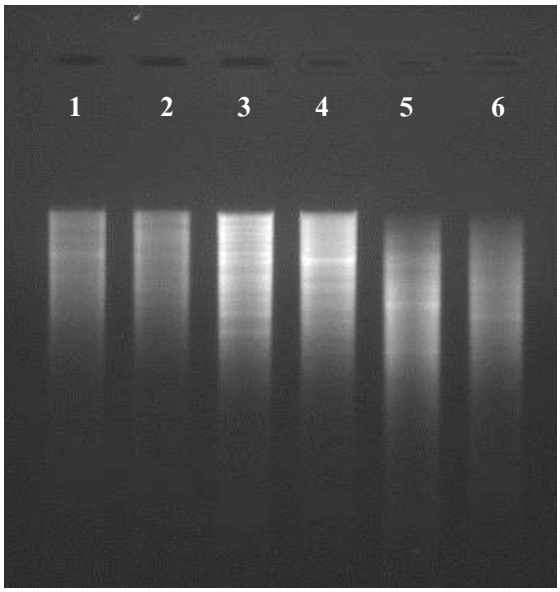
รูป 4.2 Partial digestion genomic DNA ของรา *A. nigricans* ด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI (A) เทียบกับ marker Lambda/*Hin*dIII/*Eco*RI (M)

หลังจากทำการเชื่อมต่อ (ligate) ชิ้น DNA กับเฟจ Lambda Fix® II/*Xho*I แล้วจึงนำเข้าสู่แบคทีเรีย (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบโคลนที่ได้ (titering) โดยดูจากจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองมาถึงขั้นตอนนี้ไม่พบ plaque เกิดขึ้นเลยและผลทดสอบชุดควบคุม (control) ให้ผลไม่ตรงตามเกณฑ์ที่ได้มีการอ้างอิงไว้ (รูป 4.3) ซึ่งจากเลนที่ 5 และ 6 เป็นส่วนของชุดควบคุมที่มีการเติมเบส A และ G ลงไปที่ปลายทั้งสองด้านของ DNA นั้น เมื่อนำมาต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ตามขั้นตอนในคู่มือต้องไม่สามารถเชื่อมต่อกันเป็นวงได้ แต่ผลที่ได้กลับให้ผลที่แตกต่างกับที่ระบุไว้ในคู่มือที่ควรจะมีลักษณะเหมือนกับ pUC19/*Bam*HI-digested control DNA ในเลนที่ 4 ใน

งานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนจากการทำ genomic library มาเป็นการทำ partial genomic DNA library ของชิ้นยีนเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมแทน

4.3 การเตรียม Partial DNA library

ทำ Partial library ด้วยการเตรียม genomic DNA ของรา *A. nigricans* ทำ DNA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit จากนั้น DNA ที่บริสุทธิ์แล้วที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม จะถูกนำมาตัดแบบ complete digestion ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ *Bam*HI *Hin*dIII *Xho*I *Eco*RI และแบบ combination enzymes ได้แก่ *Xho*I/*Hin*dIII และ *Eco*RI/*Hin*dIII ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์รวม 100 ยูนิต ในปริมาตรรวมทั้งหมด 200 ไมโครลิตร ดังแสดงให้เห็นในแถบ DNA ของแต่ละเลน (รูปที่ 4.3)

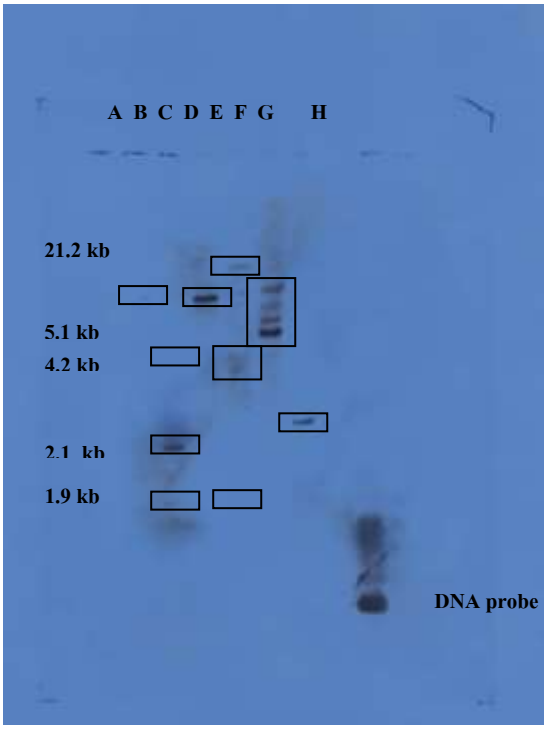


รูปที่ 4.3 Genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (1) *Eco*RI (2) *Xho*I (3) *Bam*HI (4) *Eco*RI/*Hin*dIII (5) และ *Xho*I/*Hin*dIII (6)

4.3.1 การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP จาก genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แบบสมบูรณ์

ทำการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP ซึ่งต้องการทราบว่าอยู่บน fragment ใดของ genomic DNA ของรา *A. nigricans* จึงนำ genomic DNA ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แบบสมบูรณ์ ตรวจสอบ DNA ด้วย 0.7% Agarose gel electrophoresis ที่ 60 โวลต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ DNA probe สำหรับยีน *badh* ขนาด 596 bp ที่ได้จากหัวข้อ 3.1.4 ในการวิเคราะห์ด้วยการทำ Southern Hybridization แสดงแถบ positive signal ที่พบชิ้นยีนที่สามารถจับกับโพรบได้ และปรากฏบนแผ่นฟิล์มทั้งหมดจำนวน 14 ชิ้น (รูปที่ 4.4) แถบ A เป็น Lambda/*Hin*dIII/*Eco*RI marker ซึ่งบอกตำแหน่งชิ้น

DNA บนเจล จากการทำเครื่องหมายบนแผ่นพลาสติกไว้และนำมาทาบทับแผ่นฟิล์ม จะทำให้ทราบถึงตำแหน่งของ DNA บนแผ่นฟิล์มที่ผ่านการทำ Southern Hybridization (ไม่แสดงบนแผ่นฟิล์มดังกล่าวเนื่องจากไม่มีส่วนใดจับกับ DNA probe ได้) แถบ B เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พบบริเวณ positive signal จำนวน 1 แถบ ขนาด 10 kb แถบ C เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII พบบริเวณ positive signal จำนวน 3 แถบ ขนาด 4.5 kb 3.7 kb และ 1.7 kb แถบ D เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII พบบริเวณ positive signal จำนวน 1 แถบ ขนาด 10 kb แถบ E เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I พบบริเวณ positive signal จำนวน 4 แถบ ขนาด 17 kb 4.5 kb 4.2 kb และ 1.7 kb แถบ F เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI พบบริเวณ positive signal จำนวน 4 แถบ ขนาด 12 kb 8 kb 7 kb และ 6 kb ตามลำดับ สุดท้ายแถบ G เป็น genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI/*Hin*dIII พบบริเวณ positive signal จำนวน 1 แถบ มีขนาด 4 kb และแถบ H เป็นโพรบที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4.4 Positive signal บน Southern blot analysis จาก genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์แบบสมบูรณ์ชนิดต่างๆ Lambda/*Hin*dIII/*Eco*RI marker (A) genomic DNA ของรา *A. nigricans* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (B) *Xho*I/*Hin*dIII (C) *Hin*dIII (D) *Xho*I (E) *Eco*RI (F) *Eco*RI/*Hin*dIII (G) และ DNA probe (H)

โดยตำแหน่งแถบที่เป็น positive signal ดังกล่าวคาดว่าน่าจะมีส่วนที่เกี่ยวข้องกับยีน *badh* เนื่องจาก DNA probe ที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *badh* ในราดังกล่าว แต่ในแถบ positive signal บางแถบที่เห็นผลไม่ชัดเจน หรือปรากฏแถบไม่ชัดเจน คาดว่า DNA probe อาจจับได้เพียงบางส่วนของยีน ซึ่งยีนที่ได้อาจเป็น homologous กันกับยีน *badh* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนในกลุ่มเดียวกับ *badh* ดังนั้นเมื่อทราบตำแหน่งที่แน่นอนของชิ้น DNA ที่มียีนที่ต้องการแล้ว ทำซ้ำขั้นตอนการเตรียม partial DNA library อีกครั้ง โดยการนำ genomic DNA ไปตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แบบสมบูรณ์ภายใต้สภาวะเดียวกับการทำ Southern Hybridization จากนั้นนำเจลที่มีชิ้น DNA ที่ต้องการมาทาบด้วยแผ่นพลาสติกที่ทำสัญลักษณ์บริเวณตำแหน่งของชิ้น DNA ที่ต้องการไว้ จากนั้นตัดเจลบริเวณที่มี DNA ที่ต้องการอยู่ออกมา สกัดชิ้น DNA ที่ตัดได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAEX II Gel Extraction Kit และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ตกตะกอน DNA เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไปโดยการทำ purification ด้วยชุดสกัด QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit เพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและตรวจสอบชิ้น DNA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่ง

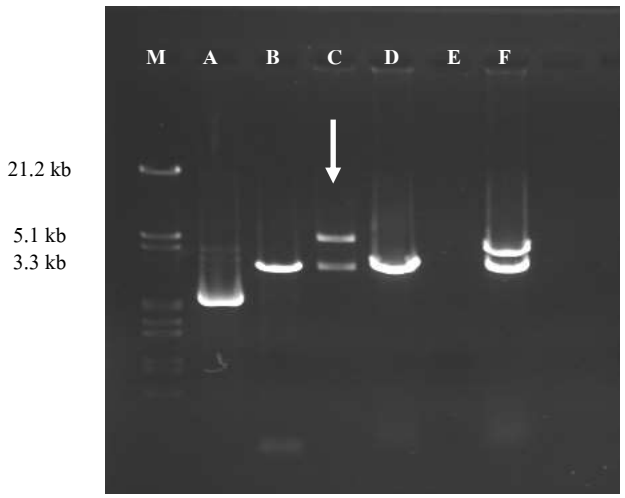
4.3.2 การโคลนนิง

ชิ้น insert DNA ที่เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pZEro™-2 เรียบร้อยแล้วจะนำไปทำการ transformation เข้าสู่ *Escherichia coli* TOP10 competent cell เลี้ยงบนอาหาร LB ที่มี kanamycin เพื่อใช้คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบน selective media ได้ นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร (ตารางที่ 4.2) ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แสดงแถบ positive signal ขนาด 10 kb แต่เมื่อนำมาทำการโคลนกลับไม่ปรากฏโคโลนีบนอาหาร เนื่องจากชิ้น DNA อาจมีขนาดใหญ่มากเกินไปที่จะสามารถโคลนเข้าไปในเวคเตอร์ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญบน selective media ได้ ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII พบแถบ positive signal ขนาด 4.5 kb มีจำนวน 15 โคโลนี ส่วนขนาดชิ้น 3.7 kb และขนาด 1.7 kb พบมากกว่า 300 โคโลนี ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII พบโคโลนีบนอาหารจำนวน 3 โคโลนี ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I มีชิ้น DNA ขนาด 17 kb ไม่พบโคโลนีบนจานอาหาร ส่วนชิ้น DNA ขนาด 4.5 kb พบจำนวน 20 โคโลนี ชิ้น DNA ขนาด 4.2 kb พบจำนวน 15 โคโลนี และชิ้น DNA ขนาด 1.7 k พบมากกว่า 300 โคโลนี ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI พบชิ้น DNA ที่เป็น positive signal จำนวน 4 ชิ้น เป็นชิ้น DNA ขนาด 12 kb ไม่พบจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร ชิ้น DNA ขนาด 8 kb พบจำนวน 3 โคโลนี ชิ้น DNA ขนาด 7 kb พบจำนวน 2 โคโลนี และชิ้น DNA ขนาด 6 kb พบจำนวน 8 โคโลนี ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI/*Hin*dIII แสดงแถบ positive signal ของชิ้น DNA ขนาด 4 kb พบจำนวน 30 โคโลนี จากผลการวิจัยนี้เห็นได้ว่าเวคเตอร์ pZEro™-2 ซึ่งมีขนาด 3.3 kb สามารถรับชิ้น DNA ขนาดเล็กกว่า 4 kb ได้ดี แต่หากชิ้น DNA มีขนาดใหญ่กว่า 4 kb ประสิทธภาพการรับชิ้น DNA ของเวคเตอร์ก็ลดลงตามลำดับ และเห็นได้ว่าขนาด DNA ที่ใหญ่กว่า 8 kb ก็ไม่สามารถพบ

โคโลนีบน selective media ได้แล้ว แสดงให้เห็นว่าในงานวิจัยนี้พลาสมิดดังกล่าว สามารถรับชิ้น DNA ได้ขนาดใหญ่กว่าประมาณ 2.4 เท่า

ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีที่ได้จากวิธี transformation ของชิ้น DNA ขนาดต่างๆ

เอนไซม์	**ขนาด DNA (kb)**	**จำนวนโคโลนี**
*Bam*HI	10	-
*Xho*I/*Hin*dIII	4.5	15
	3.7	>300
	1.7	>300
*Hin*dIII	10	3
*Xho*I	17	-
	4.5	20
	4.2	15
	1.7	>300
*Eco*RI	12	-
	8	3
	7	2
	6	8
*Eco*RI/*Hin*dIII	4	30



