



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

ชีวเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์จากข้าว (*Oryza sativa* L.)

Characterization of BADH2 Mutants from Rice (*Oryza sativa* L.)

نامผู้วิจัย นางสาวนภาพร ธรรมชูเชาวรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์รัตรี วงศ์ปัญญา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชวงศ์โกมล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ณัฏฐ์ บัญญาลัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชวงศ์โกมล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์จากข้าว (*Oryza sativa* L.)

Characterization of BADH2 Mutants from Rice (*Oryza sativa* L.)

โดย

นางสาวนภาพร ธรรมชูเชาวรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นภาพร ธรรมฐะชาวัฒน์ 2554: การศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์จากข้าว (*Oryza sativa* L.)

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี อาจารย์ที่ปรึกษา

วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ราตรี วงศ์ปัญญา, Ph.D. 116 หน้า

Betaine Aldehyde Dehydrogenase 2 (BADH2) เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมหลักชนิดหนึ่งในข้าว นั่นคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) โดยพบยีน BADH2 อยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับความหอม (*fgr* gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ยีนดังกล่าวพบได้ทั้งในข้าวหอม และข้าวไม่หอม โดยในข้าวหอมพบว่าเกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 8 นิวคลีโอไทด์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 3 ตำแหน่งในเอกซอนที่ 7 ทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของยีนไป ส่งผลให้ข้าวนี้มีการผลิตสารหอม 2AP ขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ในข้าว โดยทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยการเพิ่มกรดอะมิโนไทโรซีนในตำแหน่ง 420 (Y420 insertion) และทำการกลายพันธุ์แบบแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 162 260 และ 294 (N162A E260A และ C294A) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทดลองทำการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที จากการทดลองพบว่าเมื่อนำยีนกลายพันธุ์ที่อยู่ในดีเอ็นเอพาหะ pET28b เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นทำการผลิตโปรตีน และทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ จึงนำไปศึกษาประสิทธิภาพการจับกับอย่างจำเพาะระหว่าง BADH2 กลายพันธุ์กับ โคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH เปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ BADH2 ดั้งเดิม พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A และ E260A ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH แต่ทำให้การจับกับเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A มีประสิทธิภาพลดลง เมื่อจับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อจับกับ NADH เมื่อเทียบกับ BADH2 ดั้งเดิม การศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ต่อสับสเตรท aminobutyraldehyde (AB-ald) และ Betaine aldehyde (Bet-ald) (K_m , k_{cat} และ k_{cat}/K_m) พบว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมทำปฏิกิริยากับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ ซึ่งผลการทำปฏิกิริยานำมาทดสอบหา γ -aminobutyric acid (GABA) ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบสาร GABA ในผลผลิตจากกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรท รวมถึง BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 และ N162A แต่ในปฏิกิริยาที่ใช้ Bet-ald ไม่พบสาร GABA ในเอนไซม์ทุกชนิด และจากผลการทำกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที พบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีดังกล่าวได้

Napaporn Thamchuchaowarat 2011: Characterization of BADH2 Mutants from Rice (*Oryza sativa L.*).

Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry.

Thesis Advisor: Miss. Ratree Wongpanya, Ph.D. 116 pages.

Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) is believed to be involved in an accumulation of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) in rice. The BADH gene located on chromosome eighth has been found in both fragrant and non-fragrant rice. The 8 bp deletion and 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) at exon 7 of BADH2 gene resulted in loss of its function, which is suggested to be associated with 2AP accumulation in aromatic rice. In this study, BADH2 mutations were constructed by site-directed mutagenesis consisting of tyrosine insertion at residue 420 (Y420 insertion) and alanine replacement at amino acid residues 162, 260 and 294, respectively. Moreover, random mutagenesis was also carried out by exposing to ultraviolet at 10, 30 seconds and 1 minute. The result showed that all mutants were successfully constructed in pET28b plasmid following by transformation into bacterial *E. coli*. The recombinant proteins were then over produced and purified by Ni^{+2} -NTA affinity column chromatography. Then binding affinity between the purified recombinant proteins and cofactors, NAD^+ and NADH, were examined. The results indicated that mutation of Y420, N162A and E260A did not show different binding affinity toward both NAD^+ and NADH comparing to the wildtype. However, C294A mutant resulted in decrease of binding affinity toward NAD^+ that contrasts to toward NADH with increasing. The kinetic study (K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m) of the BADH2 mutants toward aminobutyraldehyde (AB-ald) and Betaine aldehyde (Bet-ald) were then performed. The results indicated that wild type BADH2 showed higher activities towards both substrates than all BADH2 mutants. In addition, Thin Layer Chromatography (TLC) was also performed to detect γ -aminobutyric acid (GABA), an expected product of the enzyme when AB-ald is used as a substrate. The GABA could be only observed in the reaction of wild type BADH2, Y420 and N162A with AB-ald as the substrate. Nevertheless, the random mutagenesis was not successfully constructed.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.นลวัฒน์ บุญญาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ดวงพร วรสุนทรโรตถ ประธานกรรมการ ในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรพงษ์ บัวบูชา กรรมการในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วรรณวิจิตร หัวหน้าศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทางการเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวหอมมะลิ (badh2.8)

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา รัตนโก ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา จนผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่กัญจน์ พี่ตุ้ม พี่ช พี่นุช แคร่ เพื่อนๆทุกคนรวมทั้งเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือตลอดมา และทำให้ทุกๆวันในห้องปฏิบัติการมีแต่ความสุข

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า ทั้งหมดเพื่อให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จครั้งนี้

นภาพร ธรรมชูเชาวรัตน์

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	32
อุปกรณ์	32
วิธีการทดลอง	34
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	50
สรุปผลการทดลอง	82
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	86
ภาคผนวก	95
ภาคผนวก ก ลำดับเบส กรดอะมิโนของยีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์	96
ภาคผนวก ข เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ	103
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE และ ดีเอ็นเออิเล็กโทรโฟรีซิส	106
ภาคผนวก ง การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และยาปฏิชีวนะ	110
ภาคผนวก จ การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิดด้วยเบส	112
ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารสำหรับทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเครื่อง FPLC	
และการเตรียมสารสำหรับทำ TLC	114
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	116

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบของเอนไซม์ตัดจำเพาะ	34
2	แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับโคลนนิ่งพีซีอาร์	35
3	แสดงสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับโคลนนิ่งพีซีอาร์	35
4	แสดงรายการไพรเมอร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ	37
5	แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ	38
6	แสดงสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ	38
7	แสดงรายการไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ	39
8	แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR	46
9	แสดงสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR	47
10	แสดงส่วนประกอบของการเชื่อมต่อยีน BADH2 กับ pGEM-T easy vector	48
11	แสดงส่วนประกอบของการเชื่อมต่อยีน BADH2 กับ pET28b vector	49
12	แสดงค่าการจับกันของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ ทั้ง 4 แบบที่จับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH	62
13	แสดงค่า k_d ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ ทั้ง 4 แบบ	67
14	แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์แบบ คู่ๆ ด้วยวิธีกลายพันธุ์โดยส่งได้แสงอัลตราไวโอเลต	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH	5
2	แสดงลำดับการเข้าจับของโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+	6
3	แสดงบริเวณจับของโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ ของ BADH จากถั่วลิสงเตา	7
4	แสดงบริเวณจับของสับสเตรทของ BADH จากถั่วลิสงเตา	7
5	แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ BADHs	8
6	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนในกลุ่ม ALDHs	9
7	แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่ม ALDHs	10
8	แสดงบริเวณจับของ cation ของ BADH จากถั่วลิสงเตา	11
9	แสดงโครงสร้างของยีน BADH2 จากข้าว	12
10	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน BADH1 และ BADH2 ในข้าวหอม และไม่หอม	13
11	แสดงโครงสร้างของ 2AP	14
12	แสดงกลไกการสร้าง 2-Acetyl-1-pyrroline และ 5-Aminobutyric acid ผ่าน polyamine	15
13	แสดงกลไกการสังเคราะห์ 2AP	16
14	แสดงโครงสร้างของ GABA	16
15	แสดงบริเวณ catalytic triad ของเอนไซม์ BADH จาก <i>E.coli</i>	18
16	แสดงตำแหน่งกลายพันธุ์ในข้าวหอม	19
17	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นมา 3 เบสของ ยีน <i>badh</i> 2.8 จากข้าวหอมพม่าและยีน BADH2 จากข้าวไม่หอม	20

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420	20
19	แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N162A	22
20	แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E260A	23
21	แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A	24
22	แสดงแผนภาพการทำกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ	27
23	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร	30
24	แสดงกราฟ Michaelis-Menten ใช้หาค่า V_{max} และ K_m	31
25	แสดงแผนภาพการแยกของสารตัวอย่างด้วยวิธี TLC	44
26	ผลการตัดพลาสมิด BADH2_pET28b ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>XhoI</i>	50
27	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ หลังจากทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ	51
28	ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของยีน BADH2 กลายพันธุ์ 4 แบบ	52
29	ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่าจะมียีน BADH2 กลายพันธุ์ 4 แบบ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>XhoI</i>	53
30	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ	54
31	แสดงผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์	56
32	กราฟแสดง Intrinsic fluorescence ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ ในตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A	59
33	กราฟแสดงการเปรียบเทียบ fluorescence titration ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A	61
34	กราฟแสดงปริมาณ NADH ที่เปลี่ยนแปลงไปของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม กลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 และ N162A	64
35	กราฟแสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ใน ตำแหน่ง Y420 และ N162A	65
36	แสดงผล TLC ของ GABA มาตรฐาน	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	แสดงผล TLC ของสับสเตรท AB-ald มาตรฐาน	69
38	แสดงผลการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากการทำกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 และ N162A	71
39	แสดงผลการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากการทำกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง E260A และ C294A	73
40	การแสดงผลของโปรตีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยวิธีส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต	75
41	กราฟแสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ ด้วยวิธีส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต	77
42	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี Error prone PCR	80
43	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ <i>Ex Taq</i> DNA polymerase	81

คำอธิบายคำย่อ

คำอธิบายอักษรย่อสารเคมี

EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
HCl	=	Hydrochloric acid
HEPES-KOH	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid potassiumhydroxide
IPTG	=	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
PMSF	=	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TAME	=	Tosyl arginine methyl ester
Tris	=	Tris hydroxymethyl aminomethane

การศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์จากข้าว

Characterization of BADH2 Mutants from Rice (*Oryza sativa* L.)

คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่ได้รับความนิยมที่สุดอย่างหนึ่งของโลกและได้รับส่วนแบ่งทางการตลาดอย่างสูง โดยข้าวแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามความหอมได้แก่ ข้าวหอมและข้าวไม่หอม โดยข้าวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือข้าวหอม เนื่องจากมีกลิ่นหอมอันเป็นเสน่ห์เฉพาะ จากการศึกษาสารให้กลิ่นหอมในข้าวพบสารให้กลิ่นหอมในข้าว 114 ชนิด อาทิเช่น ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ ฟีนอล เอสเตอร์ ไพรีดีน ไพราซีน เป็นต้น (Yajima *et al.*, 1978) โดยสารหอมหลักคือ 2AP ซึ่งพบได้ในข้าวสายพันธุ์ indica jasmine และ basmati (Butter *et al.*, 1982) จากการติดตามด้วย¹⁵N-proline พบว่า proline เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นหอมในข้าว เนื่องจากไนโตรเจนของ proline ใช้เป็นไนโตรเจนของสารกลิ่นหอม 2AP (Yoshihashi *et al.*, 2002; Bradbury *et al.*, 2005; Vanavichit *et al.*, 2006; Amarawathi *et al.*, 2008) จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมหลักดังกล่าว ได้แก่ Betaine aldehyde Dehydrogenase (BADH: 1.2.1.8) โดยเอนไซม์ดังกล่าวช่วยในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ betaine aldehyde เกิดเป็น glycine betaine โดยใช้ NAD(P)⁺ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ (Rasario *et al.*, 2009) เอนไซม์ BADH พบในสิ่งมีชีวิตทั้งยูคาริโอตและโปรคาริโอต ในข้าวมีรายงานว่า พบเอนไซม์ BADH จำนวน 2 ไอโซฟอร์มได้แก่ BADH1 และ BADH2 โดยยีน BADH1 อยู่บนโครโมโซมที่ 4 เกี่ยวข้องกับ osmolytic stress ส่วนยีน BADH2 พบบนโครโมโซมที่ 8 เกี่ยวข้องกับสารความหอม (Bradbury *et al.*, 2008) จากการรายงานโครงสร้างของยีน BADH2 ในข้าวพบว่าประกอบด้วย 15 เอกซอน และ 14 อินตรอน ยีนดังกล่าวจึงจัดเป็นยีนควบคุมความหอม (*fgr* gene) โดยในข้าวหอมพบว่า ยีน BADH2 เกิดการกลายพันธุ์ โดยมีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 8 เบส รวมถึงพบเบสเปลี่ยน 3 เบส (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ในบริเวณเอกซอนที่ 7 ของยีนดังกล่าว (Bradbury *et al.*, 2005) ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำให้ยีน *fgr* ที่เป็นลักษณะทางพันธุกรรมด้อย

นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ในลักษณะต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดความหอมขึ้นในข้าว เช่น มีการดออะมิโนไทโรซีนเพิ่มขึ้นในตำแหน่งที่ 420 (Kovach *et al.*, 2009) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 นอกจากนี้ยังสนใจศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 เมื่อกรดอะมิโนบริเวณเร่งถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน

งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการกลายพันธุ์ยีน BADH2 ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดั้งเดิม และตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์จากกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้ผู้วิจัย ยังสนใจศึกษาการกลายพันธุ์แบบสุ่มของยีนดังกล่าว ว่ามีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์หรือไม่ อย่างไร



วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ 4 ชนิด โดยวิธี Site Directed Mutagenesis ได้แก่ Y420 N162A E260A และ C294A
2. เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ Y420 N162A E260A และ C294A
3. เพื่อผลิตเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์แบบสุ่มโดยวิธีส่งได้แสงอัลตราไวโอเลต และด้วยวิธี Error prone PCR

การตรวจเอกสาร

1. ข้าว (Rice)

ข้าวจัดอยู่ในอาณาจักรพืช วงศ์ Poaceae สกุล *Oryza* ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L.

Kingdom: Plantae
Division: Angiosperms
Class: Monocots
Order: Poales
Family: Poaceae
Genus: *Oryza*
Species: *O. sativa*

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญอย่างหนึ่งของโลก ประเทศไทยได้ส่งออกข้าวทั้งในเอเชีย ยุโรป ออสเตรเลีย อเมริกา และตะวันออกกลาง โดยได้รับส่วนแบ่งจากตลาดโลกถึง 21 เปอร์เซ็นต์ ในเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้มีผู้บริโภคข้าวมากถึง 76 เปอร์เซ็นต์ (Berner and Hoff, 1986; Reinke *et al.*, 1991; Shobha *et al.*, 2006)

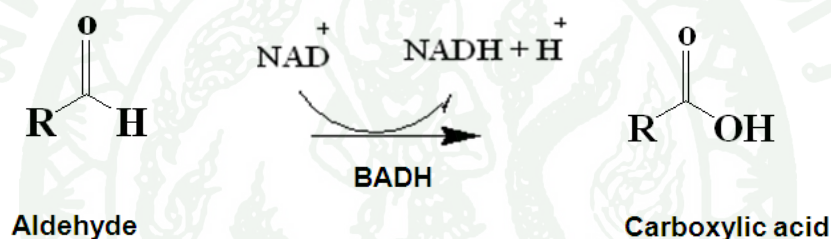
ข้าวแบ่งออกเป็นสองประเภทตามความหอม ได้แก่ ข้าวหอม และข้าวไม่หอม โดยข้าวหอมเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีกลิ่นหอมอันเป็นเสน่ห์เฉพาะ ทำให้มีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง (Baishya *et al.*, 2009) จากการศึกษาพบว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นในข้าวมีมากกว่า 300 ชนิด โดยพบสารสำคัญกว่า 100 ชนิดในข้าวหอม เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ ฟีนอล เอสเตอร์ ไพรีดีน ไพราซีน เป็นต้น (Yajima *et al.*, 1978) ซึ่งสารสำคัญหลักที่ทำให้เกิดความหอมในข้าวหอมคือสาร 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) (Petrov *et al.*, 1996; Widjaja *et al.*, 1996)

ข้าวหอมแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสายพันธุ์ของข้าว ได้แก่ 1. Group V 2. Indica และ 3. Tropical japonica โดยกลุ่มหนึ่งได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ Basmati และ Sadri กลุ่ม Indica ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ Jasmin และกลุ่ม Tropical japonica ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ Tinawon และ Unoy (Kovach *et al.*, 2009)

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมหลักดังกล่าว ได้แก่ Betaine aldehyde Dehydrogenase เอนไซม์นี้ พบในสิ่งมีชีวิตทั้งยูคาริโอต และโปรคาริโอต ในข้าวมีรายงานว่า พบเอนไซม์ BADH จำนวน 2 ไอโซฟอร์มได้แก่ BADH1 และ BADH2 ซึ่งยีน BADH2 จัดเป็นยีนควบคุมความหอม (*mgr* gene)

2. เอนไซม์ Betaine aldehyde Dehydrogenase (BADH2)

เอนไซม์ Betaine aldehyde Dehydrogenase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Aldehyde dehydrogenase (ALDH) สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ aldehyde เป็น carboxylic acid โดยใช้ NAD(P)^+ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ (Rasario *et al.*, 2009) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH

เอนไซม์ BADH (BADH: 1.2.1.8) จัดอยู่ใน ALDH 3 กลุ่ม (Sanche *et al.*, 2007)

ได้แก่ - ALDH 9 เป็นเอนไซม์ BADH ที่พบในสัตว์ แบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด

- ALDH 10 เป็นเอนไซม์ BADH ที่พบในพืช และเชื้อราบางชนิด

- ALDH 23 เป็นเอนไซม์ BADH ที่พบในแบคทีเรียเฟอมีคิว และแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส

โดยเอนไซม์ในกลุ่ม ALDH9 มีโครงสร้างเป็น tetrameric ขณะที่กลุ่ม ALDH10 มีโครงสร้างเป็น dimeric (Weretilnyk *et al.*, 1989; Falkenberg *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1998; Valenzuela *et al.*, 2003)

