



วิทยานิพนธ์

การผลิตและการศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส
กลายพันธุ์จากพะยุง

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MUTANT
FORMS OF THAI ROSEWOOD β -GLUCOSIDASE

นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากพะยูน

Production and Characterization of Mutant Forms of Thai Rosewood β -glucosidase

นามผู้วิจัย นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชัย พรบันลือลาภ, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนโก, ปร.ด.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากพะยูน

Production and Characterization of Mutant Forms of Thai Rosewood β -glucosidase

โดย

นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2550

ชมพูนุท พรเจริญพ 2550: การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากพะยูน ปริญญุทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม) สาขาพันธุ์วิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.
140 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในส่วนของหมู่อะไคโคน เอนไซม์อัลโคซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนมีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติอัลโคซินินกลูโคไซด์ ขณะที่เอนไซม์ลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติลินามาริน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากจะเร่งปฏิกิริยาการสลายได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่นการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย โดยเอนไซม์อัลโคซิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่นการสลายได้ดี และสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้ ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ลินามาเรสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่เร่งปฏิกิริยาอื่นการสลายไม่ได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อหาตำแหน่งของกรดอะมิโนในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไคโคน ที่น่าจะมีความสำคัญต่อความจำเพาะต่อสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ในงานวิจัยนี้ได้สร้างเอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิด คือ I185A V255F G367S และ E455I โดยการแทนที่กรดอะมิโนในบริเวณที่คาดว่าทำหน้าที่จับกับหมู่อะไคโคนของเอนไซม์อัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ทำการโคลน และให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* จากนั้นสกัดให้บริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A V255F G367S และ E455I ไม่ทำให้เอนไซม์สลายลินามารินได้ แต่ลดค่า K_m ในการสลายอัลโคซินินกลูโคไซด์ เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A และ E455I ทำให้ค่า K_m ในการสลาย *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*pNP*-Glc) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการสลายอัลโคซินินกลูโคไซด์ และ *pNP*-Glc น้อยลงมาก เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสพบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A และ V255F เพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับ อย่างไรก็ตามเอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้เลย ดังนั้นจึงคาดว่าหากทำการกลายพันธุ์ที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง จะทำให้ได้เอนไซม์อัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ที่สามารถทำงานได้คล้ายกับเอนไซม์ลินามาเรสมากขึ้น

Chompoonuth Porncharoenp 2007: Production and Characterization of Mutant Forms of Thai Rosewood β -glucosidase. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Ms. Prachumporn Kongsaree, Ph.D. 140 pages.

β -Glucosidases from different organisms exhibit diverse substrate specificities, especially for the aglycone moiety. Dalcochinase (a β -glucosidase from Thai rosewood) shows specificity for its natural substrate (dalcochinin glucoside), while linamarase (a β -glucosidase from cassava) has specificity for its natural substrate (linamarin). Apart from hydrolysis reaction, both enzymes can also catalyze reverse hydrolysis and transglucosylation reactions. Dalcochinase are capable of catalyzing reverse hydrolysis and transglucosylation by using primary and secondary alcohol as acceptor, but not tertiary alcohol. In contrast, linamarase is good at catalyzing transglucosylation by using primary, secondary and tertiary alcohol as acceptor, but poor in catalyzing reverse hydrolysis. In this project, we were interested in studying structure and function relationship of β -glucosidase, in order to identify the amino acid residues in the aglycone binding pocket that are important for substrate specificity and transglucosylation reaction. Four dalcochinase mutants, namely I185A, V255F, G367S and E455I, were generated by replacing amino acid residues that are likely located in the aglycone binding site of dalcochinase with the corresponding residues of linamarase. Mutant enzymes were cloned and expressed in yeast *Pichia pastoris*, and purified from culture media. Kinetic studies of all mutant enzymes showed that I185A, V255F, G367S and E455I did not improve the hydrolytic activity towards linamarin, but decreased K_m for hydrolysis of dalcochinin glucoside. I185A and E455I increased K_m for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc). In addition, all 4 mutations decreased the hydrolytic efficiency towards dalcochinin glucoside and *p*NP-Glc. In transglucosylation studies, I185A and V255F increase the enzymes' ability to transfer glucose to primary and secondary alcohol acceptors. However, all 4 dalcochinase mutants could not catalyze transglucosylation by using tertiary alcohol as acceptor. Thus, it is expected that mutation at more than one position may generate new dalcochinase mutants which may function similarly to linamarase.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ประชุมพร คงเสรี ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัยของวิทยาพนธ์ฉบับนี้ และช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขวิทยาพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชัย พรบันลือลาภ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร.สุนันทา รัตนโก กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และรศ.ดร.ศรีสม สุวรรณวงศ์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ม.ร.ว.ชัยยุทธ สวัสดิวัตน์ และผศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการของอาจารย์ทุกท่านที่ช่วยให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณพี่อ้อย ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และอาจารย์ปัญญภัทร โสจิกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.มหิดล ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง scanning densitometer และขอบพระคุณอาจารย์ชัยวัฒน์ กิตติกุล หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ม.เกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง Elisa scanning ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณคุณเพ็ญพร สุจิตต์นารัตน์ และคุณนุสริน ทองทับทิม ที่คอยให้คำแนะนำ และคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆ พี่ๆ ในสาขาพันธุ์วิศวกรรมทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย และน้องชาย ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ชมพูนุท พรเจริญพ

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ	86
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	93
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A	98
ภาคผนวก ง ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F	106
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S	114
ภาคผนวก ฉ ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I	122
ภาคผนวก ช กราฟ Michaelis-Menten	131
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	140

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	34
2	กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A	52
3	กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F	53
4	กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S	53
5	กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I	54
6	การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L	55
7	การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L	56
8	การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L	56
9	การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L	57
10	ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดในการสลาย pNP-Glc	62
11	ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดในการสลายคัลโคซิโนไกลูโคไซด์	62
12	เปอร์เซ็นต์ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของ แอลกอฮอล์ปฐมภูมิกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส และคัลโคซิเนส N.D. กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด	73
13	เปอร์เซ็นต์ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และตติยภูมิกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE	90
ก2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม non-denaturing PAGE	91

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง(α/β) ₈ barrel structure ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover	6
2	กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส	8
3	การปลดปล่อย HCN ออกจาก cyanogenic glucoside	9
4	โครงสร้างของคัลโคซินินกลูโคไซด์	11
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนส	12
6	โครงสร้างของลินามาริน และโลตัสตราลิน	14
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส	16
8	การเกิดปฏิกิริยาการสลาย ปฏิกิริยาย้อนการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส	17
9	โครงสร้างของ DIMBOA-Glc และ dhurrin	19
10	พลาสมิด pPICZ และ pPICZ α A,B,C	24
11	โครงสร้างของแลคตูโลส	27
12	โครงสร้างทางเคมีของโอลิโกแซคคาไรด์บางชนิด	28
13	อัลคิลกลูโคไซด์ที่ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว	29
14	พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG	30
15	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรส	43
16	โครงสร้างสามมิติของแบบจำลองคัลโคซิเนส	43
17	โครงสร้างกรดอะมิโน	44
18	ผลการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ	45
19	ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่าจะเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	46
20	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคัลโคซิเนสดั้งเดิมกับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A	48
21	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคัลโคซิเนสดั้งเดิมกับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดัลโคซิเนสดั้งเดิมกับเอนไซม์ดัลโคซิเนส กลายพันธุ์ G367S	50
23 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดัลโคซิเนสดั้งเดิมกับเอนไซม์ดัลโคซิเนส กลายพันธุ์ E455I	51
24 การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้	59
25 การวิเคราะห์ห่อเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนชเซอริงพอลิอะครีลาไมด์	61
26 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M methanol และ 0.9 M ethanol เป็น glucosyl acceptor	68
27 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>n</i> -propanol และ 0.9 M <i>iso</i> -propanol เป็น glucosyl acceptor	69
28 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>n</i> -butanol และ 0.9 M <i>iso</i> -butanol เป็น glucosyl acceptor	70
29 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>sec</i> -butanol และ 0.9 M <i>tert</i> -butanol เป็น glucosyl acceptor	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข1 กราฟมาตรฐาน BSA	94
ข2 กราฟมาตรฐาน p NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	95
ข3 กราฟมาตรฐาน p NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์	96
ข4 กราฟมาตรฐานกลูโคส	97
ช1 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติในการสลาย p NP-Glc	132
ช2 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสในการ สลาย p NP-Glc	132
ช3 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามาเรสในการสลาย p NP-Glc	133
ช4 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ใน การสลาย p NP-Glc	133
ช5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ใน การสลาย p NP-Glc	134
ช6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ใน การสลาย p NP-Glc	134
ช7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ใน การสลาย p NP-Glc	135
ช8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ใน การสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์	135
ช9 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ใน การสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์	136
ช10 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ใน การสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์	136

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ช11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ใน การสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์	137
ช12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามาเรสในการสลายลินามาริน	137
ช13 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ใน การสลายลินามาริน	138
ช14 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ใน การสลายลินามาริน	138
ช15 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ใน การสลายลินามาริน	139
ช16 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ใน การสลายลินามาริน	139

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BSA	=	Bovine serum albumin
bp	=	base pair
K_m	=	Michaelis-Menten constant
k_{cat}	=	catalytic constant
kDa	=	Kilodalton
4-MU-Glc	=	4-methylumbelliferyl- β -D-glucose
non-denaturing PAGE= Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis		
N.D.	=	Not detectable
<i>p</i> NP	=	<i>para</i> -Nitrophenol
<i>p</i> NP-Glc	=	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside
<i>p</i> NP-Fuc	=	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-fucopyranoside
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis
TLC	=	Thin-Layer Chromatography
V_{max}	=	maximum velocity

การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากพะยูน

Production and Characterization of Mutant Forms of Thai Rosewood β -glucosidase

คำนำ

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ทำหน้าที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) สับสเตรทที่เป็นสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์ ตรงบริเวณพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก (β -O-glucosidic bond) ที่เชื่อมระหว่างหมู่ไกลโคซิลกับหมู่อะไกลโคซิล เอนไซม์ส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 55-65 กิโลดาลตัน มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ 5-6 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอาจทำหน้าที่ต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในมนุษย์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทำหน้าที่สลายกลูโคซิลเซอรามีด์ (glucosylceramide) และการขาดเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเป็นสาเหตุของโรค Gaucher's disease ในเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสมีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสให้ได้กลูโคส ซึ่งถือเป็นการสร้างพลังงานทดแทนจากของเสีย ในพืชเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะเครียด การย่อยเซลลูโลส การสร้างลิกนิน และระบบป้องกันตัวเอง (Esen, 1993)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในสิ่งมีชีวิตบางชนิด นอกจากจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้อีกด้วย เช่น เอนไซม์ดัลโคชินเนส (dalcochinase) จากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai rosewood) มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย คือสามารถเปลี่ยนกลูโคสอิสระให้กลับมาเป็นไดแซคคาไรด์ หรือ ไตรแซคคาไรด์ได้ดี (Svasti *et al.*, 2003) นอกจากนี้เอนไซม์ดัลโคชินเนสยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสมาสู่ตัวรับซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ให้เป็น alkyl glucoside โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) ได้ดี และกับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้บ้าง (Svasti *et al.*, 2003) เอนไซม์ชนิดที่สองคือ เอนไซม์ลินามาราส (linamarase) จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz หรือ cassava) สามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้น้อย แต่มีประสิทธิภาพสูงในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิได้ดี ซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (Svasti *et al.*, 2003)

การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทำได้โดยการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน ค่าจลนพลศาสตร์ ตัวยับยั้ง การดัดแปลงทางเคมี affinity labeling และการกลายพันธุ์ โดยพบว่ากรดอะมิโนที่เป็นกรด เช่น กลูตามัท และแอสปาร์เตท ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และเป็น nucleophile ระหว่างการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งพบว่ามีค่าคล้ายคลึงกันในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทุกตัว นอกจากนี้ยังรวมถึงเบต้า-กลูแคนเนส ไชลานเนส และไลโซไซม์อีกด้วย เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะใช้แอสปาร์เตท และกลูตามัท ที่อยู่บริเวณเร่ง ในการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท เกิดเป็นเอนไซม์-สับสเตรทอินเตอร์มีเดียท (enzyme-substrate intermediate) ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการสลาย สำหรับส่วนอื่นๆ ของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการจับกับหมู่อะไกลโคน (Esen, 1993) ทำให้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยส่วนมากจะแตกต่างกันในส่วนของหมู่อะไกลโคน ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ดัลโคชินเนสจากเมล็ดพะยูน มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติดัลโคซินินกลูโคไซด์ (dalcochinin glucoside) ที่เป็น isoflavonoid β -glucoside และเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังมีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติลินามาริน (linamarin) ที่เป็น cyanogenic glucoside (Svasti *et al.*, 2003)

เนื่องจากเอนไซม์ดัลโคชินเนส และเอนไซม์ลินามาเรสมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันถึง 70% แต่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ต่างกัน งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อหาตำแหน่งของกรดอะมิโนในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคน ที่น่าจะมีความสำคัญต่อความจำเพาะต่อสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย่อยหมู่กลูโคส โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืชไทย 2 ชนิดเป็นต้นแบบในการศึกษา คือเอนไซม์ดัลโคชินเนสจากพะยูน และเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง ซึ่งจะศึกษาโดยทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ดัลโคชินเนส โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคนของเอนไซม์ดัลโคชินเนส ให้เป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส โดยมีสมมุติฐานว่าถ้าทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่สำคัญ น่าจะทำให้เอนไซม์ดัลโคชินเนสกลายพันธุ์ที่ได้ มีคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ลินามาเรส คือ สามารถสลายลินามาริน ซึ่งคือสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรสได้ และน่าจะทำปฏิกิริยาย่อยหมู่กลูโคสได้ดีขึ้นอีกด้วย จึงคาดว่างานวิจัยนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และสามารถนำความรู้ที่ได้นี้ไปประยุกต์

ใช้ในการผลิตเอนไซม์ชนิดใหม่ให้มีคุณสมบัติตามที่เรต้องการเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน
การแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ทำนายตำแหน่งของกรดอะมิโนในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไลดโคน ที่อาจมีความสำคัญต่อความจำเพาะต่อสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาถ่ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัลโคซิเนส โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรส ควบคู่กับโครงสร้างสามมิติของแบบจำลองคัลโคซิเนส
2. สร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ โดยการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส
3. ศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat}) ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสกับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ และเอนไซม์ลินามาเรสในการสลายสับสเตรทต่างๆ
4. ศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการถ่ายหมู่กลูโคสของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสกับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ และเอนไซม์ลินามาเรสกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

การตรวจเอกสาร

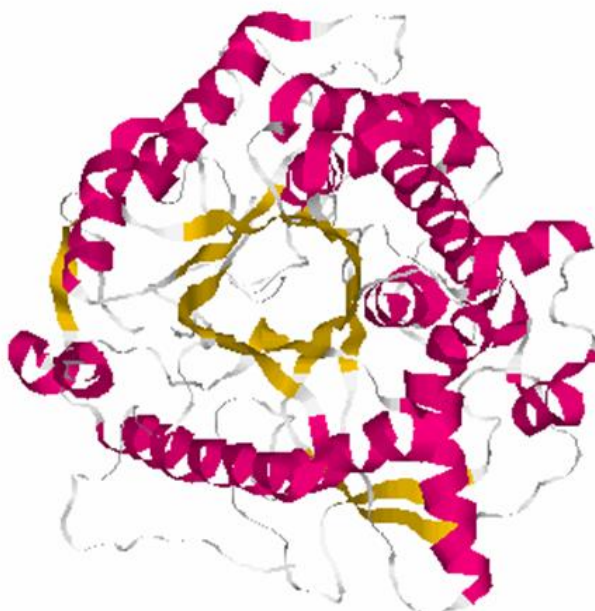
1. ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์ ตรงบริเวณพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ที่เชื่อมระหว่างหมู่ไกลโคโคนกับหมู่อะไกลโคน (Esen, 1993) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จัดอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลี 1 (Hanrissat and Bairoch, 1996) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ส่วนใหญ่มีขนาด 55-65 กิโลดาลตัน มีช่วง pH ที่เหมาะสมกับการทำงานอยู่ที่ pH 5-6 และสับสเตรทคือสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์ เช่น ไอโซฟลาโวนอยด์เบต้า-กลูโคไซด์ ไอซาโนจินิกกลูโคไซด์ และสเตียรอยด์กลูโคไซด์ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสพบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์อาจทำหน้าที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ในมนุษย์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทำหน้าที่สลายกลูโคซิลเซอรามิด (glucosylceramide) และการขาดเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเป็นสาเหตุของโรค Gaucher's disease ในเชื้อรา และแบคทีเรีย เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเป็นส่วนหนึ่งของ cellulose complex ซึ่งมีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสให้ได้เป็นเซลโลไบโอส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะย่อยเซลโลไบโอสให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส ซึ่งถือเป็นการสร้างพลังงานทดแทนจากของเสีย (Esen, 1993) ในพืชเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะเครียด การย่อยเซลลูโลส การสร้างลิกนิน และระบบป้องกันตัวเอง เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยการปลดปล่อยไซโตไคนินซึ่งเป็น growth factor ออกจากสารประกอบกลูโคไซด์ และเอนไซม์จะเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเองโดยการผลิตสารประกอบ เช่น ไฮโดรเจนไอซยานด์ ซาโปนิน คูมาริน และแนฟโทควิโนน จากปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท (Conn, 1993)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช ส่วนมากจะแตกต่างกันในส่วน of หมู่อะไกลโคน (Esen, 1993) ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน หรือคัลโคซิเนส (dalcochinase) มีสับสเตรทธรรมชาติเป็นไอโซฟลาโวนอยด์เบต้า-กลูโคไซด์ (Svasti *et al.*, 1999) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง หรือลินามาราส (linamarase) มีสับสเตรทธรรมชาติเป็นไอซยานจินิก กลูโคไซด์ (Eksittikul and Chulavatnatol, 1988) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวโพดมีสับสเตรทธรรมชาติเป็น 2-O- β -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-

benzoxazin (DIMBOAGlc) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวฟ่าง มีลำดับสเตรทธรรมชาติเป็น *p*-hydroxy-(*S*)-mandelonitrile- β -D-glucose (dhurrin) (Cicek *et al.*, 2000)

นักวิจัยได้ทำการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และในปัจจุบันสามารถหาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตได้แล้ว 10 ชนิด ซึ่งทุกตัวมีโครงสร้างเป็นแบบ $(\beta/\alpha)_8$ barrel structure (ภาพที่ 1) (Davies and Henrissat, 1995) โดยโครงสร้างแรกที่เราได้คือ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover (Barret *et al.*, 1995)



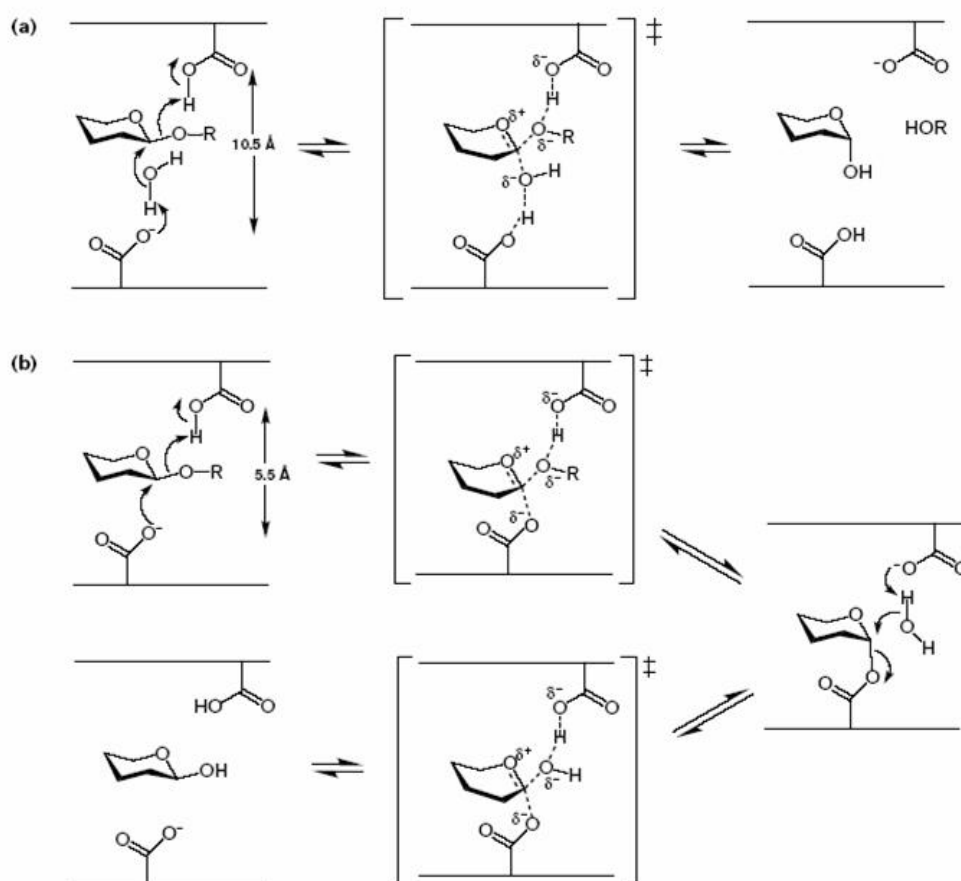
ภาพที่ 1 โครงสร้าง $(\alpha/\beta)_8$ barrel structure ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก white clover สีชมพู แสดงโครงสร้าง α -helix สีเหลืองแสดงโครงสร้าง β -sheet
ที่มา: Protein data bank (2007)

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบคือ inversion และ retention (ภาพที่ 2) โดยทุกเอนไซม์ที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกันจะเกิดการเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบเดียวกัน การเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวเป็น acid และ base catalysts ซึ่งวางอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันประมาณ 10.5 Å ซึ่งยอมให้โมเลกุลของสับสเตรท และน้ำมาจับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลได้พร้อมกัน โดยหมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น acid catalyst จะให้โปรตอนกับ glycosidic oxygen พร้อมกับหมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น base catalyst จะรับโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำ ซึ่งเข้ามาเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon เกิดการสลาย

พันธะไกลโคซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งคือ น้ำตาล ที่มี anomeric configuration เปลี่ยนแปลงไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ single-displacement และ transition state จะมีลักษณะเป็น ออกโซคาร์บอเนียมไอออน (oxocarbenium ion) (ภาพที่ 2a) ส่วนการเร่งปฏิกิริยาแบบ retention จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวเป็น acid/base catalysts และ nucleophile ซึ่งวางอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกัน ประมาณ 5.5 Å ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ double-displacement ซึ่งจะเกิดโควาเลนต์ ไกลโคซิล-เอนไซม์อินเตอร์มีเดียท (covalent glycosyl-enzyme intermediate) (ภาพที่ 2b) ใน ขั้นตอนแรกหมู่คาร์บอกซิลตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid catalyst ซึ่งจะให้โปรตอนแก่ glycosidic oxygen พร้อมกับสลายพันธะไกลโคซิดิก และหมู่คาร์บอกซิลอีกตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งจะเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon สร้างเป็นโควาเลนต์ไกลโคซิล เอนไซม์อินเตอร์มีเดียท ในขั้นตอนที่สองหมู่คาร์บอกซิลที่สูญเสียโปรตอนจะทำหน้าที่เป็น base catalyst โดยจะดึงโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำที่เข้ามาโจมตี anomeric center ทำให้ได้น้ำตาลหลุด ออกมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมี anomeric configuration เหมือนเดิม โดยทั้ง 2 ขั้นตอนจะเกิดขึ้นผ่าน transition states ที่มีลักษณะเป็นออกโซคาร์บอเนียมไอออน (David *et al.*, 2000)

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium faecalis* แสดงให้เห็นว่ากลูตามาที่ตำแหน่ง 358 (ตรงกับกลูตามาที่ตำแหน่ง 397 ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover) มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกตัวที่กลูตามาที่ตำแหน่ง 358 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Trimbur *et al.*, 1992) และจากการจับกันของเอนไซม์กับตัวยับยั้งคือ 2-deoxy-2-fluoroglucoside ทำให้เกิดโควาเลนต์ไกลโคซิลเอนไซม์อินเตอร์มีเดียท ซึ่งให้เห็นว่ากลูตามาที่ตำแหน่ง 397 ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover ทำหน้าที่เป็น nucleophile และอยู่ในลำดับกรดอะมิโน I(V)TENG ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์อย่างมากในไกลซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 ทุกตัว (Henrissat, 1991) สำหรับการหาตำแหน่งที่ทำหน้าที่ acid/base catalyst ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง โดยใช้ N-bromo-acetyl- β -D-glucosamine เป็นตัวยับยั้ง พบว่ากลูตามาที่ตำแหน่ง 198 (ตรงกับกลูตามาที่ตำแหน่ง 183 ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover) ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst อยู่ในลำดับกรดอะมิโน LNEP ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์อย่างมากในไกลซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 ทุกตัว (Keresztessy *et al.*, 1994) โดยกลูตามาที่ตำแหน่ง 183 และกลูตามาที่ตำแหน่ง 397 ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover จะอยู่บน β -strand 4 และ 7 ตามลำดับ (Barrett *et al.*, 1995) และอยู่ห่างกันเป็นระยะทางประมาณ 5.2 Å (Henrissat *et al.*, 1995) จากการตรวจสอบโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover พบว่ามีกรดอะมิโนประเภทที่มีขั้ว และวงแหวน อะโรมาติกจำนวนมาก บริเวณตำแหน่งจับของหมู่น้ำตาล

และที่บริเวณบริเวณตำแหน่งจับของหมู่อะไคโคน น่าจะอยู่บริเวณปลาย c-terminal loop ตรงทางเข้าของโพรง ที่ตำแหน่งนี้ส่วนมากจะประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่ชอบน้ำ และกรดอะมิโนที่มีขั้วจำนวนมาก (Barrett *et al.*, 1995)

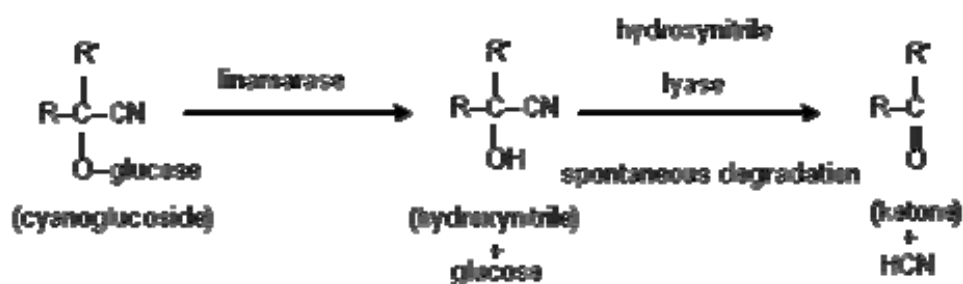


ภาพที่ 2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (a) inverting (b) retaining
ที่มา: Carl and Stephen (2000)

2. เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพืช

นักวิจัยได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืชมานานกว่า 150 ปีแล้ว โดยเอนไซม์นี้จะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียด การสร้างลิกนิน การย่อยเซลลูโลส การควบคุมการเจริญเติบโต โดยเอนไซม์นี้จะสลายกลูโคไซด์ในไฟโตสอร์โมนของพืช ทำให้ได้สอร์โมนอิสระที่จะไปทำหน้าที่ต่อไป (Hughes, 1993) และหน้าที่ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืช คือการป้องกันอันตรายจากสัตว์กินพืช (Esen, 1993) โดยเอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส (หรือลินามาเรส) จะเร่งปฏิกิริยาการสลายไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์

แล้วได้ผลิตภัณฑ์คือ กลูโคสกับไฮดรอกซีไนไตรล์ (hydroxynitrile) ซึ่งอาจถูกสลายโดย เอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรล์ไลเอส (hydroxynitrilelyase) หรือสลายตัวเอง (spontaneous degradation) ให้เป็นคีโตนและไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งเป็นสารพิษ ดังภาพที่ 3 (Hughes, 1993) กระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการไซยาโนจีนีซิส (cyanogenesis) จะพบในพืชมากกว่า 3000 สปีชีส์ โดยพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และสับสเตรท จะอยู่ในบริเวณที่ต่างกันภายใน เซลล์ และหลังจากที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดบาดแผล โดยการเข้าทำลายของสัตว์กินพืชหรือจุลินทรีย์ จะทำให้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรท แล้วได้สาร HCN ซึ่งเป็น สารพิษออกมาขยับยังจุลินทรีย์ที่เข้ามาตรงบริเวณบาดแผลนั้นด้วย



ภาพที่ 3 การปลดปล่อย HCN ออกจาก cyanogenic glucoside; $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}' = \text{CH}_3$ linamarin; $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$ lotaustralin

ที่มา: Hughes (1993)

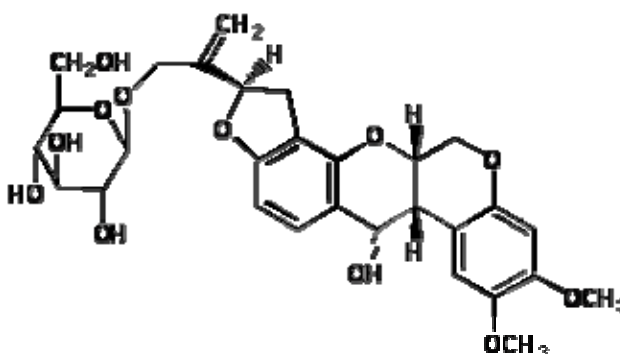
จากการศึกษาของ Selmar ปี 1993 พบว่าสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์ส่วนมากจะถูกขนส่งภายในเซลล์พืชในรูปของไดกลูโคไซด์ ซึ่งจะไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สำหรับโมโนกลูโคไซด์จะไม่สามารถถูกขนส่งภายในเซลล์ได้ เนื่องจากจะถูกย่อยโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่อยู่บริเวณเมมเบรน แต่จะสามารถถูกขนส่งได้เมื่อมีการเปลี่ยนให้มาอยู่ในรูปของไดกลูโคไซด์โดยอาศัยปฏิกิริยาไกลโคซิเลชัน (glycosylation) และจะเปลี่ยนกลับไปเป็นโมโนกลูโคไซด์ได้ โดยอาศัยเอนไซม์ไดกลูโคซิเดส (Selmar, 1993)

2.1 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre, Thai rosewood)

จากการคัดกรองหาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเมล็ดมากกว่า 50 สปีชีส์ของพืชในประเทศไทย โดยใช้ *para*-nitrophenyl- β -D-glycopyranoside (*p*NP-glycoside) หลายชนิดเป็นสับสเตรท พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเมล็ดพืช 9 ชนิด โดยเมล็ดของพะยูนมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดของพืชชนิดอื่น (Surarit *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดของพะยูนมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี 35-70% saturated ammonium sulphate fractionation, isoelectric focusing และ Sephadex G-150 chromatography (Srisomsap *et al.*, 1996)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าคัลโคชินเนส มีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 ดาลตัน คาดว่าประกอบด้วย 4-6 subunit แต่ละ subunit มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 5.5 เอนไซม์นี้มีสับสเตรทธรรมชาติคือ 12-dihydroamorphigenin-8'-*O*- β -D-glucoside สับสเตรทนี้เป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ และได้ตั้งชื่อว่า คัลโคชินินกลูโคไซด์ (dalcochinin-8'-*O*- β -glucoside) แสดงดังภาพที่ 4 เนื่องจากคัลโคชินินกลูโคไซด์มีโครงสร้างที่คล้ายกับ rotenone ซึ่งเป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นยาฆ่าแมลง จึงคาดว่าหุ้จะไกลโคโคนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันพวกสัตว์กินพืช และได้มีการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ในการสลายคัลโคชินินกลูโคไซด์ พบว่าเอนไซม์คัลโคชินีสมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.68 mM และ 452 nkat/ml ตามลำดับ (Svasti *et al.*, 1999) นอกจากนี้เอนไซม์คัลโคชินีสยังสามารถย่อยได้ทั้ง β -glucoside และ β -fucoside จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์คัลโคชินีส มีค่า K_m ต่อสาร *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) และ *para*-nitrophenyl- β -D-fucopyranoside (*p*NP-Fuc) เป็น 5.4 mM และ 0.54 mM ตามลำดับ มีค่า k_{cat} ต่อสาร *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc เป็น 307 sec⁻¹ และ 151 sec⁻¹ ตามลำดับ เอนไซม์คัลโคชินีสถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย mercuric compound (HgCl₂ และ *p*-chloromercuribenzoate) และไม่รุนแรงด้วย δ -gluconolactone และ conduritol epoxide (Srisomsap *et al.*, 1996) เนื่องจากเอนไซม์มีกิจกรรมที่สูงกับทั้ง *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาว่าเอนไซม์มีบริเวณเร่งเดียว หรือมี 2 บริเวณเร่งที่แยกกันสำหรับการเร่งปฏิกิริยาการสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc จึงมีการตรวจสอบโดยการทำ chemical modification โดยใช้ conduritol B epoxide (CBE) ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีบริเวณเร่งเดียวสำหรับการสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc

(Surarit *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีการยืนยันจากการวิเคราะห์ทางจุลณพลศาสตร์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีบริเวณเร่งเดียวเช่นกัน (Surarit *et al.*, 1997)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของดัลโคซินินกลูโคไซด์

ที่มา: Svasti (1999)