รูปที่ 4.5 ตัวอย่าง DNA ของยีนที่โคลนได้จากชิ้น insert DNA ขนาด 4.5 กิโลเบสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hind*III (บริเวณลูกศรชี้)

การตรวจสอบให้แน่ใจว่าเป็นโคลนที่ต้องการอย่างแท้จริงสามารถทำได้โดยการสุ่มโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิด จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกับที่ตัดชิ้น DNA ในตอนแรก แล้วตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.5 ซึ่งแถบ A ถึง F เป็นการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่เกิดขึ้นจากชิ้น DNA ขนาด 4.5 kb ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII โดยพบจำนวน 15 โคโลนี สุ่มมาสกัดพลาสมิดจำนวน 6 โคโลนี ตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าแถบ C พบส่วนที่เป็นพลาสมิด (ขนาด 3.3 kb) และส่วนที่เป็นชิ้น insert DNA (ขนาด 4.5 kb) ส่วนแถบ B และ D พบเฉพาะส่วนพลาสมิด ไม่พบชิ้น insert DNA แถบ A คล้ายกับเป็นพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ไม่ขาดส่วนแถบ E ไม่เห็นแถบใดๆปรากฏอยู่เลย และแม้ว่าแถบ F จะเห็นแถบสองแถบ โดยแถบล่างน่าจะเป็นพลาสมิดเนื่องจากมีขนาดเท่ากับพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง แต่แถบด้านบนมีขนาดเพียงไม่เกิน 4 kb จึงแน่ใจว่าไม่ใช่ชิ้น insert DNA ที่ต้องการ

4.4 การหาลำดับเบสของยีนที่โคลนได้

ส่งชิ้นยีนไปวิเคราะห์หาลำดับเบสจำนวนทั้งหมด 6 ชิ้นได้แก่ ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI/*Hin*dIII ขนาด 4 kb ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ขนาด 8 kb และ 6 kb ชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII ขนาด 4.5 kb และ 3.7 kb และชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I ขนาด 1.7 kb ได้ผลการวิเคราะห์มาจำนวน 2 ชิ้นยีน โดยเป็นชิ้นยีนขนาด 4.5 kb ซึ่งเป็นยีนของ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII และยีนขนาด 1.7 kb ซึ่งเป็น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I โดยชิ้นยีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I/*Hin*dIII มีขนาดทั้งหมด 4673 เบสและมีลำดับเบสดังนี้

```
TGCTCGAGTC ACACGTCCAG CTGATTCGAA AAGGAAACTC TCGACTATCT CCGGGACTCT        60
CCACGCTTCA ACGGCGCGAG TGGAGTCATT GATATTCCTG CTGCCATGGC TGAGATTACA       120
ATCTATACTG CTGCACGCGC GTTGCAGGGC GAGGAGGTCC GCAAGAAGCT CACGGCAGAG       180
TTCGCTGAAC TGTACCACGA TCTAGACAAG GGATTCAGCC CCATTAACTT CATGCTCCCT       240
TGGGCTCCAT TGCCGCACAA CCGGAAGCGT GATGCTGCTC ATGCTCGGAT GAGAGAAATC       300
TACACGGACA TTATCAACGA ACGACGCAAG AACCCAGACG AGGAGAAGTC AGACATGATC       360
TGGAATCTGA TGCATTGCAC CTACAAGAGT GGCCAGCCGG TCCCGGACAA AGAGATTGCT       420
CACATGATGA TCACTCTGTT GATGGCAGGG CAACACTCGT CTTCTTCGAT TAGTTCTTGG       480
ATCATGCTGC GATTGGCCTC TGAGCCTCAG GTGCTTGAAG AGCTCTACCA AGAACAGCTG       540
GCCAGCCTTA GTAACAGAAA TGGAGTCTTC GAGCCGCTGC AGTATCAGGA CCTTGACAAG       600
CTGCCATTCC TCCAGAGTGT CATCAAGGAG ACTCTACGGA TCCACTCGTC CATCCACTCG       660
ATCATGCGCA AGGTGAAAAA CCCGCTACCA GTACCTGGCA CCTCTTACAT TATTCCCGAA       720
GACCATGTTC TACTCGCCTC ACCAGGCGTA ACCGCGCTTA GTGACGAATA CTTTCCTAAC       780
GCAACCAGGT GGGATCCGCA TCGTTGGGAG AACCAGCCTG ACAAAGAGGA GGATGGAGAG       840
ATGGTGGACT ACGGATATGG CAGCGTGTCG AAGGGCACTG CTAGTCCCTA TCTACCTTTT       900
GGCGCTGGCC GTCACCGCTG CATTGGAGAG AAGTTCGCCT ACGTCAACTT GGGCGTTATT       960
ATCGCGACCA TAGTGCGCCA CTTGAAGCTA TTCAATGTGG ATGGCAGGAA AGGAGTGCCC      1020
GGAACCGATT ACTCGACCCT CTTCTCCGGT CCCATGAAGC CTGCTATAGT GGGTTGGGAG      1080
CGACGCTTCC CGGACCACTC CAAAGGGTCC TTGAATTAGG CCACCTTCTT GCAGGTTACC      1140
TTTCGTCTCC AGTCTTTTCC CAACTAGTAC CTTGTAATAA GCATCCTGTA TGATTAGAGC      1200
ATTCAGTCCA TAGCCAAAGA AAGAGATATG ACCGCTGACC AGTCAGCATA AAGATCCAAC      1260
ATCCCAATCT TGAACCGTGA TTGTAGACAA ACCGAGGGTG AATGAATGAA TGAATGCACG      1320
TGAGATCCCT CGTGTCATCA TTCCACCACC TGTGAAACTT GCCCCCCTTC CATCCGAGGG      1380
TCAATTTCCA CTTACCTTGA CATGCGCATC AATACAAGTG CTGTCCGTGT ACCAGCAAAA      1440
CCGCGTATAT GAAATACCAC CCCAGGGCAA AGAAAGCTAC ATTGAGATAA GGCGCACACA      1500
TGCGCAGGGT GGCGTCTCAG AATGAACAAA AAGCAAGTAA ATAGAACAGC GAGGATAAGG      1560
CTAGACCCAT CTCGCCACAA AGCAAAGCAA AGTAGAAGAG GCATTTGACC TATTGTTCCG      1620
CGGGATGATG TACAGAATGC GACCCAGAGC CTGCTCCTGA ACACTGAGGC TGAGCGCCAG      1680
CAAACACACA CACAGCGCCA CCTGCGGGAG AAGGGCCCGA GTATGTCAAA ATAAGGATAC      1740
GATATGGGGA AGGTGGAAGG GCGTGTGACC GACAGAAAAA GCTGCGGGCC GAAGTGTCAG      1800
ACCCAGTGAT GGATAGTTGA AGGTTTGATA ATAGGTTGAA TAGATTACCT AGACGGGGAT      1860
```

```
AAATTGCGAT CATAATGACA TAAAAAAAGT ACATGGGGGG ATTTGGCGCT GATCGACAGG      1920
CCTGGACCTG GAATACGAAG CCTGGAGGAA GCATCCAGAA ATGGATGAAT CTGCAGTGTA      1980
GTATACCTAA TGTAGGGGAC GGAGGCTCAT GACAGATTTG GTCGTGAAGG TGTGTGTGTG      2040
TGAAAGGCTG ACCTCATCGC CGAAACAGGA CTGCAGAACA AACAACTGCA GAGTGTCTTC      2100
TATCATCATC ATCATCCACT TCCAGGATCA GAATCCATTG AATGGAGCCC TGAGGACAAG      2160
GTATCCTGCT GCTCCGGATC ACGGGCGTGT GATGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAATTAGA      2220
AGGAGGGGAC CATAATATCG TAAAGATCGG CGGGAAATTC GCTAAGCAAT ATTAAGAAGC      2280
CACTGAATTG ATGACTTGTC AGCGCGTAAT CCCGGGATTC CAGGAGGAGC CAAGGGAACA      2340
TCCGCAATGT GATCGAATTG CCAACGCAGA GATCTGGTGA CCCGGAGATC GACAGTCGCC      2400
AGGTCCTACA ACGCTAGAGA CACAGTCCTC CGGCTCCCAG CACCGGCAGA CATGGGGAGC      2460
AGAGAGGTAT AGGGAAAAAG TACCTGAGCT GGTTTGAAGA AAAGGCTACG GACAAGAGGA      2520
GGTTTGATTT CGCGTGTCTC TTTGCGGGGC GTACAAATGA TGCTGACTGT TGTTGCAAAG      2580
AGGCCAGCCG CCATGTGACC ACGTGATGGG GTCGGTCTAG CAGTGCTAAG CGCATTCAGG      2640
TCACCTTATT CGCACTTTCT CTTGGGCAGA TGAACTGGAT ACGAATGCTA GGAGAGGCAA      2700
TACTCCCGTA TTGTGCCGGC AGATGACGAT CTTTGGGCAT CGCGGGGAGA ATCTGGGGAA      2760
ACATTGACCT TGTGGATCTG TCTGTCAGAG CCGACTGCAA GTATCGCCAG CTGTGGATGT      2820
GGAATACTGT GCAATCTCTC GACTGTAACC ATCTGACGTT GACCTCAACA TGTCAGTGTG      2880
TCTATCTTTG CTTTTCCCTG ACCCCATTCT GGCATCTGGC GTCGTCTTGT GGCTTGTATG      2940
ATGGGAGCGC GCATGTCCAC TGATCTTCTT CACGTTGGCC ACCACCCTGT GGATGTTATA      3000
CTCTATATGG ACATATATAC GTACGTCTGA AATAAGGCAG AACTCCGGTT TACGAGAAGA      3060
AGAAGGTCAG TAGGTGAAAC GGTTACCTAA AGTCCTAACC CAGTGTACCC AAGTTGTTGG      3120
AAGGATCCTA TATCGAGTAT TCGGCAGAGT TTCACCTAAC AATGCAGACA GCACAGCTCC      3180
TGATAACCGG AGAATTGGTT GCTGCTACCC TCCATGAAGA AAGGAAGTTA AACCTAATCG      3240
ATAACACCGA CACTTTGGGT CTTCCTTCAT TGGGATTTGG CCAGCGATAT TCACCCGCTG      3300
TGAAGTCAAG CGCGGATGAT GCTATGATGA TTCCCGASCC AGGCTATGAT GATAACCCCG      3360
TTAACTTGTT TGCAAATGAA CATCGGTTGC ACAAAGCAGG TAGACTGAGA ATTCTCCGGC      3420
TGGCATTCGC AATAGGACTA TACACGGGGT TATGATAGGC ATGGGCATCC TGTTTTTCGT      3480
CCACATTCCC AAGAAAACAA ATGATAGCGA GGTGCAACGC TCCACCAGCC TCTTCGAATC      3540
ACTGCCAGCG ACTTTCATCT TCTAGTTTAC CCGTCTGGTA TAGAGCAGAG GCAGGGCAAT      3600
GCAAACCAGT CGAGTTGAAT AAGCAGGCGA GTGGTACAGC ACAAGTACCT CCGTATGTAA      3660
ACGGGGCTAT TGATACCGAC GAAAACCTCG ATGGAACCCC GGCAATACGA CTAGCGACTA      3720
AACCGCCGCG GAATACCCGG TCACTTGGCT CCAATCCCAC CAGCATTCCG ATCTTGATAT      3780
GCAGGGAGAC ACCGGCGCCA TTGTACCACA CCATATGGTG ACATTAATTT CCCAAGCCCT      3840
ATGCGATCCC TGATCTTTCA ATAAAGCCAC AACTCAAATT ATACCGGGCG TACATTTGTC      3900
TGTGCTACCG TGATCGAATG GTGATTAGTC TTGCCGGGAG TGGGAGGAGA AAAGCCTCAC      3960
TAAGAAACGC GTCCCCAACT TCCCCGCCAA ATCATCGTCG TGACTAGGCT TGCTCCCCGC      4020
GCCTCCCCCT CACTAACCAG GCGCACAGAG CGCTGCTTGT TCTGATTCGC AGGTGGCTTT      4080
TGCGATTAAG GACGAATCGA GTAAGCTGAG CCCGGATGAA TGTAACTTGG ACCCACTGAC      4140
GAGGATATTC AGGAGCGTGA CTTGGGACCC TAATCTGAGG GTAATACAGC TCGCTGCCAG      4200
CTACGAGCCC CCGGCTGCAT AACACGGCAT TCACAGTGTG CGTTGGGTAA TAGAATATGT      4260
GCGACAATCC CAACAAGCGG TAGGCCTACA TGTACGGATT GGGTTTTGGG AGCAGTTGGT      4320
CTACAACCGC TGCACTCAAC GAATCAAGCA ATCGCCTGAC TCTCTGGACG CCGTAGCTTC      4380
AAGTGTGAAC CAGCAAATTG AGGTAACGTG AGACATGCCA TTGGTTGTGA GCTCGGGATA      4440
GCGCGTATTC GAGGTACGCC GCACCAGGAA AAGTCATTGC CATCATGTGA CTCCTAGCCC      4500
TTCCGGCTAG CCCGGAAAGG GGATCAGTTT CTCCGTGATT ACTCCGTCCA TACGGACCTG      4560
GCCCTGAGCC AAAGCACCAA CAATTGTCCC TGGAAACCAG CAATCCATGC CCAATGAAGA      4620
CCCAGTTGTA CCTACTCTGT TAAATAATCG ACCAAAAGTC CCGACTCCCG GCA              4673
```