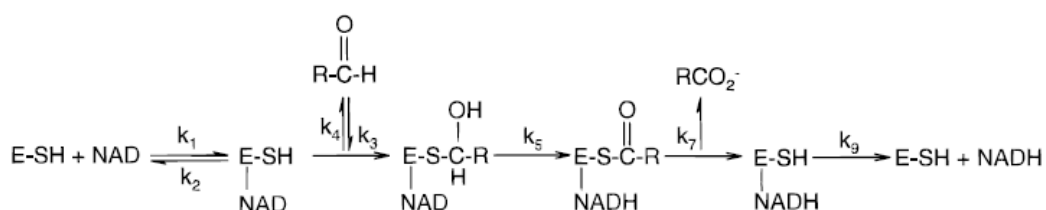
จากการศึกษา BADH เป็นเอนไซม์เร่งการเปลี่ยน betaine aldehyde (Bet-ald) เป็น glycine betaine ซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันการออกซิไดซ์ (Ishitani *et al.*, 1993; Russell *et al.* 1998; Shirasawa *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า BADH ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไม่สามารถเปลี่ยนสับสเตรท Bet-ald เป็น glycine betaine ได้ เช่น ในพืชตระกูลข้าว (Ishitani *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1997; Mohanty *et al.*, 2002; Niu *et al.*, 2007) เนื่องจากข้อผิดพลาดของเอนไซม์ choline monooxygenase (CMO) บนโคโมโซมคู่ที่ 6 ที่เปลี่ยน choline เป็น betaine aldehyde (Shirasawa *et al.*, 2006; Bradbury *et al.*, 2008) ซึ่งจาก

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า BADHs ในพืชสามารถใช้สับสเตรท omega-aminoaldehydes ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าใช้ Bet-ald (Trossat *et al.*, 1997; Incharoensakdi *et al.*, 2000; Livingstone *et al.*, 2002; Oishi and Ebina, 2005) และจากการรายงานพบว่า เอนไซม์ aminoaldehyde dehydrogenase (ADD) ซึ่งเป็น homolog กับ BADH ไม่สามารถใช้สับสเตรท Bet-ald แม้จะเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Sebela *et al.*, 2000; Livingstone *et al.*, 2002; Reumann, 2004)

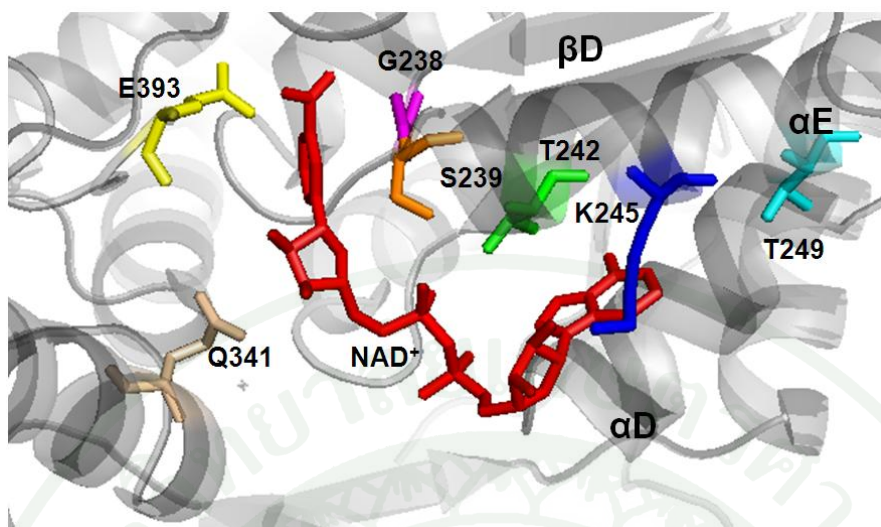
BADHs สามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทในกลุ่มแอลดีไฮด์ได้หลายชนิด เช่น 3-aminopropionaldehyde (AP-ald) Betaine aldehyde (Bet-ald) และ γ -aminobutyraldehyde (AB-ald) เป็นต้น โดยพบว่า AB-ald เป็นสารตัวกลางในกลไกของ polyamine ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร γ -aminobutyric acid (GABA) และสารหอม 2AP ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นหอมหลักในข้าวหอม (Moschou *et al.*, 2008)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบยีน Betaine aldehyde dehydrogenase (BAHD) ในข้าว (*O. sativa*) 2 ไอโซฟอร์ม คือ BAHD1 และ BAHD2 โดย BADH1 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน betaine aldehyde ไปเป็น glycine betaine ที่ช่วยป้องกันความเครียดต่อความเค็ม ความแห้งแล้งในพืช (salt and tolerance stress) (Bradbury *et al.*, 2005) ส่วน BADH2 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 เกี่ยวข้องกับการสะสมสารหอม 2AP ในข้าว โดยโครงสร้างของยีน BADH2 ในข้าวประกอบด้วย 15 เอกซอน และ 14 อินตรอน

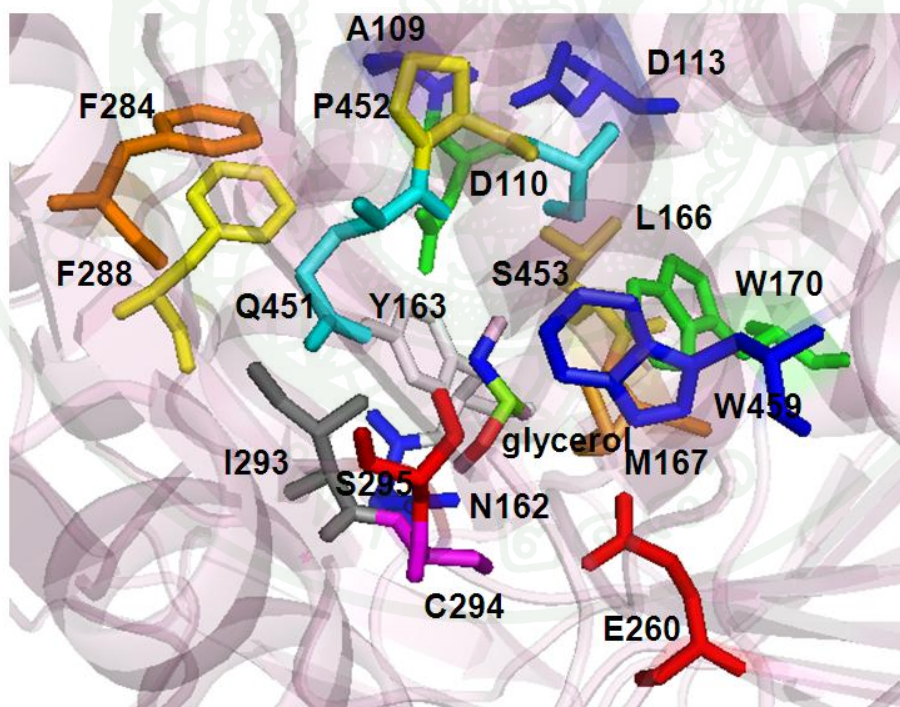
การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH อาศัยโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADP^+ โดยโคแฟกซ์เตอร์จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ก่อน จากนั้นสับสเตรท aldehyde จะเข้าจับกับเอนไซม์บริเวณหมู่ไทออล (-SH) ของซีสทีนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (Mann and Weiner, 1999; Costanzo *et al.*, 2007) แสดงดังภาพที่ 2 โดยการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดบริเวณที่เรียกว่า Rossmann fold (Johansson *et al.*, 1998) จากรายงานโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADHs (PsAMADHs) จากถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) พบตำแหน่ง NAD^+ binding site คือ บริเวณ E393 G238 S239 T242 K245 T249 และ Q341 แสดงดังภาพที่ 3 และบริเวณ substrate channel ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่ง N162 Y163 W170 I293 C294 S295 S453 และ W459 แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 2 แสดงลำดับการเข้าจับของโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+



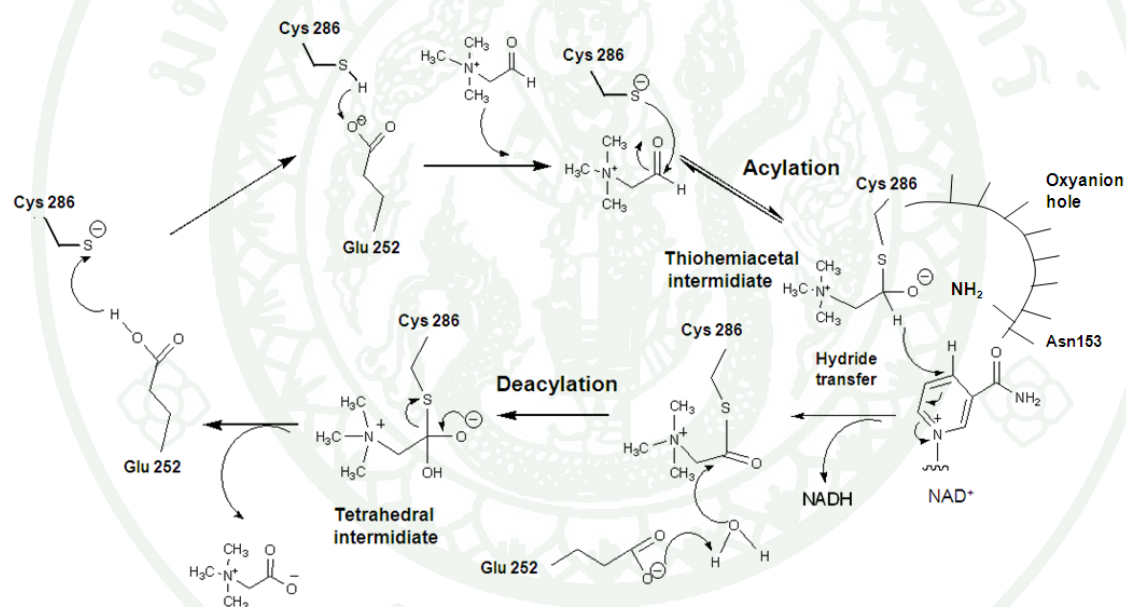
ภาพที่ 3 แสดงบริเวณจับของโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ ของ BADH จากถั่วลิ้นเตา ด้วยโปรแกรม PyMOL