เพื่อศึกษาโครงสร้าง และวิวัฒนาการของเอนไซม์ดัลโคซินินส จึงมีการหาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้โดยการทำให้ peptide sequencing ตามด้วยการทำให้ RT-PCR amplification, 3'RACE, 5'RACE, cloning และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ดัลโคซินินส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 547 ตัว (ภาพที่ 5) ซึ่งแบ่งเป็น propeptide 23 ตัว และ mature protein 524 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่า mature protein ของเอนไซม์ดัลโคซินินส มีความเหมือนกับไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover ถึง 60% จึงคาดว่าเอนไซม์ดัลโคซินินส น่าจะมีโครงสร้างแบบ barrel structure คล้ายกับไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover (1CBG) (Barrett *et al.*, 1995) การที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีกรดอะมิโนบางตัวแตกต่างกัน จึงทำให้ความจำเพาะกับสับสเตรตแตกต่างกัน จากการทดลองตัดเอนไซม์ดัลโคซินินสด้วยเอนไซม์ endoglycosidase-F/peptide-N-glycosidase F (endo F) พบว่าเอนไซม์ดัลโคซินินสเป็นไกลโคโปรตีน และมีการเกิดกระบวนการ N-glycosylation จากการที่มี signal sequence แสดงให้เห็นว่าโปรตีนนี้น่าจะอยู่ใน secretory organelle, vacuole หรืออยู่นอกเซลล์ จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ดัลโคซินินส ทำให้สามารถจัดเอนไซม์อยู่ในแฟมิลี 1 ของกลุ่มเอนไซม์เบต้า-ไกลโคซิเดส ซึ่งคาดว่าจะสลายสับสเตรตโดยใช้กลไกแบบ retention (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

```

                                     aaacagactcatcatccttccttttcattc
31 atgcttgcaatgacatccaaaggcgattttgcttctcggtctcttggtcccttggttagcacttcgggt
  H L A N T S K A I L L L G L L A L V S T S A 22
97 tctattgactttgcacaaagagtccgtgcaaccattactgaggttctctccattccaccgaagctgt
  S I D F A K E V R E T I T E V P P F N R S C 44
163 tttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtacccagtatgaaggtgagggcagagta
  F P S D F I F G T A S S S Y Q Y E G E G R V 66
229 ccaagtacatgggataacttcacccccaatatacagaagaagatagcgggatagaagcaacgggagat
  P S I W D N F T H Q Y P E K I A D R S N G D 88
295 gttgcagctgagccaatctcaccgctatagaagagatattgcaatcatgaagratatgaacttcggat
  V A V D Q F H R Y K K D I A I N K D H N L D 110
361 gcttatagaatgtccatctccttggtctagaattctcccaacgggttaggggttagtgaggagcatcaac
  A Y R N S I S W P R I L P T G R V S G I N 132
427 caaacagggttgactactcaaacaggcttcataaatgagtcacttggccaatggcatcaacccaattt
  Q T G V D Y Y H R L I N E S L A N G I T P F 154
493 gtaaccacttttcatctgggatcttcacaaagcctctggaggtatgagtcaggttggcttcttcaaatcat
  V T I F H W D L P Q A L E D E Y G G F L N H 176
559 agcgttgtaaatgattcccaagatatgggatatcttgctcccaattacttggtagatagggtcaag
  S V W N D F Q D Y A D L C F Q L F G D R V K 198
625 catttggtatcactcaaatgagccatcaatcttcaccggaatgggtatgcatccgggtatgtttgca
  H W I T L N E P S I F T A N G Y A Y G N F A 220
691 ccaggctgatgttctccatcgaatcaatccttgccacgggtggggatgcaaggacagagacttat
  P G R C S P S Y H P T C T G G D A G T E T Y 242
757 ctgggttgggcacacccctgatcctttctcatgcaagcaactgtcccaagtgtaacaaagggaagtatcag
  L V A H N L I L S R A A T V Q V Y K R K Y Q 264
823 gaacatcagaaggtacaatatgggatacttccttgcaagtagcttgggttatcaagctttcaaataga
  E H Q K G T I G I S L H V V W V I P L S N S 286
889 acatcagatcaaatgctcccaagcagatattcttgacttcccatgttggtatgggttatggacccactt
  T S D Q N A T Q R Y L D F T C G W F H D P L 308
955 ccaggcagggaaggtatccagatagcatgcaatatactagttaggagatcagattgctcaagtttactaca
  T A G R Y P D S R Q Y L V G D R L P K F T T 330
1021 gatcaagcccaattagtccaagggttccatttgattttatcgactcaactattacacactcaactat
  D Q A K L V K G S F D F I G L N Y Y T T H Y 352
1087 gctaccacaatcggatcggtcacacatgctgccacccatgttacctcacagatccccaagtcactctc
  A T K S D A S T C C P P S Y L T D P Q V T L 374
1153 ttacagcaacgcaatgggtcttttataggctcagtgactccctcaggatggatgtgtctttatcca
  L Q Q R N G V F I G P V T P S G W H C I Y P 396
1219 aaaggacttcagatattgttgctttacttcacgggaaggtatacaaatccttttggtttacatcact
  K G L R O L L L Y F K E K Y M W P L V Y I T 410
1285 gaaatcgggtatagatgaggaaggtgatgcatcacttcccttgaggatcccttgatagacacttat
  E N G I D E K N D A S L S L E E S L I D T Y 440
1351 agaatcagatagttacttatcgccatcctcttttatgttcgatatgcaatcaggtccctgggcacaaatgtg
  R I D S Y Y R H L F Y V R Y A I R S G A N V 462
1417 aaaggattttttgcatggtcattgttggaacactttgaatgggttgagggttatccatccagattt
  K G F F A U S L D N F E W A E G Y T S R F 484
1483 ggattatattttgtgactcactcacttttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaag
  G L Y F V N Y T T L W R Y P K L S A T W F K 506
1549 tattttctggccagtgatcaagagagtgctcaaatgggaatttttagcccaacaggccagatggagc
  Y F L A R D Q E S A K L E I L A P K A R W S 528
1615 tcatcaagcatgatcaagggaaggaagcaaccccaagagggcatcgaaggcttttgatcgtgct
  L S T H I K E E K T K P K R G I E G F *.....574
1681 ttagtttatttagtttatggatttgatagattactttatttttgatttgtatttgtgtcactcaagaa
1747 ataatcgggttttaacaaagggtatcccttatgggtttgcctagtccatatttatgttggtcaagt
1813 ttttatttttatttagtttactgagtcgggttaagtgccctccctgagtttcgoggtcttttgtggg
1879 ggatgtatcagctgtcccgcccaaaagaaattgcatcgcctctctctctatccatccatccatcgtc
1945 tttgttttgggtt

```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนส ตัวอักษรสีเขียวแสดงตำแหน่ง start codon ตัวอักษรสีฟ้าแสดงตำแหน่ง stop codon ตัวอักษรสีแดงแสดงตำแหน่ง propeptide ตัวหนาแสดงตำแหน่ง N-terminal sequence ของ mature protein และตัวอักษรสีชมพูแสดงบริเวณที่คาดว่าจะเกิด N-glycosylation

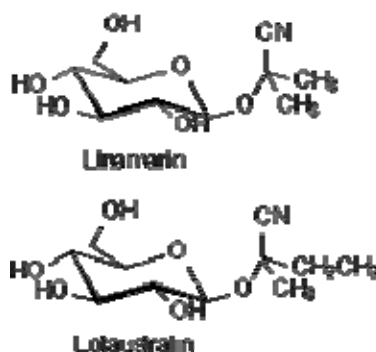
ที่มา: Ketudat-Cairns (2000)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสที่ได้จากการโคลน จะมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับเอนไซม์คัลโคซิเนสที่ได้จากพืชหรือไม่ แต่เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชใบเลี้ยงคู่ต้องผ่านกระบวนการ glycosylation ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะทำการแสดงออกใน *Escherichia coli* เพราะขาดขั้นตอน glycosylation จึงมีการทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งมีกระบวนการ glycosylation แทน เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีลักษณะเหมือนธรรมชาติมากที่สุด จากการศึกษาพบว่าสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสได้ทั้งในเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถย่อยสลาย pNP-Glc และคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์จากเมล็ด (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

นักวิจัยได้ทำการโคลน และแสดงออกเอนไซม์คัลโคซิเนสในระบบการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ พบว่าการแสดงออกของเอนไซม์คัลโคซิเนสใน *E. coli* จะได้โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถทำให้โปรตีนละลายได้โดยให้มีการแสดงออกร่วมกับ chaperonin GroESL แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้ก็ไม่มีกิจกรรม เพราะใน *E. coli* ขาดกระบวนการ post-translational modification ที่เหมาะสม ซึ่งจำเป็นต่อการม้วนพับ และการทำงานของเอนไซม์ สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์คัลโคซิเนสใน *P. pastoris* และ *Saccharomyces cerevisiae* จะได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรม และพบว่าการแสดงออกใน *P. pastoris* ภายใต้อาหารที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการแสดงออกใน *P. pastoris* และ *S. cerevisiae* ในสถานะที่มีการแสดงออกตลอดเวลา ดังนั้นจึงมีการสร้างรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส 2 แบบคือ ให้มีกรดอะมิโนฮิสติดีนติดอยู่ที่บริเวณปลาย C-terminus และ N-terminus ซึ่งจะสามารถทำให้บริสุทธิ์ผ่าน immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) ได้ง่าย จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสทั้ง 2 แบบไม่จับกับคอลัมน์ IMAC ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนฮิสติดีนน่าจะถูกตัดออกที่บริเวณปลาย C-terminus และ N-terminus ในกระบวนการ post-translation modification และจากการหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N-terminus ของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ใน *P. pastoris* พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีลำดับกรดอะมิโนเริ่มต้นที่ EVPPFN แสดงว่ากรดอะมิโน 12 ตัวแรกของ mature dalcocinase ถูกตัดออกไปพร้อมกับกรดอะมิโนฮิสติดีนที่อยู่ทางด้านปลาย N-terminus ดังนั้นจึงมีการสร้างรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสตัวใหม่ที่มี signal peptide กรดอะมิโนฮิสติดีน 8 ตัว และตามด้วยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่ปลาย N-terminus หายไป 13 ตัว (เริ่มต้นที่ลำดับกรดอะมิโน VPPFN) ซึ่งทำให้สามารถมีการแสดงออก และทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ hydrophobic interaction chromatography และคอลัมน์ IMAC ได้ โดยรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ได้มีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ (Toonkool *et al.*, 2006)

2.2 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz, cassava)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ลินามาเรส (linamarase) เอนไซม์นี้มีการผลิตในส่วนต่างๆ ของต้นมันสำปะหลัง ทำหน้าที่สลายไซยาโนกลูโคไซด์ 2 ชนิด คือ ลินามาริน (linamarin, 2-hydroxyisobutyronitrile- β -D-glucopyranoside) และ โลตัสตราลิน (lotaustralin, 2-hydroxy-2-methylbutyronitrile- β -D-glucopyranoside) (ภาพที่ 6) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคีโตน และไฮโดรเจนไซยาไนด์ ซึ่งเป็นสารพิษที่มีบทบาทในการป้องกันอันตรายจากสัตว์กินพืช (Hughes *et al.*, 1992) เอนไซม์ลินามาเรสมีบทบาทสำคัญในการกำจัดไซยาโนกลูโคไซด์ ระหว่างขั้นตอนการกำจัดสารพิษในกระบวนการผลิตอาหารจากมันสำปะหลัง (Eksittikul *et al.*, 1988)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของลินามาริน และ โลตัสตราลิน

ที่มา: Kemisk Institute of Syddansk University (2001)

นักวิจัยได้มีการแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากพืชชนิดต่างๆ เช่น white clover (*Trifolium repens* L), birdfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L), ปอ (*Linum ussitatissimum*), ถั่ว (*Phaseolus lunatus*), ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และมันสำปะหลัง สำหรับมันสำปะหลังได้มีการแยกเอนไซม์ครั้งแรกจากส่วนของราก ต่อมาได้มีการแยกจากส่วนลำต้น ก้านใบ และเปลือกกราก พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่แยกได้จากส่วนต่างๆ เหล่านี้ มีลักษณะเป็น homopolymer แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตัน มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 6 สามารถย่อยลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติได้ แต่ไม่สามารถย่อยพรุนาซิน (prunasin) หรืออะมิกดาลิน (amygdalin) ได้ นอกจากนี้ยังสามารถย่อย pNP-Glc และ pNP-Fuc ซึ่งเป็นสับสเตรทที่หาซื้อได้ทางการค้าได้อีกด้วย เอนไซม์ลินามาเรสถูกยับยั้งด้วย δ -gluconolactone, isopropyl- β -D-thioglucoiside, Hg_2Cl สำหรับ pNP-Glc และ Tris ion สำหรับ pNP-Fuc จากการศึกษพบว่า

เอนไซม์ลินามาเรสจากก้านใบ มีค่า K_m ต่อลินามาริน $pNP-Glc$ และ $pNP-Fuc$ เท่ากับ 0.57, 5.05 และ 0.23 mM ตามลำดับ มีค่า V_{max} ต่อลินามาริน $pNP-Glc$ และ $pNP-Fuc$ เท่ากับ 58, 256 และ 266 $\mu\text{mol/min/mg}$ ตามลำดับ (Eksittikul *et al.*, 1988)

นักวิจัยได้ทำการโคลน cDNA ของเอนไซม์ลินามาเรสจาก cDNA library ของใบเลี้ยงของต้นมันสำปะหลัง โดยใช้โพรบเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างที่มีการงอก เอนไซม์ลินามาเรสประกอบด้วยกรดอะมิโน 532 ตัว (ภาพที่ 7) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณที่คาดว่าจะมีการเติมน้ำตาล 5 บริเวณ จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังเป็นไกลโคโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลแบบ high-mannose-type N-linked oligosaccharide ประมาณ 7-15% ของน้ำหนักโมเลกุล (Hughes *et al.*, 1992) จากการทำ radio-affinity labeling โดยใช้ N-bromoacetyl- β -D-[^{14}C]-glucopyranosylamine แสดงให้เห็นว่ากลูตามาตำแหน่ง 198 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst (Keresztessy *et al.*, 1994)

ได้มีการทำให้เอนไซม์ลินามาเรสแสดงออกใน *E. coli* โดยใช้ pGEX-2T fusion vector พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้ไม่มีการเติมน้ำตาล ไม่เสถียร และมีการม้วนพับที่ไม่ถูกต้อง (Keresztessy *et al.*, 1996) จึงมีการทำให้เอนไซม์ลินามาเรสแสดงออกในยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีกระบวนการเติมน้ำตาลแทน จากการศึกษาพบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรม มีการเติมน้ำตาล และมีความเสถียรเหมือนกับเอนไซม์ที่ได้จากพืช สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสได้ทั้งในเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ 90 และ 10% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์สามารถสลายลินามาริน และ $pNP-Glc$ ได้เหมือนกับเอนไซม์จากพืช (Keresztessy *et al.*, 2001)

```

                                acsactttcttccagctatccagg
24  atgcccgcctcgtccatcagccctgctggccctccaccaggccagccacggggaactgatgatgatgat
   M L V L F I S L L A L T R P A N G T B B O O 22
90  gataatatctcctgacgatctttagccgtcaaatctttccagatgactccactttttgggaacggctact
   D N I P D O F S R K Y F P D D F I F G T A T 44
156  tctgccttatcagatccgaagggtgaagcaaccgcgaagggtcagagccaccagtgctctgggacatctct
   S A Y Q I E G E A T A K G R A P S V M D I F 66
222  tcccaaggagactccagatagaatattagatggcagcaatggagacgcttgccagttgatttctataac
   S K E T P O R I L D G S H G D V A V D F Y N 88
288  cgtacatccagatataaaaaagctcaaaaagatgggtttcaatgcatcttagaatgtccatttca
   R Y I Q D I K N V K K H G F N A F R K S I S 110
354  tgggtctagagtttatcccatccgggaaggagacgtgaaggagtgaaacagggaaggaattccactctcac
   U S R V I P S G R R R E G V H E E G I Q F Y 132
420  aatgatgttatcaatgaattataagcaatggacttagagccttttcttactatttttcaatcgggat
   N D V I H E I I S H G L E P F V T I F N H O 154
486  actcccccagccctgcaggaacaaatctggcctcttccagccctgatactgcgacagatcatctc
   T P Q A L Q D K Y G G F L S R D I V Y D Y L 176
552  caatatgcagatcttctctttgaaagattcggctgactcagtgaaacccgtggatgacttttcaatgaa
   Q Y A D L L F E R F G D R V K P U N T F H E 198
618  ccatcagcatatgttggactttgcccattgatgatggagtttttgcacccctggctcagatgctcactctgg
   P S A Y V G F A H D D G V F A P G R C S S H 220
684  gtagaatgcacccgcctagctgagctcagccacagaaacttatctagttgcccataatttgcctt
   V N R Q C L A G D S A T E P Y I V A K N L L 242
750  ctttctcatgctgcagctgttcccaaatatagaacaaatttatccagggaactcaaaaggcccaagatt
   L S H A A A V H Q Y R K Y Y Q G T Q K G K I 264
816  ggggactaacctctcttaccctctcgggtatgaacccctctccagacgtcaaaagtctgatgtgcaggaagcc
   G I T L F T F H Y E P L S D S K V D V Q A A 286
882  aaaaaagcccttcagatctcatgtttggattgtgagatggaatccatgactttatggacgatatacaga
   K T A L D F H F G L H H D P H T Y G R V P R 308
948  acctatggcagatttcagccggagatcaacttgatgggattccagatgaaggaatctcaatccacttagg
   T H V D L A G D K L I G F T D E E S Q L L R 330
1014  ggatccatatgattttgttggattaccatactcactgcataattatgcagaaacaaattcctccagttt
   G S Y D F V G L Q Y Y T A Y Y A E P I P P V 352
1080  gatccaaaattttgtagatcaaaaactgactagtggtgttaatggactcccttccagatcttaatgggt
   D P K F R R Y K T D S G V A T P Y D L H G 374
1146  aatcttatttgggtcccaaggcttactcgtcatggttttaccattttcccaaaagggtattcgaacattt
   H L I G P Q A Y S S H F Y I F P K G I R H F 396
1212  tcgaactataccaaagatcacatataatgatccagtcatttccgttactgagaaatgggtttgacaaac
   L Y T K D T Y N D P V I Y V T E N G V D N 418
1278  tcaaatcaatgaactctccacaaatcgaaggagcactccaaagatgactccagggacttcgtccacataaa
   Y N E S Q P I E A L Q D D F R I S Y V K 440
1344  aagcatatgttgaatgcactaggatctctcagaacactccggtgttaaaactcaaaaggttatcttgc
   K H H H W A L G S L K H Y G V K L K G V F A 462
1410  tgggtcatattccagcaacttcgaatgggaatccggtcaccatccagatccgggtcgtaccatgta
   U S Y L D H F E H H I G Y T S R F G L Y Y V 484
1476  gactcaaaaataaactcaaaagggtatcccaagaaatcgggtcattggttcacaaaattcctgaaat
   D Y K H L T R V P R K S A H U F T K F L 506
1542  atatcgggttaatgcacaaatatactatgagcttccatcaaaaggattccagggaaggttggcaattc
   I S V H A H H I Y E L T S E D S R K V G K F 528
1608  tatgcgatgtagatttatgcctggatgtttcgtgtgcactcacaatcaaaataatatacgttgggcaa
   Y V H 532
1674  tcatgaagctccaatgatctagcatatgttgt

```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ตัวอักษรสีเขียวแสดง

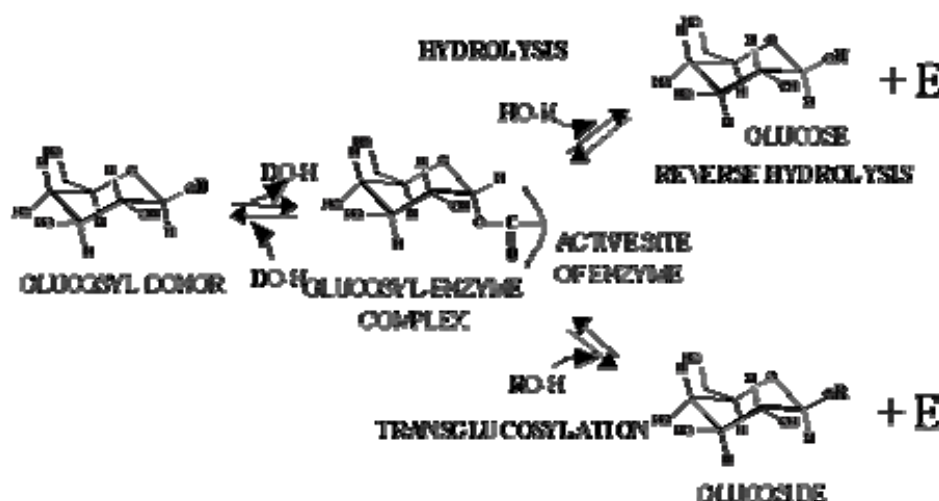
ตำแหน่ง start codon ตัวอักษรสีฟ้าแสดงตำแหน่ง stop codon และตัวอักษรสีชมพูแสดง

บริเวณที่คาดว่าจะเกิด N-glycosylation

ที่มา: Hughes (1992)

3. ปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation)

โดยปกติเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์และโอลิโกแซคคาไรด์ แต่เมื่อในสภาวะที่เหมาะสมคือ มีความเข้มข้นของโมโนแซคคาไรด์สูง (เช่น 60-85%) และมี water activity ต่ำ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบางชนิดจะสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้ดังภาพที่ 8 โดยสร้างพันธะระหว่างกลูโคสอิสระได้เป็นไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ได้ นักวิจัยได้ทำการทดลองบ่มเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกับโมโนแซคคาไรด์ 60% ใน sodium acetate buffer pH 5.0 นาน 1-20 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ดีลโคซิเนสจากพะยูน สามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ได้ภายในวันแรก และสังเคราะห์ไตรแซคคาไรด์ได้ภายในวันที่ 4 ของการบ่ม หลังจากการบ่มเป็นเวลา 20 วันแล้วได้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดประมาณ 30% ของปริมาณกลูโคสตั้งต้น (ไดแซคคาไรด์ 25% และ ไตรแซคคาไรด์ 5%) (Srisomsap *et al.*, 1999) เมื่อใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอนด์ สามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ และไตรแซคคาไรด์ได้ 30% เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท (Ajisaka *et al.*, 1987) สำหรับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังสามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ได้เพียง 5% เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตต่างกันมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายต่างกัน



ภาพที่ 8 การเกิดปฏิกิริยาการสลาย ปฏิกิริยาย้อนการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส D =

donor R = หมู่ alkyl E = enzyme

ที่มา: Toonkool (2003)

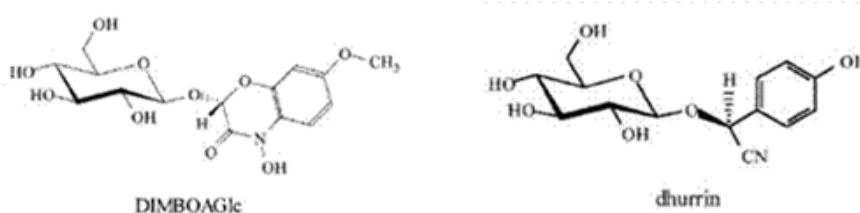
นอกจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาขบวนการสลายได้แล้ว เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบางชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ซึ่งคือการย้ายกลูโคสจากตัวให้ เช่น *p*NP-Glc ไปยังตัวรับตัวอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ ได้อีกด้วย (ภาพที่ 8) ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารพวก alkyl glucoside ได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่มีหลักฐานว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสในสิ่งมีชีวิต (Hommalai *et al.*, 2005) นักวิจัยได้ทำการทดลองบ่มเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังกับ *p*NP-Glc ความเข้มข้น 15 mM และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ (แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และแอลกอฮอล์ตติยภูมิ) ในบัฟเฟอร์ McIlvaine pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังสามารถสังเคราะห์ alkyl glucoside ได้ดีกับแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด (Svasti *et al.*, 2003) ซึ่งตรงข้ามกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนและอัลมอนต์ที่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้เลย แต่สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ผลผลิตกันที่ 70-90% และ 8-23% ตามลำดับ (Lirdprapamongkol and Savsti, 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ glycosyl donor ตัวอื่นนอกจาก *p*NP-Glc เช่น *p*NP-Fuc, เซลโลไบโอส และเจนดิโอไบโอส เป็นตัวให้ และใช้ hexan-1-ol เป็นตัวรับ พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง พะยูน และอัลมอนต์สามารถใช้ *p*NP-Fuc เป็น donor ในการสังเคราะห์ hexyl glucoside ได้ และที่น่าสนใจคือเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอนต์สามารถใช้ทั้งเซลโลไบโอส และเจนดิโอไบโอสเป็นตัวให้ได้ ขณะที่เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนใช้เจนดิโอไบโอสเป็นตัวให้ได้เพียงตัวเดียว และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลังไม่สามารถใช้เซลโลไบโอส และเจนดิโอไบโอสเป็นตัวให้ได้เลย (Svastiet *et al.*, 2003)

4. การศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

ได้มีการทำการกลายพันธุ์ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เพื่อที่จะศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโนในบริเวณเร่ง (Keresztessy *et al.*, 2000) และศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ (Cicek *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังทำเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้นอีกด้วย (Mayer *et al.*, 2000) ในการศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโน ที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง โดยการเปลี่ยนกลูตามีนตำแหน่ง 413 เป็นไกลซีน (E413G) เปลี่ยนกลูตามีนตำแหน่ง 339 เป็นกลูตามีน (Q339E) เปลี่ยนอะลานีนตำแหน่ง 201 เป็นวาเลอีน (A201V) และเปลี่ยนฟีนิลอะลานีนตำแหน่ง 269 เป็นแอสพาราจีน (F269N) โดยเทคนิค site-directed mutagenesis พบว่าการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E413G และ Q339E ทำให้เอนไซม์

ไม่ทำงาน แสดงให้เห็นว่า กลูตามัทตำแหน่ง 413 และกลูตามีนตำแหน่ง 339 น่าจะเป็น catalytic nucleophile และ catalytic diad ตามลำดับ สำหรับการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A201V ทำให้ค่า pK_a ของ กลูตามัทตำแหน่ง 198 (acid/base catalyst) เปลี่ยนแปลง และทำให้ค่า K_m ในการสลาย ลินามารินเพิ่มขึ้น แสดงว่าแขนงข้างของกรดอะมิโนวาเลอีนอาจจะไปขัดขวางการจับกับลินามาริน และการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง F269N ทำให้ค่า K_m ในการย่อยสลายลินามารินเพิ่มขึ้นมากถึง 16 เท่า ส่วนใน $pNP-Glc$ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าฟีนิลอะลานีนตำแหน่ง 269 น่าจะ เกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นลินามารินมากกว่า $pNP-Glc$ (Keresztessy *et al.*, 2001)

ในการศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อสับสเตรท ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ได้มีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวโพด (maize β -glucosidase, Glu1) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวฟ่าง (sorghum β -glucosidase, Dhr1) เป็นต้นแบบ เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันถึง 70% แต่มีความจำเพาะต่างกันสูง โดย Glu1 สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้หลายชนิด นอกเหนือจาก 2- α -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA-Glc) ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของมัน แต่ไม่สามารถย่อยสลาย p -hydroxy-(s)-mandelonitrile- β -D-glucoside (dhurrin) ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของ Dhr1 ได้ ขณะที่ Dhr1 สามารถย่อยสลายได้เฉพาะ dhurrin ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติเพียงชนิดเดียว ภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่าส่วนที่ทำหน้าที่กำหนดความจำเพาะของหมู่ อะไกลโคน จะแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ (Verdoucq *et al.*, 2004)



ภาพที่ 9 โครงสร้างของ DIMBOA-Glc และ dhurrin

ที่มา: Cicek (2000)

นักวิจัยได้มีการศึกษาโดยการทำการแลกเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C-terminus ของ Glu1 ด้วย Dhr1 (Glu1/Dhr1 chimeras) และของ Dhr1 ด้วย Glu1 (Dhr1/Glu1 chimeras) และจากการทดลองพบว่า Glu1/Dhr1 chimeras สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้

เหมือนกับ Glu1 รวมทั้งยังสามารถย่อยสลาย dhurrin ซึ่ง Glu1 ไม่สามารถย่อยสลายได้ ได้อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่กำหนดการย่อยสลาย dhurrin อยู่ทางด้านปลาย C-terminus ของ Dhr1 คือกรดอะมิโน ซีรีนตำแหน่ง 462 และตำแหน่ง 463 ฟีนิลอะลานีนตำแหน่ง 469 ในทางตรงกันข้าม Dhr1/Glu1 chimeras สามารถย่อยสลาย dhurrin ได้เพียงอย่างเดียว และยังมีค่า catalytic efficiency ต่ำกว่า Dhr1 อีกด้วย แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่กำหนดการย่อยสลาย DIMBOA-Glc ไม่ได้้อยู่ทางด้านปลาย C-terminus ของ Glu1 (Cicek *et al.*, 2000) จากการทำ superimposition ของโครงสร้างของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ พบความแตกต่างของลักษณะธรรมชาติของช่องในบริเวณเร่งคือ ใน Glu1 จะมีลักษณะเป็นช่องที่แคบ และยาว ขณะที่ช่องนี้ดูเหมือนจะกว้าง และเล็กกว่าใน Dhr1 นอกจากนี้พบว่าในบริเวณช่องจับซับสเตรทของ Glu1 จะถูกดัดแปลงเพื่อให้เสถียรต่อรูปร่างของซับสเตรทที่แตกต่างกัน และยังมีคามยืดหยุ่นต่อหมู่อะไคลโคสที่แตกต่างกัน จึงทำให้ Glu1 มีกิจกรรมกับซับสเตรทได้หลายชนิด ซึ่งตรงข้ามกับ Dhr1 ที่บริเวณช่องจับซับสเตรทของเอนไซม์ จะจำเพาะต่อการจับกับซับสเตรทธรรมชาติของมันในรูปแบบที่มีการบิดเบี้ยว ซึ่งทำให้ Dhr1 มีความจำเพาะต่อซับสเตรทสูง (Verdoucq *et al.*, 2004) นอกจากนี้จะมีการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อซับสเตรทของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืชแล้ว ยังมีการศึกษาในจุลินทรีย์อีกด้วย เช่น ได้มีการแลกเปลี่ยนกรดอะมิโน 58 ตัวทางด้านปลาย C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Celvibrio gilvus* ด้วยกรดอะมิโน 60 ตัวทางด้านปลาย C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *C. gilvus* ที่มีกรดอะมิโน 60 ตัวทางด้านปลาย C-terminus ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. tumefaciens* แสดงความจำเพาะต่อซับสเตรทของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. tumefaciens* (Singh and Hayashi, 1995)

สำหรับการทำการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสนั้น ปัจจุบันการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์กำลังได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมยา เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค (Perugino *et al.*, 2004) ซึ่งวิธีการดั้งเดิมในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์คือใช้วิธีการทางเคมี ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องของความถูกต้องของ stereochemistry ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ จึงมีการพัฒนามาใช้ระบบของเอนไซม์ เพื่อเอาชนะข้อจำกัดนี้ โดยการใช้ระบบของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ผ่านปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยการจำกัดความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายออกไป ซึ่งจะเรียกเอนไซม์นี้ว่า ไกลโคซินเทส (glycosynthase) ซึ่งก็คือเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ทำการกลายพันธุ์ โดยการแทนที่กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile ด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีความสามารถเป็น nucleophile

ไกลโคซินเทสตัวแรกได้มาจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nucleophile ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จาก *Agrobacterium sp.* โดยการแทนที่กลูตามัทที่ตำแหน่ง 358 ด้วยอะลานีน (E358A) ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ได้สามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้มากถึง 90% (Mackenzie *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้ยังเกิดปฏิกิริยาได้ช้า ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวใหม่ขึ้น ซึ่งมีการแทนที่กลูตามัทที่ตำแหน่ง 358 ด้วยซีรีน (E358S) พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นถึง 24 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ E358A นอกจากนี้ E358S ยังสามารถใช้ *p*NP-N-acetylglucosamine เป็น acceptor ในการสังเคราะห์ *p*NP-N-acetylglucose ได้ แต่ใน E358A ไม่สามารถใช้ได้อีกด้วย (Mayer *et al.*, 2000) ต่อมาได้มีการทำ saturation mutagenesis พบว่า E358G มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสสูงกว่า E358S และ E358A 2 เท่า และ 50 เท่า ตามลำดับ เมื่อใช้ α -D-galactopyranosyl fluoride (GalF) และ *p*NP-glc เป็นตัวให้ และตัวรับ ตามลำดับ (Mayer *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium sp.* โดยการทำการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้ AbgE358G เป็นตัวเริ่มต้น พบว่าได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสสูงคือ 1D12 (A19T, E358G) และ 2F6 (A19T, E358G, Q248R, M407V) ในการทำการกลายพันธุ์รอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า k_{cat}/K_m ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสเป็น 1:7:27 ใน AbgE358G : 1D12 : 2F6 ตามลำดับ เมื่อใช้ β -D-galactopyranosyl fluoride และ 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside เป็นสับสเตรท และนอกจาก 2F6 จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสสูงแล้ว ยังสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้หลายชนิดอีกด้วย จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ 2F6 แสดงให้เห็นว่าการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A19T และ M407V ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการจับกับสับสเตรท แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของบริเวณเร่ง ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น สำหรับ Q248R นั้นยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดเนื่องจากตำแหน่งของกรดอะมิโนวางอยู่บนบริเวณผิวของโปรตีน (Kim *et al.*, 2004)

5. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris*

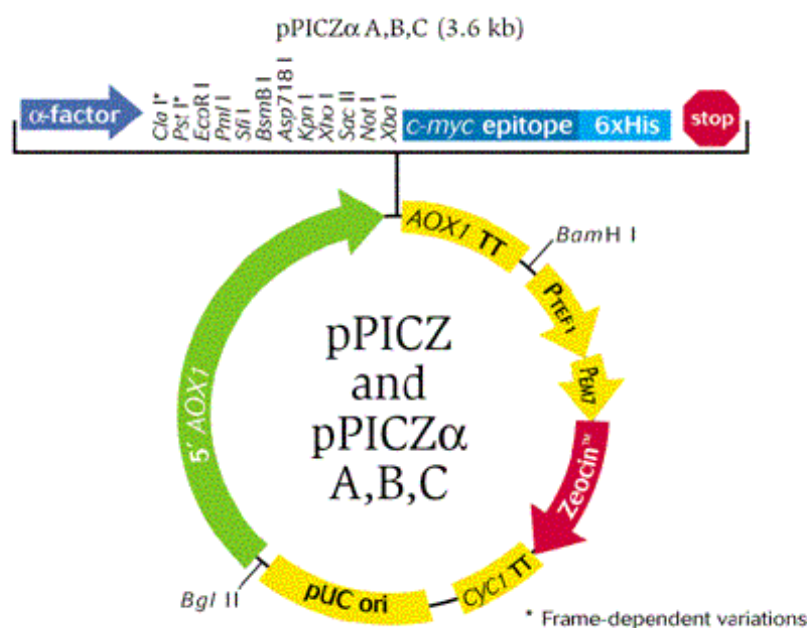
การผลิตโปรตีนส่วนใหญ่นิยมที่จะใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจาก *E. coli* เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดการได้ง่าย โตเร็ว อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมง่าย และราคาไม่แพง นอกจากนี้เรายังรู้แผนที่ยีนทั้งหมดของ *E. coli* แล้ว แต่อย่างไรก็ตาม *E. coli* เป็นโปรคาริโอต และไม่มีออร์แกเนลภายในเซลล์เช่น endoplasmic reticulum และ golgi apparatus ซึ่งพบในยูคาริโอต และเป็นออร์แกเนลที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงโปรตีน ดังนั้นจึงทำให้โปรตีนจากยูคาริโอต ที่ผลิตได้ใน *E. coli* นั้นไม่ทำหน้าที่ หรืออยู่ในรูปแบบที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขาดกระบวนการเติมน้ำตาล (glycosylation) หรือกระบวนการดัดแปลงหลังการถอดรหัส (post-translational modification) ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาสนใจยีสต์ เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีน (Cino, n.d.)

ในระยะเวลา 15 ปีที่ผ่านมายีสต์ *P. pastoris* ได้รับการพัฒนาจนกลายเป็นระบบที่ประสบความสำเร็จในการผลิตเฮเทอโรโลกัสโปรตีนที่หลากหลาย การได้รับความนิยมที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถอธิบายได้ด้วยปัจจัยหลายอย่าง แต่ปัจจัยที่เห็นเด่นชัดคือ (1) *P. pastoris* เป็นยูคาริโอตชั้นสูงที่มีกระบวนการดัดแปลงหลังการถอดรหัส เช่น กระบวนการเติมน้ำตาล การม้วนพับของโปรตีน และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ คล้ายกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Cereghino and Cregg, 2000) (2) เลี้ยงง่าย โตเร็ว อาหารเลี้ยงเชื้อราคาไม่แพง (Invitrogen, n.d.) และไม่มีปัญหา endotoxin เหมือนในแบคทีเรีย หรือปัญหาการปนเปื้อนจากไวรัสเหมือนในเซลล์สัตว์ (Cino, n.d.) (3) สามารถผลิตโปรตีนได้ในระดับสูงทั้งภายในเซลล์ หรือนอกเซลล์ และ (4) สามารถหาซื้อเป็นชุดเครื่องมือได้ในการค้า (Cereghino and Cregg, 2000)

P. pastoris เป็น methylotrophic yeast ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์โดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase, AOX) และในปฏิกิริยานี้จะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นด้วย เอนไซม์ AOX ถอดรหัสมาจากยีน *AOX1* และ *AOX2* ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์ AOX ในเซลล์จะถอดรหัสมาจากยีน *AOX1* เอนไซม์ AOX นี้จะอยู่ใน peroxisome ร่วมกับเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ซึ่งทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจนกับน้ำ ส่วนฟอร์มัลดีไฮด์จะออกจาก peroxisome และถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟอร์มิกกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) 2 ตัว ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมต่อไป ซึ่งกลไกนี้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญของ *P. pastoris* ที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับฟอร์มัลดีไฮด์ที่เหลืออยู่ใน peroxisome จะรวมกับ xylulose 5-monophosphate โดยเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase

(DHAS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดที่ 3 ที่อยู่ใน peroxisome ได้ผลิตกันขึ้นเป็น glyceraldehydes 3-phosphate และ dihydroxyacetone ซึ่งจะออกจาก peroxisome และนำกลับไปสร้างเป็น xylulose 5-monophosphate ใหม่ โดยจะพบเอนไซม์ AOX และ DHAS ในระดับสูงเมื่อเลี้ยงเซลล์ในเมทานอล แต่จะไม่ตรวจพบเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในเซลล์ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนตัวอื่นๆ เช่น กลูโคส กลีเซอรอล หรือเอทานอล สำหรับโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ alcohol oxidase คือ *AOXI* ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยเมทานอล (Cereghino and Cregg, 2000) ดังนั้นจึงมีการใช้โปรโมเตอร์ *AOXI* มาใช้ในการควบคุมการผลิต heterologous protein (Invitrogen, n.d.)