ส่วนชิ้นยีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I มีขนาดทั้งหมด 1376 เบส (จากที่คาดไว้ประมาณ 1.7 kb) และมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

```
GTTGGCATAC TCAAGACCTG GGTGTCAAGC TCTGTATCCA TATCAACAAT GACAGATGCT        60
ATCTCCCACT CCTCCATGTC AATCAAACTC GCCAACTCTG AACAGCAGTC ATTGGCTTCA       120
GGCACACCTG CAAAGTCCAA GCTCTCATAA TCTGGTTCCT CGATCATCTG TCTAATTTGG       180
CTCTGATGAC CCTGCATGTT TTCGCCACGA TTGTCGACAT CGGACATCAA GGACGACTTA       240
TCCCTGCTGC CATTATTCAG GAACCGGGAG AGTAGGTCGT AGTCTGGTGT GATTGTTTTT       300
CGGAGCTTGG CACCCATTGC TCCTTCATAA TCAAATTCCT CAGTGTCAGC CACGGAGGTG       360
CTGCCAGGCT CCAAGGTTGG CTGCCGGCAC TTGCTGGCAT TGGGCCAGGC AAATTGGCTG       420
ATAGTATTGC CGTGCACAGG AGCTGCCACA ACTTTCTTGT CTAATCCCCG TTCCTTGATC       480
CCTTGGTCGT CTGCTTTGTT TTCATCAACA GATCTGTCTG CGAGCTCATC CAACCTCATG       540
GCGTCACAGG GATGCTTGCA CTTCTGAGAG ACTCCATCAA GTCTAGTGGA GCACCGCTGG       600
CCTTCATCTA CGCTTGTATT ATCGACTATA TTATGACTAG TCAACTGGGA GCCTGGTTCC       660
TTATCACAGT GCACCTCAGA ATTTCTACTT GGCGGGTTAA CAAGAGCAGA CACGTAACTG       720
TCTGTAGCAG GTTCTGAAAT GGCAGTCATT GCCTTGGGCT CGGTAGCAAG GTCGTCTGCT       780
TTGGGTAATT CTTGTGAGCG ATAGAGGGCG ACTGCAGAGG GGGTGTCCGA GACAACATTC       840
TTATACATGG TCCCCCCTGT GATCGAACCG CATTCTTCCT CGAAGTGTCC ATAGGTCGGG       900
CCGTTTAGGG TAGCTTGATT GGTATTGCTC CCATGAAGAA AGTCGCTTTC AGAGAAACCA       960
GAGCCAACAC TAGCTTTGGT TTCTGAATTC AGAATCGTAT CAAATCCGAA GAAGTCGAGC      1020
GACGGATCGC GGCTGCGGGT TCTGACAGGA GATGATGCCT TTCCTCTTCT GAAAATCCCG      1080
CTCGGGCACC TTTGATTCAG CTGTGATGGT ATTAGCCCTC TCACTTTAGG CGTAGTAGCA      1140
TGGCCACTCA CAGTAAGACG ATCACAGGGC ACGTTGGGGG CACGAAAGCT GTCGTTGTTT      1200
```

```
GTCCTCTTCT TCGAACGGGA GCGTTCGCTG CTCTTCTTAT TCTGAACCTT GTACTCATAT      1260
CGGTCTTTCT TGGTTCTGTG TCGAGGCTGC CGCTCATAAC CGTTCCGTCC CCCTTTTTCG      1320
GTGTTTGAAG ATGTTTCCAT ATCATTTACT GTTGATGATG CACCTGGCTG TTGGGA           1376
```

โดยชิ้นยีนที่เหลือที่ส่งไปได้ผล sequencing เพียงบางส่วนตอนต้น แต่เมื่อทำการอ่านลำดับเบสต่อมากลับพบปัญหาไม่สามารถทำการ sequence ต่อได้เนื่องจากปัญหาการเกิดการจับตัวกันเป็น hairpin loop ที่ลำดับเบสบางส่วนของชิ้นยีนระหว่างการทำ sequencing จึงไม่สามารถอ่านลำดับเบสในบริเวณนั้นได้ ส่วนชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ได้มาทั้งสองยีนเมื่อตรวจสอบด้วยโปรแกรม ClustalX เพื่อใช้ในการ alignment เปรียบเทียบความเหมือนระหว่างชิ้นยีนที่ได้กับ probe ที่ใช้ทำการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP แล้วมีส่วนคล้ายคลึงกันอยู่น้อย จึงวิเคราะห์ผลเพิ่มเติมโดยการเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรม blast หรือ Basic Local Alignment Search Tool บนเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ ซึ่งทำหน้าที่ใน การค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของลำดับเบสที่ต้องการค้นหากับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เมื่อใช้โปรแกรม nucleotide blast ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับค้นหาข้อมูลของนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลโดย upload ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ต้องการเปรียบเทียบลงไป พบว่าลำดับเบสชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ contig An11c0070 ของ *Aspergillus niger* บนฐานข้อมูลของ NCBI ที่ลำดับเบสตำแหน่ง 33732 ถึงลำดับเบสที่ 38398 เปรียบเทียบความเหมือนกันคิดเป็นร้อยละ 99 จึงอาจสรุปได้ว่าส่วนของชิ้นยีนดังกล่าวน่าจะเป็นยีนเดียวกัน ดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 6.1 (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.3 ผลการทำ BlastN ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM270224.1	Aspergillus niger contig An11c0070, complete genome	8331	8331	99%	0.0	99%
XM_001394187.1	Aspergillus niger CBS 513.88 hypothetical protein (An11g02230) par	1990	1990	23%	0.0	99%
XM_002375082.1	Aspergillus flavus NRRL3357 14-alpha sterol demethylase Cyp51A, n	720	720	21%	0.0	76%
XM_001215095.1	Aspergillus terreus NIH2624 cytochrome P450 51 (ATEG_05917) par	719	719	23%	0.0	74%
AB514681.1	Aspergillus oryzae CYP51F2 mRNA for cytochrome P450 monooxyge	699	699	21%	0.0	75%
XM_001819367.1	Aspergillus oryzae RIB40 hypothetical protein partial mRNA	699	699	21%	0.0	75%
AP007155.1	Aspergillus oryzae RIB40 DNA, SC003	699	815	24%	0.0	100%
XM_001394188.1	Aspergillus niger CBS 513.88 hypothetical protein (An11g02240) par	659	1235	14%	0.0	100%
BN001307.1	TPA: TPA_reasm: Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome VII	655	655	23%	0.0	73%
XM_654413.1	Aspergillus nidulans FGSC A4 hypothetical protein AN1901.2 partial r	655	655	23%	0.0	73%
AF266481.1	Aspergillus nidulans cytochrome P450 sterol 14 alpha-demethylase g	646	646	23%	0.0	73%
EU626227.1	Aspergillus fumigatus strain CM 1244 cytochrome P450 14-alpha ste	623	623	22%	3e-174	73%
FJ548884.1	Aspergillus fumigatus strain F17764 14-alpha sterol demethylase (cy	619	619	22%	4e-173	73%
FJ548883.1	Aspergillus fumigatus strain F17294 14-alpha sterol demethylase (cy	619	619	22%	4e-173	73%
FJ548880.1	Aspergillus fumigatus strain F16510 14-alpha sterol demethylase (cy	619	619	22%	4e-173	73%
FJ548879.1	Aspergillus fumigatus strain F16157 14-alpha sterol demethylase (cy	619	619	22%	4e-173	73%
FJ548873.1	Aspergillus fumigatus strain F14946 14-alpha sterol demethylase (cy	619	619	22%	4e-173	73%

ส่วนชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I มีความคล้ายคลึงกับ contig An02c0390 ของ *A. niger* ถึงร้อยเปอร์เซ็นต์ที่ลำดับเบสตำแหน่ง 52861 ถึงลำดับเบสที่ 54236 (รูปที่ 6.2 ภาคผนวก ก) และมีความคล้ายคลึงกับ hypothetical protein ของ *A. niger* CBS 513.88 ถึงร้อยละ 96 ที่ลำดับเบสตำแหน่ง 367 ถึงลำดับเบสที่ 1691 (รูปที่ 6.3 ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.4 ผลการทำ BlastN ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM270033.1	Aspergillus niger contig An02c0390, complete genome	2482	2482	100%	0.0	100%
XM_001400320.1	Aspergillus niger CBS 513.88 hypothetical protein (An02g12290) par	2293	2293	100%	0.0	96%
CP000002.3	Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome	44.6	44.6	2%	1.6	90%
XM_001208978.1	Aspergillus terreus NIH2624 predicted protein (ATEG_01613) partial	44.6	44.6	3%	1.6	78%
AE017333.1	Bacillus licheniformis DSM 13, complete genome	44.6	44.6	2%	1.6	90%
AC095350.8	Homo sapiens 12 BAC RP11-662M24 (Roswell Park Cancer Institute	44.6	44.6	3%	1.6	78%
AB010693.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K21C	44.6	44.6	3%	1.6	84%
CP001839.1	Thermotoga naphthophila RKU-10, complete genome	42.8	42.8	1%	5.5	100%
CP000916.1	Thermotoga neapolitana DSM 4359, complete genome	42.8	42.8	1%	5.5	100%
CP000969.1	Thermotoga sp. RQ2, complete genome	42.8	42.8	1%	5.5	100%
AP009178.1	Nitratiruptor sp. SB155-2 genomic DNA, complete genome	42.8	42.8	3%	5.5	81%
CP000702.1	Thermotoga petrophila RKU-1, complete genome	42.8	42.8	1%	5.5	100%
AC147560.3	Mus musculus BAC clone RP23-451A8 from 9, complete sequence	42.8	42.8	2%	5.5	92%
AC092498.8	Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 9 clone rp23-21l18, com	42.8	42.8	2%	5.5	92%
AE000512.1	Thermotoga maritima MSB8, complete genome	42.8	42.8	1%	5.5	100%

เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BlastX ซึ่งเป็นโปรแกรม blast ที่ใช้สำหรับค้นหาข้อมูลของโปรตีนจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลของ translated nucleotide ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไปเพื่อตรวจดูว่า translated nucleotide นั้นจะเปลี่ยนเป็นโปรตีนชนิดใด การประมวลผลจากโปรแกรม แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII มีความคล้ายคลึงกับ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An11g02230) ถึงร้อยละ 99 ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 150 ถึงลำดับกรดอะมิโนที่ 509 (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 6.4 ภาคผนวก ก) ส่วนการประมวลผลจากโปรแกรมของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I มีความคล้ายคลึงกับ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An02g12290) ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 123 ถึงลำดับกรดอะมิโนที่ 563 ร้อยละ 96 (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 ผลการทำ BlastX ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XP_001394224.1	hypothetical protein An11g02230 [Aspergillus niger] >emb|CAK4058	729	729	23%	0.0	99%
XP_001215095.1	cytochrome P450 51 [Aspergillus terreus NIH2624] >gb|EAU33678.1	600	600	22%	4e-169	81%
XP_002375123.1	14-alpha sterol demethylase Cyp51A [Aspergillus flavus NRRL3357]	599	599	22%	9e-169	80%
XP_001819419.1	hypothetical protein [Aspergillus oryzae RIB40] >dbj|BAE57417.1| u	598	598	22%	3e-168	79%
ACL83607.1	14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatus] >gb|ACL83613.	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17707.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17702.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17701.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17700.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17699.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
AAF32372.1	cytochrome P450 sterol 14 alpha-demethylase [Aspergillus fumigatu	580	580	23%	8e-163	80%
ACF17708.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	579	579	23%	1e-162	79%
ACL83626.1	14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatus]	578	578	23%	2e-162	79%
ACF17706.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	578	578	23%	2e-162	79%
ACF17703.1	cytochrome P450 14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatu	578	578	23%	2e-162	79%
ACL83619.1	14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatus]	577	577	23%	4e-162	79%
ACL83612.1	14-alpha sterol demethylase [Aspergillus fumigatus]	577	577	23%	4e-162	79%