ภาพที่ 4 แสดงบริเวณจับของลิแกนด์ของ BADH จากถั่วลิ้นเตา ด้วยโปรแกรม PyMOL

กลไกการทำงานของเอนไซม์ BADH พบว่าโคแฟกซ์เตอร์จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ก่อน จากนั้นลิแกนด์ aldehyde จะเข้าจับกับเอนไซม์บริเวณหมู่ไทออล (-SH) ของซีสทีนซึ่งเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา

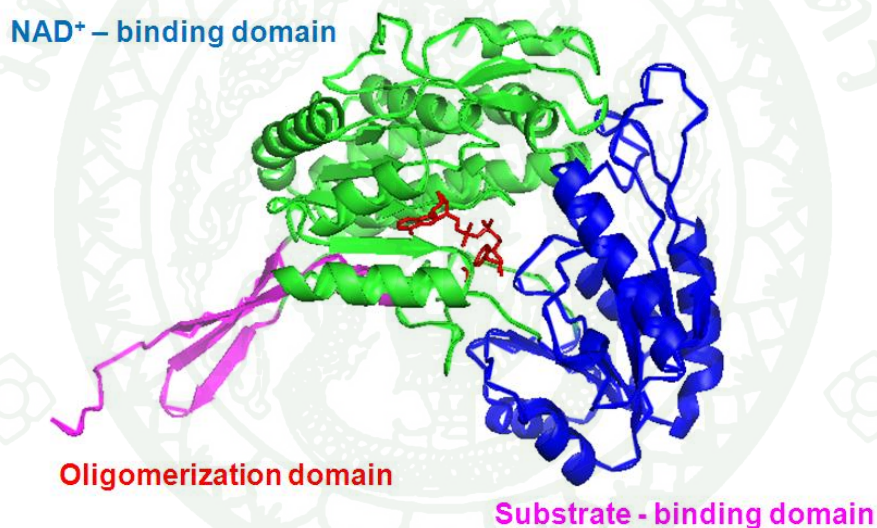
โดยซิสทีอีนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาจะถูกดึงโปรตอน (deprotonate) จากกลูตามัตซึ่งเปลี่ยน ซิสทีอีน ในภาวะไม่ทำงาน ให้อยู่ในสภาวะพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรท หลังจากที่คาร์บอนของแอลดีไฮด์จับกับหมู่ไทออลของซิสทีอีนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาแล้วจะเกิดกระบวนการ acylation และเกิดการจัดเรียงตัวของสับสเตรทให้อยู่ในรูป thiohemiacetal intermediate โดยในขั้นตอนนี้ เอไมด์ไนโตรเจนของแอสปารากินจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสับสเตรท เพื่อทำให้โครงสร้างของสับสเตรทเกิดความเสถียร (Gonzalez-Segura *et al.*, 2008) และจะเกิดการถ่ายทอดไฮโดรเจนไปสู่วงนิโคตินาไมด์ของ NAD^+ ให้กลายเป็น NADH จากนั้นกลูตามัตที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ จะไปรับไฮโดรเจนจากน้ำ และน้ำจะไปจับบริเวณคาร์บอนของสับสเตรท ทำให้เกิดกระบวนการ deacylation และเกิดการจัดเรียงตัวของสับสเตรทให้อยู่ในรูป Tetrahedral intermediate โดยผลผลิตจากปฏิกิริยาจะหลุดออกไป จากนั้นเอนไซม์ไปจับกับสับสเตรทตัวอื่นต่อไปแสดงดังภาพที่ 5



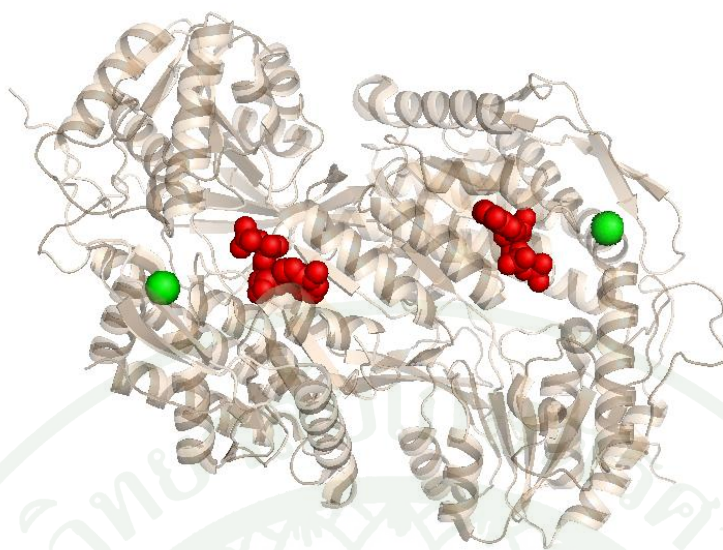
ภาพที่ 5 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ BADHs

ปัจจุบันมีรายงานโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADHs จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในฐานข้อมูลของโปรตีน (Protein Data Bank: PDB) ได้แก่ เอนไซม์ BADH จากตับของปลาคอด (cod PDB: 1A4S) (Johansson *et al.*, 1998) จาก *E.coli* (cod PDB: 1WNB) (Gruez *et al.*, 2004) จาก *Pseudomonas aeruginosa* (cod PDB:) (Gonzalez-Segura *et al.*, 2008) และจากถั่วลิสง (cod PDB: 3IWJ) (Tylichova *et al.*, 2010) โดยโครงสร้างของเอนไซม์จาก 3 สิ่งมีชีวิตแรกมีลักษณะเป็น Tetrameric แต่โครงสร้างเอนไซม์จากถั่วลิสงเป็น Dimeric จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ BADHs จากที่กล่าวมาโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ดังแสดงตามภาพที่ 6 พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ BADH2 จากข้าวมีความคล้ายกับ BADH

โครงสร้างของเอนไซม์ BADHs ของปลาคอด ประกอบด้วย 3 โดเมน ได้แก่ 1. oligomerization domain 2. NAD^+ binding domain และ 3. substrate binding domain (ภาพที่ 7) โดยโดเมนทั้ง 3 มีหน้าที่ดังนี้ NAD^+ binding domain เป็นตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับโคแฟกซ์เตอร์ ส่วน Oligomerization domain เป็นส่วนที่ช่วยรวมตัวของสับยูนิตต่างๆ และ Substrate binding domain เป็นบริเวณที่จับกับสับสเตรท (Johansson *et al.*, 1998; Rasario *et al.*, 2009) โดย NAD^+ binding domain และ substrate binding domain คือบริเวณ $\alpha\beta$ ของ Rossmann fold ขณะที่ oligomerization domain คือบริเวณ β -strand 3 เส้นที่บริเวณปลายคาร์บอกซิล และจากรายงานโครงสร้างสามมิติของ BADH จากถั่วลิสง พบบริเวณที่มีความสำคัญต่อความเสถียรของเอนไซม์คือ cation binding site (Tylichova *et al.*, 2010) ดังแสดงตามรูปที่ 8

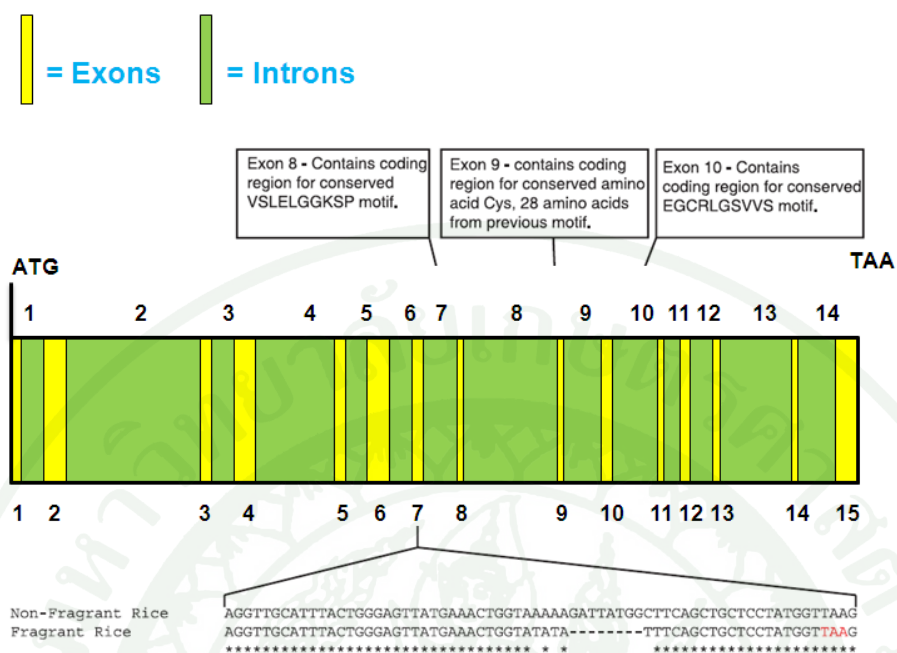


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่ม ALDHs ประกอบด้วย 3 โดเมน โดยใช้โปรแกรม PyMOL บริเวณสีเขียว คือ NAD^+ binding domain บริเวณสีน้ำเงิน คือ substrate binding domain บริเวณสีชมพู คือ oligomerization domain และบริเวณสีแดง คือ โคแฟกซ์เตอร์ NAD^+