การแสดงออกของเฮเทอโรโลกัสโปรตีนใน *P. pastoris* ทำได้โดยการโคลนยีนที่สนใจเข้าสู่เวกเตอร์ และถ่ายโอนเวกเตอร์เข้าสู่จีโนมของ *P. pastoris* โดยการเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน จากนั้นตรวจสอบความสามารถของ *P. pastoris* ในการสร้างโปรตีน ปัจจุบันมีเวกเตอร์มากมายที่ใช้สำหรับการแสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* (Cereghino and Cregg, 2000) เช่น พลาสมิด pPICZαB (ภาพที่ 10) ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ *AOXI* ที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจ, α-factor secretion signal สำหรับการส่งโปรตีนออกนอกเซลล์, ยีนต้านยาปฏิชีวนะ zeocin, myc epitope เพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีนโดย Anti-myc antibody, polyhistidine tag เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์กับคอลัมน์ IMAC และ pUC origin สำหรับการจำลองตัวเองของพลาสมิดใน *E. coli* (Invitrogen, n.d.)



ภาพที่ 10 พลาสมิด pPICZ A,B,C and pPICZαA,B,C ประกอบด้วย จุดเริ่มต้นในกระบวนการจำลองตัว (pUC ori) โปรโมเตอร์ (AOX1) สัญญาณในการส่งออกนอกเซลล์ (α-factor) ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (multiple cloning site) ยีนของโปรตีน myc ซึ่งเป็นแอนติเจนสำหรับจับกับ anti myc antibody (c-myc-epitope) ฮิสติดีน 6 ตัว (6x His) และยีนต้านยาปฏิชีวนะ zeocin (Zeocin)

ที่มา: Invitrogen (n.d.)

6. ประโยชน์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสนอกจากจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่นการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย ซึ่งความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลายนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

6.1 ปฏิบัติการสลาย

6.1.1 ย่อยสลายเซลลูโลส

การสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส จะได้กลูโคสเพียงเล็กน้อย และได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเซลโลไบโอส (ซึ่งเป็นไดเมอร์ของกลูโคส) โดยเซลโลไบโอสจะเป็นตัวไปยับยั้งปฏิกิริยา และทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสช้าลง นักวิจัยพบว่า สามารถเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายเซลโลไบโอสให้ได้เป็นกลูโคส และเนื่องจากเซลโลไบโอสสามารถละลายน้ำได้ เพราะฉะนั้นจึงอาจใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในรูปแบบที่มีการตรึง ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ถูกตรึงจะเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นานหลายเดือน ทำให้สามารถใช้ย่อยสลายเซลโลไบโอสอย่างต่อเนื่องโดยไม่สูญเสียประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงอาจเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในการเตรียม commercial cellulase สำหรับการย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือใช้เปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ถูกตรึงไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้อีก เช่น ใช้ในการสังเคราะห์กลูโคไซด์ และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น (Esen, 1993)

6.1.2 ย่อยสลายกลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนในนมถั่วเหลือง

ไอโซฟลาโวนเป็นฮอร์โมนจากพืช ซึ่งมีโครงสร้าง และหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนในมนุษย์ และมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคภาวะหมดประจำเดือน และโรคกระดูกพรุน ไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองมีการศึกษามากที่สุดในบรรดาฮอร์โมนพืชทั้งหมด เนื่องจากมีการบริโภคถั่วเหลืองอย่างมาก กลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนที่พบมากในถั่วเหลืองคือ genistin และ daidzin จะถูกดูดซึมได้น้อยในลำไส้เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอะไกลโคนของมันซึ่งคือ genistein และ daidzein เนื่องจากกลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนมีขนาดใหญ่กว่า และมีความซับซ้อนมากกว่า นอกจากนี้กลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนยังมีกิจกรรมทางชีวภาพน้อยกว่าส่วนอะไกลโคน โดยกลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนจากพืชเหล่านี้จะถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ แต่กลไกการสลายยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นเพื่อเอาชนะข้อจำกัดนี้ จึงมีการศึกษาที่จะทำการย่อยกลูโคไซด์ไอโซฟลาโวนให้ได้เป็นไอโซฟลาโวนก่อนที่จะมีการบริโภค โดยใช้เอนไซม์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เป็นหัวเชื้อในการหมักนมถั่วเหลือง ซึ่งจะทำให้เราสามารถได้ประโยชน์จากไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองได้อย่างเต็มที่ (Pyo et al., 2005)

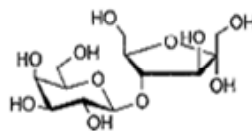
6.1.3 สร้างกลิ่นหอมในระหว่างกระบวนการผลิตไวน์

การผลิตไวน์เป็นกระบวนการทางจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับยีสต์ และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยนิยมใช้ *S. cerevisiae* ในกระบวนการผลิตไวน์ ความหอมของไวน์เป็นผลที่ได้มาจากการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารจากผลองุ่น ซึ่งสารเหล่านี้จะมีการผลิตขึ้นระหว่างการหมัก โดยสารเทอร์ปีน (terpene) เป็นหนึ่งในสารประกอบหลักขององุ่นซึ่งช่วยให้ไวน์มีกลิ่นหอม ซึ่งสารนี้จะอยู่ใน 2 รูปแบบคือ free volatile form และ nonvolatile sugar conjugated form โดย nonvolatile compound อาจจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทำให้มีการปลดปล่อย volatile terpene ออกมา การย่อยสลายระหว่างกระบวนการทำไวน์มีสาเหตุมาจากเอนไซม์จากผลองุ่น หรือจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระบวนการผลิต (Hernandez *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในผลองุ่น มีความเสถียรต่ำภายใต้สภาวะการผลิตไวน์ ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มกลิ่นหอมของไวน์จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย ซึ่งคาดว่าจะทำให้ไวน์ที่ผลิตได้มีความหอมเพิ่มมากขึ้น (Barbagallo *et al.*, 2004)

6.2 ปฏิกริยาย่อนการสลาย

6.2.1 สังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีบทบาทเป็นยา

นักวิจัยได้ใช้ปฏิกริยาย่อนการสลายของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีประโยชน์สำหรับใช้ในการวิจัยในด้านต่างๆ ทั้งทางการแพทย์ เกษษศาสตร์ ใช้ศึกษาพัฒนาเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโรค และการพัฒนาต่างๆ ซึ่งพบว่ามัลติแซคคาไรด์ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นยา เช่น แลคตูโลส (lactulose) ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ (ภาพที่ 11) ใช้เป็นยารักษาโรคท้องผูกเรื้อรัง โดยการย่อยสลายแลคตูโลสจะช่วยดึงน้ำเข้าไปยังลำไส้ทำให้มีการระบาย นอกจากนี้แลคตูโลสยังช่วยรักษาโรค Hepatic encephalopathy ได้อีกด้วย (Geert-Jan Boons, 1996)



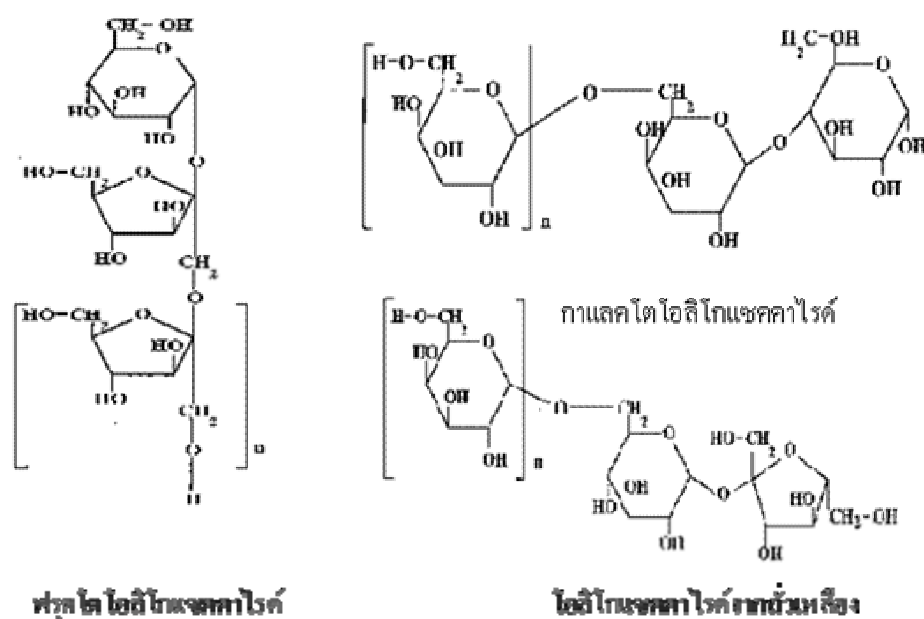
ภาพที่ 11 โครงสร้างของแลคทูโลส

ที่มา: Geert-Jan Boons (1996)

6.2.2 สักระยะโพลิโกแซคคาไรด์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

นักวิจัยได้ใช้ปฏิกิริยาย้อนการสลายของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในการสังเคราะห์โพลิโกแซคคาไรด์ เนื่องจากโพลิโกแซคคาไรด์เป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-10 โมเลกุล โดยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว 2 อย่างคือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ เช่น *Bifidobacteria* ซึ่งเป็น normal flora ที่มีอยู่ในลำไส้ใหญ่ และด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของโพลิโกแซคคาไรด์ทำให้มีการนำโพลิโกแซคคาไรด์มาใช้เป็นสารให้ความหวานที่ให้แคลอรีต่ำ โดยใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารต่างๆ เช่น ลูกก๊วย ถั่วกวาด กล้วยไฟซ์ และน้ำอัดลม (Tomomatsu, 1994) นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบของ prebiotic food (M.E. Bruins *et al*, 2003) โดยโพลิโกแซคคาไรด์ที่นิยมใช้คือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galactooligosaccharides) และ โพลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (soybean oligosaccharides) (ภาพที่ 12)

สำหรับประโยชน์โดยตรงของการบริโภคโพลิโกแซคคาไรด์ก็คือ ช่วยเพิ่มจำนวนของ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ซึ่งเป็น normal flora อยู่ในลำไส้ ส่วนประโยชน์ทางอ้อม ได้แก่ ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ช่วยลดอาการท้องผูก ช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย (Tomomatsu, 1994)

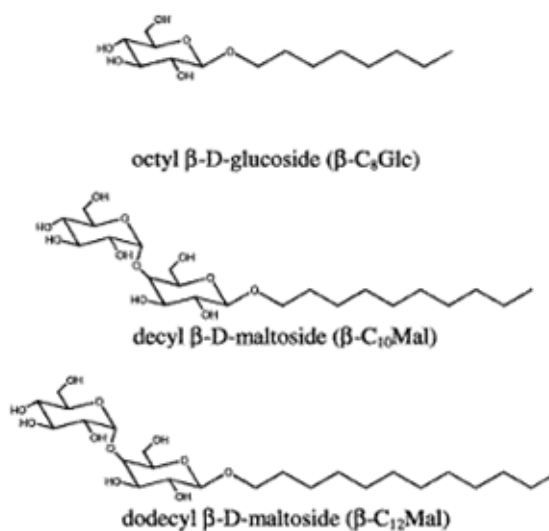


ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของโอลิโกแซคคาไรด์บางชนิด

ที่มา: Tomomatsu (1994)

6.3 ปฏิกริยาย้ายหมู่กลูโคส

นักวิจัยได้มีการใช้ปฏิกริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ (ใช้น้ำตาล เป็น acceptor) และอัลคิลกลูโคไซด์ (ใช้แอลกอฮอล์เป็น acceptor) เนื่องจากสารประกอบไกลโคไซด์มีลักษณะเป็น amphipathic molecule คือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่มีขั้ว และอะไมด์ที่ไม่มีขั้ว ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นจึงมีการใช้ไกลโคไซด์เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งไกลโคไซด์ธรรมชาติบางตัว เช่น saponin มีคุณสมบัติเป็นสารลดความตึงผิวธรรมชาติ แต่ไม่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้ใช้ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะใช้ไกลโคไซด์ที่สังเคราะห์ขึ้นเช่น อัลคิลกลูโคไซด์ (Lirdprapamongkol, 1999) จำพวก octyl β -D-glucoside, decyl β -D-glucoside และ dodecyl β -D-glucoside (ภาพที่ 13) เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภท non-ionic surfactants ชนิดใหม่ เนื่องจากมันสามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และมีการระคายเคืองต่อตา และผิวหนังน้อย (Lirdprapamongkol, 1999)



ภาพที่ 13 อัลคิลกลูโคไซด์ที่ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว

ที่มา: Wikipedia (2007)

สารลดแรงตึงผิวมีบทบาทสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ และใช้เป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายอย่าง เช่น ผงซักฟอก สบู่ น้ำยาปรับผ้านุ่ม ครีมนวดผม สี หมึก ยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าแมลง และอิมัลซิฟายเออร์

อุปกรณ์และวิธีการ

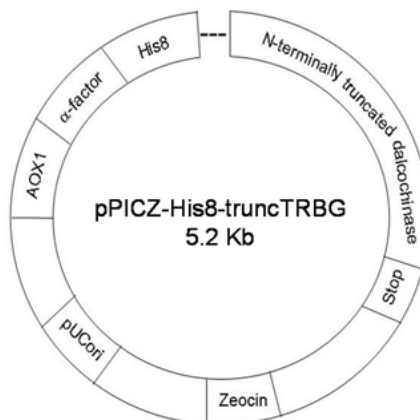
อุปกรณ์

1. เชื้อและพลาสมิด

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

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

1.3 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG เป็นพลาสมิด pPICZ α B ที่มียีนของเอนไซม์ คัลโคซิเนส (ลำดับกรดอะมิโนเริ่มที่ VPPFN) ต่อจากลำดับเบสของฮิสติดีน 8 ตัว ดังภาพที่ 14 ซึ่งมี อยู่ในห้องปฏิบัติการ (Toonkool *et al.*, 2006)



ภาพที่ 14 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG ประกอบด้วย จุดเริ่มต้นในกระบวนการจำลองตัว (pUCori) โปรโมเตอร์ (AOX1) สัญญาณในการส่งออกนอกเซลล์ (α -factor) ยีนของ ฮิสติดีน 8 ตัว (His8) ยีนของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่เริ่มต้นที่ลำดับกรดอะมิโน VPPFN (N-terminally truncated dalcocinase) และยีนต้านยาปฏิชีวนะ zeocin (Zeocin)

2. สารเคมีและเอนไซม์

- 2.1 คัลโคซินินกลูโคไซด์ (สกัดโดย นางสาวเพ็ญพร สุจิตนารัตน์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
- 2.2 คัลโคซินเนสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร
สวัสดิวัฒน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- 2.3 ลินามาริน (สกัดโดย นางนุสรา ทองทับทิม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
- 2.4 ลินามาเรสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยณูสร
สวัสดิวัฒน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- 2.5 2,2'-Azonobis-3-Ethylbenz-Thiazolinesulfonic Acid (ABTS) (Roche, USA)
- 2.6 Acrylamide (Bio Basic, Canada)
- 2.7 Bis-acrylamide (Bio Basic, Canada)
- 2.8 Agarose (Research organics, USA)
- 2.9 Amicon Ultra Centrifugal Filter (Millipore, USA)
- 2.10 Ammonium Sulphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.11 *iso*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.12 *n*-Butanol (Lab-Scan, Thailand)
- 2.13 *sec*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.14 *tert*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.15 Coomassie Plus Protein Assay Kit (Pierce, USA)
- 2.16 ECL plus Western blotting Detection System (Amersham, Sweden)
- 2.17 Ethanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.18 Ethyl acetate (Carlo ERBA, Italy)
- 2.19 Glucose oxidase kit (Sigma, USA)
- 2.20 Imidazole (ICN Biomedicals, Germany)
- 2.21 Methanol (Lab-Scan, Thailand)
- 2.22 alpha-D-Methylglucoside (ACROS organics, USA)
- 2.23 Mouse monoclonal antibody against natural dalcochinase (ห้องปฏิบัติการ รศ.ดร.
วัชร กสิณฤกษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- 2.24 Ni-NTA Superflow (Qiagen, Germany)
- 2.25 NucleoSpin[®] Plasmid kit (Macherey-Nagel, Germany)

- 2.26 *para*-Nitrophenol (*p*NP) (Sigma, USA)
- 2.27 *para*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) (Sigma, USA)
- 2.28 PCR clean-up Gel extraction Nucleospin[®] Extrac II (Machery-Nagel, Germany)
- 2.29 pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA)
- 2.30 Phenyl-Sepharose CL-4B (Amersham, Sweden)
- 2.31 *iso*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.32 *n*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.33 QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)
- 2.34 Rabbit Anti-Mouse Immunoglobins/HRP (Dako Cytomation, Denmark)
- 2.35 *Sac*I (Fermentas, USA)
- 2.36 Sodium acetate (Merck, Germany)
- 2.37 Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.38 Silica gel 60 F254 aluminium Sheets (Merck, Germany)
- 2.39 Zeocin (Invitrogen, USA)

หมายเหตุ สารเคมีทุกการายเป็น analytical grade

วิธีการ

1. การสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

1.1 การหาตำแหน่งบนเอนไซม์คัลโคซิเนสเพื่อทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

สร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการจับกับหมู่อะไกลโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส เป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามารส ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามารส และเลือกตำแหน่งที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีกรดอะมิโนที่ต่างกัน และเป็นตำแหน่งที่มีแขนงข้างชี้เข้าไปในบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วย โดยดูจากโครงสร้างสามมิติของแบบจำลองคัลโคซิเนส และในการทดลองนี้จะทำการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่ง คือ กรดอะมิโนไอโซลิวซีนในตำแหน่ง 185 ของเอนไซม์คัลโคซิเนส จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนของเอนไซม์ลินามารส (I185A) กรด

อะมิโนวาลีนในตำแหน่ง 255 ของเอนไซม์ดัล โคซิเนส จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน ฟีนีลอะลานีนของเอนไซม์ลีนามาเรส (V255F) กรดอะมิโนไกลซีนในตำแหน่ง 367 ของเอนไซม์ดัล โคซิเนส จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนซีรีนของเอนไซม์ลีนามาเรส (G367S) และกรดอะมิโนกลูตามีนในตำแหน่ง 455 ของเอนไซม์ดัล โคซิเนส จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนไอโซลิวซีนของเอนไซม์ลีนามาเรส (E455I)

1.2 ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

ทำการออกแบบไพรเมอร์ของดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว โดยมีหลักการ ดังนี้

- ไพรเมอร์ทั้ง 2 สาย ต้องมีตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ต้องการ และจับกับสายต้นแบบที่ตำแหน่งเดียวกัน ของสายที่อยู่ตรงข้ามกัน
- ไพรเมอร์ควรมีความยาวระหว่าง 12 ถึง 45 เบส และมี melting temperature (Tm)

มากกว่าหรือเท่ากับ 78 องศาเซลเซียส โดยคำนวณจากสูตร

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

N คือ ความยาวของไพรเมอร์

- ตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ควรอยู่ตรงกลางของสายไพรเมอร์
- ไพรเมอร์ควรมี %GC อย่างน้อย 40% และที่ปลายของไพรเมอร์ควรเป็นเบส cytosine (C) หรือ guanine (G) 1 ตัว หรือมากกว่า 1 ตัว

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในตารางที่ 1 เมื่อออกแบบไพรเมอร์ได้แล้วทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (ปริมาณ 50 ng)	2	μl
ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ (25 ng/μl)	5	μl
รีเวิร์สไพรเมอร์ (25 ng/μl)	5	μl
2 mM dNTP mix	1	μl
10x บัฟเฟอร์	5	μl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว	31	μl
PfuUltra HF DNA polymerase (2.5U/μl)	1	μl
ปริมาตรรวม	50	μl

มีสภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ

95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	} 16 รอบ
95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
55	องศาเซลเซียส	1	นาທີ	
68	องศาเซลเซียส	5.50	นาທີ	

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ดีเอ็นเอ	ชื่อไพรเมอร์	%GC	ลำดับนิวคลีโอไทด์
กลายพันธุ์			
I185A	<u>DearI185Afor</u>	48	5'GGA TTA CAC TAA ATG AGC CAT CAG CTT TCA CCG CGA ATG GGT ATG C3'
	<u>DearI185Arev</u>	48	5'GCA TAC CCA TTC GCG GTG AAA GCT GAT GGC TCA TTT AGT GTA ATC C3'
V255F	<u>DearV255Ffor</u>	47	5'GGC ATT TCC TTG CAC GTA TTT TGG GTT ATA CCG C3'
	<u>DearV255Frev</u>	47	5'GCG GTA TAA CCC AAA ATA CGT GCA AGG AAA TGC C3'
G367S	<u>DearG367Sfor</u>	48	5'GGT CCA GTG ACT CCC TCA TCT TGG ATG TGC ATT TAT CCA AAA GG3'
	<u>DearG367Srev</u>	48	5'CCT TTT GGA TAA ATG CAC ATC CAA GAT GAG GGA GTC ACT GGA CC 3'
E455I	<u>DearE455Ifor</u>	39	5'CAT TGT TGG ACA ACT TTG AAT GGG CTA TTG GTT ATA CAT CAC GAT TTG G3'
	<u>DearE455Irev</u>	39	5'CCA AAT CGT GAT GTA TAA CCA ATA GCC CAT TCA AAG TTG TCC AAC AAT G3'

หมายเหตุ ตัวอักษรสีชมพู คือ ตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์

หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบผล โดยการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1% (ภาคผนวก ก ข้อ 1) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* (10 U/ μ l) ปริมาตร 1 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยสายดีเอ็นเอต้นแบบ

1.3 การโคลนตัดโคจีนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E. coli* (DH5 α)

เมื่อได้พลาสมิดตัดโคจีนสกลายพันธุ์แล้ว ทำการถ่ายโอนเข้าสู่ competent *E. coli* (DH5 α) โดยวิธี electroporation (ภาคผนวก ก ข้อ 2) เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB pH 7.5 (1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl, 1.5%(w/v) agar) ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เมื่อได้โคโลนีแล้วคัดเลือกโคโลนี ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยการสกัดพลาสมิด (ภาคผนวก ก ข้อ 4) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จากนั้นตรวจสอบผล โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1% (ภาคผนวก ก ข้อ 1)

เมื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้ว นำโคโลนีที่ถูกต้องมาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Plasmid kit จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้เอนไซม์ตัดโคจีนสกลายพันธุ์ที่ถูกต้องตามที่เรากำลังต้องการ

1.4 การโคลนตัดโคจีนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P. pastoris* (GS115)

นำโคโลนีของเอนไซม์ตัดโคจีนสกลายพันธุ์ในเชื้อ *E. coli* จากข้อ 1.3 มาสกัด พลาสมิด (ภาคผนวก ก ข้อ 4) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอล (ภาคผนวก ก ข้อ 5) และเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณ 5 μ g ปริมาตร 10 μ l จากนั้นถ่ายโอนดีเอ็นเอ ที่ได้เข้าสู่ competent *P. pastoris* (GS115) ด้วยวิธี electroporation (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

2. การผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

2.1 การคัดเลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมาก

เมื่อได้โคโลนีของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ใน *P. pastoris* แล้ว นำมาเลี้ยงในอาหาร BMGH (100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(v/v) glycerol) ที่มี 4×10^{-5} %(w/v) biotin และ 4×10^{-3} %(w/v) histidine เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180-200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH (100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34%(w/v) yeast nitrogen base, 0.5%(v/v) methanol, 0.5%(w/v) casamino) ที่มี 4×10^{-5} %(w/v) biotin และ 4×10^{-3} %(w/v) histidine โดยให้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 10 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180-200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน แล้วเติม 100% methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.5%(v/v) ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงไปประมาณ 4-6 วัน แล้วนำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (ข้อ 5.1) และเลือกโคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในระบบ Shake flask ต่อไป

2.2 การผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในระบบ Shake flask

ในการเลี้ยงเซลล์แบบ Shake flask นำโคโลนีมา 1 โคโลนีเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 20 ml ที่มี 4×10^{-5} %(w/v) biotin และ 4×10^{-3} %(w/v) histidine เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180-200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มา 20 ml เลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 130 ml ที่มี 4×10^{-5} %(w/v) biotin และ 4×10^{-3} %(w/v) histidine เลี้ยงเหมือนกับสภาวะแรกนานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งเอาเฉพาะเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH ปริมาตร 150 ml ที่มี 4×10^{-5} %(w/v) biotin และ 4×10^{-3} %(w/v) histidine โดยให้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 10 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180-200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน แล้วเติม 100% methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยให้อาหารมีความเข้มข้นของ 0.5%(v/v) methanol เลี้ยงไปประมาณ 10-15 วัน วัดกิจกรรมเอนไซม์ในอาหารที่เลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน (ข้อ 5.1) จนกระทั่งกิจกรรมไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่

ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้เพื่อแยกเอนไซม์ คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ต่อไป (ข้อ 3)

3. การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์มาผ่าน ultrafiltration membrane ที่มี molecular weight cut off เท่ากับ 30 กิโลดาลตัน เพื่อลดปริมาตร จากนั้นเติม ammonium sulfate ให้ได้ความเข้มข้น 1 M นำไปผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate pH 7 ที่มี 1 M ammonium sulfate และชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate pH 7 วัดกิจกรรมเอนไซม์ (ข้อ 5.1) ทุก fraction และเก็บ fraction ที่มีกิจกรรม

นำ fraction ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose มาทำไดอะไลซิส (dialysis) กับ 10 mM sodium phosphate pH 8 เพื่อกำจัด ammonium sulfate และปรับ pH ให้ได้ 8 จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA โปรตีนชนิดอื่นจะไม่จับกับนิเกิลไออน และจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ แต่โปรตีนที่เราต้องการจะมี polyhistidine tag และจับกับนิเกิลไออนทำให้ติดอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer (50 mM Sodium phosphate, pH 8, 300 mM NaCl) แล้วชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (50 mM Sodium phosphate, pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) เก็บ fraction ไว้ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์

นำ fraction ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Ni-NTA มาผ่าน Amicon ultrafiltration ที่มี molecular weight cut off 30 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัด imidazole ออก และละลายเอนไซม์ คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้ด้วย 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ปริมาตร 1 ml นำเอนไซม์ คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้ในแต่ละขั้นของการทำบริสุทธิ์ มาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่าปริมาณโปรตีน (mg/ml) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (ภาพผนวกที่ ข1)

4. การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้

นำเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยการวิเคราะห์ อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate-Polycrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (ภาคผนวก ก ข้อ 6) การวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีเนชเชอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Non-denaturing-Polycrylamide Gel Electrophoresis, Non-denaturing PAGE) โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ดัลโคซิเนส 0.2 unit แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucose (4-MU-Glc) แล้วตรวจสอบการเรืองแสงของแถบเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีกิจกรรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก ก ข้อ 7) และการทำเวสเทิร์นอิมมูโนวิเคราะห์ (Western blot) โดยใช้ mouse monoclonal antibody against natural dalcochinase เป็น primary antibody และใช้ horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal antibody against mouse immunoglobulins เป็น secondary antibody (ภาคผนวก ก ข้อ 8)

5. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

5.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อกับสับสเตรท *p*NP-Glc ทำได้โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปริมาตร 250 μ l เติมสับสเตรทให้ได้ความเข้มข้น 1 mM และเติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร สำหรับในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาพผนวกที่ ข2)

5.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ปริมาตรต่างๆ ร่วมกับ 15 mM *p*NP-Glc ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาพผนวกที่ ข3)

5.3 การศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat})

นำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมา 0.1 unit ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท 3 ชนิด (0-15 mM คัลโคจีนินกลูโคไซด์ 0-7 mM ลินามาริน และ 0-45 mM *p*NP-Glc) เติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มนาน 5 นาที และทำให้เย็นทันที จากนั้นเติม 2 mg/ml ABTS ปริมาตร 50 μ l และ glucose oxidase kit (5 unit/ml) ปริมาตร 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน กลูโคส (ภาพผนวกที่ ข4) และใช้โปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software) ในการหาค่าจลนพลศาสตร์โดยคำนวณจากสมการของ Michaelis-Menten

$$V = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

5.4 การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

ใช้เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.1 unit ทำปฏิกิริยากับ 0.9 M short chain alkyl alcohols (C_1 - C_4) ชนิดต่างๆ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol) เพื่อเป็น glucosyl acceptor และใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็น glucosyl donor ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 100 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มนาน 5 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

การวิเคราะห์ TLC จะนำตัวอย่างมา 8 μ l หยดบนแผ่น Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium แล้วนำไปแช่ในสารละลาย A (ethyl acetate/methanol/water 16:6:1) ให้สารละลาย A วิ่งผ่านแผ่น TLC ประมาณ 4.25 เซนติเมตร ทำ 2 รอบ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย P (2-propanol/ethanol/water 5:1:2) และให้สารละลาย P วิ่งผ่านแผ่น TLC ประมาณ 1.75 เซนติเมตร ทำ 2 รอบ จากนั้นนำแผ่น silica ไปจุ่มใน 20% (v/v) sulfuric acid ใน ethanol แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 125

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ standard marker จะประกอบด้วยกลูโคส *p*NP-Glc และ เมทิลกลูโคไซด์ ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol แล้วนำไปวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ ที่ได้ด้วยเครื่อง GS-800 imaging densitometer (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม Quantity One[®]

ผลและวิจารณ์

1. การสร้างเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

1.1 การหาตำแหน่งบนเอนไซม์ดัลโคซิเนสเพื่อทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการจับกับหมู่อะไกลโคนของเอนไซม์ดัลโคซิเนส เป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งคาดว่าจะถ้าทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่สำคัญเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้ น่าจะมีคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ลินามาเรส คือสามารถสลายลินามาริน ซึ่งคือสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรสได้ และน่าจะทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้นอีกด้วย

การหาตำแหน่งเพื่อทำการกลายพันธุ์ ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรส ดังภาพที่ 15 และเลือกตำแหน่งที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีกรดอะมิโนที่ต่างกัน และเป็นตำแหน่งที่มีแขนงข้างชี้เข้าไปในบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วย โดยดูจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของดัลโคซิเนส ดังภาพที่ 16 และในการทดลองนี้จะทำการสร้างเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิดคือ

1. เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A เป็นการแทนที่กรดอะมิโนไอโซลิวซีนในตำแหน่ง 185 ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนอะลานีนของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งทั้งกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (ภาพที่ 17ก) และอะลานีน (ภาพที่ 17ข) เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้วเหมือนกัน แต่กรดอะมิโนอะลานีนมีแขนงข้างที่สั้นกว่า ซึ่งอาจจะทำให้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A สามารถจับกับสับสเตรทที่มีหมู่อะไกลโคนขนาดใหญ่ อย่างเช่น หมู่อะไกลโคนของดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น และน่าจะเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิและตติยภูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติอีกด้วย

2. เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F เป็นการแทนที่กรดอะมิโนวาเลีนในตำแหน่ง 255 ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนของเอนไซม์ลินามาเรส เนื่องจากกรดอะมิโนวาเลีน (ภาพที่ 17ค) และฟีนิลอะลานีน (ภาพที่ 17ง) เป็นกรดอะมิโนประเภท

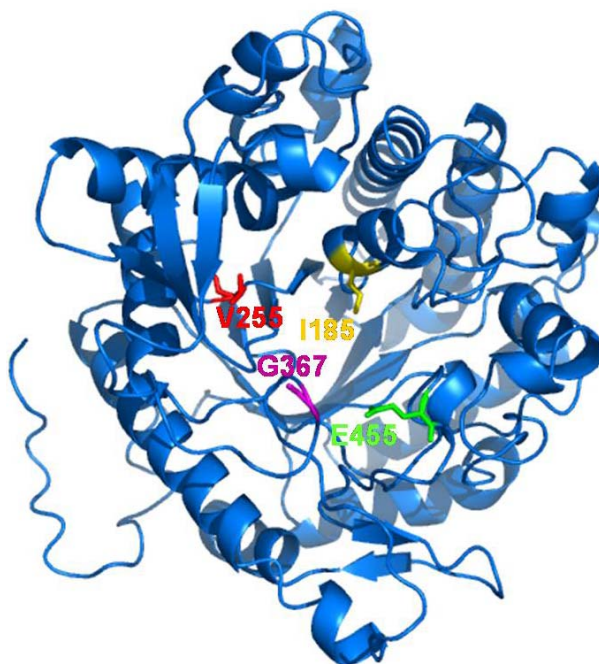
ไม่มีขั้วเหมือนกัน แต่ฟีนอละลานีนมีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าแขนงข้างของวาเลอีนซึ่งเป็นประเภทอะลิฟาติก ซึ่งน่าจะทำให้แขนงข้างของฟีนอละลานีนเข้าถึงสับสเตรทที่มีหมู่อะไกลโคโคนขนาดเล็ก อย่างเช่น หมู่อะไกลโคโคนของลินามาริน และ *pNP-glc* ได้ดีขึ้น ดังนั้น เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F น่าจะเร่งปฏิกิริยาการสลายลินามาริน และ *pNP-glc* และเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีกว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ

3. เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S เป็นการแทนที่กรดอะมิโนไกลซีนในตำแหน่ง 367 ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนซีรีนของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งกรดอะมิโนไกลซีน (ภาพที่ 17จ) เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว ขณะที่กรดอะมิโนซีรีน (ภาพที่ 17ฉ) เป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้ว และมีแขนงข้างยาวกว่ากรดอะมิโนไกลซีนเล็กน้อย น่าจะทำให้แขนงข้างของซีรีนเข้าถึงสับสเตรทได้ดีขึ้น จึงคาดว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S น่าจะเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท และเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีกว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ

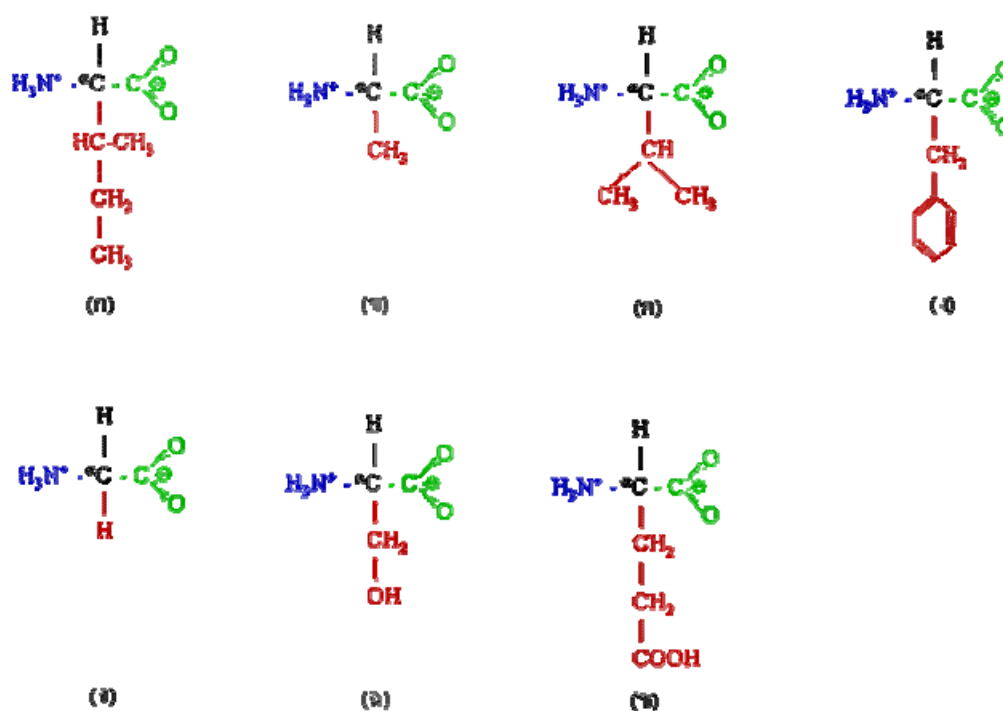
4. เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I เป็นการแทนที่กรดอะมิโนกลูตาเมตในตำแหน่ง 455 ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนไอโซลิวซีนของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งกรดอะมิโนกลูตาเมต (ภาพที่ 17ข) เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุลบ ขณะที่กรดอะมิโนไอโซลิวซีน (ภาพที่ 17ก) เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความเป็น hydrophobic ให้กับสภาพแวดล้อมในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคโคน จึงน่าจะทำให้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I สามารถจับกับหมู่อะไกลโคโคนของสับสเตรทที่เป็น hydrophobic เหมือนกัน เช่น หมู่อะไกลโคโคนของดัลโคซินินกลูโคไซด์ ลินามาริน และ *pNP-Glc* รวมถึงการจับกับแอลกอฮอล์ได้ดีขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I น่าจะเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทที่มีหมู่อะไกลโคโคนเป็นชนิดไม่มีขั้ว และเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีกว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ

	182	190	200	210	220	230
TRBG	177WITLNEP3	IFTANGYATGH	APGRCSPTNPTCTCGDAGTETVLVAMHLILSHAAATVQVY			
CVLM	193WITLNEP3	YVGFANDDGVF	APGRCSPTNPTCTCGDAGTETVLVAMHLILSHAAATVQVY			
	240	250	260	270	280	290
TRBG	237SRKYQGHQNGTIGISLW	WVIFLSTSTSDQMATQRYL	DFTCGPHDPLTAGRYFDSNQY			
CVLM	253SRKYQGTQDGEIGITLFT	WTEPLSDSKVDVQAANTALDFHFGLEHDPHTYGRYPRTWVD				
	360	370	380	390	396	400
TRBG	355BNGVFIGPVTP3	WNCIYFQGLRQLLLYFEKYNPLVYITENGIDEKNDAS-LSLEES				
CVLM	372LQGNLIGPQAYS	WVYIFPQGIKFLNYTKDTYNDPVIYVTENGVDWYHNS-QPIEEA				
	420	430	440	450		
TRBG	413LIDTYRIDSYRHLFVRYAIR	SGANWKGFFAUSLLDNFEUA	GYTSRFGLYFVNYTC			
CVLM	430LQDDFRISYYEKHDMHALGSLKNYGVKLEGYFANSTLDNFEUA	GYTSRFGLYVDYNNH				

ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัดโคซินกับเอนไซม์ลินามาเรส
 TRBG = เอนไซม์คัดโคซิน CVLM = เอนไซม์ลินามาเรส ตัวอักษรสีชมพู =
 ตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ จดเส้นใต้ = ตำแหน่งอนุรักษ์อย่างมากในไกลซิล
 ไฮโดรเลส แฟมิลี 1



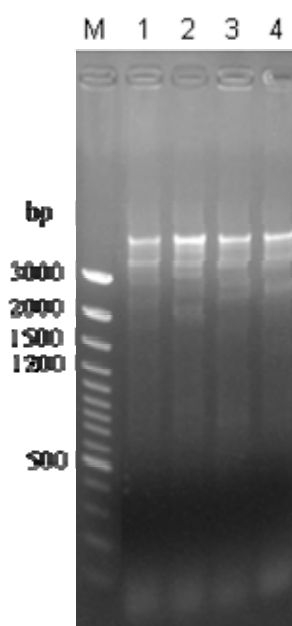
ภาพที่ 16 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของคัดโคซินที่แสดงให้เห็นตำแหน่งของ I185 (สีเหลือง), V255 (สีแดง), G367 (สีชมพู) และ E455 (สีเขียว)



ภาพที่ 17 โครงสร้างกรดอะมิโน (ก) ไอลิวซีน (ข) อะลานีน (ค) วาลีน (ง) ฟีนีลอะลานีน (จ) กลูตามีน (ฉ) ซีรีน (ช) ทรีโอนีน

1.2 การทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (Site-directed mutagenesis)

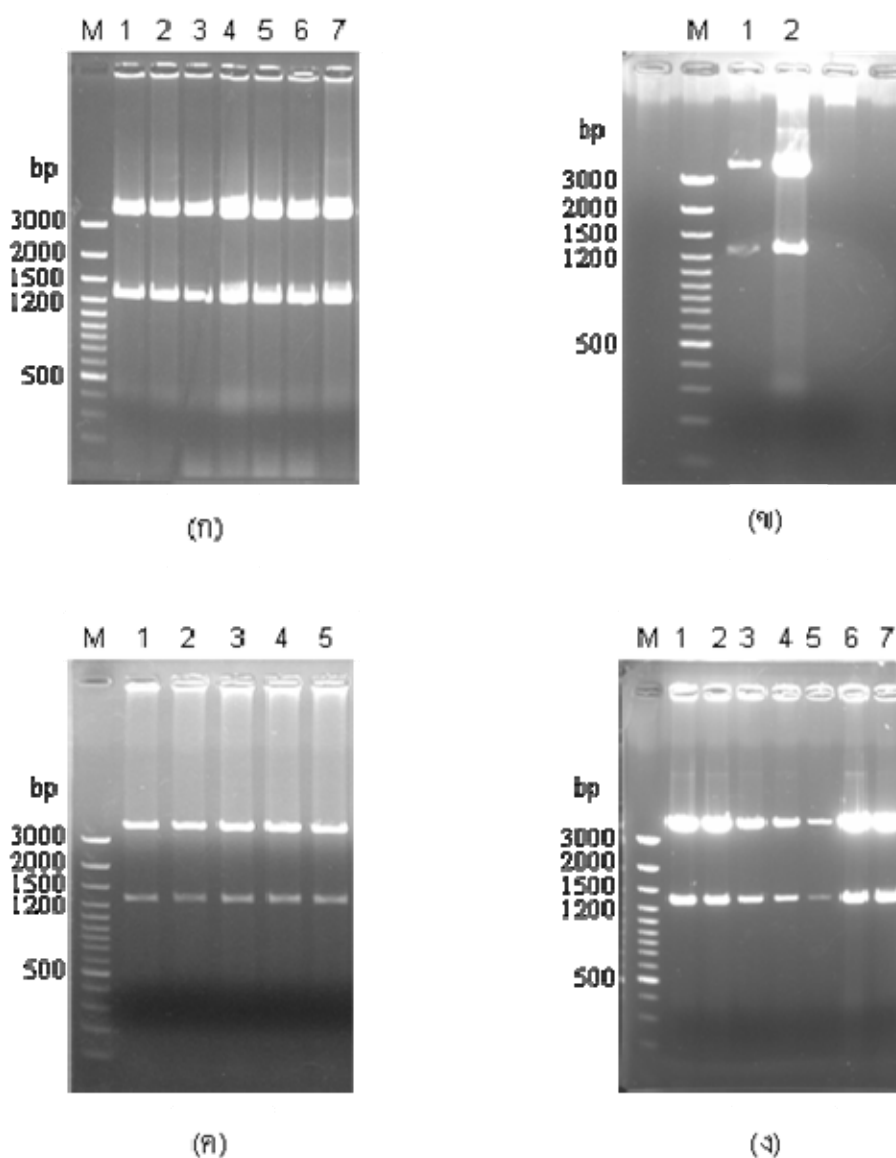
เมื่อออกแบบไพรเมอร์ของเอนไซม์ตัดโคจีนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดได้แล้ว ดังวิธีการทดลองข้อ 1.2 ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit และตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟเรซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1% เปรียบเทียบกับ DNA standard ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 18 พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 3 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าจะเป็นแถบดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดโคจีนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด คือ I185A, V255F, G367S และ E455I ซึ่งจากผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟเรซิสนี้ ไม่สามารถระบุขนาดของแถบดีเอ็นเอได้แน่ชัด เนื่องจากดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้มีขนาดไม่เหมาะสม ดังนั้นควรเลือกใช้ DNA standard ที่มีขนาดเหมาะสมมากกว่านี้ เช่น ดีเอ็นเอของฟาจแลมดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*



ภาพที่ 18 ผลการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (1 = คัดโคชินะสกลายพันธุ์ I185A 2 = คัดโคชินะสกลายพันธุ์ V255F 3 = คัดโคชินะสกลายพันธุ์ G367S 4 = คัดโคชินะสกลายพันธุ์ E455I M = DNA standard)

1.3 การโคลนเอนไซม์คัดโคชินะสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) และ *P. pastoris* (GS115)

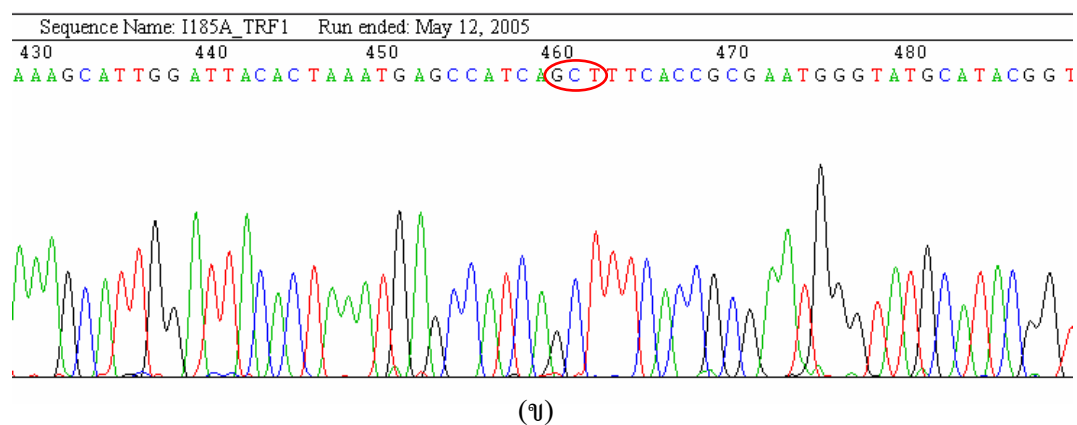
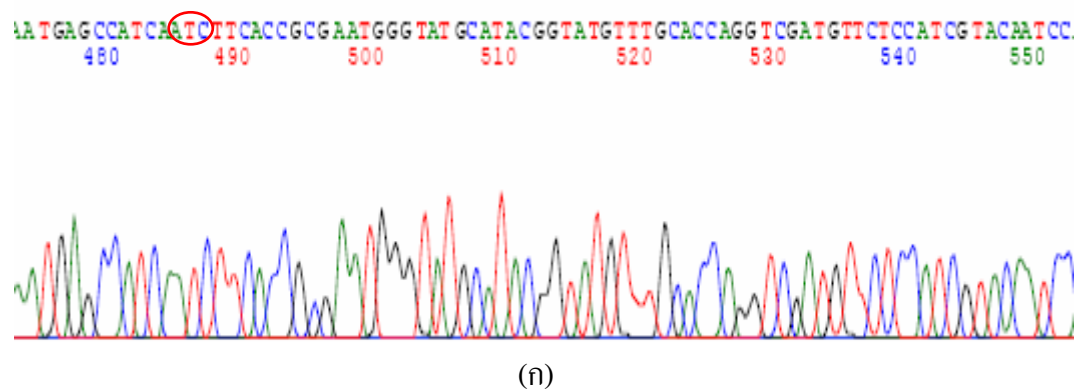
เมื่อทำการถ่ายโอนพลาสมิด ที่คาดว่าจะจะเป็นเอนไซม์คัดโคชินะสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เข้าสู่ competent *E. coli* (DH5 α) โดยวิธี electroporation แล้ว พบว่าได้โคลนจำนวน 7, 2, 5 และ 7 โคลน สำหรับเอนไซม์คัดโคชินะสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ เมื่อได้โคลนแล้วคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยการสกัดพลาสมิดจากโคลนของเอนไซม์คัดโคชินะสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จากนั้นตรวจสอบผล โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1% เปรียบเทียบกับ DNA standard ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 19 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 3.8 กิโลเบส และ 1.4 กิโลเบส ตามที่คาดไว้ในทุกๆ โคลนของเอนไซม์คัดโคชินะสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I แสดงว่าโคลนที่ได้เป็นโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดทั้งหมด



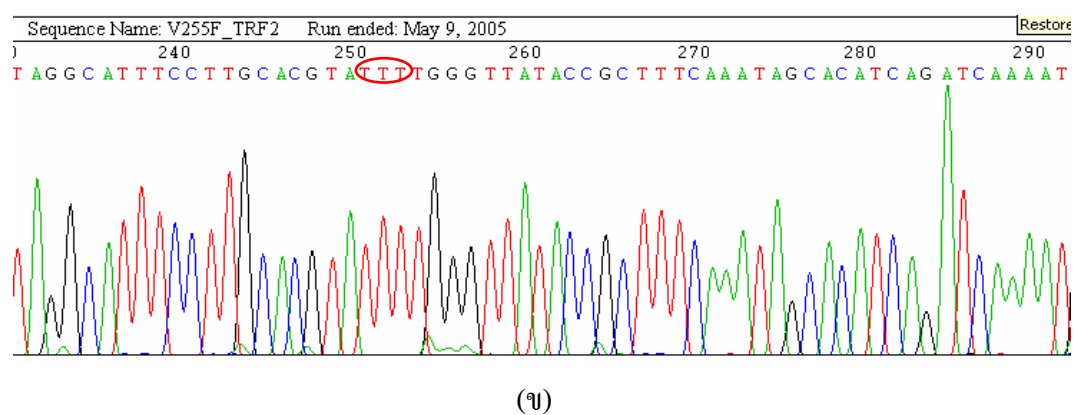
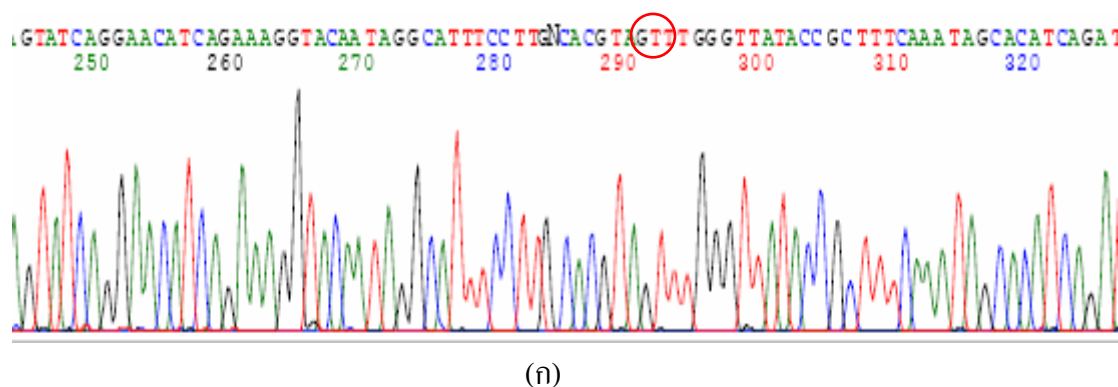
ภาพที่ 19 ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่าจะจะเป็นเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ก) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A (ข) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F (ค) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S (ง) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I หมายเลขบนรูป = หมายเลขโคโลนีของพลาสมิดที่สกัดได้ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* M = DNA standard

จากนั้นเลือกโคโลนีจากเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์แต่ละชนิดมา 1 โคโลนี คือโคโลนีที่ 7, 1, 5 และ 1 สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (NucleoSpin[®] Plasmid kit) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบให้แน่ใจว่าเอนไซม์คัลโคซิเนส

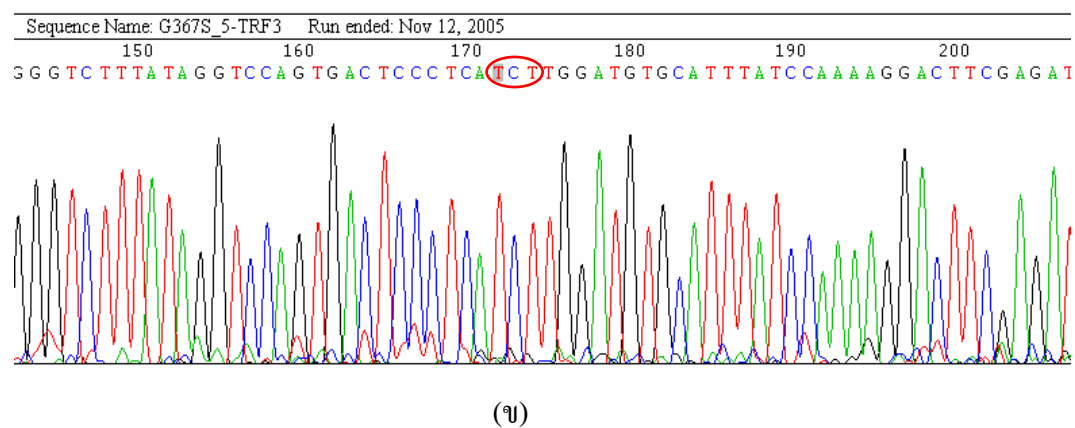
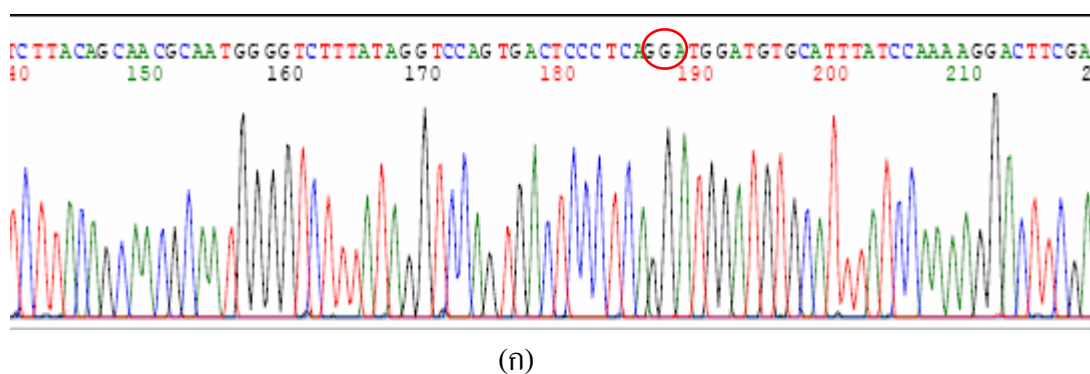
กลายพันธุ์ที่ได้มีตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงดังภาพที่ 20-23 และแสดงผลอย่างละเอียดในภาคผนวก ค-ฉ จากผลการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดคัลโคซิเนสกลายพันธุ์แต่ละชนิด พบว่าประสบความสำเร็จในการสร้าง เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นได้จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการ เปลี่ยนแปลงไปอย่างถูกต้อง ในตำแหน่งที่ต้องการ คือ เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A มีการ เปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ATC (โคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน) ไปเป็น GCT (โคดอน ของกรดอะมิโนอะลานีน) (ภาพที่ 20) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F มีการเปลี่ยนลำดับ นิวคลีโอไทด์จาก GTT (โคดอนของกรดอะมิโนวาเลีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโน ฟีนีลอะลานีน) (ภาพที่ 21) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GGA (โคดอนของกรดอะมิโนไกลซีน) ไปเป็น TCT (โคดอนของกรดอะมิโนซีรีน) (ภาพที่ 22) เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GAG (โคดอนของ กรดอะมิโนกลูตาเมต) ไปเป็น ATT (โคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน) แต่เนื่องจากผลการหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ใช้รีเวิร์สไพรมเมอร์ ดังนั้นผลที่ได้จึงแสดงออกมาเป็น AAT (ภาพที่ 23)



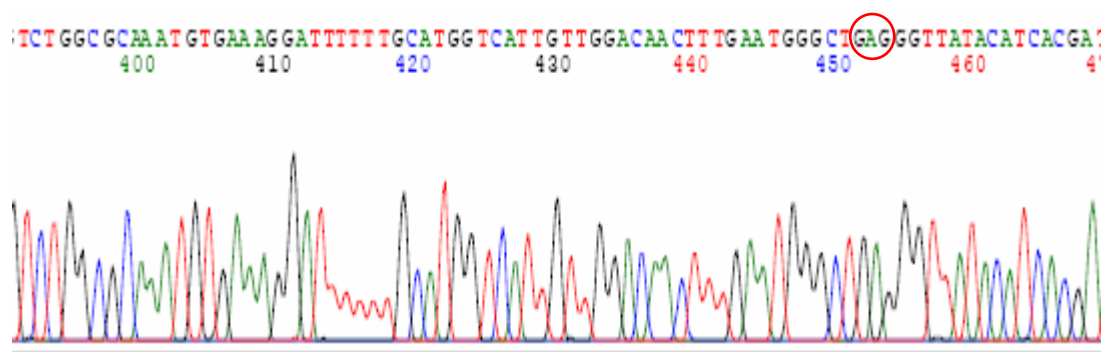
ภาพที่ 20 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (ก) ยีนดัลโคซิเนสดั้งเดิม และ (ข) เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ลำดับนิวคลีโอไทด์ ATC ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน เปลี่ยนเป็น GCT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนอะลานีน วงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์



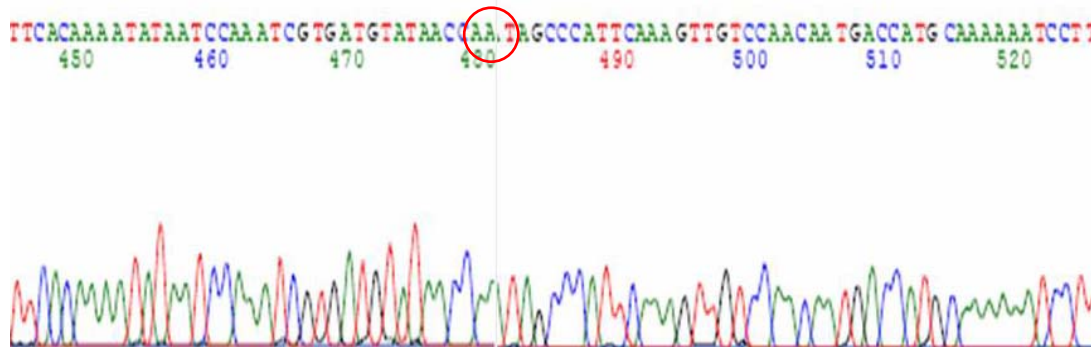
ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (ก) ยีนดัลโคซิเนสดั้งเดิม และ (ข) เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ลำดับนิวคลีโอไทด์ GTT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโน วาลีน เปลี่ยนเป็น TTT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน วงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (ก) ยีนดัลโคซิเนสดั้งเดิม และ (ข) เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ลำดับนิวคลีโอไทด์ GGA ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนไกลซีน เปลี่ยนเป็น TCT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนซีรีน วงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 23 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (ก) ยีนอัลโลอินสตังเค็ม และ (ข) เอนไซม์ อัลโลอินสกลายพันธุ์ E455I ลำดับนิวคลีโอไทด์ GAG ซึ่งเป็นโคดอนของ กรดอะมิโนกลูตาเมต เปลี่ยนเป็น ATT ซึ่งเป็นโคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (แต่เนื่องจากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ใช้เวิร์กโฟรเมอร์ ดังนั้นผลที่ได้จึงแสดง ออกมาเป็น AAT) วงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์

เมื่อนำโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดที่ได้ มาสกัด พลาสมิด และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง แล้วถ่ายโอนดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่ competent *P. pastoris* (GS115) ด้วยวิธี electroporation พบว่าได้โคลนจำนวน 8, 14, 6 และ 20 โคลน สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ

2. การผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

เมื่อได้โคลนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดแล้ว นำโคลนที่ได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร BMGH นานข้ามคืน และเลี้ยงในอาหาร BMMH ที่มี 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง นาน 6 วัน แล้วนำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังวิธีการทดลองข้อ 5.1 ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2-5 และเลือกโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์แต่ละชนิด ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในระบบ shake flask ต่อไป โดยเลือกโคลนที่ 1, 13, 5 และ 13 สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A

โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
1	0.388
2	0.182
3	0.116
4	0.239
5	0.162
6	0.139
7	0.216
8	0.181

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F

โคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
1	0.967
2	1.279
3	1.559
4	1.333
5	1.263
6	0.016
7	0.071
8	1.642
9	0.560
10	0.317
11	0.752
12	1.123
13	1.661
14	0.615

ตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S

โคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
1	0.337
2	0.246
3	0.132
4	0.123
5	0.743
6	0.689

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคจีนในสกลายพันธุ์ E455I

โคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
1	0.373
2	0.759
3	0.907
4	0.466
5	0.888
6	0.746
7	0.868
8	0.946
9	0.821
10	0.564
11	0.526
12	0.702
13	1.012
14	0.608
15	0.852
16	0.618
17	0.701
18	0.601
19	0.617
20	0.745

3. การแยกเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์

นำโคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงที่สุดของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์แต่ละชนิด ได้แก่ โคโลนีที่ 1, 13, 5 และ 13 สำหรับเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ มาเลี้ยงในระบบ shake flask ดังวิธีการทดลองในข้อ 2.2 เนื่องจากเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์จะถูกหลั่งออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจะนำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

ในการแยกเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปผ่าน ultrafiltration membrane, คอลัมน์ phenyl sepharose, คอลัมน์ Ni-NTA และ amicon ultrafiltration ตามลำดับ ดังวิธีการทดลองในข้อ 3 ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จะมีการหากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน โดยผลการแยกเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดให้บริสุทธิ์แสดงดังตารางที่ 6-9

ตารางที่ 6 การแยกเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L

Purification Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
culture medium	9.16	250.35	0.04	1.00	100.00
ultrafiltration	7.94	179.04	0.04	1.21	86.69
phenyl sepharose	4.23	43.12	0.10	2.68	46.13
Ni -NTA	2.26	30.98	0.07	1.99	24.68
amicon centrifugal	1.56	10.23	0.15	4.16	17.00

ตารางที่ 7 การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L

Purification Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
culture medium	50.77	223.92	0.23	1.00	100.00
ultrafiltration	48.01	142.61	0.34	1.48	94.56
phenyl sepharose	19.80	49.78	0.40	1.75	39.01
Ni -NTA	10.88	29.02	0.37	1.65	21.43
amicon centrifugal	7.16	9.55	0.75	3.31	14.10

ตารางที่ 8 การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L

Purification Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
culture medium	14.44	83.77	0.17	1.00	100.00
ultrafiltration	10.82	47.94	0.23	1.31	74.91
phenyl sepharose	5.58	21.07	0.26	1.54	38.67
Ni -NTA	2.67	8.45	0.32	1.84	18.52
amicon centrifugal	2.09	3.98	0.53	3.05	14.47

ตารางที่ 9 การแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ให้บริสุทธิ์ต่อปริมาตร culture 1 L

Purification Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
culture medium	21.89	172.25	0.13	1.00	100.00
ultrafiltration	22.27	110.05	0.20	1.59	101.74
phenyl sepharose	14.83	43.89	0.34	2.66	67.76
Ni -NTA	6.68	23.01	0.29	2.29	30.53
amicon centrifugal	3.96	5.71	0.69	5.46	18.10

ผลจากการแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์พบว่า ได้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณ 1.56, 7.16, 2.09 และ 3.96 U ต่อ ปริมาตร culture 1 L ตามลำดับ จากตารางการแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์จะพบว่าปริมาณโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนการทำ amicon centrifugal (10.23, 9.55, 3.98 และ 5.17 mg ตามลำดับ) มีค่าน้อยกว่าในขั้นตอนที่ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA (30.98, 29.02, 8.45 และ 23.01 mg ตามลำดับ) มาก ซึ่งจริงๆ แล้วน่าจะมีค่าใกล้เคียงกัน เพราะในขั้นตอนการทำ amicon centrifugal มีจุดประสงค์เพื่อจะลดปริมาตร และกำจัด imidazole ที่ใช้เป็นตัวชะโปรตีนออกเท่านั้น แต่ที่ได้ผลเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ จึงทำให้โปรตีนถูกเอนไซม์โปรติเอสย่อยจนมีขนาดเล็กกว่า 30 กิโลดาลตัน จึงหลุดผ่านเมมเบรนที่มี molecular weigh cut off เท่ากับ 30 ไปได้ หรืออาจจะมีการรั่วของเมมเบรนจึงทำให้โปรตีนที่ต้องการหลุดผ่านเมมเบรนไปได้ ซึ่งจะทำได้ค่าปริมาณโปรตีนหลังการทำ amicon centrifugal ลดน้อยลง

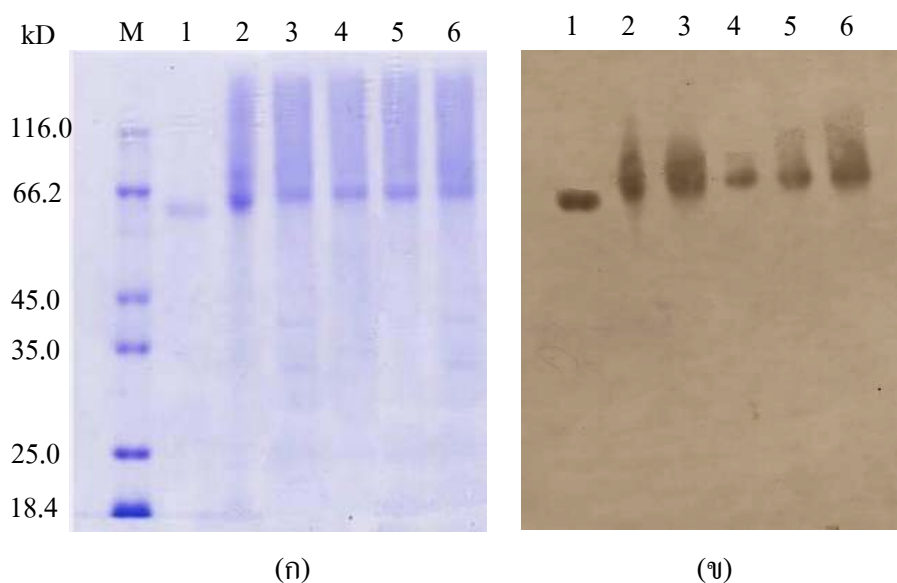
สำหรับค่า specific activity ซึ่งปกติแล้วค่านี้จะต้องมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (total activity) ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ควรมีค่าเท่าเดิม หรือลดลงเล็กน้อย ขณะที่ค่าปริมาณโปรตีน (total protein) ควรจะมีค่าน้อยลงเรื่อยๆ เพราะมีการกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปมากขึ้น แต่ในการทดลองนี้พบว่าค่า specific activity ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F และ E455I ในขั้นตอนที่ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA (0.07, 0.37 และ 0.29 unit/mg ตามลำดับ) จะมีค่าน้อยกว่าในขั้นตอน phenyl sepharose (0.10, 0.40 และ 0.34 unit/mg ตามลำดับ) ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าในขั้นตอนที่ผ่าน

คอลัมน์ Ni-NTA มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เยอะ แต่ปริมาณโปรตีนไม่ได้ลดลงเยอะตามไปด้วย ดังนั้นจึงทำให้ได้ค่า specific activity น้อยลง และการที่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไปเยอะนั้น อาจเนื่องมาจากเอนไซม์มีการเสียดสภาพในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรติเอส หรืออุณหภูมิของตู้เย็นที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ไม่เย็นพอนอกจากนี้ และจากการที่ค่า specific activity ในขั้น Ni-NTA น้อยลงนั้นก็ส่งผลถึงค่า purification fold ด้วย

และเพื่อที่จะแก้ไขปัญหาต่างๆ ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ผู้ทำการทดลองควรจะทำ ความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ รวมถึงตู้เย็นที่จะใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ให้สะอาดก่อนการใช้งานทุกครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรติเอส และควรใช้ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเสียดสภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้ควรวัดค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ให้มีความแม่นยำ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องที่สุด

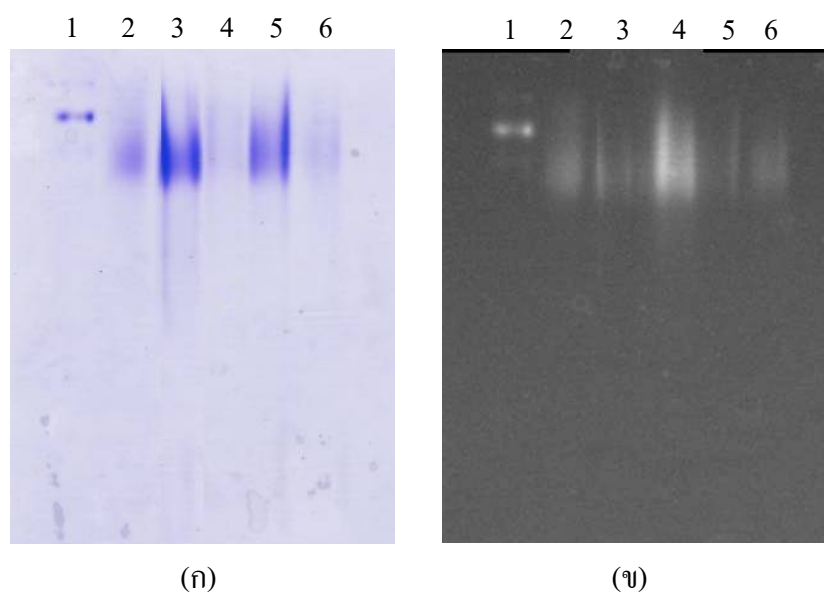
4. การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้

เมื่อแยกเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดได้แล้ว นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ห่อเล็กโครโทเฟซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจล และตรวจสอบว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์ดัลโคซิเนสจริง โดยการทำเวสเทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์โดยใช้ mouse monoclonal antibody against natural dalcocinase เป็น primary antibody ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 24 จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์ดัลโคซิเนสจริง เนื่องจากปรากฏแถบบนแผ่นฟิล์มในการทำเวสเทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์ และมีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนส คือมีขนาดประมาณ 66 กิโลดาลตัน แต่เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์จะมีลักษณะเป็นปื้น และมีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติเล็กน้อย ซึ่งคาดว่าเกิดจากกระบวนการเติมหมู่น้ำตาลของยีสต์ที่มีความหลากหลายและมีมากกว่าของพืช (Carlsson, 1993)



ภาพที่ 24 การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้ (ก) SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข) Western blot ที่แสดงผลบนแผ่นฟิล์ม (1 = เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ 2 = รีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนส 3 = เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A 4 = เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F 5 = เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S 6 = เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I และ M = Protein standard)

นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบื้องต้น โดยการวิเคราะห์หัตถ์โคโร โพรเซสแบบนอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์คัลโคซิเนส 0.2 unit และ ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucose (4-MU-Glc) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 25 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อพิจารณาจากเจลที่ย้อมด้วย 4-MU-Glc (ภาพที่ 25ข) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิด มีความสามารถในการสลายสับสเตรท 4-MU-Glc ได้แตกต่างกัน ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F มีกิจกรรมสูงที่สุด (ภาพที่ 25ข lane 4) ทั้งๆ ที่มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดเมื่อพิจารณาจากเจลที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ภาพที่ 25ก lane 4) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F มีความสามารถในการสลาย 4-MU-Glc ได้ดีที่สุด สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ G367S มีกิจกรรมน้อยที่สุด (ภาพที่ 25ข lane 3 และ 5 ตามลำดับ) ทั้งๆ ที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (ภาพที่ 25ก lane 3 และ 5) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ G367S มีความสามารถในการสลาย 4-MU-Glc ได้แย่มาก ขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I มีกิจกรรมใกล้เคียงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (ภาพที่ 25ข lane 6, 1 และ 2 ตามลำดับ) แต่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (ภาพที่ 25ก lane 6, 1 และ 2 ตามลำดับ) แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I มีความสามารถในการสลาย 4-MU-Glc ได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีความสามารถในการสลายสับสเตรท 4-MU-Glc ได้ใกล้เคียงกัน จากการที่แถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I มีลักษณะเป็นปื้น อาจเป็นเพราะกระบวนการเติมหมูนํ้าตาลที่แตกต่างกันในพีชกับในยีสต์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้การที่แถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิด เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ อาจเป็นเพราะประจุ หรือ รูปร่างของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืช



ภาพที่ 25 การวิเคราะห์ห่อเล็กโครโฟเรซิสแบบนอน-ดิแนชเซอริง-พอลิอะครีลาไมด์ (ก) เจลที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข) เจลที่ย้อมด้วย 4-MU-Glc แล้วตรวจสอบการเรืองแสงของแถบเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีกิจกรรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (1 = เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ 2 = รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส 3 = เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A 4 = เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F 5 = เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S และ 6 = เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I)

5. การศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat})

เมื่อนำเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ลินามาเรส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดมาศึกษาค่าจลนพลศาสตร์กับสับสเตรท 3 ชนิดคือ *p*NP-Glc คัลโคซิโนกลูโคไซด์ และลินามาริน โดยใช้วิธีการดั่งการทดลองที่ 5.3 และคำนวณจากสมการของ Michaelis-Menten ค่าจลนพลศาสตร์พร้อมค่า standard error (S.E.) ที่ได้แสดงในตารางที่ 10-11 และกราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กับสับสเตรทแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 10 ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส
 ลินามาเรส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ในการสลาย *p*NP-Glc

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$V_{\max} \pm \text{S.E. (mU)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / K_m (\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
I185A	14.33 $\pm$ 1.07	226.59 $\pm$ 6.74	12.29	0.86
V255F	2.67 $\pm$ 0.17	161.82 $\pm$ 2.34	10.60	3.97
G367S	5.53 $\pm$ 0.42	91.66 $\pm$ 2.18	9.34	1.69
E455I	11.83 $\pm$ 0.88	156.79 $\pm$ 4.47	49.85	4.21
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส	3.91 $\pm$ 0.31	226.80 $\pm$ 4.59	237.01	60.62
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	3.92 $\pm$ 0.46	215.78 $\pm$ 7.15	261.09	66.61
ลินามาเรส	0.72 $\pm$ 0.04	206.55 $\pm$ 1.62	131.91	183.20

ตารางที่ 11 ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส
 ลินามาเรส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$V_{\max} \pm \text{S.E. (mU)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / K_m (\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
I185A	0.46 $\pm$ 0.05	3.96 $\pm$ 0.12	0.51	1.12
V255F	0.24 $\pm$ 0.02	9.30 $\pm$ 0.13	1.51	6.30
G367S	0.21 $\pm$ 0.01	8.18 $\pm$ 0.07	1.24	5.92
E455I	0.65 $\pm$ 0.11	12.67 $\pm$ 0.61	6.37	10.33
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส	1.51 $\pm$ 0.26	26.36 $\pm$ 1.77	27.55	18.24
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	0.83 $\pm$ 0.17	33.34 $\pm$ 2.14	40.34	48.60
ลินามาเรส	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = ไม่สามารถหาค่าได้

ผลจากการหาค่าจลนพลศาสตร์ในการสลาย *p*NP-Glc ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และลินามารเอส พบว่าได้ค่า K_m (3.92, 3.91 และ 0.72 mM ตามลำดับ) แตกต่างจากที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้เล็กน้อย (5.37, 5.78 และ 0.35 mM ตามลำดับ) (Srisomsap *et al.*, 1996; Keresztessy *et al.*, 2001; Toonkool *et al.*, 2006) ซึ่งอาจเป็นเพราะใช้วิธีการหาค่าจลนพลศาสตร์ที่ต่างกัน เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่า K_m ใกล้เคียงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ แสดงว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์มีคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์เหมือนกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดกับเอนไซม์ลินามารเอส พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีค่า K_m สูงกว่าเอนไซม์ลินามารเอส แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์มีความสามารถในการจับกับ *p*NP-Glc ได้น้อยกว่าเอนไซม์ลินามารเอส และเมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสพบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ E455I มีค่า K_m (14.33 mM และ 11.83 mM ตามลำดับ) สูงขึ้นประมาณ 3 เท่าของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (3.91 mM) แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับ *p*NP-Glc ได้น้อยกว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ซึ่งการแทนที่ไอโซลิวซีนด้วยอะลานีนที่เป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างสั้นกว่า ในกรณีของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A น่าจะทำให้เอนไซม์มี hydrophobic interaction ที่น้อยลงในการจับกับส่วนอะไกลโคนของ *p*NP-Glc ขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่มีการแทนที่กรดอะมิโนกลูตามัทซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุลบ ด้วยไอโซลิวซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว น่าจะทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I สามารถจับกับ *p*NP-Glc ได้ดีขึ้น เพราะเป็นการเพิ่มความเป็น hydrophobic ให้กับสภาพแวดล้อมในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคน แต่ผลที่ได้กลับตรงกันข้าม ซึ่งอาจเป็นเพราะ คุณสมบัติของกรดอะมิโนกลูตามัทที่มีประจุลบในตำแหน่งนี้ อาจจะมีความสำคัญในการจับกับหมู่ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) ของ *p*NP-Glc และเมื่อมีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว จึงอาจมีผลกระทบทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I มีความเหมาะสมในการจับกับ *p*NP-Glc ได้น้อยลง นอกจากนี้ขนาดและรูปร่างของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน อาจจะไม่เหมาะสมในการจับกับ *p*NP-Glc อีกด้วย ส่วนเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F และ G367S มีค่า K_m (2.67 และ 5.53 mM ตามลำดับ) เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (3.91 mM) โดยคิดเป็น 0.7 และ 1.4 เท่า ของค่า K_m ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F และ G367S มีความสามารถในการจับกับ *p*NP-Glc ได้ดีพอๆ กับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแทนที่กรดอะมิโนวาเลีนตำแหน่ง 255 ด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน และไอโซลิวซีนตำแหน่ง 367 ด้วยกรดอะมิโนซีรีน ไม่น่าจะมีความสำคัญในการจับกับ *p*NP-Glc

เมื่อพิจารณาค่า $V_{\max}$ ในการสลาย *pNP-Glc* พบว่าเอนไซม์ทุกชนิดมีค่า $V_{\max}$ ใกล้เคียงกัน ยกเว้นเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มีกิจกรรมต่อ *pNP-Glc* เท่ากัน คือ 0.1 U จึงทำให้ค่า $V_{\max}$ ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน หรือแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ค่า $V_{\max}$ นี้ไม่สามารถบอกถึงประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดได้ เพราะในเอนไซม์ 0.1 U มีจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงควรพิจารณาประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจากค่า k_{cat} และ k_{cat}/K_m เมื่อพิจารณาค่า k_{cat} พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่า k_{cat} ใกล้เคียงกัน (261.09 และ 237.01 s^{-1} ตามลำดับ) และใกล้เคียงกับค่า k_{cat} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่เคยมีการรายงานมาก่อน (307 s^{-1}) (Srisomsap *et al.*, 1996) และมีความมากกว่าค่า k_{cat} ของเอนไซม์ลินามารส (131.91 s^{-1}) แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส มีความสามารถในการสลาย *pNP-Glc* ได้มากกว่าเอนไซม์ลินามารส สำหรับค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส พบว่าได้ค่าใกล้เคียงกัน (66.61 และ 60.62 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ตามลำดับ) เมื่อคำนวณค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติจากค่าที่เคยมีการรายงานไว้ พบว่าได้ค่า k_{cat}/K_m (57.17 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ และมีค่าน้อยกว่าค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ลินามารส (183.20 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) มาก ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ลินามารสมีค่า K_m ต่อ *pNP-Glc* ต่ำมาก แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส มีประสิทธิภาพในการสลาย *pNP-Glc* ได้น้อยกว่าเอนไซม์ลินามารส ในกรณีของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีค่า k_{cat} และ k_{cat}/K_m น้อยกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และลินามารสมาก แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิด มีประสิทธิภาพในการสลาย *pNP-Glc* ได้น้อยลง

ผลจากการหาค่าจลนพลศาสตร์ในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส พบว่าได้ค่า K_m เท่ากับ 1.51 mM ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (1.48 mM) (Toonkool *et al.*, 2006) ขณะที่ค่า K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ (0.83 mM) มีค่าน้อยกว่าที่เคยมีการรายงานไว้ประมาณ 2 เท่า (1.68 mM) (Svasti *et al.*, 1999) สำหรับเอนไซม์ลินามารสสามารถสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้น้อยมาก อาจเป็นเพราะคัลโคซินินกลูโคไซด์มีหมู่อะไลดโคนขนาดใหญ่กว่าลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามารสมาก จึงอาจทำให้โครงสร้างในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไลดโคนของเอนไซม์ลินามารส มีลักษณะไม่เหมาะสมที่จะจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ จึงไม่สามารถสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบค่า K_m ในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดมีค่า K_m ลดลงเป็น

0.3, 0.16, 0.14 และ 0.43 เท่า ของค่า K_m ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนส กลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ทั้ง 4 ชนิด สามารถจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีกว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ซึ่งจริงๆ แล้ว คาดว่าการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ไม่น่าจะมีผลทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์จับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น แต่อาจจะ เป็นไปได้ว่าการทำการกลายพันธุ์ใน 4 ตำแหน่งนี้ อาจจะทำให้เอนไซม์ที่ได้มีโครงสร้างที่ เหมาะสมมากขึ้นในการจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์

เมื่อพิจารณาค่า k_{cat} ของการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนส ธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่า k_{cat} (40.34 และ 27.55 s^{-1} ตามลำดับ) ใกล้เคียงกัน แต่มีค่าน้อยกว่าค่าที่เคยมีการรายงานไว้มากสำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ (328.05 s^{-1}) (Svasti *et al.*, 1999) ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ใช้มี ความบริสุทธิ์ต่างกัน เนื่องจากการแยกให้บริสุทธิ์ในเวลาที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังใช้วิธีการหาค่า จลนพลศาสตร์ที่ต่างกันอีกด้วย สำหรับค่า k_{cat} / K_m พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่าต่างกัน (48.60 และ 18.24 $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ ตามลำดับ) เพราะคำนวณ จากค่า K_m ที่ต่างกัน และเมื่อคำนวณค่า k_{cat} / K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติจากค่าที่เคยมีการ รายงานไว้ พบว่าได้ค่า k_{cat} / K_m (195.27 $mM^{-1} \cdot s^{-1}$) แตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้นี้มาก เนื่องจากค่า k_{cat} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้นี้ มีค่าแตกต่างจากค่าที่เคยมีการ รายงานไว้มาก จึงทำให้ค่า k_{cat} / K_m มีความแตกต่างกันด้วย เมื่อเปรียบเทียบค่า k_{cat} และ k_{cat} / K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด กับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส พบว่าเอนไซม์ คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดมีค่า k_{cat} (0.51, 1.51, 1.24 และ 6.37 s^{-1}) และ k_{cat} / K_m (1.12, 6.30, 5.92 และ 10.33 $mM^{-1} \cdot s^{-1}$) สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส แสดงว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุก ชนิด มีประสิทธิภาพในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้น้อยลง และการทำการกลายพันธุ์อาจทำ ให้โครงสร้างในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคโคนของเอนไซม์มีความเหมาะสมน้อยลงในการ สลายคัลโคซินินกลูโคไซด์

ผลจากการหาค่าจลนพลศาสตร์ในการสลายลินามารินของเอนไซม์ลินามาเรสพบว่า ได้ค่า K_m , k_{cat} และ k_{cat} / K_m เท่ากับ 2.28 mM, 40.91 s^{-1} และ 17.94 $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างจาก ค่าที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้มาก (1.05 mM, 0.026 s^{-1} และ 0.025 $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ ตามลำดับ) (Keresztessy *et al.*, 2001) เพราะใช้วิธีในการหาค่าจลนพลศาสตร์ที่ต่างกัน นอกจากนี้เอนไซม์

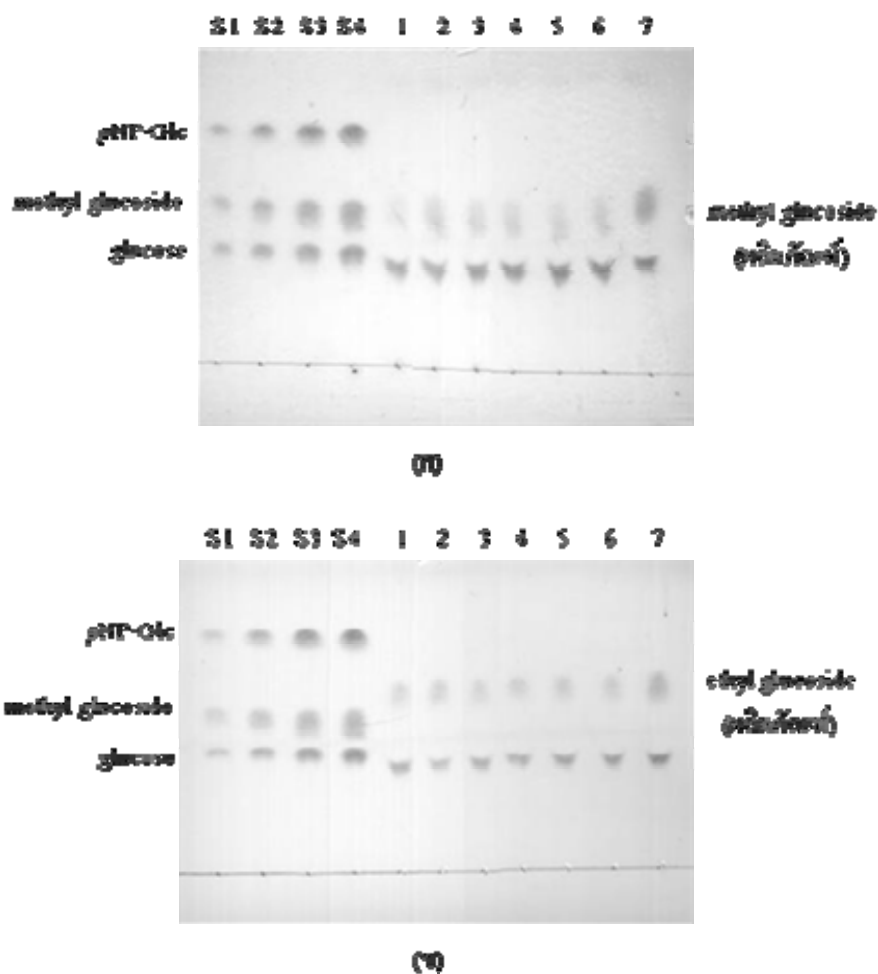
ลินามารีส และลินามารินที่ใช้ในการทดลองก็มีความบริสุทธิ์ต่างกัน เนื่องจากการแยกให้บริสุทธิ์ในเวลาที่แตกต่างกัน สำหรับเอนไซม์คัลโคซินธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซินส และเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด สามารถสลายลินามารินได้น้อยมากจนไม่อาจคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ได้ ในกรณีของเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ I185A คาดว่าน่าจะสลายลินามารินได้ เนื่องจาก Keresztessy *et al.* (2003) ได้ทำการทดลองพบว่า เมื่อมีการแทนที่กรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่ง 201 ของเอนไซม์ลินามารีสด้วยกรดอะมิโนวาเลีน (A201V) มีผลทำให้ค่า K_m สูงขึ้น 5 เท่า และ ค่า k_{cat} น้อยลง 1.6 เท่า ในการสลายลินามาริน แสดงว่ากรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่ง 201 ของเอนไซม์ลินามารีส ซึ่งตรงกับไอโซลิวซีนตำแหน่ง 185 ของเอนไซม์คัลโคซินส เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับ และการสลายลินามาริน ดังนั้นเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ I185A น่าจะสามารถสลายลินามารินได้ แต่ที่เอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ I185A และเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์อีก 3 ชนิด ไม่สามารถสลายลินามารินได้ อาจเป็นเพราะการแทนที่ด้วยกรดอะมิโน A201, F271, S384 และ I473 ของเอนไซม์ลินามารีส ไม่ช่วยให้เอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์สามารถสลายลินามารินได้ หรือการทำการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียว ยังไม่สามารถทำให้โครงสร้างในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคโคนของเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์เหมาะสมเพียงพอ ที่จะจับกับลินามาริน และสลายลินามารินได้ และการที่เอนไซม์คัลโคซินสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซินส ไม่สามารถสลายลินามารินได้ อาจเนื่องจากโครงสร้างในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคโคนของเอนไซม์คัลโคซินส ไม่เหมาะสมกับลินามาริน ซึ่งมีหมู่อะไกลโคโคนขนาดเล็กกว่าคัลโคซินินกลูโคไซด์ ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์คัลโคซินส และลินามารินยังมีโครงสร้างที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ ติดอยู่กับอะตอมของคาร์บอน ซึ่งโครงสร้างลักษณะนี้อาจไปขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คัลโคซินส

เนื่องจากการหาค่า K_m ต้องการความแม่นยำสูง และค่า K_m มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายถ้ามีความคลาดเคลื่อนในการทดลองเพียงเล็กน้อย ดังนั้นค่า K_m ที่ได้จากการทดลองนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนบ้าง แต่อยู่ในระดับที่เชื่อถือได้ เนื่องจากผู้ทำการทดลองได้เลือกใช้ค่าจลนพลศาสตร์จากกราฟ Michaelis Menten (ภาคผนวก ข) ที่มีค่า R^2 มากกว่า 0.99 ขึ้นไป ความคลาดเคลื่อนในการทดลองอาจเกิดจาก ผู้ทำการทดลองไม่มีความแม่นยำในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาแต่ละขั้น เช่น เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ปริมาตรในการปิเปตสาร และเอนไซม์อาจไม่แม่นยำ เป็นต้น กิจกรรมของเอนไซม์ glucose oxidase ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็มีความสำคัญมากเช่นกัน ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลง จะทำให้ค่า V_{max} ที่ได้ไม่ถูกต้อง และจะมีผลต่อค่า k_{cat} ซึ่งอาจแก้ปัญหาโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง สับสเตรทที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต้องมีความบริสุทธิ์สูง แต่ในการทดลองนี้สับสเตรทคัลโคซินินกลูโคไซด์ที่ใช้มีความบริสุทธิ์น้อย จึงอาจทำ

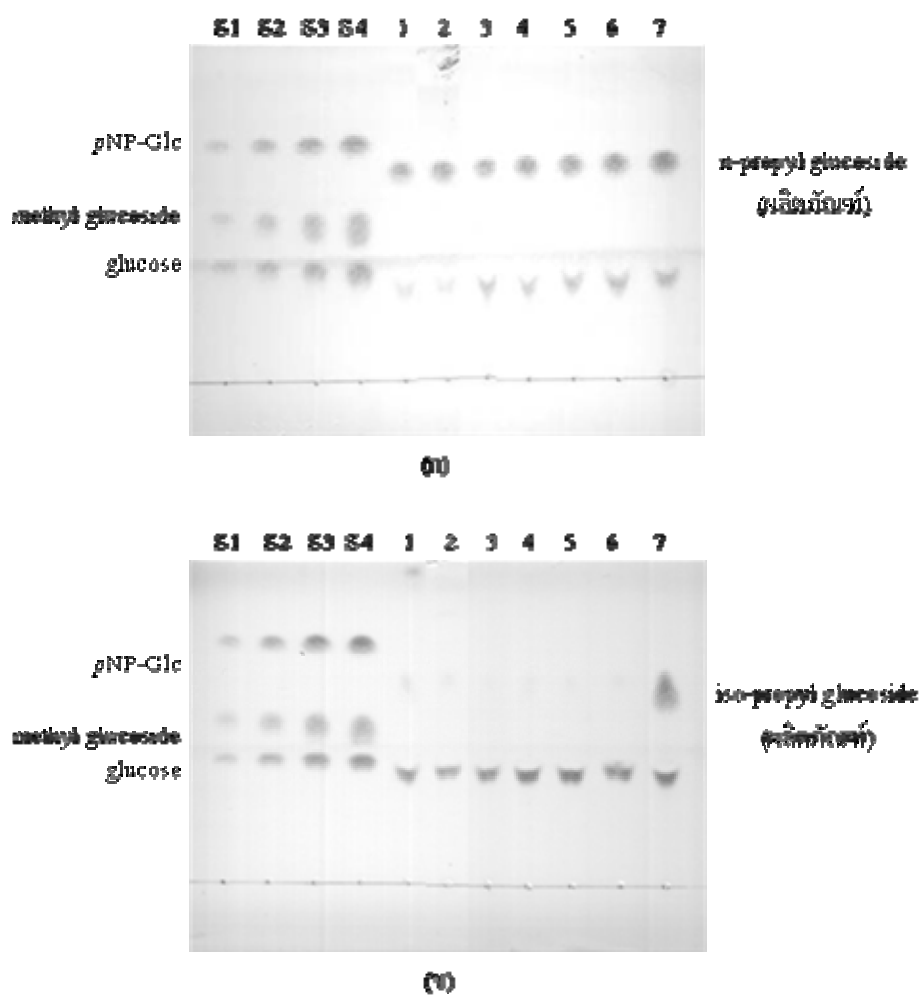
ให้ได้ค่าจลนพลศาสตร์ที่คลาดเคลื่อน นอกจากสับสเตรทแล้วเอนไซม์ที่ใช้ก็ต้องมีความบริสุทธิ์ และควรใช้เทคนิคในการหาปริมาณโปรตีนที่มีความแม่นยำ จึงจะได้ค่า k_{cat} ที่ถูกต้องแม่นยำ

6. การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

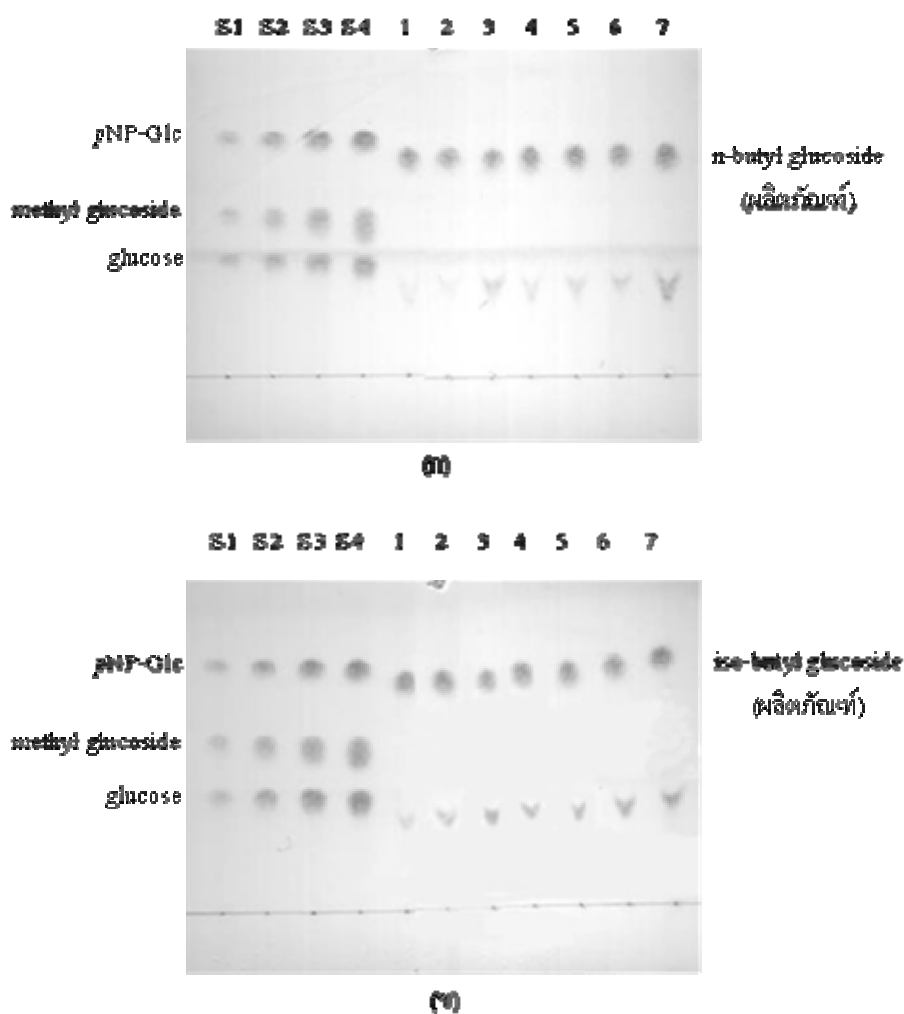
จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ลินามาเรส และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็น glucosyl donor และใช้ short chain alkyl alcohols (C_1 - C_4) ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.9 M เป็น glucosyl acceptor ดังวิธีการทดลองในข้อ 5.3 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ TLC ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 26-29



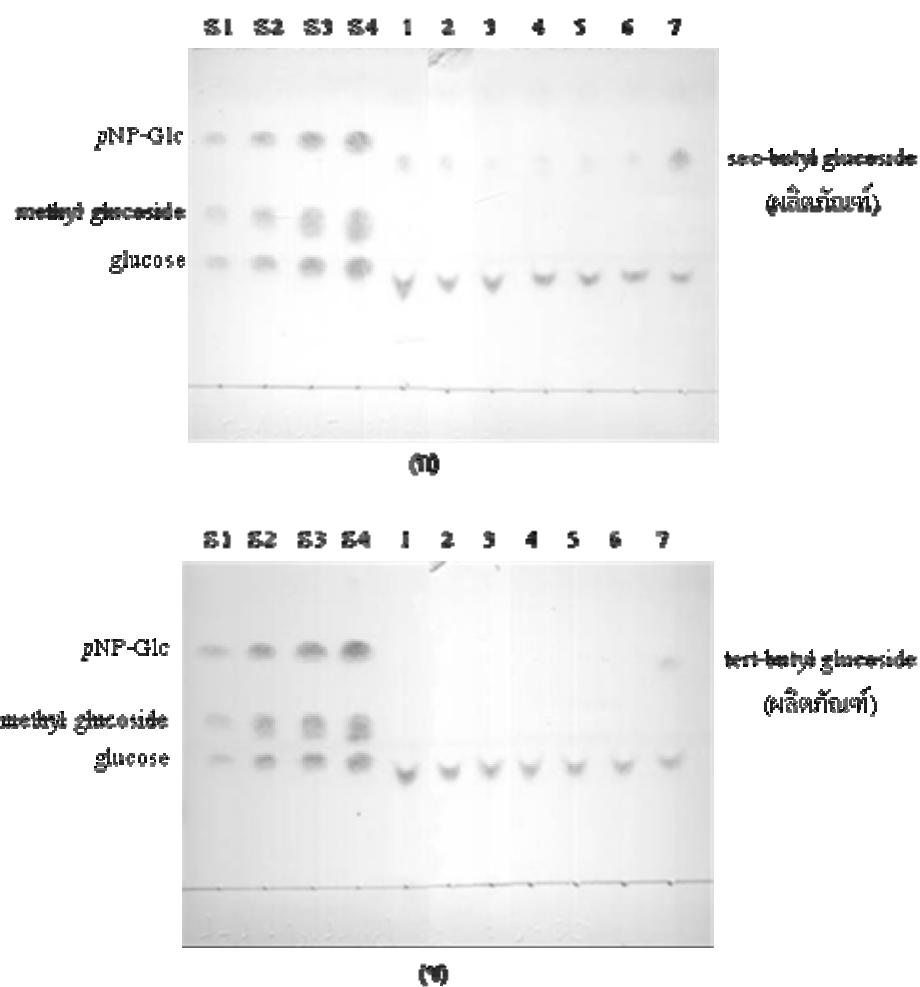
ภาพที่ 26 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ (ก) 0.9 M methanol และ (ข) 0.9 M ethanol เป็น glucosyl-acceptor (S1-S4 = standard marker ที่ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol ตามลำดับ 1-7 = ปฏิกริยาที่ใช้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S เอนไซม์คัลโคซิเนส กลายพันธุ์ E455I เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ)



ภาพที่ 27 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ (ก) 0.9 M *n*-propanol และ (ข) 0.9 M *iso*-propanol เป็น glucosyl-acceptor (S1-S4 = standard marker ที่ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol ตามลำดับ 1-7 = ปฏิกริยาที่ใช้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนส เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ)



ภาพที่ 28 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ (ก) 0.9 M *n*-butanol และ (ข) 0.9 M *iso*-butanol เป็น glucosyl-acceptor (S1-S4 = standard marker ที่ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol ตามลำดับ 1-7 = ปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ)



ภาพที่ 29 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ (ก) 0.9 M *sec*-butanol และ (ข) 0.9 M *tert*-butanol เป็น glucosyl-acceptor (S1-S4 = standard marker ที่ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol ตามลำดับ 1-7 = ปฏิกริยาที่ใช้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ)

เมื่อนำแผ่น TLC ไปวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่อง scanning densitometer และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามวิธีที่ได้รายงานโดย Svasti *et al.*, 2003 ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 12-13 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์สามารถเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ แต่ยังไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้ (ตารางที่ 13) และเอนไซม์ลินามาเรสสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีที่สุดในแอลกอฮอล์เกือบทุกชนิด ยกเว้นใน *n*-propanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol ที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ V255F สามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า

เมื่อพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับ (ตารางที่ 12) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F สามารถผลิต alkyl glucoside ได้มากกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ในแอลกอฮอล์ปฐมภูมิทุกชนิด โดยผลิตได้มากกว่าประมาณ 1.5 เท่า ใน methanol และประมาณ 1.2 เท่าใน ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol นอกจากนี้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ยังสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรสเมื่อใช้ ethanol เป็นตัวรับ และผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่าเอนไซม์ลินามาเรสเมื่อใช้ *n*-propanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol เป็นตัวรับ สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A สามารถผลิต alkyl glucoside ได้มากกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ในแอลกอฮอล์ปฐมภูมิเกือบทุกตัวประมาณ 1.2 เท่า ยกเว้นใน methanol และ ethanol ขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S และ E455I สามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีใกล้เคียงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ยกเว้นใน methanol และ *iso*-butanol สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S และ E455I ตามลำดับ ที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถผลิตได้มากกว่า

เมื่อพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับ (ตารางที่ 13) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ V255F สามารถผลิต alkyl glucoside ได้มากกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสในแอลกอฮอล์ทุติยภูมิทุกตัว โดยเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ผลิตได้มากกว่าประมาณ 4 เท่า และ 2 เท่า สำหรับ *iso*-propanol และ *sec*-butanol ตามลำดับ และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ผลิตได้มากกว่าประมาณ 3.5 เท่า และ 2 เท่า สำหรับ *iso*-propanol และ *sec*-butanol ตามลำดับ สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I และ G367S สามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีใกล้เคียงกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส อย่างไรก็ตามเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

ทั้ง 4 ชนิดยังผลิต alkyl glucoside ได้น้อยกว่าเอนไซม์ลินามาเรส เมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุกชนิดเป็น
ตัวรับ

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของแอลกอฮอล์
ปฏิกิริยากับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ลินามาเรส และ
คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด

เอนไซม์	แอลกอฮอล์ปฏิกิริยา				
	methanol	ethanol	<i>n</i> -propanol	<i>n</i> -butanol	<i>iso</i> -butanol
I185A	19.87	39.99	73.01	91.98	89.67
V255F	39.84	54.12	79.90	92.03	84.34
G367S	30.36	35.84	57.56	72.95	62.36
E455I	26.44	40.05	67.39	86.61	80.10
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส	22.41	42.14	67.58	79.43	70.52
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	24.47	38.30	66.41	83.38	68.58
ลินามาเรส	51.86	51.33	72.65	71.17	73.56

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของแอลกอฮอล์
ทุติยภูมิ และตติยภูมิกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส
ลินามาเรส และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด

เอนไซม์	แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ		แอลกอฮอล์ตติยภูมิ
	<i>iso</i> -propanol	<i>sec</i> -butanol	<i>tert</i> -butanol
I185A	17.53	24.69	0
V255F	14.50	20.99	0
G367S	9.00	7.89	0
E455I	6.61	9.77	0
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส	3.89	11.89	0
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	4.37	12.31	0
ลินามาเรส	60.11	65.15	34.84

จากการศึกษานี้พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิทุกตัวเป็นตัวรับได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ซึ่งอาจเป็นเพราะการแทนที่กรดอะมิโนวาเลอีนด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า น่าจะทำให้แขนงข้างของฟีนิลอะลานีนเกิด hydrophobic interaction กับแอลกอฮอล์ได้ดี และทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างที่เหมาะสมมากขึ้น ในการเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิทุกตัวเป็นตัวรับ นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ยกเว้นใน methanol และ ethanol ซึ่งอาจเป็นเพราะการแทนที่กรดอะมิโนไอโซลิวซีน ที่มีแขนงข้างยาวด้วยกรดอะมิโนอะลานีนที่มีแขนงข้างสั้นลง น่าจะทำให้แขนงข้างของกรดอะมิโนอะลานีนไม่ไปขัดขวางในบริเวณช่องจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ จึงอาจทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A สามารถจับกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิที่มีคาร์บอนสายยาวมากกว่า 2 อะตอม และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิซึ่งมีแขนงข้างกะทัดรัดได้ดีขึ้น

ค่าที่ได้จากการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง scanning densitometer ดังแสดงในตารางที่ 12-13 นั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย แต่อยู่ในระดับที่เชื่อถือได้ โดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของแอลกอฮอล์แต่ละชนิด ซึ่งควรมีค่ามากกว่า 0.90 ขึ้นไป โดยความคลาดเคลื่อนในการทดลองนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาตรของสารที่จุดลงบนแผ่น TLC อาจไม่แม่นยำ เนื่องจากอาจมีสารติดค้างอยู่ในอุปกรณ์ที่ใช้ การเตรียมสารละลาย A และ P ที่ใช้เป็นตัวชะ ต้องมีการผสมอย่างดีเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และควรวางกระดานกรองในภาชนะที่ใช้ในการทำการทดลอง เพื่อให้สารละลายกระจายไปทั่วภาชนะ นอกจากนี้ลักษณะของจุดบนแผ่น TLC ควรมีรูปร่างกลม และมีความเข้มภายในจุดสม่ำเสมอ เพื่อให้การคำนวณด้วยเครื่อง scanning densitometer มีความแม่นยำมากขึ้น แต่เนื่องจากการทดลองนี้ต้องใช้บัฟเฟอร์ ซึ่งมีเกลือเป็นส่วนประกอบเป็นส่วนหนึ่งในการทำปฏิกิริยา จึงอาจทำให้จุดที่ได้มีรูปร่างไม่กลมมากนัก และการที่จะได้ความเข้มภายในจุดสม่ำเสมอนั้น ต้องใช้ sulfuric acid ที่มีความเข้มข้นสูงพอ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 20% (v/v) sulfuric acid ใน ethanol

สำหรับการพัฒนาที่น่าจะทำให้เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ดีดิกูมิได้ ควรจะทำการกลายพันธุ์ที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อให้ผลของการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งช่วยส่งเสริมกัน เพื่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ดีดิกูมิเป็นตัวรับได้ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ I185A และ V255F สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ดีดิกูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคจีนส ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตควรจะสร้างเอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งคือ 185A และ V255F ซึ่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส เพื่อให้เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ที่ได้สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ดีดิกูมิ หรือแอลกอฮอล์ที่มีสายยาวเป็นตัวรับได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการจับกับหมู่อะไกลโคนของเอนไซม์ดัดโคซิเนสเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งคาดว่าถ้าทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่สำคัญ เอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้น่าจะมีคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ลินามาเรส คือ สามารถสลายลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรสได้ และน่าจะทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้นอีกด้วย โดยในการทดลองนี้ได้สร้างเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, V255F, G367S และ E455I โดยเลือกตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ดัดโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรส และเลือกตำแหน่งที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีกรดอะมิโนที่ต่างกัน และเป็นตำแหน่งที่มีแขนงข้างชี้เข้าไปในบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วย โดยดูจากโครงสร้างสามมิติของแบบจำลองดัดโคซิเนส จากนั้นทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit

เมื่อได้โคลนของเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดแล้ว ให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ใน *Pichia pastoris* ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จะหลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจะนำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อไปแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่าน ultrafiltration membrane, คอลัมน์ phenyl sepharose, คอลัมน์ Ni-NTA และ amicon ultrafiltration ตามลำดับ ซึ่งจะไดเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป นำเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดที่แยกได้มาวิเคราะห์หือเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล และทำเวสต์เทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์พบว่า เอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์ดัดโคซิเนสจริง นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบื้องต้น โดยการวิเคราะห์หือเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนซเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล โดยย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucose (4-MU-Glc) พบว่าเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิดมีกิจกรรมต่อสับสเตรท 4-MU-Glc ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F มีกิจกรรมสูงที่สุด และมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ดัดโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์ดัดโคซิเนส ขณะที่เอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ G367S มีความสามารถในการสลาย 4-MU-Glc ได้น้อยที่สุด สำหรับเอนไซม์ดัดโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I มีกิจกรรมใกล้เคียงกับเอนไซม์ดัดโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์ดัดโคซิเนส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และลินามารีส โดยใช้ สับสเตรท *p*NP-Glc คัลโคซินินกลูโคไซด์ และลินามาริน พบว่าการแทนที่กรดอะมิโนของ เอนไซม์คัลโคซิเนสด้วย A201, F271, S384 และ I473 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามารีส ไม่ช่วยทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดสามารถสลายลินามารินได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะ การกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียว อาจจะทำให้ได้เอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ที่ไม่มี ความสามารถเพียงพอที่จะสลายลินามาริน และการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง I185A V255F G367S และ E455I น่าจะมีความสำคัญต่อค่า K_m ในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ โดยพบว่าเอนไซม์ คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัวสามารถจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น สำหรับการสลาย *p*NP-Glc พบว่าการกลายพันธุ์ที่ G367S และ V255F ไม่น่าจะมีความสำคัญต่อค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc แต่การกลายพันธุ์ที่ I185A และ E455I ทำให้ค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า k_{cat}/K_m พบว่าการทำการกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ ทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนส สกลายพันธุ์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการสลายคัลโคซินินกลูโคไซด์ และ *p*NP-Glc ลดลงมาก

การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท ในส่วนของหมู่อะไกลโคโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส นอกจากจะศึกษาโดยการทำการทดลองดังกล่าวนี้ได้แล้ว ยังสามารถทำนายได้จากคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม Modelling และ Molecular docking ได้อีกด้วย โดยดูจากค่าพลังงานของเอนไซม์ ที่ใช้ในการจับกับสับสเตรท ซึ่งการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์จะช่วยให้สามารถทำนายความ สัมพันธ์ได้ล่วงหน้า และอาจจะช่วยให้การวิเคราะห์ผลการทดลองง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการ ทำการทดลองจริง เพื่อยืนยันผลที่เกิดขึ้น เพราะสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่แท้จริง อาจแตกต่างจากสภาพแวดล้อมที่จำลองขึ้นในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ผลจากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ทุกชนิด สามารถเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้ แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่ยังไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิ เป็นตัวรับได้ โดยพบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ V255F สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิทุกตัวได้ดีกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส ซึ่งอาจเป็นเพราะการแทนที่กรดอะมิโนวาลีนด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่มีแขนง ข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าน่าจะทำให้แขนงข้างของฟีนิลอะลานีนเข้าถึง สับสเตรทได้ดี และทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างที่เหมาะสมมากขึ้นในการเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่ กลูโคส นอกจากนี้เอนไซม์คัลโคซิเนสสกลายพันธุ์ I185A ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส

โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับ ได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ยกเว้นใน methanol และ ethanol ซึ่งอาจเป็นเพราะแขนงข้างที่สั้นลงของกรดอะมิโนอะลานีน น่าจะทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A สามารถจับกับสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่ได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามการที่จะพัฒนาให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับได้นั้น ควรจะทำการกลายพันธุ์ที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อให้ผลของการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งช่วยส่งเสริมกันเพื่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A และ V255F สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ดีกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตควรจะสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งคือ 185A และ V255F ซึ่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส เพื่อให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ หรือแอลกอฮอล์ที่มีสายยาวเป็นตัวรับได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Ajisaka, K., H. Nishida and H. Fujimoto. 1987. The synthesis of oligosaccharides by the reversed hydrolysis reaction of β -glucosidase at high substrate concentration and at high temperature. **Biotechnol. Lett.** 9: 243-248
- Barbagallo, R., G. Spagna, R. Palmeri, C. Restuccia and P. Giudici. 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 58-66
- Barrett, T., G. C. Suresh, S. Tolly, E. Dodson and M. Hughes. 1995. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. **Structure** 3: 951-960
- Boons, G. 1996. Synthetic oligosaccharides: recent advances. **Res. Foc.** 1: 331-342
- Burmeister, W. P., S. Cottaz, H. Driguez, I. Renato, S. Palmieri and B. Henrissat. 1997. The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insight into the substrate recognition and active-site machinery of an *S*-glycosidase. **Structure** 5: 663-675
- Carl, S. R. and W. G. Stephen. 2000. Glycosidase mechanisms. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 4: 573-580
- Cereghino, L. J. and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 45-66
- Chi, Y. I., A. L. Martinez, J. Jancarik, V. R. Swanson, E. D. Robertson and S. Kim. 1999. Crystal structure of the β -glycosidase from the thermophile *Thermoplasma aggregans*: insights into its activity and thermostability. **FEBS Lett.** 445: 375-383

- Cicek, M., D. Blanchard, D.R. Bevan and A. Esen. 2000. The aglycone specificity-determining site are different in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize β -glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -glucosidase). **J. Biol. Chem.** 275: 20002-20011
- Cino, J. n.d. High Yield Protein Production from *Pichia pastoris* Yeast: A Protocol for Benchtop Fermentation. *Pichia pastoris* Protocol for Growth in Fermentor, pp. 1-2. Invitrogen Company Limited.
- David L. Zechel and Stephen G. Withers. 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18
- Davies, G. and B. Henrissat. 1995. Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. **Structure** 3: 149-154
- Eksittikul, T. and M. Chulavatnatol. 1988. Characterization of cyanogenic b-glucoside (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Arch. Biochem. Biophys.** 266: 263-269
- Esen, A. 1993. β -glucosidase: overview. In β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology. (A. Esen, Ed.), pp. 1-14. **American Chemical Society**, Washington D.C.
- Hughes, A. M., K. Brown, A. Pancoro, B. S. Murray, E. Oxtoby and J. Hughes. 1992. A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). **Arch. Biochem. Biophys.** 295: 273-279
- Hakulinen, N., S. Paavilainen, T. Korpela and J. Rouvinen. 1999. The crystal structure of β -glucosidase from *Bacillus circulans* ssp. *alkalophilus*: ability to form long polymeric assemblies. **J. Struct. Biol.** 129: 69-79

- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280: 309-316
- Henrissat, B., I. Callebaut, S. Fabrega, P. Mornon and G. Davies. 1995. Evolution: conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold several families of glycosyl hydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92: 7090-7094
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Biochem. J.** 316: 695-696
- Hernandez, L. F., J. C. Espinosa, M. Fernandez-Gonzalez and A. Briones. 2003. β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **Int. J. Food. Micro.** 80: 171-176
- Tomomatsu H. 1994. Health Effects of Oligosaccharides. **Food Tech.** 48: 61-65
- Hommalai, G., P. Chaiyen and J. Svasti. 2005. Studies on the transglucosylation reactions of cassava and Thai reosewood β -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. **Arch. Biochem. Biophys.** 442: 11-20
- Hughes, M. A. 1992 Molecular Genetics of Plant Cyanogenic β -glucosidases. In β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology. (A. Esen, Ed.) pp. 153-169. **American Chemical Society**, Washington D.C.
- Keresztessy, Z., L. Kiss and M. A. Hughes. 1994. Investigation of the active site of the cyanogenic β -D-glucosidase (linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (cassava). II. Identification of Glu-198 is an active site carboxylate group with acid catalytic function. **Arch. Biochem. Biophys.** 315: 323-330
- Keresztessy, Z., J. Hughes, L. Kiss and A. M. Hughes. 1996. Co-purification from *E. coli* of a plant β -glucosidase-GST fusion protein and the bacteria chaperonin GroEL. **Biochem J.** 314: 41-47

- Keresztessy, Z., K. Brown, M.A. Dunn and M.A. Hughes. 2001. Identification of essential active-site residues in cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. **Biochem. J.** 353: 199-205
- Ketudat-Cairn, J.R., V. Champattanachai, C. Sriomsap, B. Wittman-Liebold, B. Thiede and J. Svasti. 2000. Sequence and expression of thai rosewood β -glucosidase/ β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. **J. Biochem.** 128: 999-1008
- Kim, Y.W., S. S. Leet, R. A. J. Warren and S.G. Witherst. 2004. Directed Evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. Increase its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. **J. Biol. Chem.** 279: 42787-42793
- Lirdprapamongkol, K. and J. Svasti, 2000. Alkyl glucoside synthesis using thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 22: 1889-1994
- Mackenzie, L.F., Q. Wang, R. A. J. Warren and S.G. Withers. 1998. Glycosynthase: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. **J. Am. Chem. Soc.** 120: 5583-5584
- Mayer, C., D.L. Zechel, S.P. Reid, R. A. J. Warren and S. G. Withers. 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is greatly improved glycosynthase. **FEBS Lett.** 466: 40-44
- Mayer, C., D. L. Jakeman, M. Mah, G. Karjala, L. Gal, R. A. J. Warren and S. G. Withers. 2001. Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium* β -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis. **Chem. Biol.** 8: 437-443
- Perugino, G., A. Trincone, M. Rossi and M. Moracci. 2004. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends Biotechnol.** 22: 31-37
- Pyo, Y., T. Lee and Y. Lee. 2005. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Res. Int.** 38: 551-559

- Sanz-Aparicio, J., A. J. Hermoso, M. Martinez-Ripoll, L. J. Lequerica and J. Polaina. 1998. Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insight into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. **J. Mol. Biol.** 275: 491-502
- Selmar, D. 1993 Apoplastic Occurrence of Cyanogenic β -Glucosidases and Consequences for the Metabolism of Cyanogenic Glucosides. In β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology. (A. Esen, Ed.) pp. 191-204. **American Chemical Society**, Washington D.C.
- Surarit, R., J. Svasti, C. Srisomsap, W. Suginta, S. Khunyoshyeng, S. Nilwarangkoon, P. Harnsakul and E. Benjavongkulchai. 1995. Screening of glycohydrolase enzyme in Thai plant seeds for potential use in oligosaccharide synthesis. **J. Sci. Soc. Thailand.** 21: 293-303
- Surarit, R., H. Matsui, S. Chiba, J. Svasti and C. srisomsap. 1996. Chemical modification of β -glucosidase/ β -fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre by conduritol B epoxide. **Biosci. Biotech. Biochem.** 60: 1265-1268
- Surarit, R., H. Matsui, S. Chiba, J. Svasti and C. srisomsap. 1997. Evidence for a single active site in β -glucosidase/ β -fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* seeds. **Biosci. Biotech. Biochem.** 61: 93-95
- Srisomsap, C., J. Svasti, R. Surarit, V. Champattanachai, K. Boonpuan, P. Sawangareetrakul, P. Subhasitanont and D. Chockchaichamnankit. 1996. Isolation and characterization of and enzyme with β -D-glucosidase/ β -D-fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. **J. Biochem.** 119: 585-590
- Srisomsap, C., P. Subhasitanont, S. Techasakul, R. Surarit and J. Svasti. 1999. Synthesis of homo- and hetero-oligosaccharides by thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 21: 947-951

- Svasti, J., C. Srisomsap, S. Techasakul and R. Surarit. 1999. Dalcochinin-8'- β -D-glucoside and its β -Glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochemistry** 50: 739-743
- Svasti, J., T. Phongsak and R. Santhima. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassava β -glucosidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 305: 470-475
- Toonkool, P., J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2003. β -glucosidase from Thai Plants. **Srinakarinwirot University Science Journal**. 19: 1-10
- Toonkool, P., P. Metheenukul, P. Sujiwattanasat, P. Paiboon, N. Tongtubtim, M. Ketudat-Cairns, J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2006. Expression and purification of dalcochinase, a β -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacteria hosts. **Protein Expres. Purif.** 48: 195-204
- Trimbur, D. E., A. J. Warren and S. G. Wither. 1992. Region-directed mutagenesis of residues surrounding the active site nucleophile in a β -glucosidase from *Agrobacterium faecalis*. **J. Biol. Chem.** 267: 10248-10251
- Verdoucq, L., J. Morinieres, D. R. Bevan, A. Esen, A. Vasella, B. Henrissat and M. Czjzek. 2004. Structural determinants of substrate specificity in family 1 β -glucosidases. **J. Biol. Chem.** 279: 31769-31803
- Weismann, C., W. Hengstenberg and E. G. Schulz. Crystal structure and mechanism of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactobacillus lactis*. **J. Mol. Biol.** 269: 851-860

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

1. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟเรซิส

เตรียม 1% อะกาโรส โดยชั่งผงอะกาโรส 1 g ละลายใน 1X TAE buffer (40 mM Tris, 0.1142%(v/v) acetic acid, 2 mM EDTA, pH 8.5) ปริมาตร 100 ml หลอมอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟ จนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดสำหรับเทเจล เสียบหัวลงไป ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ คึงหัวออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโตโฟเรซิส ใส่ 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล คูดสารละลายดีเอ็นเอผสมกับ loading buffer (50 mM EDTA, pH 8.0, 0.4%(w/v) bromphenol, 5% (w/v) glycerol) แล้วหยอดลงไปในช่วงในแผ่นเจลที่เตรียมไว้ ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อ loading buffer เคลื่อนที่ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของเจลจึงปิดเครื่อง จากนั้นนำเจลมาข้อมใน 0.5 µg/ml ethidium bromide แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า 10 นาที นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2. การเตรียม competent *E. coli* (DH5α) และ การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* โดยวิธี electroporation

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* (DH5α) ในอาหารเหลว LB (1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl) ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นานข้ามคืน คูดเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปริมาณ 2 ml เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีจนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5-1.0 เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงตามที่เรากำลังต้องการแล้วเก็บเซลล์แขวนลอยที่ได้ใส่หลอด แล้ววางบนน้ำแข็ง 15-30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เอาส่วนของเหลวออก ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่เย็นปริมาณ 200 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่เย็นปริมาณ 100 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10%(v/v) glycerol ที่เย็นปริมาณ 40 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10%(v/v) glycerol ที่เย็นปริมาณ 2.5 ml

การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* โดยวิธี electroporation ทำโดยนำ competent cell ปริมาตร 40 μ l ผสมกับดีเอ็นเอปริมาณ 1-10 ng วางบนน้ำแข็งนาน 1 นาที คูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน cuvette แล้ววางในเครื่อง electroporation (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด 200 โอห์ม 2.5 กิโลโวลต์ จากนั้นกดปุ่มที่เครื่อง electroporation เพื่อให้กระแสไฟฟ้าทำงาน แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 ml ทันที ย้ายเซลล์แขวนลอยที่ได้มาใส่หลอดทดลอง นำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดส่วนของเหลวออก 800 μ l ผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน และคูดเซลล์แขวนลอยมา 200 μ l เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB pH 7.5 ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μ g/ml ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

3. การเตรียม competent *P. pastoris* (GS115) และการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *P. pastoris* โดยวิธี electroporation

เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) ปริมาตร 5 ml ปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน คูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 ml ใส่ในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 ml ปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเซลล์ แล้วเอาส่วนของเหลวออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่เย็นปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 ครั้ง เอาส่วนของเหลวออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 1 M sorbitol ที่เย็นปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาส่วนของเหลวออก เติม 1 M sorbitol ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 100

การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *P. pastoris* โดยวิธี electroporation ทำโดยนำ competent cell ปริมาตร 80 μ l ผสมกับดีเอ็นเอปริมาณ 5 μ g ปริมาตร 10 μ l วางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที คูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน cuvette แล้ววางในเครื่อง electroporation (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด 200 โอห์ม 1.5 กิโลโวลต์ จากนั้นกดปุ่มที่เครื่อง electroporation เพื่อให้กระแสไฟฟ้าทำงาน แล้วเติม 1 M sorbitol ปริมาตร 1 ml ทันที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดส่วนของเหลวออก 800 μ l ผสมตะกอนเซลล์

ให้เข้ากันและดูดเซลล์แขวนลอยมา 200 μ l เติ้งบนอาหารแข็ง YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1M sorbitol) ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3-4 วัน

4. การสกัดพลาสมิดโดยวิธี Miniprep

เติ้งเชื้อในอาหารเหลว LB pH 7.5 ปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะ zeocin เข้มข้น 25 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน ดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปริมาตร 1.5 ml ใส่ลงใน eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ และนำส่วนของเหลวทิ้งไป เติ้สารละลาย 1 (50 mM กลูโคส, 25 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติ้สารละลาย 2 (1% SDS, 0.2 M sodium hydroxide) ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วเติ้สารละลาย 3 (3 M potassium acetate, 2 M acetic acid) ที่เย็น ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนของเหลวใส่ eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตร 2 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของเหลวทิ้งไป แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70%(v/v) ethanol ปริมาตร 150 μ l นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของเหลวทิ้งไป ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้แห้ง แล้วละลายด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 30 μ l

5. การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตร ทั้งหมด แล้วเติม 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมด วางบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาส่วนของเหลวออก ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70%(v/v) ethanol แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-3 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

6. การวิเคราะห์ห่อเล็กโตโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

เตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ดังตารางผนวกที่ ก1

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE

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

ละลายตัวอย่างใน 1X sample buffer (1%(w/v) SDS, 5%(v/v) glycerol, 1.25%(v/v) β -mercaptoethanol, 0.0025%(w/v) Coomassie blue G, 1.25 mM Tris, pH 6.8) ตั้งเป็นเวลา 10 นาที หยอดตัวอย่างลงในช่องพอลิอะคริลาไมด์เจล หลังจากนั้นต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 mA ใน 1X running buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine, 0.1%(w/v) SDS) เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ใน 50%(v/v) methanol นาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย staining solution (0.125%(w/v) Coomassie blue R, 45%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid) นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีออกด้วย destaining solution (25%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid) นาน 15-30 นาที

7. การวิเคราะห์ห่อเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Non-denaturing-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Non-denaturing PAGE)

เตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ดังตารางผนวกที่ ข2

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Non-denaturing PAGE

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

ละลายตัวอย่างใน 1X sample buffer (12.5%(w/v) bromophenol blue, 1.25 mM Tris, pH 6.8, 10% (w/v) glycerol) หยอดตัวอย่างลงในช่องพอลิอะคริลาไมด์เจล ต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 mA ใน 1X running buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucose แล้วตรวจสอบการเรืองแสงของแถบเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีกิจกรรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

8. การทำเวสเทิร์นโบลอต (Western blot)

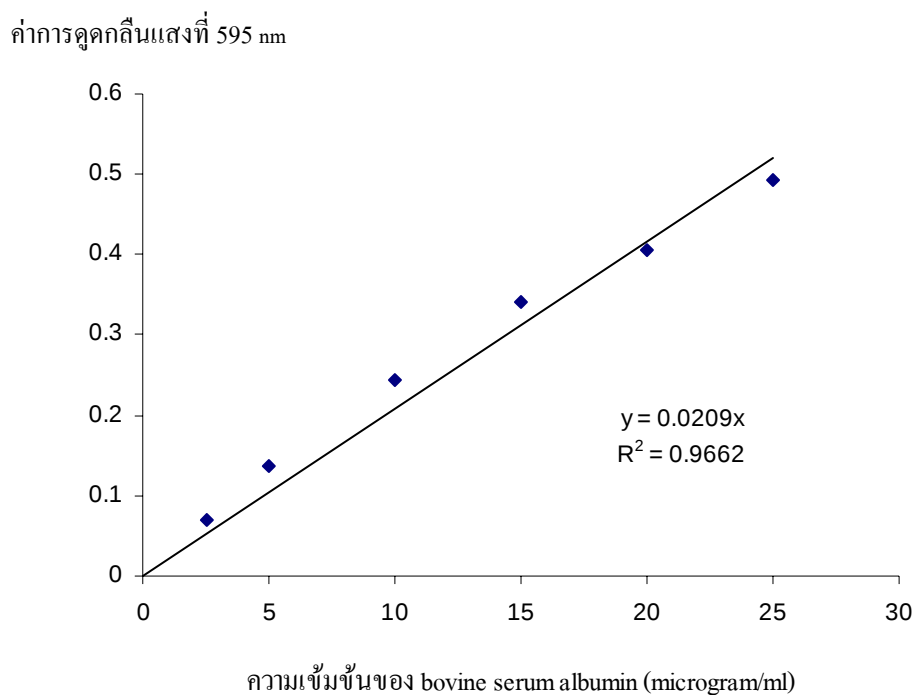
นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (จากข้อ 6) มาแช่ใน transfer buffer (10 mM Tris, 100 mM glycine) นาน 20 นาที ตัดเมมเบรนชนิด polyvinylidene fluoride ให้มีขนาดใหญ่มากกว่าเจลเล็กน้อยจำนวน 1 แผ่น แช่ใน methanol นาน 5 วินาที แล้วนำไปแช่ใน transfer buffer นาน 10 นาที สำหรับกระดาษกรองตัดให้มีขนาดเท่ากับเมมเบรนจำนวน 6 แผ่น แช่ใน transfer buffer นาน 5 นาที จากนั้นทำการย้ายโปรตีนโดยวางกระดาษกรอง 3 แผ่น ตามด้วยเมมเบรน เจล และกระดาษกรองอีก 3 แผ่น ตามลำดับ และใช้เครื่อง Trans-

Blot®Semi-Dry (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 10 V นาน 30 นาที จากนั้นนำเมมเบรนมาแช่ใน 5%(w/v) skim milk ที่ละลายอยู่ใน phosphate buffer saline plus tween pH 7.5 (PBST) ($80 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 1 M NaCl , $0.1\% \text{ tween } 20$) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้ง แล้วบ่มกับ mouse monoclonal antibody against natural dalcocinase (primary antibody) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้ง แช่เมมเบรนใน PBST นาน 15 นาที 1 ครั้ง แล้วแช่ใน PBST ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นบ่มกับ horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal antibody against mouse immunoglobulins (secondary antibody) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้ง แช่เมมเบรนใน PBST นาน 15 นาที 1 ครั้ง แล้วแช่ใน PBST ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเมมเบรนมาบ่มกับ ECL plus Western Blotting Detection System นาน 5 นาที แล้วนำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม นาน 1 นาที แล้วแช่แผ่นฟิล์มใน developer, fixer และน้ำกลั่นตามลำดับ

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$ โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μl และเติม Coomassie Plus Reagent ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

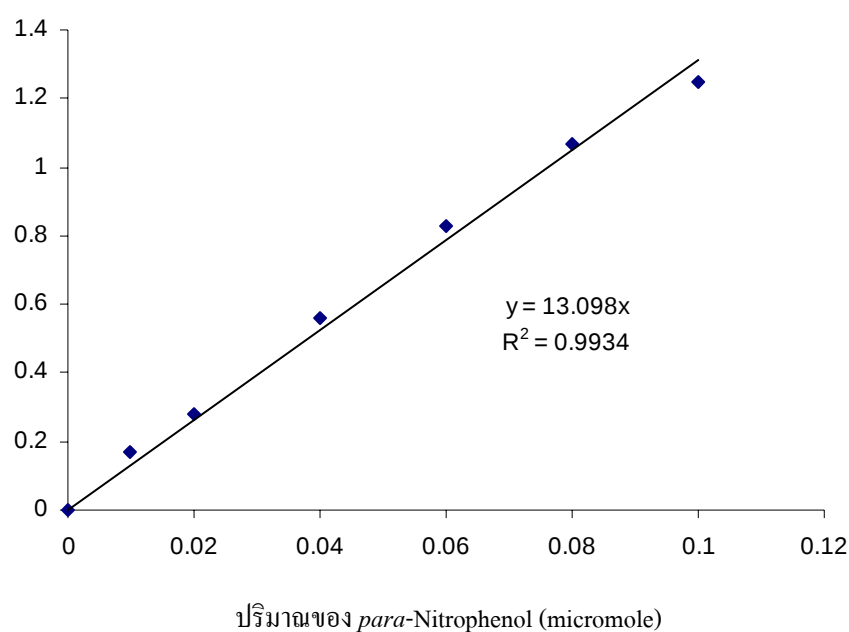


ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐาน BSA

2. กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (*p*NP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*NP ให้มีปริมาณ 0-0.1 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

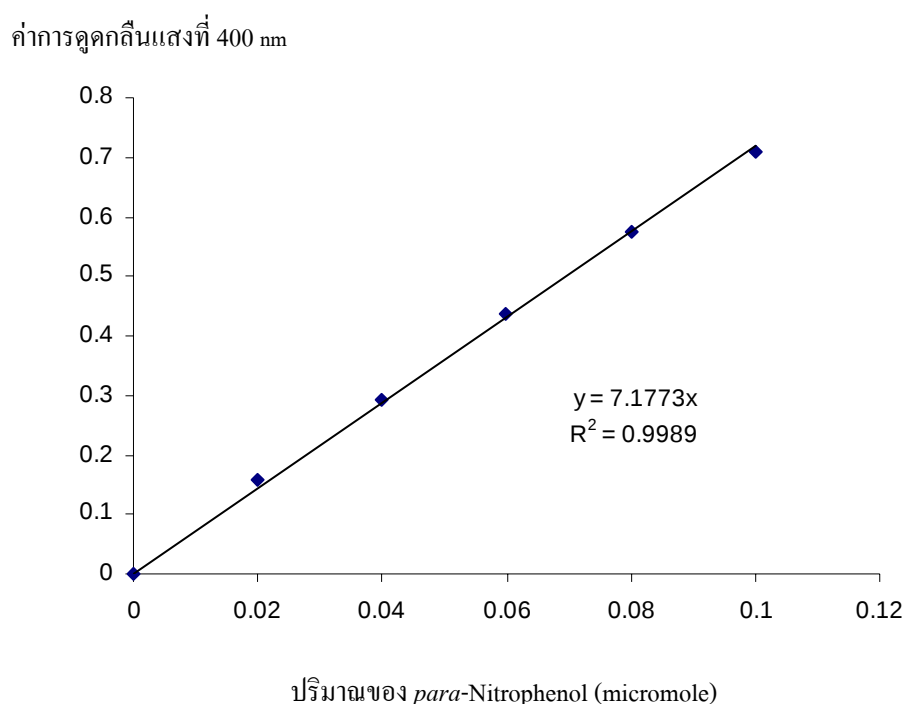
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐาน *p*NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

3. กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (*p*NP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

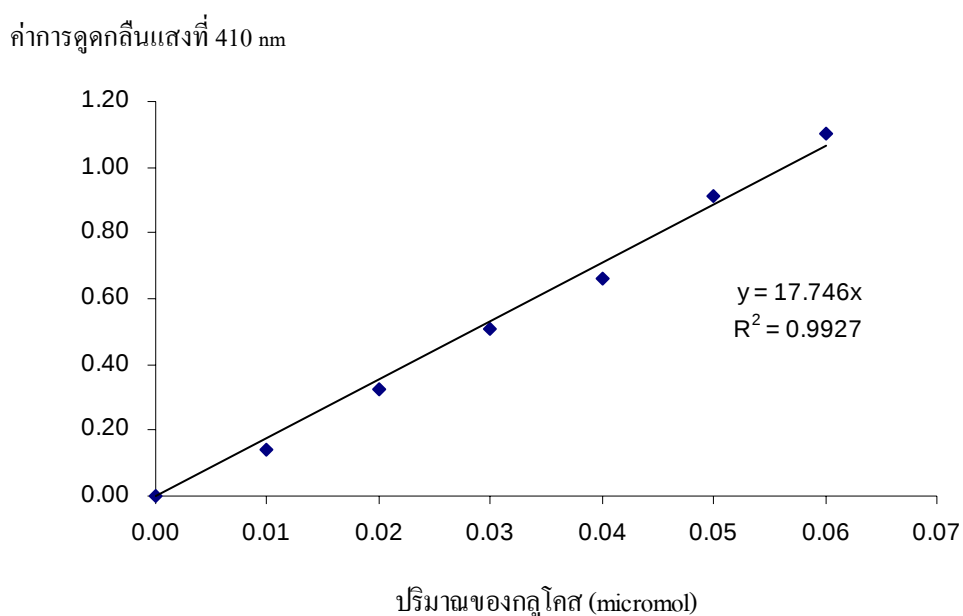
เตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*NP ให้มีปริมาณ 0-0.1 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐาน *p*NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

4. กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีปริมาณ 0-0.06 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl เติม 2 mg/ml ABTS ปริมาตร 50 μl และ glucose oxidase kit (5 unit/ml) ปริมาตร 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

GACTTTTACGACNACTTGAGAAGATCAAAAAACAACATAATTATTGAAACGATGAGATTTCTTCAATT
 TTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAA
 ACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTT
 TTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCT
 AAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCAT
 GCTGCAGTTCTCCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCAATTTTGGGACAGCATCCTCCTCG
 TACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAG
 ATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATC
 ATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCAACGGGGTA
 GGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGGCC
 AATGGCATAACCCCCATTTGTAACCATTTTTTATTGGNATCTTCCCCAAGCCTNGGNGGANGAGTACGG
 GGGGCTTCTTNAANNNAANCNGTGGNAAANGATTTCCAAANCTANGNGGGATTTTGNCTNCCANTTTNTT
 GGGAAANNNGGNAAGCNTTGGGATTTCCCTAANGNGCCNCNCTTTCCCCGAANGGGTAGCCNCNGG
 NATGTTTGGCCCNCGNC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่คาดว่าจะน่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

Query: 893 ttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 952
 ||| ||||| |||||||
 Sbjct: 4 ttttacgacnacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 63

Query: 953 tcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacact1012
 |||||||
 Sbjct: 64 tcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacact 123

Query: 1013 acaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagattta1072
 |||||||
 Sbjct: 124 acaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagattta 183

Query: 1073 gaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttattg1132
 |||||||
 Sbjct: 184 gaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttattg 243

Query: 1133 tttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaa1192
 |||||||
 Sbjct: 244 tttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaa 303

Query: 1193 agagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctccattc1252
 |||||||
 Sbjct: 304 agagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctccattc 363

Query: 1253 aaccgaagctgttttccttcagattttcatTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTAT1312
 |||||||
 Sbjct: 364 aaccgaagctgttttccttcagattttcatTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTAT 423

Query: 1313 gaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaaag1372
 |||||||
 Sbjct: 424 gaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaaag 483

Query: 1373 atagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaaggat1432
 |||||
 Sbjct: 484 atagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaaggat 543

Query: 1433 attgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatag-aatgtccatctcctggcctag1491
 |||||
 Sbjct: 544 attgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaaatgtccatctcctggcctag 603

Query: 1492 aattctcccaac-gggtagggtagtgaggagcataaaccacacaggagttgactactaca1550
 |||||
 Sbjct: 604 aattctcccaacgggttagggtagtgaggagcataaaccacacaggagttgactactaca 663

Query: 1551 acaggctcatcaatgagtcact-ggccaatggcataa-caccatttgaaccatttttca1608
 |||||
 Sbjct: 664 acaggctcatcaatgagtcactgggccaatggcataacccccatttgaaccatttttca 723

Query: 1609 ttgggatcttccacaagccttggaggatgagtag-ggtggcttcttaaatcatagc-gtt1666
 |||||
 Sbjct: 724 ttggnatcttcccaagcctngnggangagtaggggggcttctttnaannnaancggtg 783

Query: 1667 gtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggtaaag1726
 |||||
 Sbjct: 784 gnaaangatttccaaanctangngggattttgncntnccanttnttgggaannggnaaag 843

Query: 1727 cattgg 1732
 |||||
 Sbjct: 844 cnttgg 849

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ I185A โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

TCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATAT
 CCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCCGCTATAAGAAGGAT
 ATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCCA
 ACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCA
 CTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAG
 TACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTA
 TTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAGCTTTCACCGCGAATGGGTATGCA
 TACGGTATGTTTGCACCGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGATGCAGGA
 ACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGG
 GAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCCCTTGCACGTAGTTTGGGTTATACCGCTTTN
 CAAATAGCACATCANATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCNCATGTGGATGGTTTATGGACC
 CNCTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGANATCGATTGCCTAAGTTTACTA
 CAAATCAGCCNAATNANTAANGGTTCAATTTGATTTTNGGACTAACTNTACCCCTACTTGCTNCCAA
 TCAAAGGGTCAACTGNTGCCCTAGTACNCNAAAATCCCAGTCTCCTACGCACNAAGGGGCCTTAAG
 GCNGGNCCCCNGANGGNGGCTTNNCNAAGACTCANATTTTGTCTTTCA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ I185A ที่คาดว่าจะเป็
 Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ I185A ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

Query: 1295 tcctcctcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacc1354
 |||||
 Sbjct: 1 tcctcctcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacc 60

Query: 1355 caccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatggtgcagttgaccaattt1414
 |||||
 Sbjct: 61 caccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatggtgcagttgaccaattt 120

Query: 1415 caccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatg1474
 |||||
 Sbjct: 121 caccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatg 180

Query: 1475 tccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaaca1534
 |||||
 Sbjct: 181 tccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaaca 240

Query: 1535 ggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccattt1594
 |||||
 Sbjct: 241 ggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccattt 300

Query: 1595 gtaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggcttctta1654
 |||||
 Sbjct: 301 gtaaccatttttcattgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggcttctta 360

Query: 1655 aatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttgga1714
 |||||
 Sbjct: 361 aatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttgga 420

Query: 1715 gatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcagctttcaccgcgaatgggtat1774
 |||||
 Sbjct: 421 gatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcagctttcaccgcgaatgggtat 480

Query: 1775 gcatacggtatgtttgcaccaggctgatgttctccatcgtaaatccaacttgcacaggt1834
 |||||
 Sbjct: 481 gcatacggtatgtttgcaccaggctgatgttctccatcgtaaatccaacttgcacaggt 540

Query: 1835 ggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgcagca1894
 |||||
 Sbjct: 541 ggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgcagca 600

Query: 1895 actgtccaagtgtacaaaa-ggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatttc1953
 |||||
 Sbjct: 601 actgtccaagtgtacaaaagggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatttc 660

Query: 1954 cttgcacgtagtttgggttataaccgcttt-caaatagcacatcagatcaaaatgctaccc2012
 |||||
 Sbjct: 661 cttgcacgtagtttgggttataaccgctttncaaatagcacatcanatcaaaatgctaccc 720

Query: 2013 agcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggtatc2072
 |||||
 Sbjct: 721 agcgatatcttgacttcncatgtggatgggttatggaccncttacagcaggaaggtatc 780

Query: 2073 cagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagcca2132
 |||||
 Sbjct: 781 cagatagcatgcaatatctagttgganacgattgcctaagtttactacaaatc-agccn 839

Query: 2133 aattagttaagggttcatttgattttattggactaaact 2171
 ||| | |||
 Sbjct: 840 aatna-ntaanggttcatttgatttt-tnggactaaact 876