ตารางที่ 4.6 ผลการทำ BlastX ระหว่างชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I กับ DNA sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XP_001400357.1	hypothetical protein An02g12290 [Aspergillus niger] >emb|CAK3791	859	859	99%	0.0	96%
XP_001208978.1	predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624] >gb|EAU38370.1| pr	69.3	69.3	25%	1e-09	41%
XP_001270877.1	hypothetical protein ACLA_036550 [Aspergillus clavatus NRRL 1] >gb	55.8	55.8	16%	1e-05	43%
XP_002562903.1	Pc20g03520 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255] >emb|CA	51.2	51.2	24%	3e-04	30%
XP_001596661.1	predicted protein [Sclerotinia sclerotiorum 1980] >gb|EDO00024.1|	42.0	42.0	28%	0.18	25%
EFA12334.1	hypothetical protein TcasGA2_TC010230 [Tribolium castaneum]	40.8	40.8	34%	0.40	23%
EDP55205.1	PT repeat family protein [Aspergillus fumigatus A1163]	40.4	40.4	22%	0.52	30%
XP_756037.2	PT repeat family protein [Aspergillus fumigatus Af293] >gb|EAL9399	40.4	40.4	22%	0.52	30%
EER25855.1	hypothetical protein CPC735_042990 [Coccidioides posadasii C735 d	40.0	40.0	20%	0.68	31%
XP_001240488.1	hypothetical protein CIMG_07651 [Coccidioides immitis RS]	40.0	40.0	20%	0.68	31%
XP_761870.1	hypothetical protein UM05723.1 [Ustilago maydis 521] >gb|EAK8597	40.0	40.0	43%	0.68	24%
XP_500120.1	YALI0A16214p [Yarrowia lipolytica] >emb|CAG84051.1| YALI0A1621	39.7	39.7	27%	0.89	23%
XP_002493998.1	Putative chitin transglycosidase, cell wall protein [Pichia pastoris GS1	38.5	38.5	27%	2.0	22%
ZP_04525762.1	putative liporotein [Clostridium butyricum E4 str. BoNT E BL5262] >g	38.5	38.5	31%	2.0	22%
XP_002153422.1	hypothetical protein PMAA_013040 [Penicillium marneffei ATCC 1822	37.7	37.7	18%	3.4	33%
ZP_05314318.1	hypothetical protein NAL212DRAFT_0490 [Nitrosomonas sp. AL212] >	37.4	37.4	43%	4.4	25%

จากผลการทดลองดังที่พบว่าชิ้นยีนทั้งสองที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ probe ที่ใช้ในการทดลองน้อย จึงนำส่วน probe ที่ใช้ในการทดลองซึ่งสังเคราะห์มาจากส่วน full length ของยีน *badh* มาทำการ blast กับโปรแกรมดังกล่าวเทียบกับฐานข้อมูลของโปรแกรม nucleotide blast พบว่ามีส่วนคล้ายคลึงกับ *A. niger* CBS 513.88 hypothetical protein (An16g09060) และ *A. niger* contig An16c0300, complete genome ถึงร้อยละ 99 และส่วนที่คล้ายคลึงกับ betaine aldehyde dehydrogenase ของ *A. terreus* NIH2624 มีค่าร้อยละ 79 เมื่อนำ probe ดังกล่าวมาทำการ blast กับโปรแกรมดังกล่าวเทียบกับฐานข้อมูลของโปรแกรม blastx พบว่ามีส่วนคล้ายคลึงกับ hypothetical protein An16g09060 ของ *A. niger* ร้อยละ 99

และคล้ายกับ betaine aldehyde dehydrogenase (*badh*), putative ของ *A. flavus* NRRL3357 และ hypothetical protein ของ *A. oryzae* RIB40 ร้อยละ 89 จากผลดังกล่าว อาจกล่าวได้ว่าแม้แต่ส่วน probe ซึ่งเป็นส่วนของยีน *badh* ที่นำมา blast ยังพบว่ามีส่วนคล้ายคลึงกับยีนชนิดอื่นมากกว่ายีน betaine aldehyde dehydrogenase เอง ซึ่งในส่วนของยีนที่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนชนิดใด หรือยีนอะไรนั้นอาจเป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความหอมของสาร 2-AP ได้ หรือยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความหอมของสาร 2-AP อาจไม่ได้มีเพียง *badh* เพียงกลุ่มเดียว ดังนั้นควรมีการศึกษาติดตามเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมกลุ่มอื่นๆ ของราในอนาคตต่อไป

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการสร้าง partial genomic DNA library ของรา *A. nigricans* ที่มีความสามารถในการสร้างสารหอม 2-Acetyl-1-Pyrroline (2-AP) ได้ในอาหารสังเคราะห์ ผลการศึกษาสามารถสร้าง partial genomic DNA library ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP ของรา *A. nigricans* ได้ โดยพบชิ้นยีนที่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2-AP หรือมีความคล้ายคลึงกับยีน *badh* ทั้งหมดจำนวน 14 ชิ้น เมื่อทำการโคลนเข้าพลาสมิดเวคเตอร์ pZErO^{TM}-2 ขนาด 3.3 kb พบว่าชิ้น DNA ขนาดเล็กกว่า 4 kb พบจำนวนโคลนมากกว่า 300 โคลน ชิ้น DNA ขนาดระหว่าง 4-5 kb พบจำนวนโคลน 15-30 โคลน ส่วนชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 kb ได้จำนวนโคลนน้อยมาก เนื่องจากชิ้น DNA มีขนาดใหญ่ไม่สามารถโคลนเข้าพลาสมิด DNA ได้

จากการหาลำดับเบสในเบื้องต้นจากโคลนที่ตรวจสอบแล้วว่าน่าจะมีส่วนของยีนที่ต้องการอย่างแท้จริงจำนวน 6 ชิ้นยีน ได้ลำดับเบสจากการทำ sequencing ที่สมบูรณ์ทั้งหมดจำนวน 2 ชิ้นยีน ซึ่งในเบื้องต้นเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนพบว่าชิ้นส่วนของยีนทั้ง 2 ยีนนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับส่วนหนึ่งของยีน (contig) ของ complete genome และคล้ายกับ hypothetical protein ของรา *Aspergillus niger* มากกว่า 90% โดยปัจจุบันยังไม่มีใครทราบคุณสมบัติหรือหน้าที่ที่แน่นอนของส่วน hypothetical protein นี้ และเมื่อลองนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *badh* มาทำการ blast เองก็ยังมีส่วนที่รายงานว่ามีความคล้ายคลึงกับ hypothetical protein ของรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งเป็นรากลุ่มที่มีรายงานว่ามียีน *badh* อยู่

ข้อเสนอแนะ

การทำ genomic library หรือ partial genomic library ของราที่ยังไม่มีการศึกษาในระดับ molecular biology กันอย่างแพร่หลายและ pathway ที่มีการศึกษากันน้อย มีโอกาสประสบความสำเร็จได้น้อย เนื่องจากขาดข้อมูลและกระบวนการในการ manipulate ราเหล่านั้น แนวทางที่เหมาะสมในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP ใน *A. nigricans* นี้น่าจะมุ่งไปในเรื่องการวิเคราะห์ metabolites ที่สร้างขึ้น ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน และศึกษาความแตกต่างในการแสดงออกของยีนโดยรวม (transcriptomics) และสกัด mRNA ที่ได้ในสภาวะการเลี้ยงต่างๆ มาเพื่อหาลำดับเบส ซึ่งน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถ identify ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-AP ได้โดยตรง และประหยัดเวลาในการทำวิจัยมากกว่าการค้นหาจาก genomic DNA library

เอกสารอ้างอิง

สุกัญญา มหาธีรานนท์, 2540, **การศึกษาสารให้ความหอมในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105**, เอกสารวิชาการ BIOTEC 1/2540, 33 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543, **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

Adams, A. and Kimpe, N.D., 2006, Formation of pyrazines and 2-acetyl-1-pyrroline by *Bacillus cereus* **Food Chemistry**, 101, pp. 1230–1238.

Apintanapong, M., 1998, **Effect of chemical and physical parameters on 2-acetyl-1-pyrroline production by Acremonium nigricans**, Ph.D. Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand, 182 p.

Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. and Akazawa, T., 1987, Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. **J. Biochem**, 101, pp. 1485-1488.

Arakawa, K., Katayama, M. and Takabe, T., 1990, Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. **Plant Cell Physiol**, 31, pp. 797-803.

Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S. and Takabe, T., 1992, Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. **Plant Celt Physiol,** 33, pp. 833-840.

Bradbury, L.M., Fitzgerald, T.L., Henry, R.J., Jin, Q. and Waters, D.L.E., 2005, The gene for fragrance in rice. **Plant Biotechnol**, 3, pp. 363–370.

Burnet, M., Lafontaine, P.J. and Hanson, A.D., 1995, Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. **Plant Physiol**, 108, pp. 581-588.

Buttery, R.G., Ling, L.C., Juliano, B.O. and Turnbaugh, J.G., 1983, Cooked Rice Aroma and 2-Acetyl-1-pyrroline, **J. Agric. Food Chem**., 31, pp.823-826.

Buttery, R.G., Ling, L.C. and Mon, T.R., 1988, Quantitative Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Rice, **J. Agric. Food Chem**., 34, pp.112-114.

Buttery, R.G., Stern, D.J. and Ling, L.C., 1994, Studies on Flavor Volatiles of Some Sweet Corn Products, **J. Agric. Food Chem.**, 42, pp.791-795.

Chantratita, W., Henchal, E.A, Yoosook, C., 1989, Rapid detection of herpes simplex virus DNA by in situ hybridization with photobiotin-labelled double-stranded DNA probes. **Mol Cell Probes,** 3(4), pp. 363-73.

Chen, S.H., Wu, J., Yang, Y., Shi, W.W. and Xu, M.L., 2006, The *frg* region responsible for rice fragrance was restricted within 69kb. **Plant Sci,** 171, pp. 505-514.

Chen, S., Yang, Y., Shi, W., Ji, Q., He, F., Zhang, Z., Cheng, Z, Liu, X. and Xu, M., 2008, *Badh2* encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrant. **The Plant Cell,** 20, pp. 1850-1861.

Cordeiro, G.M., Christopher, M.J., Henry, R.J. and Reinke, R.F., 2000, Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. **Mol. Breed**, 9, pp. 245–250.

Fitzgerald, T.L., Waters, D.L.E. and Henry, R.J., 2008, The effect of salt on betaine aldehyde dehydrogenase transcript levels and 2-acetyl-1-pyrroline concentration in fragrant and non-fragrant rice (*Oryza sativa*). **Plant Science,** 175, pp. 539-546.

Gonzalez-Segura, L., Mujica-Jimenez, C. and Munoz- Clares, R.A., 2008, Reaction of the catalytic cysteine of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* with arsenite-BAL, phenylarsineoxide. **Chemico-Biological Interactions**, doi:10.1016/j.cbi.2008.10.049

Harinasut, P., Tsutsui, K., Takabe, T., Nomura, M., Takabe, T. and Kishitani, S., 1996, Exogenous glycinebetaine accumulation and increased salt-tolerance in rice seedlings. **Biosci.,Biotechnol., Biochem**, 60, pp. 366–368.

Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S.Y. and Takabe, T., 1995, Expression of the betainealdehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Mol.Biol**, 27, pp. 307–315.

Jian-Rong, G., Schnieder1, F., Abd-Elsalam1, K.A. and Verreet, J.A., 2005, Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different phytopathogenic fungi using DNAzol reagent. **Biotechnology Letters**, 27. pp. 3–6.

Jin, Q.S., Water, D., Cordeiro, G.M., Henry, R.J. and Reinke, R.F., 2003, A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.), **Plant Sci**, 165, pp. 359–364.

Le Rudulier D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T. and Valentine, R.C., 1984, Molecular biology of osmoregulation. **Science,** 224, pp. 1064–1068.

Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. and Takabe, T., 1997, Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. **The Plant Journal**, 11(5), pp. 1115-1120.

Nomura, T.M., Mori, H., Jagendorf, A.T., Ueda, A. and Takabe, T., 2001, An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. **Plant Cell Physiol,** 42, pp. 1088–1092.

Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. and Blazquez, J., 2000, High frequency of *Pseudomonas aeruginosa* incystic fibrosis lung infection, **Science,** 288, pp. 1251-1254.

Rathinasabapathi, B., Gage, D.H., Mackill, D.J. and Hanson, A.D., 1993, Cultivated and wild rices do not accumulate glycinebetaine due to deficiencies in two biosyntheticsteps. **Crop Sci,** 33, pp. 534–538.

Romanczyk, L.J., McClelland, C.A., Post, L.S. and Aitken W.M., 1995, Formation of 2-Acetyl-1-pyrroline by Several *Bacillus cereus* Strains Isolated From Cocoa Fermentation Boxes, **J. Agric. Food Chem.**, 43, pp.469-475.

Rungsardthong, V. and Noomhoom, A., 2005, Production of 2-acetyl-1-pyrroline by microbial culture. **Flavour and Fragrance journal***,* 20, pp. 710-714.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T., 1989, **Molecular Cloning**: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schieberle, P., 1996, Odour-active Compounds in Moderately reasted sesame, **Food Chemistry**, 55(2), pp.145-152.

Shirasawa, K., Takabe, T., Takabe, T. and Kishitani, K., 2006, Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress, **Ann.Bot***,* 98, pp. 565–571.

Struble, J., Handke, P., and Gill, R.T., 2009. Construction of Genomic Libraries. **Desk Encyclopedia of Microbiology**. Editor: M. Schaechter. 3rd Edition.

Vanavichit, A., Yoshihashi, T., Wanchana, S., Areekit, S., Saengsraku, D., Kamolsukyunyong, W., Lanceras, J., Toojinda, T., Tragoonrung, S., 2006, Positional cloning of *Os2AP*, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2- acetyl-1-pyrroline and gamma aminobutyric acid (GABA) in rice (abstract). In: 5th Int Rice Genet Symp. Manila, Philippines.

Velasco-Garcia, R., Villalobos, M.A., Ramirez-Romero, M.A, Mujica-Jimenez, C., Iturriaga, G. and Munoz-Clares, R.A.,2006, Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt, **Arch. Microbiol**, 185, pp. 14-22.