ภาพที่ 8 แสดงบริเวณจับของ cation ของ BADH จากถั่วลิสงเตา ด้วยโปรแกรม PyMOL โดยลูกบอลสีเขียว คือ Na^+

จากหลักฐานทางพันธุศาสตร์พบว่าสาเหตุที่ทำให้ข้าวหอม เนื่องจากสูญเสียหน้าที่ของ เอนไซม์ BADH2 เช่น เกิดการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ 8 เบส และเกิดการเปลี่ยนแปลงเบส ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 เบส ในเอกซอนที่ 7 ของยีน BADH2 ทำให้เอนไซม์สูญเสียหน้าที่ไป ทำให้ข้าว สว่างสารหอมขึ้น (Lorieux *et al.*, 1996; Garland *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2003) โดยภาพที่ 9 แสดงการขาด หายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BADH2 เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะได้สายพอลิเปปไทด์ที่สั้นลง โดยมีกรดอะมิโน 251 ตัว ซึ่งต่างจาก BADH2 ปกติที่มีความยาว 503 กรดอะมิโน (ภาพที่ 10) และ นอกจากนี้ยังพบข้าวหอมสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีลักษณะการขาดหายหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในตำแหน่งอื่นบนยีน BADH2 เช่น ข้าวหอมสายพันธุ์ basmati พบว่าบริเวณเอกซอนที่ 8 มีการขาดหายไป ของนิวคลีโอไทด์ 5 เบส (Amarawathi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008)



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างของยีน BADH2 จากข้าว

```

Fragrance_Rice_BADH2      --MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREAL 58
Nonfragrance_Rice_BADH2   --MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREAL 58
Nonfragrance_Rice_BADH1   MAAPSAIPRRLFTGGWRPESLGRRLPVVNPATEATIGDIPAAATAEDELAVSAARDAF 60
                          .:***:* **:* * * *:*****:***:***:***:***:***:

Fragrance_Rice_BADH2      KRNRGRDWARAPGAVRAKYLRATAAKIIERKSELARLETLDGCKPLDEAAWIMDDVAGCF 118
Nonfragrance_Rice_BADH2   KRNRGRDWARAPGAVRAKYLRATAAKIIERKSELARLETLDGCKPLDEAAWIMDDVAGCF 118
Nonfragrance_Rice_BADH1   GRDGGRHWSRAPGAVRAKYLRATAAKIKDKKSYLALLETLDSGKPLDEAAGIMEDVAACF 120
                          *: **:* *****:*****:*****:*****:*****:*****:

Fragrance_Rice_BADH2      EYFADLAESLDKQNAFVSLPMENFKCYLKEPIGVVGLITPWNYPILMATWKVAPALAA 178
Nonfragrance_Rice_BADH2   EYFADLAESLDKQNAFVSLPMENFKCYLKEPIGVVGLITPWNYPILMATWKVAPALAA 178
Nonfragrance_Rice_BADH1   EYFADLAESLDKQNAFVSLPMENFKCYLKEPIGVVGLITPWNYPILMATWKVAPALAA 180
                          *:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:

Fragrance_Rice_BADH2      GCTAVLKPSELASVTOLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVAFTG 238
Nonfragrance_Rice_BADH2   GCTAVLKPSELASVTOLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVAFTG 238
Nonfragrance_Rice_BADH1   GCTAVLKPSELASVTOLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVAFTG 240
                          *****:*****:***:***:***:***:***:***:***:***:

Fragrance_Rice_BADH2      SYETGIYFSCSYG----- 251
Nonfragrance_Rice_BADH2   SYETGKKIMASAPMVKPVSELELGGKSPVVFDDVDVEKAVENTLFGCFWINGQICISATS 298
Nonfragrance_Rice_BADH1   STETGKRIMITASQMVKPVSELELGGKSPVVFDDVDIKNAVEWAMFGCFANAGQVCSATS 300
                          * *** : . :

Fragrance_Rice_BADH2      -----
Nonfragrance_Rice_BADH2   RLILHKKIAKEFQERMVAVAKNIKVSDFLEEGCLGPNWSEGQYKIKQFVSTAKSQGAT 358
Nonfragrance_Rice_BADH1   RLILHKKIAKEFQERMVAVAKNIKVSDFLEEGCLGPNWSEGQYKIKQFVSTAKSQGAT 360
                          -----

Fragrance_Rice_BADH2      -----
Nonfragrance_Rice_BADH2   ILTGGVPRPKHLEKGFYIEPTIITDVTSMQIWRREEVFGFVLCVKEFSTEERAEIANDTH 418
Nonfragrance_Rice_BADH1   ILTGGVPRPKHLEKGFYIEPTIITDVTSMQIWRREEVFGFVLCVKEFSTEERAEIANDTH 420
                          -----

Fragrance_Rice_BADH2      -----
Nonfragrance_Rice_BADH2   YGLAGAVLSGDRERCPQLTEEIDAGIIVWNCSPQCFQAPWGGNKPSSGFGRELGGGIDN 478
Nonfragrance_Rice_BADH1   YGLAGAVISNDLERCEHISKAIQSGIIVWNCSPQCFQAPWGGNKPSSGFGRELGGGIDN 480
                          -----

Fragrance_Rice_BADH2      -----
Nonfragrance_Rice_BADH2   YLSVKQVTEYASDEFWGWYKSPSKL 503
Nonfragrance_Rice_BADH1   YLSVKQVTKYCSDEFWGWYRPPSKL 505
                          -----

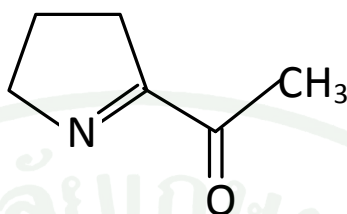
```

ภาพที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน BADH1 และ BADH2 ในข้าวหอม และ ไม่หอม โดยใช้โปรแกรม ClustalW บริเวณสีฟ้า คือ บริเวณอนุรักษ์ และบริเวณสีเหลือง คือ สัญญาณกรดอะมิโน SKL ที่ปลาย