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

TTTGGAGATAGGGTAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAGCTTTCACCGCGAATGGGTATGCAT
 ACGGTATGTTTGCACCAAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTGCACAGGTGGGGATGCAGGAA
 CAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGACAAAAGGA
 AGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAGTTGGGTTATACCGCTTTCAA
 ATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCAC
 TTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAG
 ATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTA
 CCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGC
 AACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTC
 GAGATTTGTTGCTTTACTTTCAAGGAAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGGTATA
 GATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTGGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTAT
 TATCGGCCATCTCTTTTATGTTTCGANATGCAATTAGGNCNNGGCGCNAANNNGGAAAGGATTTTTTGCA
 TGGNCATGNTNGGAAAACCTNNANNGGGCTGAGGGTTAACNTCCNGGATTGGATTATTTTGGGAACT
 ACNCACTTGNAAAA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่คาดว่าจะจะเป็น
 Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1709 tttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcagctttcaccgccaat1768
 |||||
 Sbjct: 1 tttggagatagggtaa-gcattggattacactaaatgagccatcagctttcaccgccaat 59

Query: 1769 gggatgcatacggatggttgcaccaggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgc1828
 |||||
 Sbjct: 60 gggatgcatacggatggttgcaccaggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgc 119

Query: 1829 acaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcat1888
 |||||
 Sbjct: 120 acaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcat 179

Query: 1889 gcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggc1948
 |||||
 Sbjct: 180 gcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggc 239

Query: 1949 atttccttgacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgct2008
 |||||
 Sbjct: 240 atttccttgacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgct 299

Query: 2009 acccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggtttatggaccacttacagcaggaagg2068
 |||||
 Sbjct: 300 acccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggtttatggaccacttacagcaggaagg 359

Query: 2069 tatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaa2128
 |||||
 Sbjct: 360 tatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaa 419

Query: 2129 gccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat2188
 |||||
 Sbjct: 420 gccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat 479

Query: 2189 gctaccaaatacagatgctgcaacatgctgccacctagttacctcacagatcctcaagtc2248
 |||||
 Sbjct: 480 gctaccaaatacagatgctgcaacatgctgccacctagttacctcacagatcctcaagtc 539

Query: 2249 actctcttacagcaacgcaatggggctctttataggtccagtgactccctcaggatggatg2308
 |||||
 Sbjct: 540 actctcttacagcaacgcaatggggctctttataggtccagtgactccctcaggatggatg 599

Query: 2309 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaagg-aaaagtataacaa2367
 |||||
 Sbjct: 600 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaaagtataacaa 659

Query: 2368 tcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcact2427
 |||||
 Sbjct: 660 tcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcact 719

Query: 2428 tgaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatc-gtcatctcttttatg2486
 |||||
 Sbjct: 720 ggaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcggccatctcttttatg 779

Query: 2487 ttcgatatgcaattaggtc-tggcgc-aaatgtgaaaggattttttgcatggtcattgtt2544
 |||||
 Sbjct: 780 ttcganatgcaattaggnncnnggcgnaanngggaaaggattttttgcatggncatgntn 839

Query: 2545 ggacaactttgaatgggctgaggggtatacatcacgatttgattatattttgtgaacta2604
 ||| |||||
 Sbjct: 840 ggaaaacttnnannggctgaggggttaacntccnggatttgatt-tattttgggaacta 898

Query: 2605 c 2605
 |
 Sbjct: 899 c 899

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

ANGCCAAATTAGTTAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAA
 ATCAGATGCGTCAACATGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACG
 CAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGA
 TTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGA
 GAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCG
 TCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATT
 GTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAACCTACACTAC
 TTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGC
 TAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGATCAAGGAAGAAAGACAAAA
 CCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGTA
 CGTAGAATTCACGTGGCCCGAGCNGGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCCAGCTTT
 TCTAAAAACAAAACCTCATCTCAAAAAAGGATCTGAATAGCGCCGTGACCATCATCATCATCNTCATGGA
 ANTTGNAGCCCTANACATGACTGTNCCCCAGTTTCAAGGTNNGGCCNTTACNAAAAAACGGGCTTGCTAN
 ATCTAATCAAAGGAGGCCNAAAGCCNTTNGC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query:2129 gccaaattagttaaggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat 2188
 |||||
 Sbjct:3 gccaaattagtta-ggggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat 61

Query:2189 gctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtc 2248
 |||||
 Sbjct:62 gctaccaaatacagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtc 121

Query:2249 actctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatg 2308
 |||||
 Sbjct:122 actctcttacagcaacgcaatgggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatg 181

Query:2309 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaat 2368
 |||||
 Sbjct:182 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaat 241

Query:2369 cctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcactt 2428
 |||||
 Sbjct:242 cctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcactt 301

Query:2429 gaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatggt 2488
 |||||
 Sbjct:302 gaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatggt 361

Query:2489 cgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggac 2548
 |||||
 Sbjct:362 cgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggac 421

Query:2549 aactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacact 2608
 ||
 Sbjct:422 aactttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacact 481

Query:2609 actttgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggtcaagtattttctggcacgtgat 2668
 ||
 Sbjct:482 actttgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggtcaagtattttctggcacgtgat 541

Query:2669 caagagagtgcataaattggaaattttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatg 2728
 ||
 Sbjct:542 caagagagtgcataaattggaaattttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatg 601

Query:2729 atcaaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaa 2788
 ||||||||| ||
 Sbjct:602 atcaaggaag-aaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaa 660

Query:2789 tcactagtgaattcgcgccgcctgcagtacgtagaattcacgtggcccagccggccgtc 2848
 ||
 Sbjct:661 tcactagtgaattcgcgccgcctgcagtacgtagaattcacgtggcccagcnggccgtc 720

Query:2849 tcggatcgggtacctcgagccgcgggcgccg-ccagctttctagaacaaaaactcatctca 2907
 |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| || ||||||||||||
 Sbjct:721 tcggatcgggtacctcgagccgcgggcgccgcccagcttttctaaaacaaaactcatctca 780

Query:2908 gaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagttttagtcctt 2967
 || || |||| || |||| ||||
 Sbjct:781 aaaaaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcntcatggaanttgnagccct 840

Query:2968 agacatgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagatt 3027
 | ||||||||| || ||||||| || |||| |||| | || | || ||||||| |
 Sbjct:841 anacatgactgtnccccagttcaggtngggccnttacnaaaaaaacgggcttgctana-t 899

Query:3028 ctaatcaa 3035
 ||||||||
 Sbjct:900 ctaatcaa 907

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ V255F

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

GACTTTTACGACAACCTTGAGAAGNTCAAAAAACAACCTAATTATTTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATT
 TTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAA
 ACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTT
 TTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCT
 AAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCAT
 GCTGCAGTTCCTCCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTGGGACAGCATCCTCCTCG
 TACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAG
 ATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATC
 ATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGGGTAGG
 GTTAGTGGAGGCATAAACCACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCCCTGGNCAAT
 GGCATAACACCATTTTTGTAACCATTTTTNCATTGGGNATCTTNCCNNAGNCCTTGGGAGGATGAGTACG
 GGGGCTTCTTAAATCATAAGCGNTGGNAAAANGATTTCCAAGACTATGCGGGATTTTGNCTTCCAATTAT
 TTGGGAAAAAGGGGTAAAGCNTTGGGNTTANCNTAANGGNCCNTCAANCTTCCCCGCGAANGGGTNTG
 CNNCNGGTTGTTTGNCCCCAGGCNNNGTTCCCCCNNNANAAACC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ V255F ที่คาดว่าจะน่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ V255F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

Query: 893 ttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 952
 ||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 4 ttttacgacaacttgagaagntcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttcct 63

Query: 953 tcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaaacact1012
 |||
 Sbjct: 64 tcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaaacact 123

Query: 1013 acaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcgggtactcagattta1072
 |||
 Sbjct: 124 acaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcgggtactcagattta 183

Query: 1073 gaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacggggtattg1132
 |||
 Sbjct: 184 gaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacggggtattg 243

Query: 1133 tttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaa1192
 |||
 Sbjct: 244 tttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaa 303

Query: 1193 agagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctccattc1252
 |||
 Sbjct: 304 agagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctccattc 363

Query: 1253 aaccgaagctgttttccttcagattttcatTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTAT1312
 |||
 Sbjct: 364 aaccgaagctgttttccttcagattttcatTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTAT 423

Query: 1313 gaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaaag1372
 |||
 Sbjct: 424 gaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaaag 483

```

Query: 1373 atagcggatagaagcaacggagatgttgacgttgaccaatttcacccgtataagaaggat1432
      |||
Sbjct: 484 atagcggatagaagcaacggagatgttgacgttgaccaatttcacccgtataagaaggat 543

Query: 1433 attgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcctaga1492
      |||
Sbjct: 544 attgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcctaga 603

Query: 1493 attctcccaacgggtagggttagtggaggcataaaccaaacaggagttgactactacaac1552
      |||
Sbjct: 604 attctcccaacgggtagggttagtggaggcataaaccaaacaggagttgactactacaac 663

Query: 1553 aggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacacca-tttgtaaccattttt-catt1610
      |||
Sbjct: 664 aggctcatcaatgagtccttggccaatggcataacaccattttgtaaccatttttncatt 723

Query: 1611 ggg-atcttccacaagcc--ttggaggatgagtacgggtggcttcttaaatcat-agcgtt1666
      ||| |||| | || | |||
Sbjct: 724 gggnatcttncnnagnccttgggaggatgagtacgggggcttcttaaatcataagcgnt 783

Query: 1667 -gtaaattgatttccaagactatgc-ggatctttgcttccaattatttgg--agatagggt1722
      | |||
Sbjct: 784 ggnaaangatttccaagactatgcgggattttgncttccaattatttgggaaaaaggggt 843

Query: 1723 aaagcatt-ggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgc 1776
      |||| | || | || | |||
Sbjct: 844 aaagcatttgggnttancntaangnnccntcaancttccccgcgaanggggtntgc 898

```

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGGCGCATCCTCCTCGTCCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCAC
CAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAG
AAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAC TTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATT
CTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAAT
GAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAG
GATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTC
CAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGAATGGG
TATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAAC TTGCACAGGTGGGGAT
GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACATGATCTTTCTCATGCAAGCAGCATGTGCCANGTGTAC
AAAAGGAAGTATCAGGAACATCANAAAGNACNATAGGCATTTCTTGNCNGTATTTNNGGTTATACCGC
TTTNCNAATAGCCCATC NNATCAAATGCTNCCNGCGATTCTGNANTCCCAGGGGANGGNTTAGGNACCC
TTACGCNNGGAAGGNNCCCAAAGC NNGNANNTCNAGTGGAANC GATGNCCAANTTNACAAATN

Query: ลำดับเบสของยีนคัดโคซินสกลายพันธุ์ V255F ที่คาดว่าจะจะเป็น
Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัดโคซินสกลายพันธุ์ V255F ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TRF1

Query: 1292 gcacccctcctcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttc1351
 |||||
 Sbjct: 5 gcacccctcctcgt-ccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttc 63

Query: 1352 acccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgacgttgaccaa1411
 |||||
 Sbjct: 64 acccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgacgttgaccaa 123

Query: 1412 tttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttataga1471
 |||||
 Sbjct: 124 tttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttataga 183

Query: 1472 atgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaa1531
 |||||
 Sbjct: 184 atgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaa 243

Query: 1532 acaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacacca1591
 |||||
 Sbjct: 244 acaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacacca 303

Query: 1592 tttgtaaccatttttcatctgggatcttccacaagccttggaggatgagtagcgggtggcttc1651
 |||||
 Sbjct: 304 tttgtaaccatttttcatctgggatcttccacaagccttggaggatgagtagcgggtggcttc 363

Query: 1652 ttaaatcatagcgttgtaaattgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattattt1711
 |||||
 Sbjct: 364 ttaaatcatagcgttgtaaattgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattattt 423

Query: 1712 ggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatggg1771
 |||||
 Sbjct: 424 ggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatggg 483

Query: 1772 tatgcatacgggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtacaatccaacttgaca1831
 |||||
 Sbjct: 484 tatgcatacgggatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgtacaatccaacttgaca 543

Query: 1832 ggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttctcatgca1891
 |||||
 Sbjct: 544 ggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttctcatgca 603

Query: 1892 gcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatt1951
 ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 604 gcacctgtccangtgtacaaaaggaagtatcaggaacatca-naangnacnataggcatt 662

Query: 1952 tccttgacgtattttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaa 2003
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 663 tccttgacgtattttgggttataaccgctttcaaatagccatcnnatcaaa 714

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

GGAGATAGGGTAAGCATTGGATTCACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGAATGGGTATGCATACGG
 GGAGATAGGGTAAGCATTGGATTCACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGAATGGGTATGCATACGG
 TATGTTTGCACAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGA
 GACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTA
 TCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTATTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAG
 CACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTAC
 AGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCA
 AGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAA
 ATCAGATGCGTCAACATGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACG
 CAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGA
 TTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGNAAAATGGTATAGATG
 AGAAGAATGGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGAAAGACACTTTATAGAATTGANAGTTATTA
 CGCCANCNCNTTTANGTNCNAAATGCAATTAGGNCTGGNNCAANNNGAAANGNNTTTTGCNNGGNCNT
 GGTGGACAANTTGAANGGNTGAAGGGTTNNACNCNCGAATTGGNATNANATTTGGGGAANNNCCANC
 TTGA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1712 ggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgCGAATggg1771
 |||

Sbjct: 1 ggagatagggtaa-gcattggatt-cactaaatgagccatcaatcttcaccgCGAATggg 58

Query: 1772 tatgcatacggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgTACAATCCAACCTgcaca1831
 |||

Sbjct: 59 tatgcatacggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgTACAATCCAACCTgcaca 118

Query: 1832 ggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgca1891
 |||

Sbjct: 119 ggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgca 178

Query: 1892 gcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatt1951
 |||

Sbjct: 179 gcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatt 238

Query: 1952 tccttgcacgtaTTTggggtataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctacc2011
 |||

Sbjct: 239 tccttgcacgtaTTTggggtataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctacc 298

Query: 2012 cagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacattacagcaggaaggat2071
 |||

Sbjct: 299 cagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacattacagcaggaaggat 358

Query: 2072 ccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagcc2131
 |||

Sbjct: 359 ccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagcc 418

Query: 2132 aaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct2191
 |||||
 Sbjct: 419 aaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct 478

Query: 2192 accaaatcagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcact2251
 |||||
 Sbjct: 479 accaaatcagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcact 538

Query: 2252 ctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgc2311
 |||||
 Sbjct: 539 ctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgc 598

Query: 2312 atttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcct2371
 |||||
 Sbjct: 599 atttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcct 658

Query: 2372 ttggtttacatcactg-aaaatggtatagatgagaagaat-gatgcatcactatcacttg2429
 |||||
 Sbjct: 659 ttggtttacatcactgnaaaatggtatagatgagaagaatggatgcatcactatcacttg 718

Query: 2430 aggaatccttgatagacac-ttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgtt2488
 |||||
 Sbjct: 719 aggaatccttgaaagacactttatagaattganagttatta-cgccancncntttangtn 777

Query: 2489 cgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatggtcattgttggac2548
 |||||
 Sbjct: 778 cnaaatgcaattaggnctgggnc-aannngaaangnntttttgcnnggncntggttggac 836

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีโคซินเนสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

GNTCTCGNTCAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACTAACT
 ATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCT
 TACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAG
 GACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATG
 GTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATA
 GTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTTCGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTG
 CATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTATTGGTTATACATCACGATTGGATTATATTTTGTGA
 ACTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATC
 AAGAGAGTGCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGGAGCTTATCAACGATGATCAAGGAA
 GAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCNCTAGTGNANTCNCGG
 CCGCCTGCAGTACGTAAAATNCCGNGGCCAGCCGGCCGNNCGGATCGGTACCCNAGCCNGGGGGCCCC
 NGCTTTCTANANAAAACNNTCNCAAAAAGANCGGAAACNCCCCACNNCCCCCNNCATGAGTNGGAC
 CNTAAAAAGANGTCCCATCAGTGGGCNTNCAAAAACCGGCTGCTAATCTACAAAAGGGCCAAGCCNTN
 NCCGAAANCNGCCNTTTGACTTTTTTGGACCAAAAAAGATTTTTTGCCTNNTTNCNCANCGCCNCACC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ที่คาดว่าจะน่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2128 agccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaacta2187
 |||
 Sbjct: 11 agccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaacta 70

Query: 2188 tgctaccaaatacagatgcgtcaacatgctgccacactagttacctcacagatcctcaagt2247
 |||
 Sbjct: 71 tgctaccaaatacagatgcgtcaacatgctgccacactagttacctcacagatcctcaagt 130

Query: 2248 cactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggat2307
 |||
 Sbjct: 131 cactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggat 190

Query: 2308 gtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggttgctttacttcaaggaaaagtataacaa2367
 |||
 Sbjct: 191 gtgcatttatccaaaaggacttcgagatttggttgctttacttcaaggaaaagtataacaa 250

Query: 2368 tcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcact2427
 |||
 Sbjct: 251 tcctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcact 310

Query: 2428 tgaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctcttttatgt2487
 |||
 Sbjct: 311 tgaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctcttttatgt 370

Query: 2488 tcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggttga2547
 |||
 Sbjct: 371 tcgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggttga 430

Query: 2548 caactttgaatgggctgaggggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacac2607
 |||
 Sbjct: 431 caactttgaatgggctattggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacac 490

Query: 2608 tactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtga2667
 |||
 Sbjct: 491 tactttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtga 550

Query: 2668 tcaagagagtgcataattggaaatttttagcaccaaaggcaagat-ggagcttatcaacga2726
 |||
 Sbjct: 551 tcaagagagtgcataattggaaatttttagcaccaaaggcaagatgggagcttatcaacga 610

Query: 2727 tgatcaaggaagaaaagacaaaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatctt2786
 |||
 Sbjct: 611 tgatcaaggaagaaaagacaaaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatctt 670

Query: 2787 aatcactagtgatttcgcgccgcctgcagtacgtagaattcacgtggcccagccggccg2846
 |||
 Sbjct: 671 aatcactagtgantcncggccgcctgcagtacgtaaaatnc-cngggcccagccggccg 729

```
Query: 2847 tctcggatcggtacc 2861
          |||||
Sbjct: 730  -nncggatcggtacc 743
```

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนดัล โคชินสกลายพันธุ์ G367S

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ G367S โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

TCCGTTATATACAACCTTTTCTACGACAACCTTCGACGAAGATCAATAAACAACTAATTATTCGAAACGAT
 GAGATTTTCCTTCTATTTTTACTGCTGATTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACAC
 TACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA
 TTTTCGATGTTGCTGATTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTAT
 TGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCAACA
 TCCCCATCATCACCATGCTGCAGTTCCTCCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCATATTTTCATTTTTGG
 GACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGAGAGGGTAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCA
 CCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACCGAGATGTTGCAGCTGACCAATTTACCAGTTATAA
 GAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGACCTAGAAT
 TCTCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACTACAGGCTCATCCA
 TGAGACACTGGAAAATGGCATAACACCATTTGTAACCATCTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGA
 GGATGAGTACCGTGGCTTCCTAAATCATAGCGTTGTAAAGATTTACAAAACTATTCCGATCTTTGCT
 ACCAAATATCTGGAGATAGGGCAAAGCATCGGATTAACATAAATGAACCATCAATCTCCCCCAAATGGG
 TACCCTACCGAATGATTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCTAAAATTAAATTCGACCCGGGGGGATGTT

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ G367S ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ G367S ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

Query: 909 gaagatcaaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatttccttcaatttttactgctg 968
 ||||| |||||
 Sbjct: 36 gaagatcaataaacaactaattatttcgaaacgatgagatttccttctatttttactgctg 95

Query: 969 ttttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacactacaacagaagatgaaa1028
 ||||| |||||
 Sbjct: 96 atttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacactacaacagaagatgaaa 155

Query: 1029 cggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatg1088
 ||||| |||||
 Sbjct: 156 cggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatg 215

Query: 1089 ttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttattgtttataaataactacta1148
 ||||| |||||
 Sbjct: 216 ttgctgatttgccattttccaacagcacaaataacgggttattgtttataaataactacta 275

Query: 1149 ttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctg1208
 ||||| |||||
 Sbjct: 276 ttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctg 335

Query: 1209 cacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctccattcaaccgaagctgttttc1268
 ||||| |||||
 Sbjct: 336 cacatcaacatccccatcatcaccatgctgcagttcctccattcaaccgaagctgttttc 395

Query: 1269 cttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtaccagtatgaaggtaggggagag1328
 ||||| |||||
 Sbjct: 396 cttcatatttcatttttgggacagcatcctcctcgtaccagtatgaaggtagggtagag 455

Query: 1329 taccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagca1388
 |||||
 Sbjct: 456 taccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagca 515

Query: 1389 acggagatggttgagcttgaccaatctcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaagg1448
 || |||||
 Sbjct: 516 accgagatggttgagcttgaccaatctcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaagg 575

Query: 1449 atatgaacttgatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggta1508
 |||||
 Sbjct: 576 atatgaacttgatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggta 635

Query: 1509 gggtagtgaggcataaaccacacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagt1568
 |||||
 Sbjct: 636 gggtagtgaggcataaaccacacaggagttgactactactacagggtcatccatgaga 695

Query: 1569 cactggccaatggcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagcct1628
 |||||
 Sbjct: 696 cactggaaaatggcataacaccatttgaaccatttttcattgggatcttccacaagcct 755

Query: 1629 tggaggatgagtacggtggcttcttaaatcatagcgttgtaaagtattt-ccaagactat1687
 |||||
 Sbjct: 756 tggaggatgagtaccgtggcttcttaaatcatagcgttgtaaaagatttacaaaaactat 815

Query: 1688 gcggatctttgcttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgag1747
 | |||||
 Sbjct: 816 tccgatctttgcttccaatatctggagatagggcaaagcatcggatta-actaaatgaa 874

Query: 1748 ccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccagggtcgatgttct1807
 |||||
 Sbjct: 875 ccatcaatc-tcccccaaatgggta-ccctaccgaatgattgcaccagggtcgatgttct 932

Query: 1808 ccatc 1812
 |||||
 Sbjct: 933 ccatc 937

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจินสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

AAGAAAATTTTTAAAAAGCATACAACCTCGTACAGTATGAATGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGTG
 GATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAA
 TTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACTTGGATGCTTATAGAATGTCCATC
 TCCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTAC
 AACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAAACATTTTTCATTGGGATCTT
 CCACAAGCCTTGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTAT
 GCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATC
 TTCACCGCAAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGACACAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAAC
 TGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTTTCTCATGCAGCA
 ACTGTCCAAGTGACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGTA
 GTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACA
 TGTGGATGGTTTATGGACCACTTACAGCACGAAGGTATCCAGATAGCATGCTATATCTAGTTGGAGAT
 CGAATGCCTAACTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTAATTGGACTAAA

CCATTACACCACTAACTATGCTACCCAAATCAAATGCGTTAACATTGCTGCTCCACCCAATTTACCCC
CCACATCCTCCAAGGCC

Query: ลำดับเบสของยีนดัล โคจินในสกลายพันธุ์ G367S ที่คาดว่าจะ

Subjct : ลำดับเบสของยีนคัดโคซินสกลายพันธุ์ G367S ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

```
Query: 1307 cagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatg-ggataacttcaccaccaatatcc1365
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 33   cagtatgaatgtgagggcagagtaccaagtatatgtggataacttcaccaccaatatcc 92
```

Query: 1366 agaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgaccaatttcaccgctataa1425
 |||
 Sbict: 93 agaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgaccaatttcaccgctataa 152

Query: 1426 gaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctg1485
 |||||
 Sbjct: 153 gaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctg 212

Query: 1486 gcctagaattctcccaacgggtagggttagtgaggcataaaccaaacaggagttgacta1545
 |||
 Sbict: 213 qcctagaattctcccaacgggtagggttagtgaggcataaaccaaacaggagttgacta 272

Query: 1546 ctacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttt1605
 |||
 Sbjct: 273 ctacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttt 332

Query: 1606 tcattgggatcttcacaaagccttggaggatgagtacggtggcttcttaaatcatagcgt1665
 Sbict: 333 tcattgggatcttcacaaagccttggaggatgagtacggtggcttcttaaatcatagcgt 392

Query: 1666 tgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggtaaa1725
|||||
Sbjct: 393 tgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggtaaa 452

```
Query: 1726 gcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccggaatgggtatgcatacgggat1785
          |||
Sbjct: 453  gcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcaaatgggtatgcatacgggat 512
```

Query: 1786 gtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcacaatccaacttgcacaggtggggatgcagg1845
 |||
 Sbjct: 513 gtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcacaatccaacttgcacaggtggggatgcagg 572

```
Query: 1846 aacagagacttatctggttgcgcacaaactgatcctttctcatgcagcaactgtccaagt1905
            |||
Sbjct: 573  aacagagacttatctggttgcgcacaaactgatcctttctcatgcagcaactgtccaagt 632
```

```
Query: 1906  gtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtagcaataggcatttccttgacgtagt1965
              |||
Sbjct: 633    gtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtagcaataggcatttccttgacgtagt 692
```

Query: 1966 ttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctacccagcgatatcttga2025
 |||||||
 Sbjct: 693 ttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctacccagcgatatcttga 752

Query: 2026 cttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatgca2085
 |||||||
 Sbjct: 753 cttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatgct 812

Query: 2086 atatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaaggg2145
 |||||||
 Sbjct: 813 atatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaaggg 872

Query: 2146 ttcatttgattttt-attggactaaactattacaccactaactatgcta-ccaaatcagat2203
 |||||||
 Sbjct: 873 ttcatttgatttttaattggactaaaccattacaccactaactatgctacccaaatcaaat 932

Query: 2204 gcgtcaacat 2213
 ||||
 Sbjct: 933 gcgttaacat 942

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

CCCAAATTTTCTTATTTTGTGAGATAGCGGCTAAAGCATCTGGATTACACTAAACTGAGCCATCCATCT
 TCACCGCGAATGGGTATGCATACCGTATGTTTGACACAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACTT
 GCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTTTCCCATGCAGCAA
 CTGTCCAAGTGACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACCATAGGCATTTCCCTGCACGTAG
 TTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACAT
 GTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATC
 GATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAACCCAAATTACTTAAGGGTTTCATTTCACTTTATTGGACTAAACT
 ATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATC
 CTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCATCTTGATGT
 GCATTTATCCCAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCCAGGAAAAGTATAACCATCCTTTGGTTT
 ACATCACTGAACATGCCATAGATGACAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACA
 CTTATAGAATTGATAGTTATTATCCCTCCCTCCTTTATGTTCCATATGCCATTAGGCCTGGCCCCAAC
 GCCAAACGATCCCTCGCTGCTCTTTGTTGGACAACCTCCACGGGCTGAGGGTTATACCTCACCATT
 CCATTACCTTTTCGTAAACCCCCCACTCCC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ G367S ที่คาดว่าจะพบ

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ G367S ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1722 taaagcat-tggattacactaaa-tgagccatcaatcttcaccgaggaatgggtatgcata1779
 |||||||
 Sbjct: 32 taaagcatctggattacactaaactgagccatccatcttcaccgaggaatgggtatgcata 91

Query: 1780 cggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgcacaggtgggga1839
 |
 Sbjct: 92 ccgtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgcacaggtgggga 151

Query: 1840 tgcaggaacagagacttatctggttgcgcacacacctgatcctttctcatgcagcaactgt1899
 ||
 Sbjct: 152 tgcaggaacagagacttatctggttgcgcacacacctgatcctttcccatgcagcaactgt 211

Query: 1900 ccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatttccttgca1959
 ||
 Sbjct: 212 ccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtaccataggcatttccttgca 271

Query: 1960 cgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgata2019
 ||
 Sbjct: 272 cgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgata 331

Query: 2020 tcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggtatccagatag2079
 ||
 Sbjct: 332 tcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggtatccagatag 391

Query: 2080 catgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagt2139
 ||
 Sbjct: 392 catgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaacccaaattact 451

Query: 2140 taagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaattc2199
 ||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 452 taagggttcatttcactttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaattc 511

Query: 2200 agatgcgtcaacatgctgcccacctagtctacctcacagatcctcaagtcactctcttaca2259
 ||
 Sbjct: 512 agatgcgtcaacatgctgcccacctagtctacctcacagatcctcaagtcactctcttaca 571

Query: 2260 gcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcatcttggatgtgcatttatcc2319
 ||
 Sbjct: 572 gcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcatcttggatgtgcatttatcc 631

Query: 2320 aaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggttta2379
 ||
 Sbjct: 632 caaaggacttcgagatttggtgctttacttccaggaaaagtataaccatcctttggttta 691

Query: 2380 catcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatcctt2439
 ||||||||| || ||||||| ||||||||||||||||||||
 Sbjct: 692 catcactgaacatgccatagatgacaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatcctt 751

Query: 2440 gatagacacttatagaattgatagttattat-cgtcatctcttttatgttcgatatgcaa2498
 |||||||||||||||||||||||||||| | || |||||||||
 Sbjct: 752 gatagacacttatagaattgatagttattatccctccctcctttatgttccatagcca 811

Query: 2499 ttaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattgttgacaactttgaat2558
 ||||| ||||| | || | ||| ||| | || | || |||||||||
 Sbjct: 812 ttaggcctggcccaacgccaacgatccctcgcctgctctttgttgacaactcccac 871

Query: 2559 gggctgaggggttatacatcacgattt 2584
 ||||||||||||||||| |||| ||||
 Sbjct: 872 gggctgaggggttatacctcaccattt 897

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

NCAGTTAGCAATAGTTAGGGTTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACACCACTAACTATGCTACC
 AAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAA
 CGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCATCTTGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGA
 GATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGAT
 GAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTAT
 CGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCA
 TTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAACCTACACT
 ACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGT
 GCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGATCAAGGAAGAAAAGACA
 AAACCCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCA
 GTACGTAGAATTCACGTGGCCAGCCGGTCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGGCCGCCATCT
 TTCTATAACAAAAA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

Query: 2142 agggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacag2201
 |||
 Sbjct: 17 agggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacag 76

Query: 2202 atgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc2261
 |||
 Sbjct: 77 atgctgcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc 136

Query: 2262 aacgcaatggggcttttataggtccagtgactccctcatcttggatgtgcatttatccaa2321
 |||
 Sbjct: 137 aacgcaatggggcttttataggtccagtgactccctcatcttggatgtgcatttatccaa 196

Query: 2322 aaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttaca2381
 |||
 Sbjct: 197 aaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttaca 256

Query: 2382 tcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttga2441
 |||
 Sbjct: 257 tcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttga 316

Query: 2442 tagacacttatagaattgatagttattatcggtcatctcttttatgttcgatatgcaatta2501
 |||
 Sbjct: 317 tagacacttatagaattgatagttattatcggtcatctcttttatgttcgatatgcaatta 376

Query: 2502 ggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattgttggaactttgaatggg2561
 |||
 Sbjct: 377 ggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattgttggaactttgaatggg 436

Query: 2562 ctgaggggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactttgaatagat2621
 |||
 Sbjct: 437 ctgaggggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactttgaatagat 496

Query: 2622 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtatcttctggcacgtgatcaagagagtgcta2681
 ||
 Sbjct: 497 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtatcttctggcacgtgatcaagagagtgcta 556

Query: 2682 aattggaaatcttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa2741
 ||
 Sbjct: 557 aattggaaatcttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa 616

Query: 2742 agacaaaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaatt2801
 ||
 Sbjct: 617 agacaaaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaatt 676

Query: 2802 cgcgccgcctgcagtagaattcacgtggcccagccggcgtctcggatcgggtacc2861
 ||
 Sbjct: 677 cgcgccgcctgcagtagaattcacgtggcccagccggcgtctcggatcgggtacc 736

Query: 2862 tcgagccgcggcgccgccagctttctagaacaaaaa 2898
 |||||||||||||||||| |||||| ||||||
 Sbjct: 737 tcgagccgcggcgccgccatctttctataacaaaaa 773

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนดัล โคจินเนสกลายพันธุ์ E455I

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

NCTTTCGANTTTNNCNGACTTTNACNGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTCGAAACGA
 TGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACA
 CTACAACAGAAGATGAAACGGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGG
 ATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTA
 TTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACC
 ATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCTCTCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTG
 GGACAGCATCCTCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCC
 ACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATA
 AGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAGTTGGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGA
 ATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATC
 AATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTGGTAACCATTTTTTCATNNGGATCTNCCNAGCCTTGG
 AGGATGAGTACGGNGGCTCTTAAATCATAGCGTTGGTAATGATTCCANATATGCGGATCTTGGCTNCA
 NTTNTTGGAGATNNGGTAAGCNTNGGNTTCNCTAATGANCCNCANCTTCCCNNAANGGGTTNCTNCGG
 NNGTTGNCCNNGNA

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

Query: 889 gacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatt 948
 ||||| | ||
 Sbjct: 17 gactttnacngacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatt 76

Query: 949 tccttcaatttttactgctggtttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaa1008
 ||
 Sbjct: 77 tccttcaatttttactgctggtttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaa 136

Query: 1009 cactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcaga1068
 ||
 Sbjct: 137 cactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcaga 196

Query: 1069 tttagaaggggatttcgatggttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtt1128
 ||
 Sbjct: 197 tttagaaggggatttcgatggttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtt 256

Query: 1129 attgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcga1188
 ||
 Sbjct: 257 attgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcga 316

Query: 1189 gaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcc1248
 ||
 Sbjct: 317 gaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcc 376

Query: 1249 attcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtagca1308
 ||
 Sbjct: 377 attcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtagca 436

Query: 1309 gtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataaacttcacccaccaatatccaga1368
 |||||
 Sbjct: 437 gtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataaacttcacccaccaatatccaga 496

Query: 1369 aaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaa1428
 |||||
 Sbjct: 497 aaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaa 556

Query: 1429 ggatattgcaatcatgaaggatatgaactt-ggatgcttatagaatgtccatctcctggc1487
 |||||
 Sbjct: 557 ggatattgcaatcatgaaggatatgaacttgggatgcttatagaatgtccatctcctggc 616

Query: 1488 ctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaaccaaacaggagttgactact1547
 |||||
 Sbjct: 617 ctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaaccaaacaggagttgactact 676

Query: 1548 acaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacaccatttgaaccatttttc1607
 |||||
 Sbjct: 677 acaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacaccatttgaaccatttttc 736

Query: 1608 attgggatcttccacaagccttggaggatgagtagcggtaggcttcttaaatcatagcggttg1667
 || ||||| || | |||||
 Sbjct: 737 atnnggatctncc-cnagccttggaggatgagtagcggnggc-tcttaaatcatagcggttg 794

Query: 1668 taaatgatttccaagactatgcggatcttggcttccaattatttggagatagggtaa 1724
 ||||| ||||| | ||||| || | | |||||
 Sbjct: 795 gtaatga-ttccaana-tatgcggatcttggctnc--antnttggagatnnggtaa 847

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ E455I โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

ATCTTTTTGGGCAGCATCCTCCTCGTTCCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAA
 CTTACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTCA
 CCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTG
 GCCTAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCACAGGAGTTGACTACTACAACAG
 GCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACA
 AGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGA
 TCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCAC
 CGCGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTGCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTGCAC
 AGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGT
 CCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAGTTTG
 GGTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCNCATGTGGA
 TGGTTTATGGACCNCTTCNGCAGGAGGTATCNGATAGCATGCATATCTAGTTGGAAACGATGCCTAGTT
 NCTANGATCAGCCATTANTANGGTCNTTGAATTTTGNCTACTTNNCCCTACTTGCTCCATCGAGCNCAC
 TGCTNCCCTATTCCCAATCCAGTCCNNTNACACCANGGGCTNAGNCNGGCCCCGNGNNGCTTCCAAG
 CTCGNTTTGTCTCNGAAANNNCNTGTNNCCGAGGNAAGANAGGCCCNCGGACNGACCTAAAAATTCC
 CTTTCAAANCGCAGNNTTGNTG

Query: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

Query: 1282 ttttgggacagcatcctcctcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatg1341
 |||| | | ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 4 ttttgggacagcatcctcctcgttccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatg 63

Query: 1342 ggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgc1401
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 64 ggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgc 123

Query: 1402 agttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttgga1461
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 124 agttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttgga 183

Query: 1462 tgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgagg1521
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 184 tgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgagg 243

Query: 1522 cataaaccacacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatgg1581
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 244 cataaaccacacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatgg 303