Wanchana, S., Kamolsukyunyong, W., Ruengphayak, S., Toojinda, T., Tragoonrung, S. and Vanavichit, A., 2003, "Sequence Variation in *BADH* is Associated with the Synthesis of 2-AP, a Potent Aroma Determination in rice", **Rice Biotechnology**, pp.157-160.

Yoshihashi, T., Huong, N.T.T and Kabaki, N., 1999, Quality evaluation of Khao Dawk Mali 105, an aromatic rice variety of northeast Thailand. **JIRCAS Working Report**, 30, pp. 151-160.

Yoshihashi, T., Huong, N.T.T and Inatomi, H., 2002, Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. **J. Agric. Food Chem***,* 50, pp. 2001-2004.

Zhang, D., Yang, Y., Castlebury L.A. and Cerniglia, C.E., 1996, A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. **FEMS Microbiol. Lett***,* 145, pp. 261-265.

ภาคผนวก ก

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด genomic DNA

1. Extraction buffer

100 Mm Tris.HCl

25 Mm EDTA

1.5 M NaCl

2.5% CTAB

20% sucrose

0.2% beta-mercaptoethanol

Stock solution ของ 1M Tris.HCl pH 8

นำ Tris.HCl 121.1 กรัม ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

Stock solution ของ 0.5M EDTA pH 8

นำ EDTA 18.61 กรัม ละลายในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ Ph ด้วย 1M NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Stock solution ของ 5M NaCl

NaCl 29.22 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

10% CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

ละลาย CTAB 10 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

75% Sucrose

ละลายน้ำตาลซูโครส 75 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด

Stock solution ของ Kanamycin 100 มิลลิกัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง kanamycin 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ deionized ให้ครบ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย Solution I

50 mM glucose

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

สารละลาย 1M Glucose

ละลายน้ำตาล Glucose 18 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Solution II

0.2M NaOH

10% SDS

Stock solution ของ 1M NaOH

ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

10% SDS (Sodium Dodecyl Sไมโครลิตรfate)

SDS 100 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ให้ความร้อนประมาณ 70 องศาเซลเซียส ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย HCl ปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย Solution III

60 มิลลิลิตรของ 5M potassium acetate

11.5 มิลลิลิตรของ glacial acetic acid

28.5 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น

Stock solution ของ 5M potassium acetate

ละลาย potassium acetate 49.075 กรัมในน้ำกลั่นค่อยปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการทำ southern hybridization

1. 20X SSC

3M NaCl

0.3M sodium citrate

1M Sodium citrate

sodium citrate 29.41 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2. Denaturing solution

1.5M NaCl

0.5M NaOH

3. Neutralization solution

1.5M NaCl

0.5M Tris.HCl (pH 7.2)

0.001M EDTA

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม competent cell

1. สารละลาย TFBI

30 mM Potassium acetate

100 mM RbCl2

10 mM RbCl2

50 mM MnCl2

15% Glycerol (v/v)