3. สาร 2-Acetyl-1-pyrroline

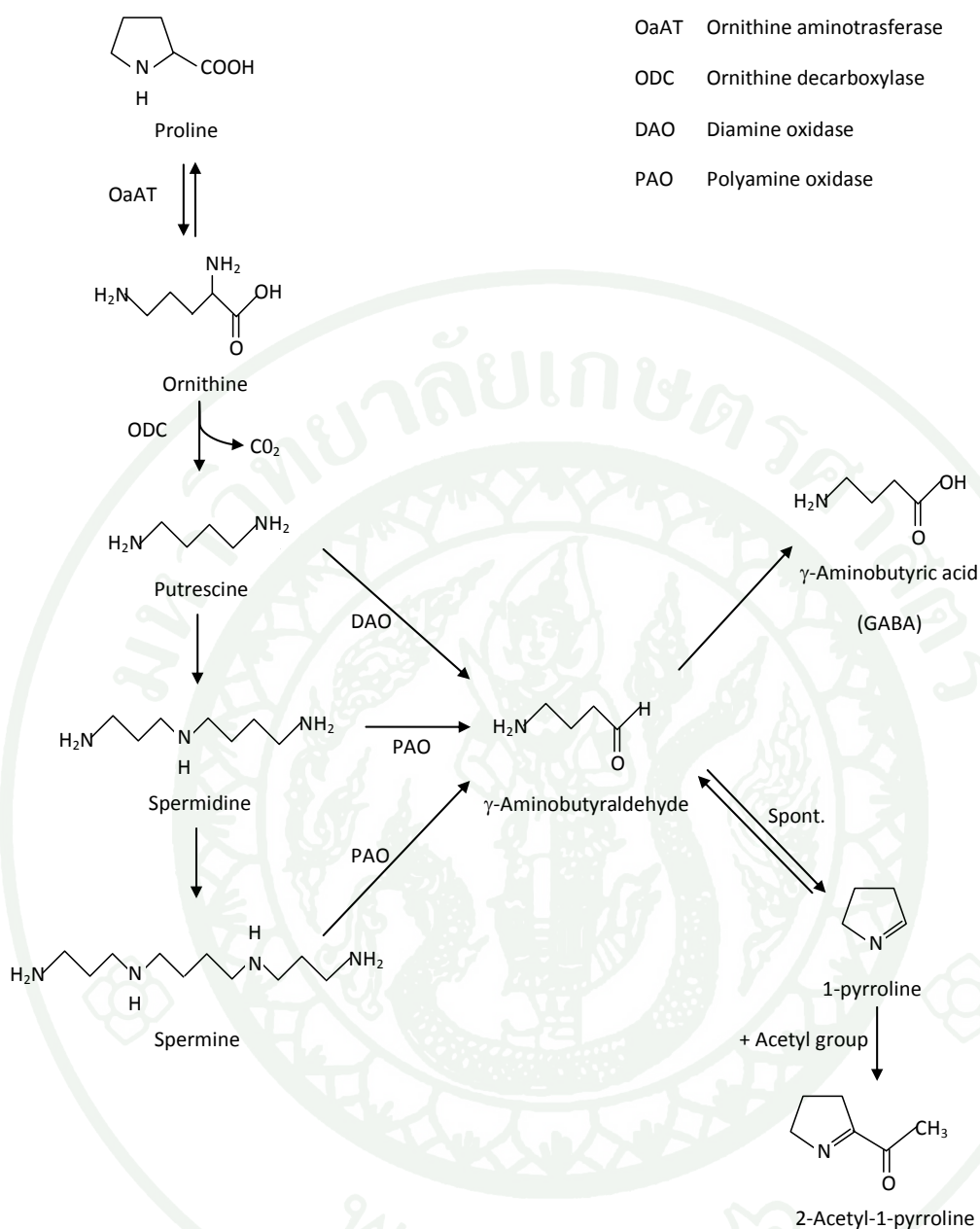
ในข้าวหอมพบกลิ่นหอมมากกว่า 114 ชนิด เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ ฟีนอล เอสเตอร์ ไพริดีน ไพราซีน เป็นต้น (Yajima *et al.*, 1978) โดยสารหอมหลักในข้าวหอม คือ 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) (ภาพที่ 11) นอกจากพบในข้าวแล้วยังพบในธัญพืชบางชนิด ใบเตย ข้าวโพดคั่ว แสม ชีส ชาเขียว แבקที่เรีย และราบางชนิด (Buttery *et al.*, 1983; Schieberle, 1995; Romanczyk *et al.*, 1995; Zehentbauer and Grosch, 1998; Costello *et al.*, 2001; Carrapiso *et al.*, 2002; Kumazawa and Masuda, 2002; Rungsardthong and Noomhoom, 2005; Snowdon *et al.*, 2006; Adams and De Kimpe, 2007)

โดยสาร 2AP พบได้ในทุกส่วนของข้าวยกเว้นราก ซึ่งสาร 2AP สร้างมาจากกลไกของ polyamine โดย L-proline เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตสารหอม 2AP ในข้าว (Bradbury *et al.*, 2008)



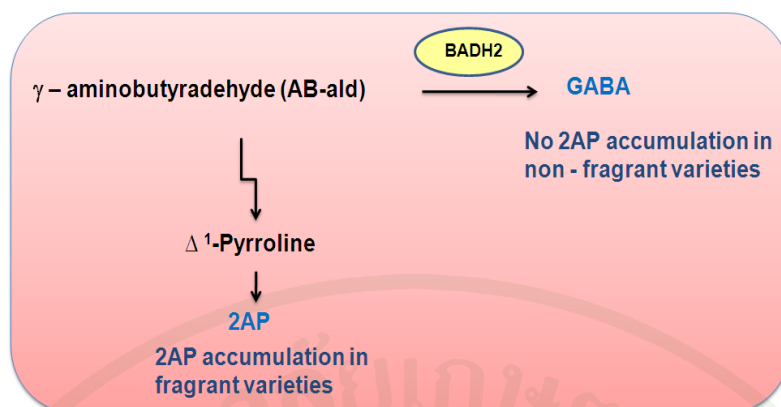
ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างของ 2AP

กลไกของ polyamine ในการสร้างสาร 2AP ในข้าวหอม ที่ศึกษาในเมล็ด และต้นอ่อนของข้าว ทดลองโดยติดฉลากด้วย ^{15}N -glycine และ proline-1- ^{13}C พบว่าไนโตรเจนที่ใช้สร้าง 2AP มาจาก proline หรือ ornithine (Buttery *et al.*, 1983; Lorieux *et al.*, 1996; Widjaja *et al.*, 1996; Yoshihashi, 2002) แต่หมู่ acetyl ไม่ได้มาจาก proline (Yoshihashi *et al.*, 2002) ซึ่งจากการทดลองพบว่าหมู่ acetyl ของ 2AP ใน *Lactobacillus hilgardii* ได้มาจากน้ำตาลฟรุกโตสที่เหลือจากการสร้างเอทานอล หรือ acetaldehyde (Costello *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า 1-pyrroline ผลิตจากกลไกของ polyamine โดย 1-pyrroline เป็นสารตั้งต้นของ 2AP และหมู่ acetyl ได้มาจาก acetyl CoA หรือ acetaldehyde ในปฏิกิริยาเคมี จากกลไกของ polyamine โมเลกุลของ proline จะเปลี่ยนเป็น ornithine โดยเอนไซม์ ornithine aminotransferase (OaAT) หลังจากนั้น ornithine จะถูก decarboxylation เป็น putresine และเปลี่ยนเป็น spermidine และ spermine ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ ornithine decarboxylase (ODC) หลังจากนั้น putresine spermidine และ spermine จะถูกเปลี่ยนเป็น γ -aminobutyraldehyde (AB-aldehyde) โดยใช้เอนไซม์ diamine oxidase (DAO) และ polyamine oxidase (PAO) ซึ่ง aminoquanidine-HCl (AG) และ 3-hydroxyethyl drodine (HEH) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ DAO และ PAO ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า AB-aldehyde เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง GABA และ 1-pyrroline โดย 1-pyrroline เป็นสารตั้งต้นของ 2AP (ภาพที่ 12) และจากกลไกการสร้าง 2AP ใน *Bacillus cereus* พบว่าจะผ่านกระบวนการ acetylation ของ 1-pyrroline (Adams and De Kimpe, 2007) อย่างไรก็ตามกลไกการสร้าง 2AP ยังไม่ชัดเจน



ภาพที่ 12 กลไกการสร้าง 2-Acetyl-1-pyrroline และ γ -Aminobutyric acid ผ่าน polyamine

จากที่กล่าวมาพบว่าสาร 2AP ถูกสร้างโดยปฏิกิริยาการเปลี่ยน AB-ald เป็น 1-pyrroline และ 2AP ตามลำดับ จากการศึกษพบว่า เอนไซม์ BADH2 เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน AB-ald เป็น GABA (ภาพที่ 13) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ BADH2 นี้ ทำให้ปริมาณของ AB-ald ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสารหอม 2AP ลดลง ในข้าวไม่หอมพบว่า เอนไซม์ BADH2 สามารถเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดี จึงไม่ก่อให้เกิดการสะสมสารหอม ซึ่งแตกต่างจากในข้าวหอม ที่พบว่า เอนไซม์ BADH2 มีกิจกรรมน้อยลง เนื่องจากยีน BADH2 ในข้าวหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังอธิบายข้างต้น



ภาพที่ 13 แสดงกลไกการสังเคราะห์ 2AP

4. สาร γ -aminobutyric acid (GABA)

สาร γ -aminobutyric acid หรือ GABA มีโครงสร้างคล้ายกรดอะมิโน (ภาพที่ 14) พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด



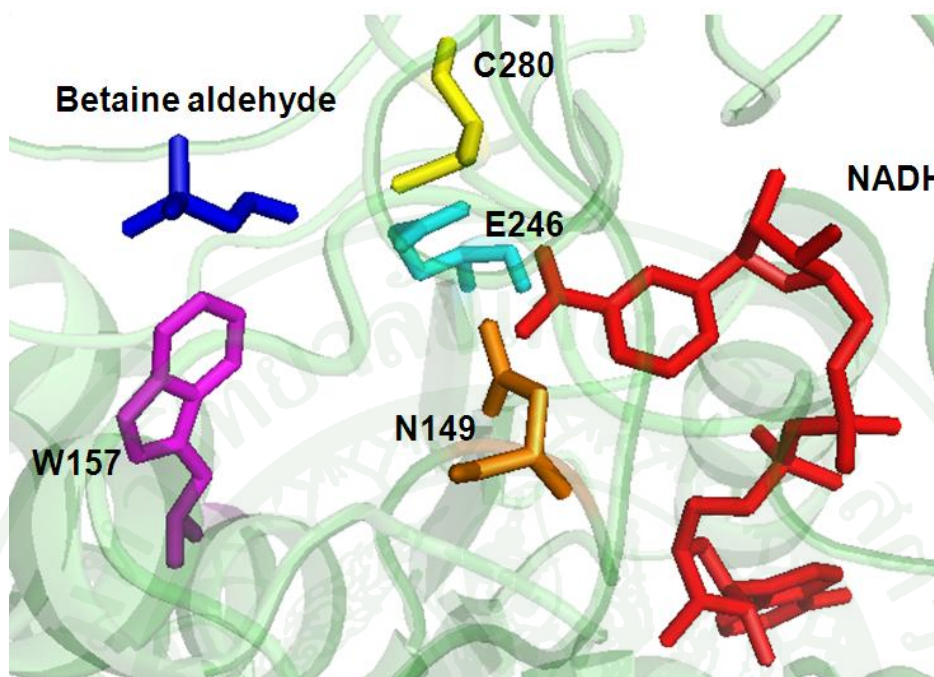
ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างของ GABA