Query: 1582 cataacaccatttgtaaccatttttcattgggatcttccacaagccttgaggatgagta1641
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 304 cataacaccatttgtaaccatttttcattgggatcttccacaagccttgaggatgagta 363

Query: 1642 cgggtggcttcttaaatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgctt1701
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 364 cgggtggcttcttaaatcatagcgttgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgctt 423

Query: 1702 ccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcac1761
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 424 ccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcac 483

Query: 1762 cgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatacaatcc1821
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 484 cgcgaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatacaatcc 543

Query: 1822 aacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacacactgatcct1881
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 544 aacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacacactgatcct 603

Query: 1882 ttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtag1941
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 604 ttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtag 663

Query: 1942 aataggcatttccttgacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatca2001
 ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 Sbjct: 664 aataggcatttccttgacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatca- 722

Query: 2002 aaatgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagc2061
 |||||
 Sbjct: 723 aaatgctaccagcgatatcttgacttcncatgtggatgggttatgga-ccnctt-cngc 780

Query: 2062 aggaaggtatccagatagcatgcaatatctagttgga 2098
 ||| ||||| | |||||
 Sbjct: 781 agg-aggtat-cngatagcatgc-atatctagttgga 814

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ E455I โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

CTTGCTTCNATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGC
 GAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCAACAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGACAGG
 TGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCA
 AGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGTAAGTTTGGGT
 TATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATG
 GTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCC
 TAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTATTACAC
 CACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGT
 CACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTA
 TCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCAC
 TGAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGA
 ATTGATAGTTATTATCGTCATCTCNTTTATGTTTCGATATGCAATTAGGTCTGGGCNAATGGGAAGGATT
 TTTGCATGGNCTTGNTGGACACNTTGANGGGCTATGGTTAACCNCCGATTGGATATTTTTGGGAACCAC
 CTANTNGAAAATCCCAGCCNCGCACTGGTCAGNTTTCGGCCNNNTCANAANGCTATTGGANTTNCCC
 AGGCANNGGCTTCNCGTTTCAGGNAAAANACCCGGGGCTGAGNTTGANAANTACNAGANCCGCCCGNAA
 AAATCNGCCNCGCCTGATGCCCCC

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ E455I ที่คาดว่าจะเป็
 Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์ E455I ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

Query: 1705 attatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgc1764
 |||||
 Sbjct: 10 attatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgc 69

Query: 1765 gaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaac1824
 |||||
 Sbjct: 70 gaatgggtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaac 129

Query: 1825 ttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttc1884
 |||||
 Sbjct: 130 ttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttc 189

Query: 1885 tcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaat1944
 |||||
 Sbjct: 190 tcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaat 249

Query: 1945 aggcatttccttgacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaa2004
 ||
 Sbjct: 250 aggcatttccttgacgtagtttgggttataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaa 309

Query: 2005 tgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcagg2064
 ||
 Sbjct: 310 tgctaccagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcagg 369

Query: 2065 aaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacaga2124
 ||
 Sbjct: 370 aaggtatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacaga 429

Query: 2125 tcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa2184
 ||
 Sbjct: 430 tcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaa 489

Query: 2185 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctca2244
 ||
 Sbjct: 490 ctatgctaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctca 549

Query: 2245 agtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgcctcaggatg2304
 ||
 Sbjct: 550 agtcactctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgcctcaggatg 609

Query: 2305 gatgtgcattttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataa2364
 ||
 Sbjct: 610 gatgtgcattttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataa 669

Query: 2365 caatcctttgggtttacatcactgaaaatgggtatagatgagaagaatgatgcacatc2424
 |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 670 caatcctttgggtttacatcactg-aaatgggtatagatgagaagaatgatgcacatc 728

Query: 2425 acttgaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctctttta2484
 |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||
 Sbjct: 729 acttgaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctctnttta 788

Query: 2485 tgttcgatatgcaattaggtctgg 2508
 ||||||||||||||||||||
 Sbjct: 789 tgttcgatatgcaattaggtctgg 812

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจีนสกลายพันธุ์ E455I โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

NNANNNCGNTCCTACNGANTCANGCCAAANTTAGTTACGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTAT
 NNANNNCGNTCCTACNGANTCANGCCAAANTTAGTTACGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAAACTAT
 TACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGNTTACCTCACAGATCC
 TCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTG
 CATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTA
 CATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACAC
 TTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGT
 GAAAGGATTTTGGCATGGTCATTTGTTGGACAACTTTGAATGGGCTATNGGTTATACATCACGATTTGG
 ATTATATTTNGTGAACCTACCTACTTGGAAATAGATATCCCAAGCTCNCTGCACCATGGTTCAAGTATTT

TCTGGCCCGTGATCAANANAGTGCTAAATTGGGAANTTTNNGCCCCNAGGGNANANGGGGCTTTTCACN
 ATGATCANGGANNAANNCNAANCCCAGGGGGNTTGANGGNTTGGANCCAAANCNNACCCNNGGANT
 CCCGGNCCCCGGCNAANTCCNNGGNCNCNGCCNTCGNNTNGNCCCACCCNGGGGGNCCNN
 TTTTAAAAAACCCNCCNAANNGGTNNANCCCCCCCCCNCNNCNCNCCNGGGGNGGCCNAAAA
 NGNGCCCCNNNNNGGGNNNNAAAAANCCNCNNNNNTNNNNNAANGNNANNCNNNNNNNAANNNNCNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNCNCNCNCNCNCCNCNNNNNNNNNGGGGNNNNNNNN
 NNNNNCCCCNNNNNNNNNNNNCNCNNNNNNNNNNNNNNNN

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่คาดว่าจะจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TRF3

Query: 2132 aaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct2191

Sbjct: 28 aanttagttacgggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgct 87

Query: 2192 accaaatcagatgctgcaacatgctgccacctag-ttacctcacagatcctcaagtcac2250

Sbjct: 88 accaaatcagatgctgcaacatgctgccacctagnttacctcacagatcctcaagtcac 147

Query: 2251 tctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtg2310

Sbjct: 148 tctcttacagcaacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtg 207

Query: 2311 catttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcc2370

Sbjct: 208 catttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcc 267

Query: 2371 tttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttga2430

Sbjct: 268 tttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttga 327

Query: 2431 ggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctcttttatgttcg2490

Sbjct: 328 ggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcctcttttatgttcg 387

Query: 2491 atatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatgggtcattgttggaaca2550

Sbjct: 388 atatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatgggtcattgttggaaca 447

Query: 2551 ctttgaatgggctattgggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactac2610

Sbjct: 448 ctttgaatgggctatnnggtatacatcacgatttggattatatttngtgaactacactac 507

Query: 2611 tttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatca2670

Sbjct: 508 ttggaatagatatcccaagctcncctgcacatggttcaagtattttctggcccgtgatca 567

Query: 2671 agagagtgctaaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgat 273

Sbjct: 568 ananagtgctaaattgggaanttttnngcccnagggnananggggcttttc-acnatgat 626

Query: 2731 caaggaagaaa 2741

Sbjct: 627 canggannaaa 637

5. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I โดยใช้ไพรเมอร์ AOXR

CNCTTCCANTTANAATNGTAGCAANGACCNCGGNTCTTCTCGNTAAGTGCCCAACTGAACTGAGGAACA
 GTCATGTCTAAGGCTACAACTCAATGATGATGATGATGATGGTCGACGGCGCTATTGAGATCCTCTTC
 TGAGATGAGTTTTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCGGGCCGCCGCGGCTCGAGGTACCGATCCGAGACGGCCGGC
 TGGGCCACGTGAATTCTACGTACTGCAGGCGGGCCGCGAATTCAGTGTGATTAAGATCTAGATCAAAAG
 CCTTCAATGCCCCACTTGGGTTTTGTCTTTTCTTCTTGATCATCGTTGATAAGCTCCATCTTGCCTTT
 GGTGCTAAAATTTCCAATTTAGCACTCTCTTGATCACGTGCCAGAAAATACTTGAACCATGTTGCAGAG
 AGCTTGGGATATCTATTCAAAGTAGTGTAGTTCACAAAATATAATCCAAATCGTGATGTATAACCAATA
 GCCCATTCAAAGTTGTCCAACAATGACCATGCAAAAAATCCTTTACATTTGCGCCAGACCTAATTGCA
 TATCGAACATAAAAGAGATGACGATAATAACTATCAATTCTATAAGTGTCTATCAAGGATTCCTCAAGT
 GATAGTGATGCATCATTCTTCTCATCTATAACATTTTCAGTGATGTAAACCAAAGGATTGTTATACTTT
 TCCTTGAAGTAAGCAACAATCTCGAAGTCCTTTTGGATAATGCACATCCATCCTGAGGGAGTCACTGGA
 CNTATAAGACCCATTGCGTTGCTGTAAAAANTGACTTNAGGATCTGNGAGGTACTAGGTGGGCAGNAT
 GTTGACNTCTGATTNGGNANNTANTTNGGGGGNTANANTTNNNCAANNAANNAANGACCCTTANTANT
 GGGNNGANNNGNNNAANNT

Query: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่คาดว่าจะเป็น

Sbjct: ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ที่วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ AOXR

Query: 2193 ccaaatcagatgcgtcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactc2252
 || ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 846 ccnaatcagang-gtcaacatnctgcccacctagt-acctcncagatcctnaagtcantt 789

Query: 2253 tcttacagcaacgcaatggggcttttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgca2312
 | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 788 t-ttacagcaacgcaatggggctt-atangtccagtgactccctcaggatggatgtgca 731

Query: 2313 tttatccaaaaggacttcgagatttgttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctt2372
 || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 730 tt-atccaaaaggacttcgagatt-gttgctt-acttcaaggaaaagtataacaatcctt 674

Query: 2373 tggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgagg2432
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 673 tggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgagg 614

Query: 2433 aatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgat2492
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 613 aatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgat 554

Query: 2493 atgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggacaact2552
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 553 atgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggacaact 494

Query: 2553 ttgaatgggctattgggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactt2612
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 493 ttgaatgggctattgggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactt 434

Query: 2613 tgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggttcaagtattttctggcacgtgatcaag2672
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 433 tgaatagatatcccaagctctctgcaacatgggttcaagtattttctggcacgtgatcaag 374

Query: 2673 agagtgcataaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatca2732
 ||
 Sbjct: 373 agagtgcataaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatca 314

Query: 2733 aggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatacac2792
 ||
 Sbjct: 313 aggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatacac 254

Query: 2793 tagtgaattcgcgccgcctgcagtagcagtagaattcacgtggcccagccggccgtctcgg2852
 ||
 Sbjct: 253 tagtgaattcgcgccgcctgcagtagcagtagaattcacgtggcccagccggccgtctcgg 194

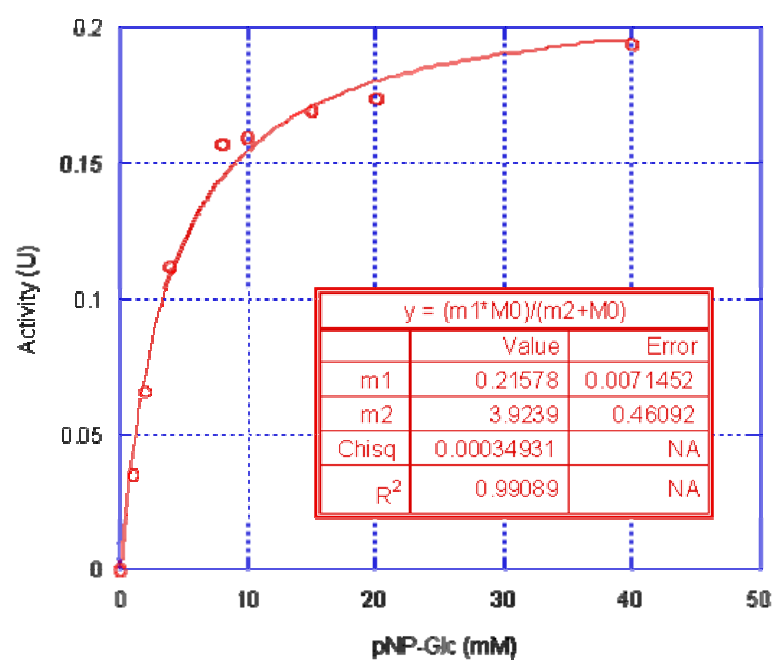
Query: 2853 atcggtagctcgagccgcggcgccgcagctttctagaacaaaaactcatctcagaaga2912
 ||
 Sbjct: 193 atcggtagctcgagccgcggcgccgcagctttctagaacaaaaactcatctcagaaga 134

Query: 2913 ggatctgaatagcgccgctcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttagaca2972
 ||
 Sbjct: 133 ggatctgaatagcgccgctcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttagaca 74

Query: 2973 tgactgttcctcagttcaagttgggcactta-cgagaaga 3011
 |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
 Sbjct: 73 tgactgttcctcagttcaagttgggcacttancgagaaga 34

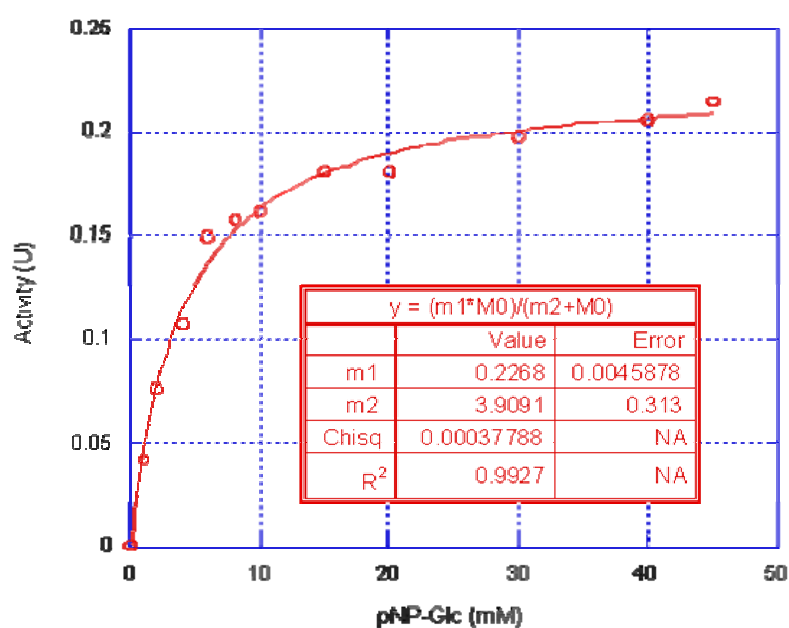
ภาคผนวก ข
กราฟ Michaelis-Menten

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



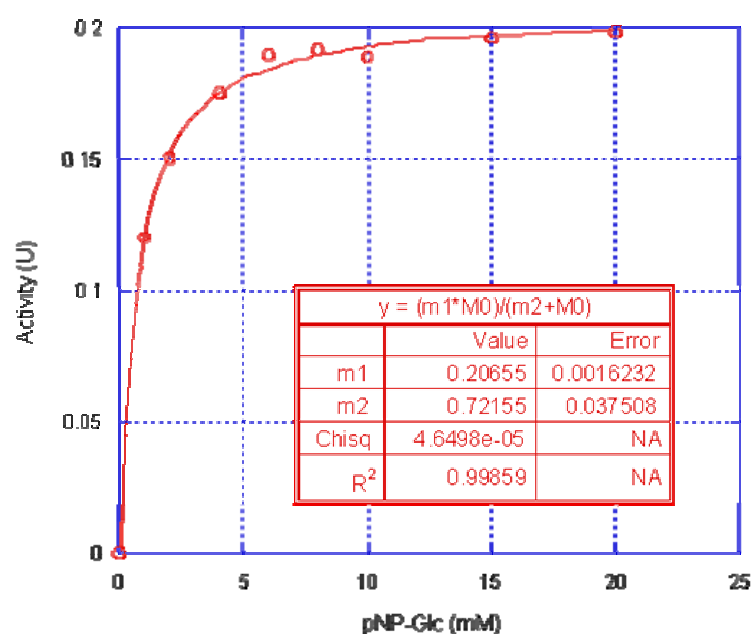
ภาพผนวกที่ ข1 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติในการสลาย *p*NP-Glc

2. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนสในการสลาย *p*NP-Glc



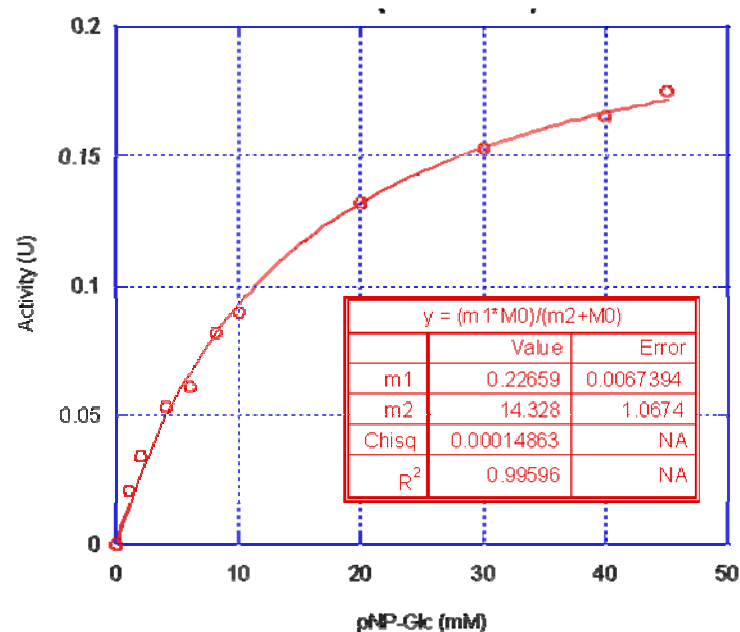
ภาพผนวกที่ ข2 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนสในการสลาย *p*NP-Glc

3. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ลีนามาเรสในการสลาย *p*NP-Glc



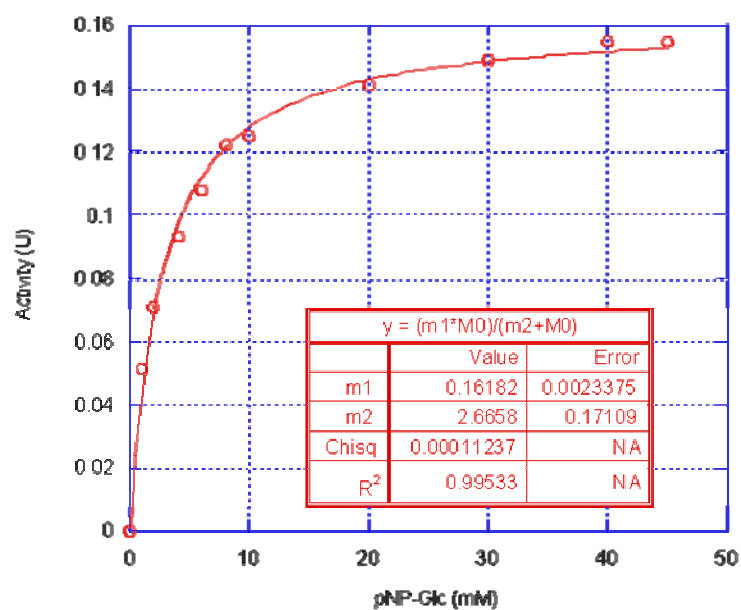
ภาพผนวกที่ ข3 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลีนามาเรสในการสลาย *p*NP-Glc

4. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลาย *p*NP-Glc



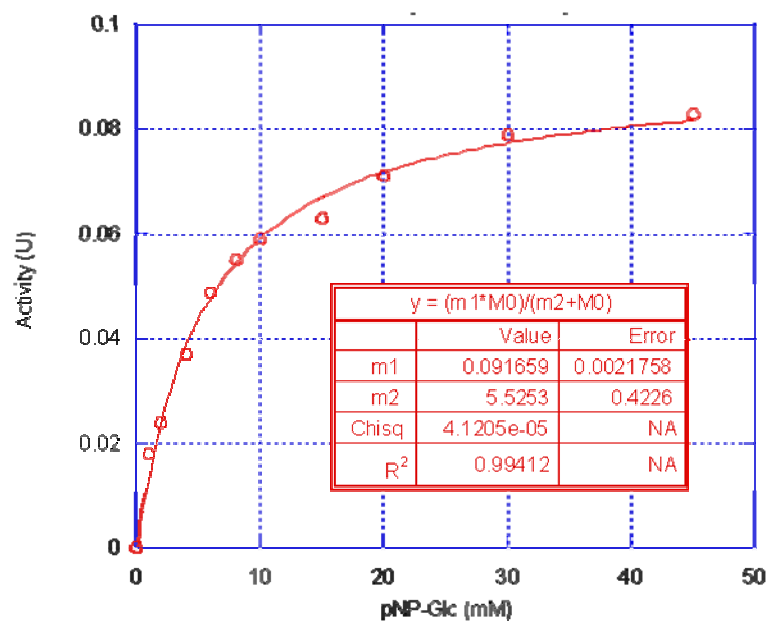
ภาพผนวกที่ ข4 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลาย *p*NP-Glc

5. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการสลาย *p*NP-Glc



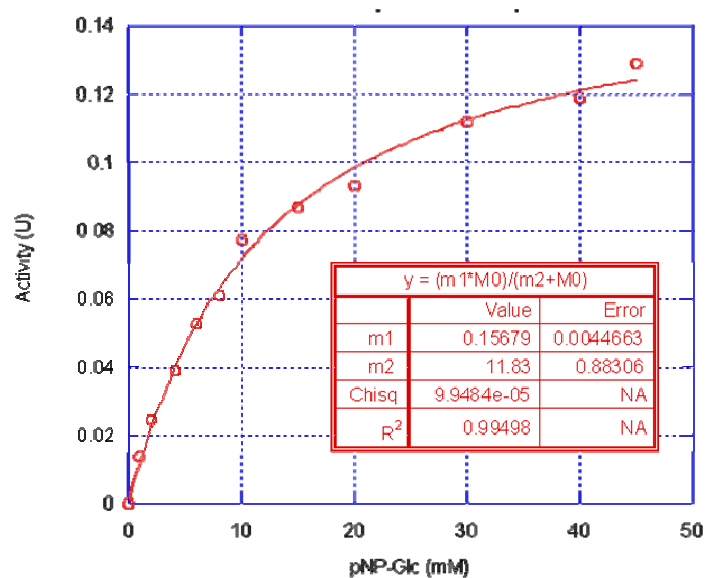
ภาพผนวกที่ ข5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการสลาย *p*NP-Glc

6. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการสลาย *p*NP-Glc



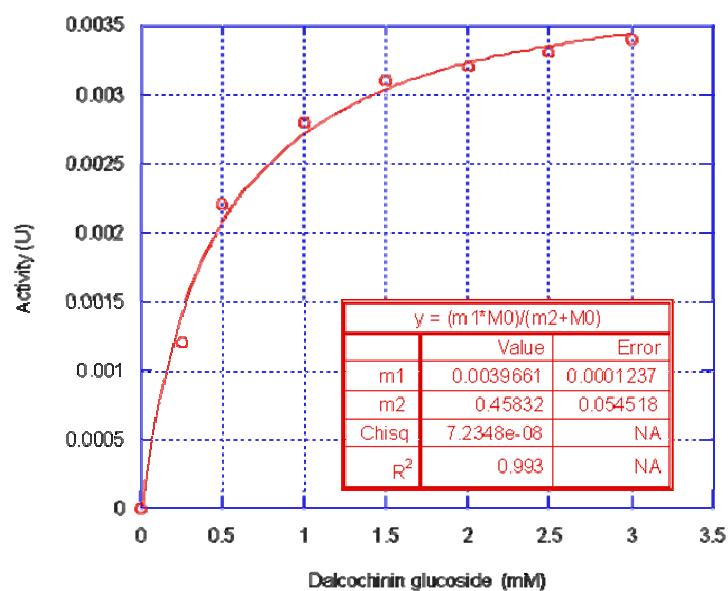
ภาพผนวกที่ ข6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการสลาย *p*NP-Glc

7. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลาย *p*NP-Glc



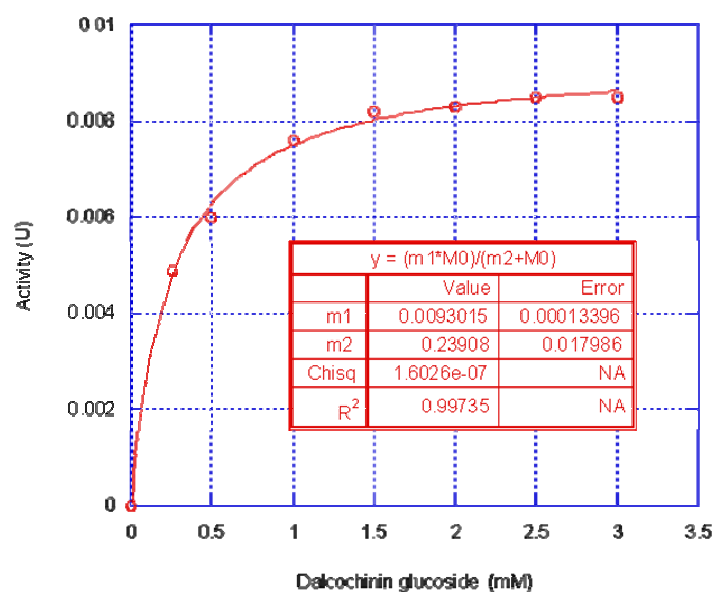
ภาพผนวกที่ ข7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลาย *p*NP-Glc

8. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลาย ดัลโคซินินกลูโคไซด์



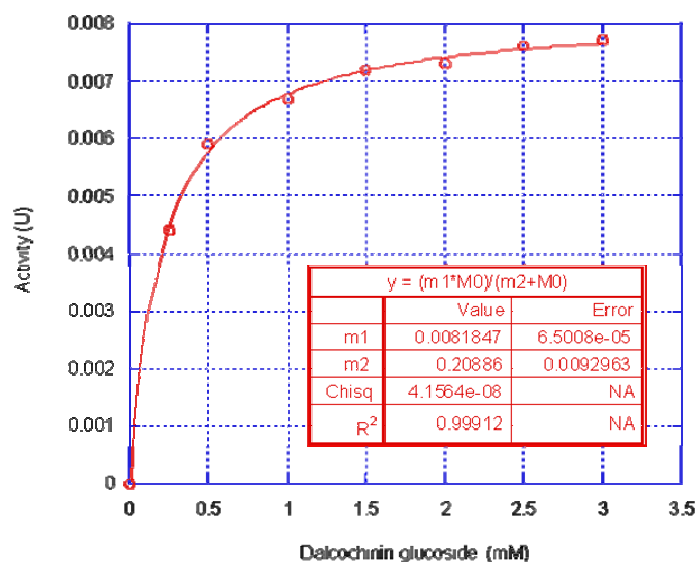
ภาพผนวกที่ ข8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลายดัลโคซินินกลูโคไซด์

9. กราฟ Michaelis Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการสลาย
ดัลโคซินินกลูโคไซด์



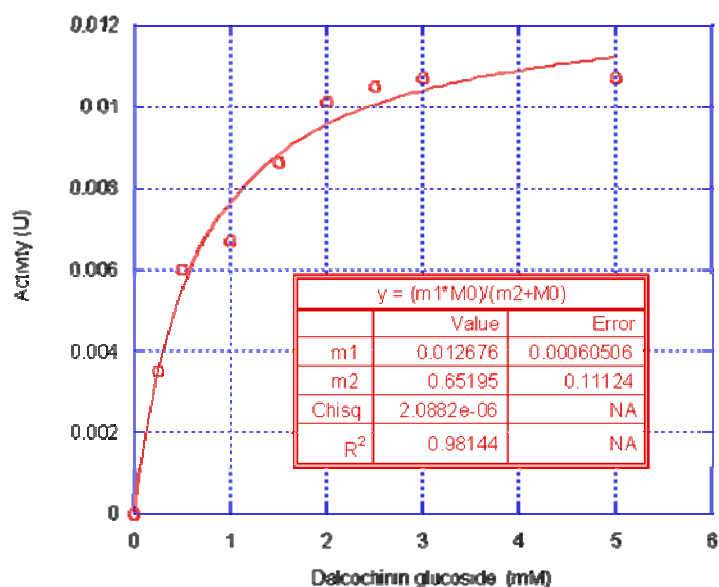
ภาพผนวกที่ ข9 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการ
สลายดัลโคซินินกลูโคไซด์

10. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการสลาย
ดัลโคซินินกลูโคไซด์



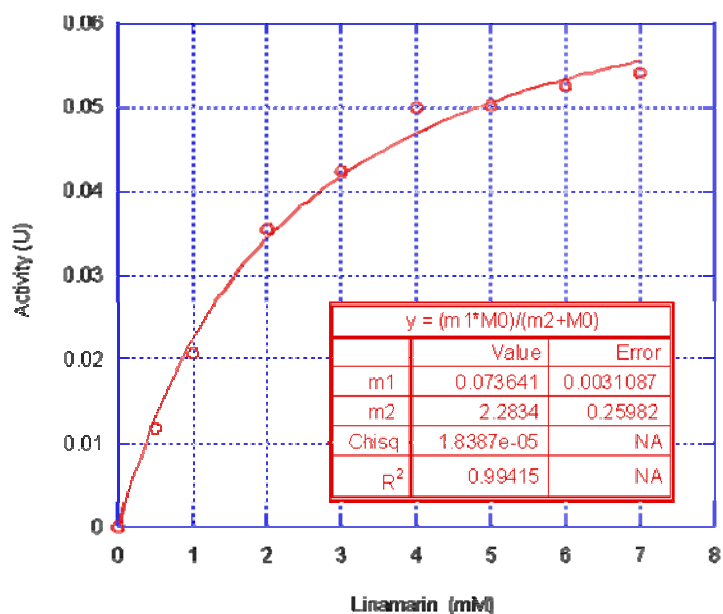
ภาพผนวกที่ ข10 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการ
สลายดัลโคซินินกลูโคไซด์

11. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลายดัลโคซินินกลูโคไซด์



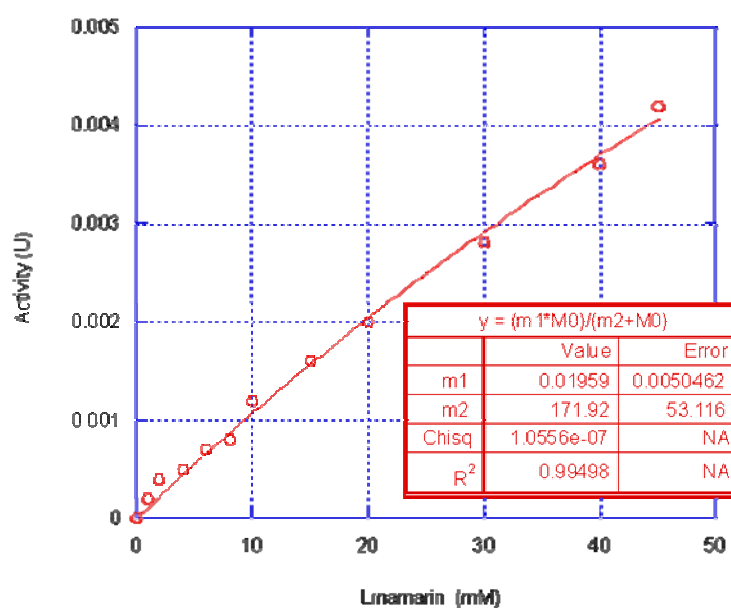
ภาพผนวกที่ ข11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลายดัลโคซินินกลูโคไซด์

12. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ลินามารีสในการสลายลินามาริน



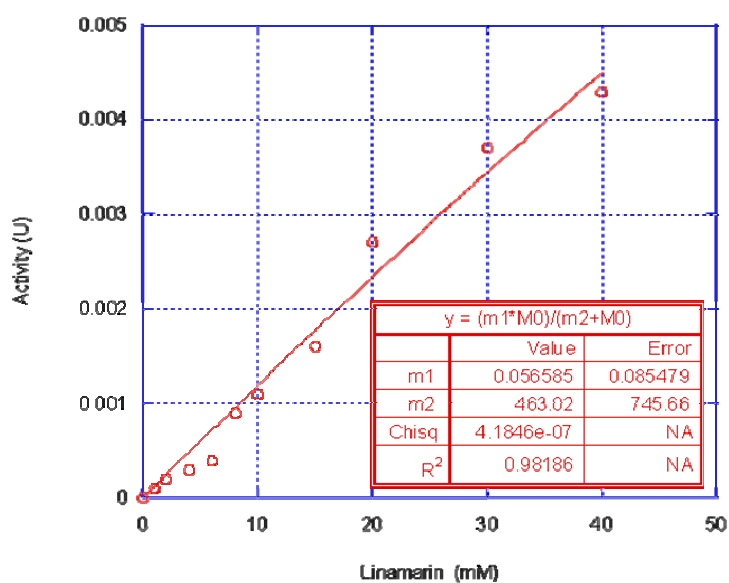
ภาพผนวกที่ ข12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามารีส ในการสลายลินามาริน

13. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลายลินามาริน



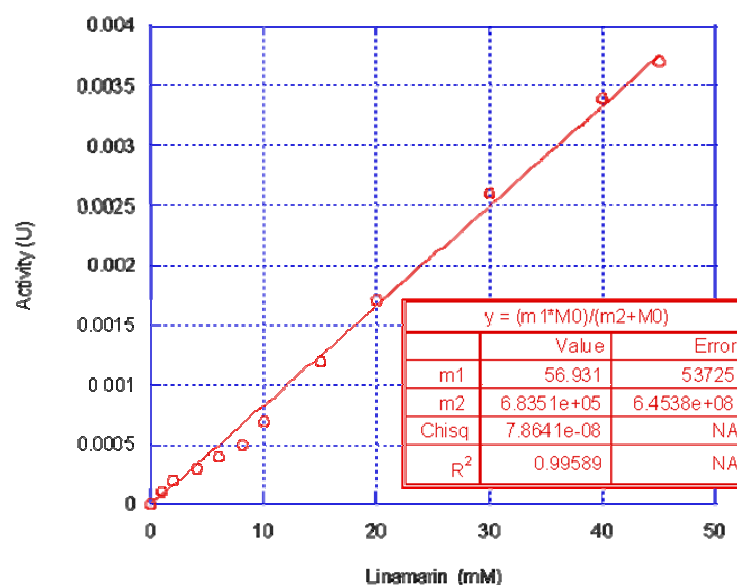
ภาพผนวกที่ ข13 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ในการสลายลินามาริน

14. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการสลายลินามาริน



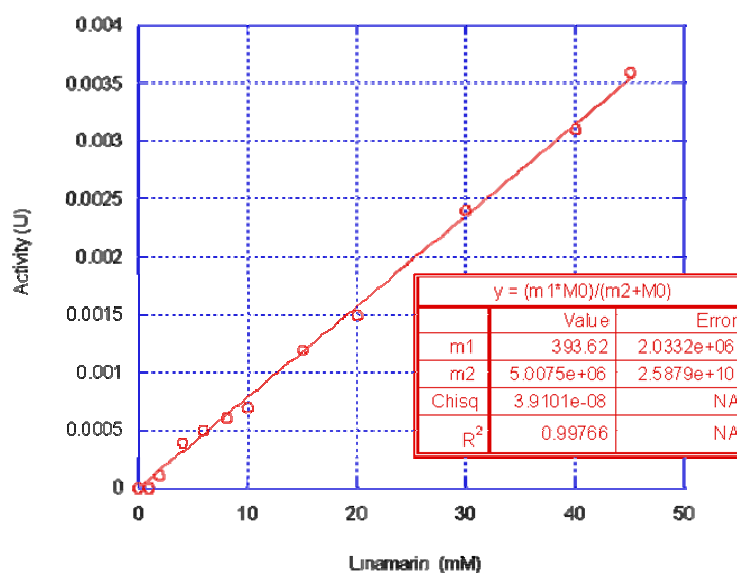
ภาพผนวกที่ ข14 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ V255F ในการสลายลินามาริน

15. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการสลายลินามาริน



ภาพผนวกที่ ข15 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ G367S ในการสลายลินามาริน

16. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลายลินามาริน



ภาพผนวกที่ ข16 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ E455I ในการสลายลินามาริน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 22 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-