2. สารละลาย TFBII

10 mM MOPS

75 mM CaCl2

10 mM RbCl2

15% Glycerol (v/v)

```
Query  2      GCTCGAGTCACACGTCCAGCTGATTCGAAAAGGAAACTCTCGACTATCTCCGGGACTCTC  61
              ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33732  GCTCGAGTCACACGTCCAGCTGAT-CGAAAAGGAAACTCTCGACTATCTCCGGGACTCTC  33790

Query  62     CACGCTTCAACGGCGCGAGTGGAGTCATTGATATTCCTGCTGCCATGGCTGAGATTACAA  121
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33791  CACGCTTCAACGGCGCGAGTGGAGTCATTGATATTCCTGCTGCCATGGCTGAGATTACAA  33850

Query  122    TCTATACTGCTGCACGCGCGTTGCAGGGCGAGGAGGTCCGCAAGAAGCTCACGGCAGAGT  181
              |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33851  TCTATACTGCTGCGCGCGCGTTGCAGGGCGAGGAGGTCCGCAAGAAGCTCACGGCAGAGT  33910

Query  182    TCGCTGAACTGTACCACGATCTAGACAAGGGATTCAGCCCCATTAACTTCATGCTCCCTT  241
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33911  TCGCTGAACTGTACCACGATCTAGACAAGGGATTCAGCCCCATTAACTTCATGCTCCCTT  33970

Query  242    GGGCTCCATTGCCGCACAACCGGAAGCGTGATGCTGCTCATGCTCGGATGAGAGAAATCT  301
              |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33971  GGGCTCCATTGCCGCACAACCAGAAGCGTGATGCTGCTCATGCTCGGATGAGAGAAATCT  34030

Query  302    ACACGGACATTATCAACGAACGACGCAAGAACCCAGACGAGGAGAAGTCAGACATGATCT  361
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34031  ACACGGACATTATCAACGAACGACGCAAGAACCCAGACGAGGAGAAGTCAGACATGATCT  34090

Query  362    GGAATCTGATGCATTGCACCTACAAGAGTGGCCAGCCGGTCCCGGACAAAGAGATTGCTC  421
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34091  GGAATCTGATGCATTGCACCTACAAGAGTGGCCAGCCGGTCCCGGACAAAGAGATTGCTC  34150

Query  422    ACATGATGATCACTCTGTTGATGGCAGGGCAACACTCGTCTTCTTCGATTAGTTCTTGGA  481
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34151  ACATGATGATCACTCTGTTGATGGCAGGGCAACACTCGTCTTCTTCGATTAGTTCTTGGA  34210

Query  482    TCATGCTGCGATTGGCCTCTGAGCCTCAGGTGCTTGAAGAGCTCTACCAAGAACAGCTGG  541
              |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34211  TCATGCTGCGATTGGCCTCGGAGCCTCAGGTGCTTGAAGAGCTCTACCAAGAACAGCTGG  34270

Query  542    CCAGCCTTAGTAACAGAAATGGAGTCTTCGAGCCGCTGCAGTATCAGGACCTTGACAAGC  601
              |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34271  CCAGCCTTAGCAACAGAAATGGAGTCTTCGAGCCGCTGCAGTATCAGGACCTTGACAAGC  34330

Query  602    TGCCATTCCTCCAGAGTGTCATCAAGGAGACTCTACGGATCCACTCGTCCATCCACTCGA  661
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34331  TGCCATTCCTCCAGAGTGTCATCAAGGAGACTCTACGGATCCACTCGTCCATCCACTCGA  34390

Query  662    TCATGCGCAAGGTGAAAAACCCGCTACCAGTACCTGGCACCTCTTACATTATTCCCGAAG  721
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34391  TCATGCGCAAGGTGAAAAACCCGCTACCAGTACCTGGCACCTCTTACATTATTCCCGAAG  34450

Query  722    ACCATGTTCTACTCGCCTCACCAGGCGTAACCGCGCTTAGTGACGAATACTTTCCTAACG  781
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34451  ACCATGTTCTACTCGCCTCACCAGGCGTAACCGCGCTTAGTGACGAATACTTTCCTAACG  34510

Query  782    CAACCAGGTGGGATCCGCATCGTTGGGAGAACCAGCCTGACAAAGAGGAGGATGGAGAGA  841
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34511  CAACCAGGTGGGATCCGCATCGTTGGGAGAACCAGCCTGACAAAGAGGAGGATGGAGAGA  34570

Query  842    TGGTGGACTACGGATATGGCAGCGTGTCGAAGGGCACTGCTAGTCCCTATCTACCTTTTG  901
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34571  TGGTGGACTACGGATATGGCAGCGTGTCGAAGGGCACTGCTAGTCCCTATCTACCTTTTG  34630

Query  902    GCGCTGGCCGTCACCGCTGCATTGGAGAGAAGTTCGCCTACGTCAACTTGGGCGTTATTA  961
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34631  GCGCTGGCCGTCACCGCTGCATTGGAGAGAAGTTCGCCTACGTCAACTTGGGCGTTATTA  34690

Query  962    TCGCGACCATAGTGCGCCACTTGAAGCTATTCAATGTGGATGGCAGGAAAGGAGTGCCCG  1021
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34691  TCGCGACCATAGTGCGCCACTTGAAGCTATTCAATGTGGATGGCAGGAAAGGAGTGCCCG  34750
```

```
Query  1022   GAACCGATTACTCGACCCTCTTCTCCGGTCCCATGAAGCCTGCTATAGTGGGTTGGGAGC  1081
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34751  GAACCGATTACTCGACCCTCTTCTCCGGTCCCATGAAGCCTGCTATAGTGGGTTGGGAGC  34810

Query  1082   GACGCTTCCCGGACCACTCCAAAGGGTCCTTGAATTAGGCCACCTTCTTGCAGGTTACCT  1141
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34811  GACGCTTCCCGGACCACTCCAAAGGGTCCTTGAATTAGGCCACCTTCTTGCAGGTTACCT  34870

Query  1142   TTCGTCTCCAGTCTTTTCCCAACTAGTACCTTGTAATAAGCATCCTGTATGATTAGAGCA  1201
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34871  TTCGTCTCCAGTCTTTTCCCAACTAGTACCTTGTAATAAGCATCCTGTATGATTAGAGCA  34930

Query  1202   TTCAGTCCATAGCCAAAGAAAGAGATATGACCGCTGACCAGTCAGCATAAAGATCCAACA  1261
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34931  TTCAGTCCATAGCCAAAGAAAGAGATATGACCGCTGACCAGTCAGCATAAAGATCCAACA  34990

Query  1262   TCCCAATCTTGAACCGTGATTGTAGACAAACCGAGGGTGAATGAATGAATGAATGCACGT  1321
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  34991  TCCCAATCTTGAACCGTGATTGTAGACAAACCGAGGGTGAATGAATGAATGAATGCACGT  35050

Query  1322   GAGATCCCTCGTGTCATCATTCCACCACCTGTGAAACTTGCCCCCCTTCCATCCGAGGGT  1381
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35051  GAGATCCCTCGTGTCATCATTCCACCACCTGTGAAACTTGCCCCCCTTCCATCCGAGGGT  35110

Query  1382   CAATTTCCACTTACCTTGACATGCGCATCAATACAAGTGCTGTCCGTGTACCAGCAAAAC  1441
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35111  CAATTTCCACTTACCTTGACATGCGCATCAATACAAGTGCTGTCCGTGTACCAGCAAAAC  35170

Query  1442   CGCGTATATGAAATACCACCCCAGGGCAAAGAAAGCTACATTGAGATAAGGCGCACACAT  1501
              |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35171  CGCGTATATGAAATACCACCCCAGGGCAAAGAAAGCTGCATTGAGATAAGGCGCACACAT  35230

Query  1502   GCGCAGGGTGGCGTCTCAGAATGAACAAAAAGCAAGTAAATAGAACAGCGAGGATAAGGC  1561
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35231  GCGCAGGGTGGCGTCTCAGAATGAACAAAAAGCAAGTAAATAGAACAGCGAGGATAAGGC  35290

Query  1562   TAGACCCATCTCGCCACAAAGCAAAGCAAAGTAGAAGAGGCATTTGACCTATTGTTCCGC  1621
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35291  TAGACCCATCTCGCCACAAAGCAAAGCAAAGTAGAAGAGGCATTTGACCTATTGTTCCGC  35350

Query  1622   GGGATGATGTACAGAATGCGACCCAGAGCCTGCTCCTGAACACTGAGGCTGAGCGCCAGC  1681
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35351  GGGATGATGTACAGAATGCGACCCAGAGCCTGCTCCTGAACACTGAGGCTGAGCGCCAGC  35410

Query  1682   AAACACACACACAGCGCCACCTGCGGGAGAAGGGCCCGAGTATGTCAAAATAAGGATACG  1741
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35411  AAACACACACACAGCGCCACCTGCGGGAGAAGGGCCCGAGTATGTCAAAATAAGGATACG  35470

Query  1742   ATATGGGGAAGGTGGAAGGGCGTGTGACCGACAGAAAAAGCTGCGGGCCGAAGTGTCAGA  1801
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35471  ATATGGGGAAGGTGGAAGGGCGTGTGACCGACAGAAAAAGCTGCGGGCCGAAGTGTCAGA  35530

Query  1802   CCCAGTGATGGATAGTTGAAGGTTTGATAATAGGTTGAATAGATTACCTAGACGGGGATA  1861
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35531  CCCAGTGATGGATAGTTGAAGGTTTGATAATAGGTTGAATAGATTACCTAGACGGGGATA  35590

Query  1862   AATTGCGATCATAATGACATaaaaaaaGTACATGGGGGGATTTGGCGCTGATCGACAGGC  1921
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35591  AATTGCGATCATAATGACATAAAAAAAGTACATGGGGGGATTTGGCGCTGATCGACAGGC  35650

Query  1922   CTGGACCTGGAATACGAAGCCTGGAGGAAGCATCCAGAAATGGATGAATCTGCAGTGTAG  1981
              |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35651  CTGGACCTGGAATACGAAGCCCGGAGGAAGCATCCAGAAATGGATGAATCTGCAGTGTAG  35710

Query  1982   TATACCTAATGTAGGGGACGGAGGCTCATGACAGATTTGGTCGTGAAGgtgtgtgtgtgt  2041
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35711  TATACCTAATGTAGGGGACGGAGGCTCATGACAGATTTGGTCGTGAAGGTGTGTGTGTGT  35770
```

```
Query  2042   gAAAGGCTGACCTCATCGCCGAAACAGGACTGCAGAACAAACAACTGCAGAGTGTCTTCT  2101
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | |||
Sbjct  35771  GAAAGGCTGACCTCATCGCCGAAACAGGACTGCAGAACAAACAACTGCAGAGTGGC-TCT  35829

Query  2102   ATCATCATCATCATCCACTTCCAGGATCAGAATCCATTGAATGGAGCCCTGAGGACAAGG  2161
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35830  ATCATCATCATCATCCACTTCCAGGATCAGAATCCATTGAATGGAGCCCTGAGGACAAGG  35889

Query  2162   TATCCTG-CTGCTCCGGATCACGGGCGTGTGATGTGaaaaaaaaaaaaaaaaaaaTTAGA  2220
              ||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35890  TATCCTGCCTGCTCCGGATCACGGGCGTGTGATGTG-AAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGA  35948

Query  2221   AGGAGGGGACCATAATATCGTAAAGATCGGCGGGAAATTCGCTAAGCAATATTAAGAAGC  2280
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35949  AGGAGGGGA-CATAATATCGTAAAGATCGGCGGGAAATTCGCTAAGCAATATTAAGAAGC  36007

Query  2281   CACTGAATTGATGACTTGTCAGCGCGTAATCCCGGGATTCCAGGAGGAGCCAAGGGAACA  2340
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  36008  CACTGAATTGATGACTTGTCAGCGCGTAATCCCGGGATTCCAGGAGGAG-CAAGGGAACA  36066

Query  2341   TCCGCAATGTGATCGAATTGCCAACGCAGAGATCTGGTGACCCGGAGATCGACAGTCGCC  2400
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36067  TCCGCAATGTGATCGAATTGCCAACGCAGAGATCTGGTGACCCGGAGATCGACAGTCGCC  36126

Query  2401   AGGTCCTACAACGCTAGAGACACAGTCCTCCGGCTCCCAGCACCGGCAGACATGGGGAGC  2460
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36127  AGGTCCTACAACGCTAGAGACACAGTCCTCCGGCTCCCAGCACCGGCAGACATGGGGAGC  36186

Query  2461   AGAGAGGTATAGGGAAAAAGTACCTGAGCTGGTTTGAAGAAAAGGCTACGGACAAGAGGA  2520
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36187  AGAGAGGTAGAGGGAAAAAGTACCTGAGCTGGTTTGAAGAAAAGGCTACGGACAAGAGGA  36246

Query  2521   GGTTTGATTTCGCGTGTCTCTTTGCGGGGCGTACAAATGATGCTGACTGTTGTTGCAAAG  2580
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36247  GGTTTGATTTCGCGTGTCTCTTTGCGGGGCGTACAAATGATGCTGACTGTTGTTGCAAAG  36306

Query  2581   AGGCCAGCCGCCATGTGACCACGTGATGGGGTCGGTCTAGCAGTGCTAAGCGCATTCAGG  2640
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36307  AGGCCAGCCGCCATGTGACCACGTGATGGGGTCGGTCTAGCAGTGCTAAGCGCATTCAGG  36366

Query  2641   TCACCTTATTCGCACTTTCTCTTGGGCAGATGAACTGGATACGAATGCTAGGAGAGGCAA  2700
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36367  TCACCTTATTCGCACTTTCTCTTGGGCAGATGAACTGGATACGAATGCTAGGAGAGGCAA  36426

Query  2701   TACTCCCGTATTGTGCCGGCAGATGACGATCTTTGGGCATCGCGGGGAGAATCTGGGGAA  2760
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36427  TACTCCCGTATTGTGCCGGCAGATGACGATCTTTGGGCATCGCGGGGAGAATCTGGGGAA  36486

Query  2761   ACATTGACCTTGTGGATCTGTCTGTCAGAGCCGACTGCAAGTATCGCCAGCTGTGGATGT  2820
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36487  ACATTGACCTTGTGGATCTGTCTGTCAGAGCCGACTGCAAGTATCGCCAGCTGTGGATGT  36546

Query  2821   GGAATACTGTGCAATCTCTCGACTGTAACCATCTGACGTTGACCTCAACATGTCAGTGTG  2880
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36547  GGAATACTGTGCAATCTCTCGACTGTAACCATCTGACGTTGACCTCAACATGTCAGTGTG  36606

Query  2881   TCTATCTTTGCTTTTCCCTGACCCCATTCTGGCATCTGGCGTCGTCTTGTGGCTTGTATG  2940
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36607  TCTATCTTTGCTTTTCCCTGACCCCATTCTGGCATCTGGCGTCGTCTTGTGGCTTGTATG  36666

Query  2941   ATGGGAGCGCGCATGTCCACTGATCTTCTTCACGTTGGCCACCACCCTGTGGATGTTATA  3000
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36667  ATGGGAGCGCGCATGTCCACTGATCTTCTTCACGTTGGCCACCACCCTGTGGATGTTATA  36726

Query  3001   CTCTATATGGACATATATACGTACGTCTGAAATAAGGCAGAACTCCGGTTTACGAGAAGA  3060
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36727  CTCTATATGGACATATATACGTACGTCTGAAATAAGGCAGAACTCCGGTTTACGAGAAGA  36786
```

```
Query  3061   AGAAGGTCAGTAGGTGAAACGGTTACCTAAAGTCCTAACCCAGTGTACCCAAGTTGTTGG  3120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36787  AGAAGGTCAGTAGGTGAAACGGTTACCTAAAGTCCTAACCCAGTGTACCCAAGTTGTTGG  36846

Query  3121   AAGGATCCTATATCGAGTATTCGGCAGAGTTTCACCTAACAATGCAGACAGCACAGCTCC  3180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36847  AAGGATCCTATATCGAGTATTCGGCAGAGTTTCACCTAACAATGCAGACAGCACAGCTCC  36906

Query  3181   TGATAACCGGAGAATTGGTTGCTGCTACCCTCCATGAAGAAAGGAAGTTAAACCTAATCG  3240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36907  TGATAACCGGAGAATTGGTTGCTGCTACCCTCCATGAAGAAAGGAAGTTAAACCTAATCG  36966

Query  3241   ATAACACCGACACTTTGGGTCTTCCTTCATTGGGATTTGGCCAGCGATATTCACCCGCTG  3300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36967  ATAACACCGACACTTTGGGTCTTCCTTCATTGGGATTTGGCCAGCGATATTCACCCGCTG  37026

Query  3301   TGAAGTCAAGCGCGGATGATGCTATGATGATTCCCGASCCAGGCTATGATGATAACCCCG  3360
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37027  TGAAGTCAAGCGCGGATGATGCTATGATGATTCCCGA-CCAGGCTATGATGATAACCCCG  37085

Query  3361   TTAACTTGTTTGCAAATGAACATCGGTTGCACAAAGCAGGTAGACTGAGAATTCTCCGGC  3420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37086  TTAACTTGTTTGCAAATGAACATCGGTTGCACAAAGCAGGTAGACTGAGAATTCTCCGGC  37145

Query  3421   TGGCATTCGCAATAGGACTATACACGGGGTTATGATAGGCATGGGCATCCTGTTTTTCGT  3480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37146  TGGCATTCGCAATAGGACTATACACGGGGTTATGATAGGCATGGGCATCCTGTTTTTCGT  37205

Query  3481   CCACATTCCCAAGAAAACAAATGATAGCGAGGTGCAACGCTCCACCAGCCTCTTCGAATC  3540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37206  CCACATTCCCAAGAAAACAAATGATAGCGAGGTGCAACGCTCCACCAGCCTCTTCGAATC  37265

Query  3541   ACTGCCAGCGACTTTCATCTTCTAGTTTACCCGTCTGGTATAGAGCAGAGGCAGGGCAAT  3600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37266  ACTGCCAGCGACTTTCATCTTCTAGTTTACCCGTCTGGTATAGAGCAGAGGCAGGGCAAT  37325

Query  3601   GCAAACCAGTCGAGTTGAATAAGCAGGCGAGTGGTACAGCACAAGTACCTCCGTATGTAA  3660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37326  GCAAACCAGTCGAGTTGAATAAGCAGGCGAGTGGTACAGCACAAGTACCTCCGTATGTAA  37385

Query  3661   ACGGGGCTATTGATACCGACGAAAACCTCGATGGAACCCCGGCAATACGACTAGCGACTA  3720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37386  ACGGGGCTATTGATACCGACGAAAACCTCGATGGAACCCCGGCAATACGACTAGCGACTA  37445

Query  3721   AACCGCCGCGGAATACCCGGTCACTTGGCTCCAATCCCACCAGCATTCCGATCTTGATAT  3780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37446  AACCGCCGCGGAATACCCGGTCACTTGGCTCCAATCCCACCAGCATTCCGATCTTGATAT  37505

Query  3781   GCAGGGAGACACCGGCGCCATTGTACCACACCATATGGTGACATTAATTTCCCAAGCCCT  3840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37506  GCAGGGAGACACCGGCGCCATTGTACCACACCATATGGTGACATTAATTTCCCAAGCCCT  37565

Query  3841   ATGCGATCCCTGATCTTTCAATAAAGCCACAACTCAAATTATACCGGGCGTACATTTGTC  3900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37566  ATGCGATCCCTGATCTTTCAATAAAGCCACAACTCAAATTATACCGGGCGTACATTTGTC  37625

Query  3901   TGTGCTACCGTGATCGAATGGTGATTAGTCTTGCCGGGAGTGGGAGGAGAAAAGCCTCAC  3960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37626  TGTGCTACCGTGATCGAATGGTGATTAGTCTTGCCGGGAGTGGGAGGAGAAAAGCCTCAC  37685

Query  3961   TAAGAAACGCGTCCCCAACTTCCCCGCCAAATCATCGTCGTGACTAGGCTTGCTCCCCGC  4020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37686  TAAGAAACGCGTCCCCAACTTCCCCGCCAAATCATCGTCGTGACTAGGCTTGCTCCCCGC  37745

Query  4021   GCCTCCCCCTCACTAACCAGGCGCACAGAGCGCTGCTTGTTCTGATTCGCAGGTGGCTTT  4080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37746  GCCTCCCCCTCACTAACCAGGCGCACAGAGCGCTGCTTGTTCTGATTCGCAGGTGGCTTT  37805
```

```
Query  4081   TGCGATTAAGGACGAATCGAGTAAGCTGAGCCCGGATGAATGTAACTTGGACCCACTGAC  4140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37806  TGCGATTAAGGACGAATCGAGTAAGCTGAGCCCGGATGAATGTAACTTGGACCCACTGAC  37865

Query  4141   GAGGATATTCAGGAGCGTGACTTGGGACCCTAATCTGAGGGTAATACAGCTCGCTGCCAG  4200
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  37866  GAGGATATTCAGGAGCGTGACTTGGGACCCTAATCTGAGGGTAATACAGCTAGCTGCCAG  37925

Query  4201   CTACGAGCCCCCGGCTGCATAACACGGCATTCACAGTGTGCGTTGGGTAATAGAATATGT  4260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37926  CTACGAGCCCCCGGCTGCATAACACGGCATTCACAGTGTGCGTTGGGTAATAGAATATGT  37985

Query  4261   GCGACAATCCCAACAAGCGGTAGGCCTACATGTACGGATTGGGTTTTGGGAGCAGTTGGT  4320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37986  GCGACAATCCCAACAAGCGGTAGGCCTACATGTACGGATTGGGTTTTGGGAGCAGTTGGT  38045

Query  4321   CTACAACCGCTGCACTCAACGAATCAAGCAATCGCCTGACTCTCTGGACGCCGTAGCTTC  4380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38046  CTACAACCGCTGCACTCAACGAATCAAGCAATCGCCTGACTCTCTGGACGCCGTAGCTTC  38105

Query  4381   AAGTGTGAACCAGCAAATTGAGGTAACGTGAGACATGCCATTGGTTGTGAGCTCGGGATA  4440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38106  AAGTGTGAACCAGCAAATTGAGGTAACGTGAGACATGCCATTGGTTGTGAGCTCGGGATA  38165

Query  4441   GCGCGTATTCGAGGTACGCCGCACCAGGAAAAGTCATTGCCATCATGTGACTCCTAGCCC  4500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38166  GCGCGTATTCGAGGTACGCCGCACCAGGAAAAGTCATTGCCATCATGTGACTCCTAGCCC  38225

Query  4501   TTCCGGCTAGCCCGGAAAGGGGATCAGTTTCTCCGTGATTACTCCGTCCATACGGACCTG  4560
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38226  TTCCGGCTAGCCCGGAAAGGGGATCAGTTTCTCCGTGATTACTCCGTCCATACGGACCTG  38285

Query  4561   GCCCTGAGCCAAAGCACCAACAATTGTCCCTGGAAACCAGCAATCCATGCCCAATGAAGA  4620
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38286  GCCCTGAGCCAAAGCACCAACAATTGTCCCTGGAAACCAGCAATCCATGCCCAATGAAGA  38345

Query  4621   CCCAGTTGTACCTACTCTGTTAAATAATCGACCAAAAGTCCCGACTCCCGGCA  4673
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38346  CCCAGTTGTACCTACTCTGTTAAATAATCGACCAAAAGTCCCGACTCCCGGCA  38398
```