GABA ในพืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะทำหน้าที่แตกต่างกัน โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม GABA เป็นสารยับยั้งสารสื่อประสาท พบในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ซึ่งช่วยลดความดันโลหิต ช่วยทำให้ผ่อนคลาย (create relaxing) ลดอาการเกร็งชัก เป็นต้น (Manyam *et al.*, 1981; Srivong *et al.*, 2007) ส่วนในพืช GABA มีหน้าที่ควบคุมการทำงานภายในเซลล์พืชผ่านกลไก shut (shut pathway) โดยควบคุมสมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจนในเซลล์พืช ช่วยควบคุม cytosolic pH ช่วยควบคุมความเครียดต่างๆในพืช เช่น ความเครียดต่อความเค็ม ป้องกันการกักกินของแมลงต่อต้นพืช และเป็น osmoregulator รวมทั้งเป็นตัวควบคุมสัญญาณต่างๆในเซลล์พืช (Bouche and Fromm *et al.*, 2004)

5. กรดอะมิโนที่สำคัญของเอนไซม์ BADH2

ในปี 2008 Gonzalez-Sagura และคณะได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH จาก *P. aeruginosa* พบตำแหน่ง catalytic triad ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง C286 N153 และ E253 ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) โดย BADH จากตับของปลาคอด พบ C297 N166 และ E263 (Johansson *et al.*, 1998) ใน *E.coli* พบ C280 N149 และ E246 (Gonzalez-Sagura *et al.*, 2008) ใน ถั่วลิ้นเตาพบที่ตำแหน่ง C294 N162 และ E260 (Tylichova *et al.*, 2010)

หน้าที่ของกรดอะมิโน 3 ตำแหน่งบริเวณ catalytic triad ของเอนไซม์ BADH จาก *E.coli* พบว่า หมู่ไทออล (-SH) ของ C280 ทำหน้าที่จับกับแอลฟาคาร์บอนของสับสเตรท โดยเอไมด์ไนโตรเจนของ N149 จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสับสเตรทขณะที่จับกับซิสทีนอื่น บริเวณเร่งปฏิกิริยา ทำให้โครงสร้างของสับสเตรทเกิดความเสถียร และ E246 มีหน้าที่ดึงโปรตอนจากซิสทีนอื่นที่ตำแหน่ง 280 จากสถานะที่ไม่สามารถทำให้สับสเตรทเข้ามาจับกับซิสทีนอื่น กลายเป็นให้เข้ามาจับได้ โดยตกผลึกเอนไซม์ BADH จาก *E.coli* กับ betaine aldehyde และ NADH (PDB code: 1WNB) (Gruez *et al.*, 2004) แสดงดังภาพที่ 15 และจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH จากถั่วลิ้นเตา พบว่าตำแหน่ง C294 อยู่ระหว่างตำแหน่ง NAD^+ และ substrate binding site ส่วนตำแหน่ง N162 และ E260 อยู่บริเวณ substrate channel (Tylichova *et al.*, 2010)



ภาพที่ 15 แสดงบริเวณ catalytic triad ของเอนไซม์ BADH จาก *E.coli*

ในปี 2009 Kovach และคณะได้สำรวจต้นกำเนิด และวิวัฒนาการความหอมของข้าวหอม (*O.sativa*) ทั่วทวีปเอเชียพบข้าวหอม 10 แบบ โดยเมื่อนำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าข้าวหอม ทั้ง 10 แบบ ได้แก่ *badh* 2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2.7 2.8 2.9 และ 2.10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ของข้าวหอมบางแบบที่มีการขาดหายไป หรือมีการเพิ่มขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงโดยการแทนที่ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เอกซอนต่างๆ แสดงดังภาพที่ 16

Allele	Mutation	Mutant	Exon
Wildtype		-	-
badh2.1		1 bp FNP	2 nd
badh2.2		7 bp deletion	2 nd
badh2.3		2 bp deletion	1 st
badh2.4		1 bp insertion	10 th
badh2.5		1 bp deletion	10 th
badh2.6		G → T SNP	10 th
badh2.7		1 bp insertion	14 th
badh2.8		3 bp insertion	13 th
badh2.9		G → T SNP	14 th
badh2.10		C → T SNP	13 th

ภาพที่ 16 แสดงตำแหน่งกลายพันธุ์ในข้าวหอม

จากที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองทำกลายพันธุ์เอนไซม์ BADH2 ด้วยวิธี Site Direct Mutagenesis หรือการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่ง การกลายพันธุ์โดยส่งได้แสงอัลตราไวโอเล็ต และการกลายพันธุ์โดยวิธี Error prone PCR เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาประสิทธิภาพของเอนไซม์

1. การทำกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 เบสในตำแหน่ง Y420 เพื่อเลียนแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้าวหอมพม่า (*badh 2.8*) และแทนที่ลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ catalytic triad ที่ตำแหน่งทั้ง 3 ได้แก่ C294 N162 และ E260 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน เพื่อศึกษากิจกรรมและความจำเพาะต่อการจับซับสเตรทของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์เปรียบเทียบกับ BADH2 ดั้งเดิม

1.1 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 เบสในตำแหน่ง Y420

จากการสำรวจต้นกำเนิด และวิวัฒนาการของความหอมทั่วทวีปเอเชียพบข้าวหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันถึง 10 แบบ (แสดงดังภาพที่ 16) จากรายงานยังไม่ระบุตำแหน่งที่กลายพันธุ์ของข้าวที่ชัดเจน แต่งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบตำแหน่งที่ชัดเจนของการกลายพันธุ์ *badh2.8* จาก รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร หัวหน้าศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

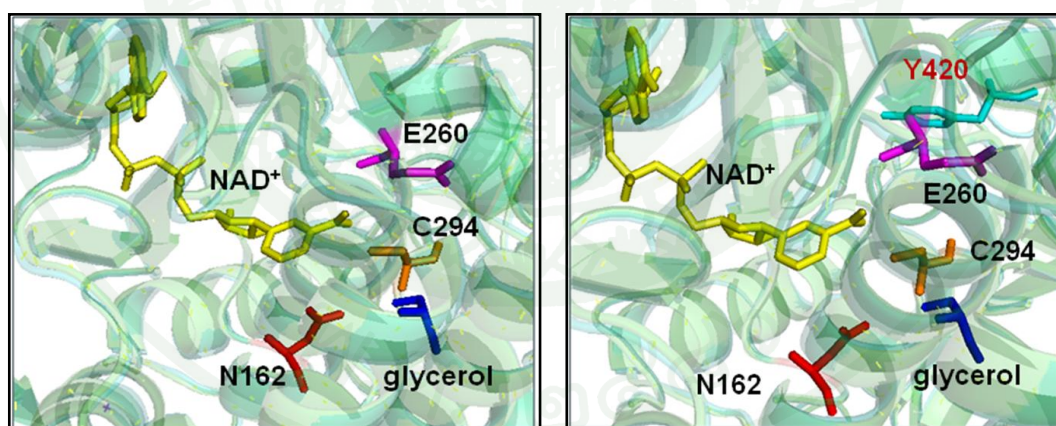
เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทางการเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังภาพที่ 17 คือมีการเพิ่มขึ้นของ 3 นิวคลีโอไทด์ (TAT) ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนไทโรซีน

```

BADH2          ATTGAATTGGCCAACGATACTCATTAT---GGTCTGGCTGGTGCTGTG 1275
badh2 . 8      ATTGAATTGGCCAACGATACTCATTATTATGGTCTGGCTGGTGCTGTG 1278
*****
  
```

ภาพที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นมา 3 เบสของ ยีน *badh* 2.8 จากข้าวหอมปทุมและยีน BADH2 จากข้าวไม่หอม โดยใช้โปรแกรม ClustalW

ผู้วิจัยได้ทำ Homology modeling ของ *badh* 2.8 ซึ่งมีตำแหน่งที่กลายพันธุ์โดยการเพิ่มของตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีนที่ตำแหน่ง 420 โดยงานวิจัยนี้จะเรียกว่า BADH2_Y420 เปรียบเทียบกับ BADH จากถั่วลิสง (PDB code: 3IWK) ด้วยโปรแกรม SWISS Model และแสดงภาพด้วยโปรแกรม PyMOL แสดงดังภาพที่ 18



(ก)

(ข)