รูปที่ 6.1 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII (Query) กับลำดับเบสของ contig An11c0070 จากรา *Aspergillus niger* (Sbjct)

```
Query  1      GTTGGCATACTCAAGACCTGGGTGTCAAGCTCTGTATCCATATCAACAATGACAGATGCT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54236  GTTGGCATACTCAAGACCTGGGTGTCAAGCTCTGTATCCATATCAACAATGACAGATGCT  54177

Query  61     ATCTCCCACTCCTCCATGTCAATCAAACTCGCCAACTCTGAACAGCAGTCATTGGCTTCA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54176  ATCTCCCACTCCTCCATGTCAATCAAACTCGCCAACTCTGAACAGCAGTCATTGGCTTCA  54117

Query  121    GGCACACCTGCAAAGTCCAAGCTCTCATAATCTGGTTCCTCGATCATCTGTCTAATTTGG  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54116  GGCACACCTGCAAAGTCCAAGCTCTCATAATCTGGTTCCTCGATCATCTGTCTAATTTGG  54057

Query  181    CTCTGATGACCCTGCATGTTTTCGCCACGATTGTCGACATCGGACATCAAGGACGACTTA  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54056  CTCTGATGACCCTGCATGTTTTCGCCACGATTGTCGACATCGGACATCAAGGACGACTTA  53997
```

```
Query  241    TCCCTGCTGCCATTATTCAGGAACCGGGAGAGTAGGTCGTAGTCTGGTGTGATTGTTTTT  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53996  TCCCTGCTGCCATTATTCAGGAACCGGGAGAGTAGGTCGTAGTCTGGTGTGATTGTTTTT  53937

Query  301    CGGAGCTTGGCACCCATTGCTCCTTCATAATCAAATTCCTCAGTGTCAGCCACGGAGGTG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53936  CGGAGCTTGGCACCCATTGCTCCTTCATAATCAAATTCCTCAGTGTCAGCCACGGAGGTG  53877

Query  361    CTGCCAGGCTCCAAGGTTGGCTGCCGGCACTTGCTGGCATTGGGCCAGGCAAATTGGCTG  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53876  CTGCCAGGCTCCAAGGTTGGCTGCCGGCACTTGCTGGCATTGGGCCAGGCAAATTGGCTG  53817

Query  421    ATAGTATTGCCGTGCACAGGAGCTGCCACAACTTTCTTGTCTAATCCCCGTTCCTTGATC  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53816  ATAGTATTGCCGTGCACAGGAGCTGCCACAACTTTCTTGTCTAATCCCCGTTCCTTGATC  53757

Query  481    CCTTGGTCGTCTGCTTTGTTTTCATCAACAGATCTGTCTGCGAGCTCATCCAACCTCATG  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53756  CCTTGGTCGTCTGCTTTGTTTTCATCAACAGATCTGTCTGCGAGCTCATCCAACCTCATG  53697

Query  541    GCGTCACAGGGATGCTTGCACTTCTGAGAGACTCCATCAAGTCTAGTGGAGCACCGCTGG  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53696  GCGTCACAGGGATGCTTGCACTTCTGAGAGACTCCATCAAGTCTAGTGGAGCACCGCTGG  53637

Query  601    CCTTCATCTACGCTTGTATTATCGACTATATTATGACTAGTCAACTGGGAGCCTGGTTCC  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53636  CCTTCATCTACGCTTGTATTATCGACTATATTATGACTAGTCAACTGGGAGCCTGGTTCC  53577

Query  661    TTATCACAGTGCACCTCAGAATTTCTACTTGGCGGGTTAACAAGAGCAGACACGTAACTG  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53576  TTATCACAGTGCACCTCAGAATTTCTACTTGGCGGGTTAACAAGAGCAGACACGTAACTG  53517

Query  721    TCTGTAGCAGGTTCTGAAATGGCAGTCATTGCCTTGGGCTCGGTAGCAAGGTCGTCTGCT  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53516  TCTGTAGCAGGTTCTGAAATGGCAGTCATTGCCTTGGGCTCGGTAGCAAGGTCGTCTGCT  53457

Query  781    TTGGGTAATTCTTGTGAGCGATAGAGGGCGACTGCAGAGGGGGTGTCCGAGACAACATTC  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53456  TTGGGTAATTCTTGTGAGCGATAGAGGGCGACTGCAGAGGGGGTGTCCGAGACAACATTC  53397

Query  841    TTATACATGGTCCCCCCTGTGATCGAACCGCATTCTTCCTCGAAGTGTCCATAGGTCGGG  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53396  TTATACATGGTCCCCCCTGTGATCGAACCGCATTCTTCCTCGAAGTGTCCATAGGTCGGG  53337

Query  901    CCGTTTAGGGTAGCTTGATTGGTATTGCTCCCATGAAGAAAGTCGCTTTCAGAGAAACCA  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53336  CCGTTTAGGGTAGCTTGATTGGTATTGCTCCCATGAAGAAAGTCGCTTTCAGAGAAACCA  53277

Query  961    GAGCCAACACTAGCTTTGGTTTCTGAATTCAGAATCGTATCAAATCCGAAGAAGTCGAGC  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53276  GAGCCAACACTAGCTTTGGTTTCTGAATTCAGAATCGTATCAAATCCGAAGAAGTCGAGC  53217

Query  1021   GACGGATCGCGGCTGCGGGTTCTGACAGGAGATGATGCCTTTCCTCTTCTGAAAATCCCG  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53216  GACGGATCGCGGCTGCGGGTTCTGACAGGAGATGATGCCTTTCCTCTTCTGAAAATCCCG  53157

Query  1081   CTCGGGCACCTTTGATTCAGCTGTGATGGTATTAGCCCTCTCACTTTAGGCGTAGTAGCA  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53156  CTCGGGCACCTTTGATTCAGCTGTGATGGTATTAGCCCTCTCACTTTAGGCGTAGTAGCA  53097

Query  1141   TGGCCACTCACAGTAAGACGATCACAGGGCACGTTGGGGGCACGAAAGCTGTCGTTGTTT  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53096  TGGCCACTCACAGTAAGACGATCACAGGGCACGTTGGGGGCACGAAAGCTGTCGTTGTTT  53037

Query  1201   GTCCTCTTCTTCGAACGGGAGCGTTCGCTGCTCTTCTTATTCTGAACCTTGTACTCATAT  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53036  GTCCTCTTCTTCGAACGGGAGCGTTCGCTGCTCTTCTTATTCTGAACCTTGTACTCATAT  52977
```

```
Query  1261   CGGTCTTTCTTGGTTCTGTGTCGAGGCTGCCGCTCATAACCGTTCCGTCCCCCTTTTTCG  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  52976  CGGTCTTTCTTGGTTCTGTGTCGAGGCTGCCGCTCATAACCGTTCCGTCCCCCTTTTTCG  52917

Query  1321   GTGTTTGAAGATGTTTCCATATCATTTACTGTTGATGATGCACCTGGCTGTTGGGA  1376
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  52916  GTGTTTGAAGATGTTTCCATATCATTTACTGTTGATGATGCACCTGGCTGTTGGGA  52861
```

รูปที่ 6.2 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I (Query) กับลำดับเบสของ contig An02c0390 จากรา *A. niger* (Sbjct)

```
Query  1      GTTGGCATACTCAAGACCTGGGTGTCAAGCTCTGTATCCATATCAACAATGACAGATGCT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1691   GTTGGCATACTCAAGACCTGGGTGTCAAGCTCTGTATCCATATCAACAATGACAGATGCT  1632

Query  61     ATCTCCCACTCCTCCATGTCAATCAAACTCGCCAACTCTGAACAGCAGTCATTGGCTTCA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1631   ATCTCCCACTCCTCCATGTCAATCAAACTCGCCAACTCTGAACAGCAGTCATTGGCTTCA  1572

Query  121    GGCACACCTGCAAAGTCCAAGCTCTCATAATCTGGTTCCTCGATCATCTGTCTAATTTGG  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1571   GGCACACCTGCAAAGTCCAAGCTCTCATAATCTGGTTCCTCGATCATCTGTCTAATTTGG  1512

Query  181    CTCTGATGACCCTGCATGTTTTCGCCACGATTGTCGACATCGGACATCAAGGACGACTTA  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1511   CTCTGATGACCCTGCATGTTTTCGCCACGATTGTCGACATCGGACATCAAGGACGACTTA  1452

Query  241    TCCCTGCTGCCATTATTCAGGAACCGGGAGAGTAGGTCGTAGTCTGGTGTGATTGTTTTT  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1451   TCCCTGCTGCCATTATTCAGGAACCGGGAGAGTAGGTCGTAGTCTGGTGTGATTGTTTTT  1392

Query  301    CGGAGCTTGGCACCCATTGCTCCTTCATAATCAAATTCCTCAGTGTCAGCCACGGAGGTG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1391   CGGAGCTTGGCACCCATTGCTCCTTCATAATCAAATTCCTCAGTGTCAGCCACGGAGGTG  1332

Query  361    CTGCCAGGCTCCAAGGTTGGCTGCCGGCACTTGCTGGCATTGGGCCAGGCAAATTGGCTG  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1331   CTGCCAGGCTCCAAGGTTGGCTGCCGGCACTTGCTGGCATTGGGCCAGGCAAATTGGCTG  1272

Query  421    ATAGTATTGCCGTGCACAGGAGCTGCCACAACTTTCTTGTCTAATCCCCGTTCCTTGATC  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1271   ATAGTATTGCCGTGCACAGGAGCTGCCACAACTTTCTTGTCTAATCCCCGTTCCTTGATC  1212

Query  481    CCTTGGTCGTCTGCTTTGTTTTCATCAACAGATCTGTCTGCGAGCTCATCCAACCTCATG  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1211   CCTTGGTCGTCTGCTTTGTTTTCATCAACAGATCTGTCTGCGAGCTCATCCAACCTCATG  1152

Query  541    GCGTCACAGGGATGCTTGCACTTCTGAGAGACTCCATCAAGTCTAGTGGAGCACCGCTGG  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1151   GCGTCACAGGGATGCTTGCACTTCTGAGAGACTCCATCAAGTCTAGTGGAGCACCGCTGG  1092

Query  601    CCTTCATCTACGCTTGTATTATCGACTATATTATGACTAGTCAACTGGGAGCCTGGTTCC  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1091   CCTTCATCTACGCTTGTATTATCGACTATATTATGACTAGTCAACTGGGAGCCTGGTTCC  1032

Query  661    TTATCACAGTGCACCTCAGAATTTCTACTTGGCGGGTTAACAAGAGCAGACACGTAACTG  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1031   TTATCACAGTGCACCTCAGAATTTCTACTTGGCGGGTTAACAAGAGCAGACACGTAACTG  972
```

```
Query  721   TCTGTAGCAGGTTCTGAAATGGCAGTCATTGCCTTGGGCTCGGTAGCAAGGTCGTCTGCT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  971   TCTGTAGCAGGTTCTGAAATGGCAGTCATTGCCTTGGGCTCGGTAGCAAGGTCGTCTGCT  912

Query  781   TTGGGTAATTCTTGTGAGCGATAGAGGGCGACTGCAGAGGGGGTGTCCGAGACAACATTC  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  911   TTGGGTAATTCTTGTGAGCGATAGAGGGCGACTGCAGAGGGGGTGTCCGAGACAACATTC  852

Query  841   TTATACATGGTCCCCCCTGTGATCGAACCGCATTCTTCCTCGAAGTGTCCATAGGTCGGG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  851   TTATACATGGTCCCCCCTGTGATCGAACCGCATTCTTCCTCGAAGTGTCCATAGGTCGGG  792

Query  901   CCGTTTAGGGTAGCTTGATTGGTATTGCTCCCATGAAGAAAGTCGCTTTCAGAGAAACCA  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  791   CCGTTTAGGGTAGCTTGATTGGTATTGCTCCCATGAAGAAAGTCGCTTTCAGAGAAACCA  732

Query  961   GAGCCAACACTAGCTTTGGTTTCTGAATTCAGAATCGTATCAAATCCGAAGAAGTCGAGC  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  731   GAGCCAACACTAGCTTTGGTTTCTGAATTCAGAATCGTATCAAATCCGAAGAAGTCGAGC  672

Query  1021  GACGGATCGCGGCTGCGGGTTCTGACAGGAGATGATGCCTTTCCTCTTCTGAAAATCCCG  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  671   GACGGATCGCGGCTGCGGGTTCTGACAGGAGATGATGCCTTTCCTCTTCTGAAAATCCCG  612

Query  1081  CTCGGGCACCTTTGATTCAGCTGTGATGGTATTAGCCCTCTCACTTTAGGCGTAGTAGCA  1140
             ||||||||||||||||||||
Sbjct  611   CTCGGGCACCTTTGATTCAG----------------------------------------  592

Query  1141  TGGCCACTCACAGTAAGACGATCACAGGGCACGTTGGGGGCACGAAAGCTGTCGTTGTTT  1200
                       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  591   -----------AGTAAGACGATCACAGGGCACGTTGGGGGCACGAAAGCTGTCGTTGTTT  543

Query  1201  GTCCTCTTCTTCGAACGGGAGCGTTCGCTGCTCTTCTTATTCTGAACCTTGTACTCATAT  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  542   GTCCTCTTCTTCGAACGGGAGCGTTCGCTGCTCTTCTTATTCTGAACCTTGTACTCATAT  483

Query  1261  CGGTCTTTCTTGGTTCTGTGTCGAGGCTGCCGCTCATAACCGTTCCGTCCCCCTTTTTCG  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  482   CGGTCTTTCTTGGTTCTGTGTCGAGGCTGCCGCTCATAACCGTTCCGTCCCCCTTTTTCG  423

Query  1321  GTGTTTGAAGATGTTTCCATATCATTTACTGTTGATGATGCACCTGGCTGTTGGGA  1376
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422   GTGTTTGAAGATGTTTCCATATCATTTACTGTTGATGATGCACCTGGCTGTTGGGA  367
```

รูปที่ 6.3 ผลการทำ BlastN ระหว่าง nucleotides ส่วนที่เหมือนกันของชิ้นยีนจาก DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I (Query) กับลำดับเบสของ hypothetical protein ของ *A. niger* CBS 513.88 (Sbjct)

```
Query  28    EKETLDYLRDSPRFNGASGVIDIPAAMAEITIYTAARALQGEEVRKKLTAEFAELYHDLD  207
             EKETLDYLRDSPRFNGASGVIDIPAAMAEITIYTAARALQGEEVRKKLTAEFAELYHDLD
Sbjct  150   EKETLDYLRDSPRFNGASGVIDIPAAMAEITIYTAARALQGEEVRKKLTAEFAELYHDLD  209

Query  208   KGFSPINFMLPWAPLPHNRKRDAAHARMREIYTDIINERRKNPDEEKSDMIWNLMHCTYK  387
             KGFSPINFMLPWAPLPHN+KRDAAHARMREIYTDIINERRKNPDEEKSDMIWNLMHCTYK
Sbjct  210   KGFSPINFMLPWAPLPHNQKRDAAHARMREIYTDIINERRKNPDEEKSDMIWNLMHCTYK  269

Query  388   SGQPVPDKEIAHMMITLLMAGQHssssissWIMLRLASEPQVLEELYQEQLASLSNRNGV  567
             SGQPVPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSISSWIMLRLASEPQVLEELYQEQLASLSNRNGV
Sbjct  270   SGQPVPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSISSWIMLRLASEPQVLEELYQEQLASLSNRNGV  329
```

```
Query  568   FEPLQYQDLDKLPFLQSVIKETLRIHSSIHSIMRKVKNPLPVPGTSYIIPEDHVLLASPG  747
              FEPLQYQDLDKLPFLQSVIKETLRIHSSIHSIMRKVKNPLPVPGTSYIIPEDHVLLASPG
Sbjct  330   FEPLQYQDLDKLPFLQSVIKETLRIHSSIHSIMRKVKNPLPVPGTSYIIPEDHVLLASPG  389

Query  748   VTALSDEYFPNATRWDPHRWENQPDKEEDGEMVDYGYGSVSKGTASPYLPFGAGRHRCIG  927
              VTALSDEYFPNATRWDPHRWENQPDKEEDGEMVDYGYGSVSKGTASPYLPFGAGRHRCIG
Sbjct  390   VTALSDEYFPNATRWDPHRWENQPDKEEDGEMVDYGYGSVSKGTASPYLPFGAGRHRCIG  449

Query  928   EKFAYVNLGVIIATIVRHLKLFNVDGRKGVPGTDYSTLFSGPMKPAIVGWERRFPDHSKG  1107
              EKFAYVNLGVIIATIVRHLKLFNVDGRKGVPGTDYSTLFSGPMKPAIVGWERRFPDHSKG
Sbjct  450   EKFAYVNLGVIIATIVRHLKLFNVDGRKGVPGTDYSTLFSGPMKPAIVGWERRFPDHSKG  509

Query  1108  SLN  1116
              SLN
Sbjct  510   SLN  512
```

รูปที่ 6.4 ผลการทำ BlastX ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Hin*dIII (Query) กับลำดับเบสของ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An11g02230) (Sbjct) ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด

```
Query  1376  SQQPGASSTVNDMETSSNTEKGGRNGYERQPRHRTKKDRYEYKVQNkkssersrskkRTN  1197
             SQQPGASSTVNDMETSSNTEKGGRNGYERQPRHRTKKDRYEYKVQNKKSSERSRSKKRTN
Sbjct  123   SQQPGASSTVNDMETSSNTEKGGRNGYERQPRHRTKKDRYEYKVQNKKSSERSRSKKRTN  182

Query  1196  NDSFRAPNVPCDRLTVSGHATTPKVRGLIPSQLNQRCPSGIFRRGKASSPVRTRSRDPSL  1017
             NDSFRAPNVPCDRLT                LNQRCPSGIFRRGKASSPVRTRSRDPSL
Sbjct  183   NDSFRAPNVPCDRLT-----------------LNQRCPSGIFRRGKASSPVRTRSRDPSL  225

Query  1016  DFFGFDTILNSETKASVGSGFSESDFLHGSNTNQATLNGPTYGHFEEECGSITGGTMYKN  837
             DFFGFDTILNSETKASVGSGFSESDFLHGSNTNQATLNGPTYGHFEEECGSITGGTMYKN
Sbjct  226   DFFGFDTILNSETKASVGSGFSESDFLHGSNTNQATLNGPTYGHFEEECGSITGGTMYKN  285

Query  836   VVSDTPSAVALYRSQELPKADDLATEPKAMTAISEPATDSYVSALVNPPSRNSEVHCDKE  657
             VVSDTPSAVALYRSQELPKADDLATEPKAMTAISEPATDSYVSALVNPPSRNSEVHCDKE
Sbjct  286   VVSDTPSAVALYRSQELPKADDLATEPKAMTAISEPATDSYVSALVNPPSRNSEVHCDKE  345

Query  656   PGSQLTSHNIVDNTSVDEGQRCSTRLDGVSQKCKHPCDAMRLDELADRSVDENKADDQGI  477
             PGSQLTSHNIVDNTSVDEGQRCSTRLDGVSQKCKHPCDAMRLDELADRSVDENKADDQGI
Sbjct  346   PGSQLTSHNIVDNTSVDEGQRCSTRLDGVSQKCKHPCDAMRLDELADRSVDENKADDQGI  405

Query  476   KERGLDKKVVAAPVHGNTISQFAWPNASKCRQPTLEPGSTSVADTEEFDYEGAMGAKLRK  297
             KERGLDKKVVAAPVHGNTISQFAWPNASKCRQPTLEPGSTSVADTEEFDYEGAMGAKLRK
Sbjct  406   KERGLDKKVVAAPVHGNTISQFAWPNASKCRQPTLEPGSTSVADTEEFDYEGAMGAKLRK  465

Query  296   TITPDYDLLSRFLNNGSRDKSSLMSDVDNRGENMQGHQSQIRQMIEEPDYESLDFAGVPE  117
             TITPDYDLLSRFLNNGSRDKSSLMSDVDNRGENMQGHQSQIRQMIEEPDYESLDFAGVPE
Sbjct  466   TITPDYDLLSRFLNNGSRDKSSLMSDVDNRGENMQGHQSQIRQMIEEPDYESLDFAGVPE  525

Query  116   ANDCCSELASLIDMEEWEIASVIVDMDTELDTQVLSMP  3
             ANDCCSELASLIDMEEWEIASVIVDMDTELDTQVLSMP
Sbjct  526   ANDCCSELASLIDMEEWEIASVIVDMDTELDTQVLSMP  563
```

รูปที่ 6.5 ผลการทำ BlastX ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของชิ้น DNA ของรา *A. nigricans* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I (Query) กับลำดับเบสของ hypothetical protein จากรา *A. niger* (An02g12290) (Sbjct) ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง (วิธีเก่า)

1. วิธีการทำ Partial fill-in

1.1 เตรียมส่วนผสมสำหรับชุดควบคุม (control reaction) และ ชุดตัวอย่าง (sample reaction) ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุม

1.5 ไมโครกรัม ของ control DNA (pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI)

2.5 ไมโครลิตร ของ 10x fill-in buffer

1 ไมโครลิตร ของ dATP (10 mM)

1 ไมโครลิตร ของ dGTP (10 mM)

1 ไมโครลิตร ของ Klenow polymerase (5 U/ไมโครลิตร)

เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร

ชุดตัวอย่าง

50 ไมโครกรัม ของชิ้น insert DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แบบไม่สมบูรณ์

30 ไมโครลิตร ของ 10x fill-in buffer

5 ไมโครลิตร ของ dATP (10 mM)

5 ไมโครลิตร ของ dGTP (10 mM)

3 ไมโครลิตร ของ Klenow polymerase (5 U/ไมโครลิตร)

เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวมเป็น 300 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมของแต่ละหลอดให้เข้ากันอย่างเบา

1.2 บ่มหลอดทดลองทั้งสองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 นาที

1.3 เติม 475 ไมโครลิตร ของ 1X STE buffer ใส่ลงในหลอดชุดควบคุม เติม 150 ไมโครลิตร ของ 1X STE buffer และ 50 ไมโครลิตร ของ 10X STE buffer ลงในชุดตัวอย่าง

1.4 เติมฟีนอลคลอโรฟอร์มลงไปทั้งสองชุด ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที ดูดเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ หากพบการปนเปื้อนระหว่างชั้นสารละลายอยู่ให้ทำซ้ำอีก 1 รอบ

1.5 เติมเอธิลแอลกอฮอล์ 100% ลงไปทั้งสองชุด ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.6 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส ล้างตะกอน DNA ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70% แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วจึงนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ในขั้นตอนต่อไป

สารเคมีที่ใช้

10X Fill-in Buffer
60 mM Tris-HCl (pH 7.5)
60 mM NaCl
60 mM MgCl2
0.5% gelatin
10 mM dithiothreitol (DTT)

TE Buffer
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

10X STE Buffer
1 M NaCl
200 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM EDTA

2. วิธีการเชื่อมต่อ (ligating) ชิ้น insert DNA

เตรียมส่วนผสมสำหรับชุดควบคุม (control reaction) และ ชุดตัวอย่าง (sample reaction) ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุม
1 ไมโครกรัม ของ Lambda FIXII ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I
0.8 ไมโครลิตร ของ pMF ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI
0.5 ไมโครลิตร ของ 10X ligase buffer
0.5 ไมโครลิตร ของ rATP (10 mM)
2 ยูนิต ของ T4 DNA ligase
เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวมเป็น 5 ไมโครลิตร

ชุดตัวอย่าง
เหมือนชุดควบคุมทุกอย่าง ยกเว้นส่วนของ DNA ควบคุมเปลี่ยนเป็น DNA ตัวอย่าง partial fill-in digested DNA ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร

บ่มตัวอย่างทั้งสองหลอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใช้ pack ลงในชุด packaging kit

3. การเพิ่มปริมาณ recombinant DNA

บรรจุเฟจแลมบ์ดาซึ่งเชื่อมต่อกับ insert DNA (recombinant DNA) จากข้อ 2 ลงในชุด packaging kit สามารถทำได้ดังนี้

3.1 นำ packaging extract ที่ถูกเก็บในตู้แช่เยือกแข็ง (-80 องศาเซลเซียส) มาบ่มที่ 0 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มละลาย เติมตัวอย่าง recombinant DNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมลงไปโดยทันที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลายปิเปตดูดขึ้นลงอย่างช้าๆ ให้เข้ากัน

3.2 spin down อย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง

3.3 เติม SM buffer 500 ไมโครลิตร

3.4 เติมคลอโรฟอร์ม 20 ไมโครลิตร และ spin down อย่างรวดเร็ว

3.5 นำไปใช้ในขั้นตอน tittering ต่อไป โดยสามารถเก็บตัวอย่างดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 1 เดือน

3.6 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเจ้าบ้าน (host bacteria) สายพันธุ์ VCS257 ซึ่งใช้กับ lambda cl857 *Sam*7 ซึ่งเป็น wild-type lambda control DNA ที่เป็นชุดควบคุมและ XL1-Blue MRA (P2) ซึ่งใช้กับ recombinant DNA ที่เป็นชุดตัวอย่าง บนอาหาร LA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7 โคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากข้อ 3.6 เลี้ยงในอาหาร LB ที่เติม 10 mM $MgSO_4$ และ 0.2% maltose ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบน เติมสารละลาย 10 mM $MgSO_4$ ที่ปราศจากเชื้อครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม ละลายให้เข้ากัน

3.9 ทำให้ค่า OD_{600} อยู่ในช่วง 0.5 โดยการเจือจางด้วย 10 mM $MgSO_4$

3.10 ทำ dilution series ของชุดควบคุมและตัวอย่าง recombinant DNA จากข้อ 3.5 ด้วย SM buffer จาก 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียเจ้าบ้านปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ดูดมาใส่ LB top agar (0.7% Agarose) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงบนหน้าอาหาร LA ให้ทั่ว รอจนแห้งจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นในหน่วย plaque-forming unit ต่อมิลลิลิตร (pfu/ ml) ซึ่งควรอยู่ในช่วงประมาณ 400 plaques