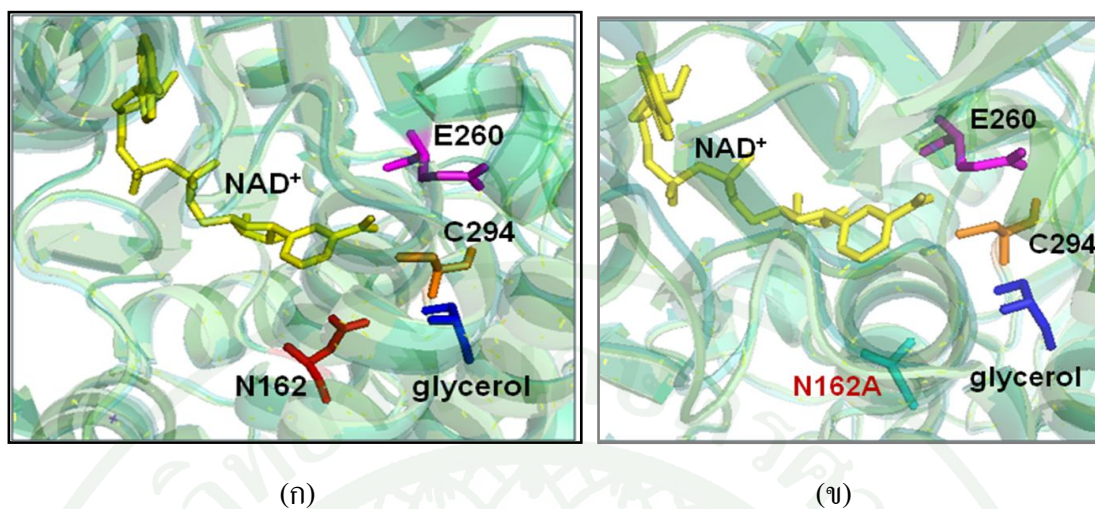
ภาพที่ 18 แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 โดยทำ Homology modeling ระหว่างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 กับ BADH จากถั่วลิสง (PDB code: 3IWJ) โดย (ก) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ (ข) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420

จากผลการทำ Homology modeling ของ BADH2_Y420 กับ BADH จากถั่วลิสง พบว่าตำแหน่ง Y420 ที่เพิ่มขึ้นมาอยู่ในบริเวณ catalytic triad ซึ่งจากการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_Y420 โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อความสามารถของเอนไซม์ต่อการจับกับสับสเตรท เนื่องจากตำแหน่ง Y420 ที่เพิ่มขึ้นมาอยู่ใกล้กับ E260 ซึ่งหน้าที่ในการทำให้ C294 พร้อมที่จะให้สับสเตรทจับ ดังนั้นตำแหน่ง Y420 ที่เพิ่มขึ้นมาอาจมีผลต่อความจำเพาะของเอนไซม์ต่อชนิดของสับสเตรทที่เปลี่ยนแปลงไป และรวมทั้งตำแหน่ง Y420 อยู่ใกล้กับตำแหน่ง NAD⁺ binding site อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ แสดงดังภาพ 18 (ข)

1.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยแทนที่ลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ catalytic triad ที่ตำแหน่งทั้ง 3 ได้แก่ C294 N162 E260 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน

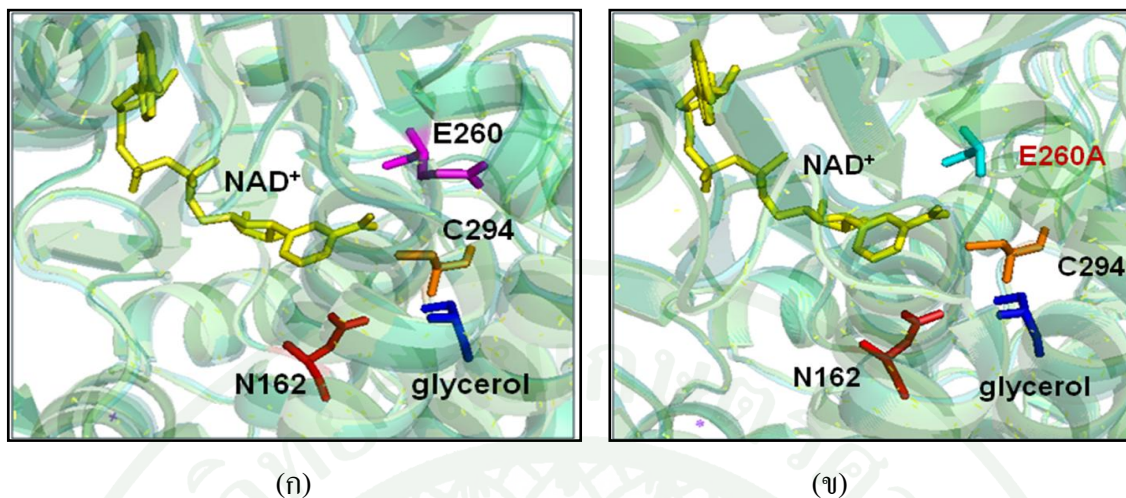
ผู้วิจัยได้ทำ Homology modeling ของ BADH2 ซึ่งมีตำแหน่งที่กลายพันธุ์โดยการแทนที่ลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ catalytic triad ทั้ง 3 ตำแหน่ง ได้แก่ C294 N162 E260 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนเปรียบเทียบกับ BADH จากถั่วลิสง (PDB code: 3IWK) ด้วยโปรแกรม SWISS Model และแสดงภาพด้วยโปรแกรม PyMOL โดยจะเรียกบริเวณที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294 N162 และ E260 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน ว่า BADH2_C294A BADH2_N162A และ BADH2_E260A ตามลำดับ

จากการทำ Homology modeling ของ BADH2_N162A กับ BADH จากถั่วลิสง พบว่าตำแหน่ง N162A อยู่ในบริเวณ substrate channel ซึ่งจากการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_N162A โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อความสามารถของเอนไซม์ต่อการจับกับสับสเตรท เนื่องจากตำแหน่ง N162 มีหน้าที่ในการทำให้สับสเตรทเกิดความเสถียร ในระหว่างการทำกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งตำแหน่ง N162 อยู่ใกล้กับตำแหน่ง NAD⁺ binding site อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ หากแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน โดยแขนงด้านข้างจากเดิมเป็นแอสปารากีน เกิดหลุดสั้นลงเป็นอะลานีน แสดงดังภาพที่ 19 (ข)



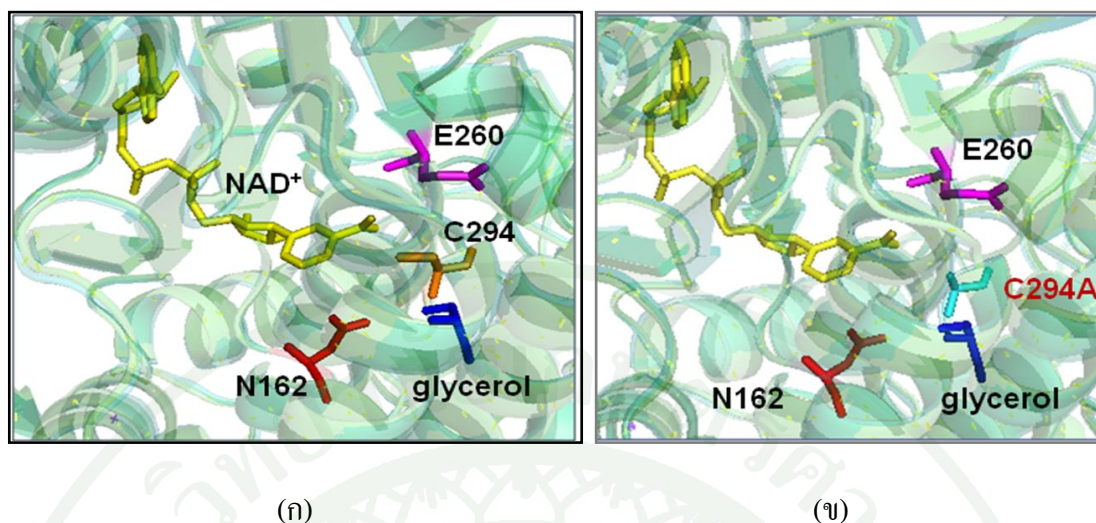
ภาพที่ 19 แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N162A โดยทำ Homology modeling ระหว่างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N162A กับ BADH จากถั่วลิ้นเตา (PDB code: 3IWJ) โดย (ก) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ (ข) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N162A

จากการทำ Homology modeling ของ BADH2_E260A กับ BADH จากถั่วลิ้นเตา พบว่าตำแหน่ง E260A อยู่ในบริเวณ substrate channel ซึ่งจากการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_E260A โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจจะส่งผลกระทบต่อความสามารถของเอนไซม์ต่อการจับกับสับสเตรท เนื่องจากตำแหน่ง E260 มีหน้าที่ในการทำให้ C294 พร้อมทั้งจะให้สับสเตรทจับ หากตำแหน่ง E260 ถูกเปลี่ยนโดยแทนที่ด้วยอะลานีนทำให้ C294 ก็ไม่สามารถให้สับสเตรทจับได้ รวมทั้งตำแหน่ง E260 อยู่ใกล้กับตำแหน่ง NAD⁺ binding site อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ หากแทนที่ด้วยอะลานีน แสดงดังภาพ 20 (ข)



ภาพที่ 20 แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E260A โดยทำ Homology modeling ระหว่างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E260A กับ BADH จากถั่วลิ้นเตา (PDB code: 3IWJ) โดย (ก) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ (ข) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E260A

จากการทำ Homology modeling ของ BADH2_C294A กับ BADH จากถั่วลิ้นเตา พบว่าตำแหน่ง C294 อยู่ระหว่างบริเวณ NAD^+ binding site และ substrate channel ซึ่งจากการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_C294A โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจจะส่งผลกระทบต่อความสามารถของเอนไซม์ต่อการจับกับสับสเตรท เนื่องจากตำแหน่ง C294 เป็นตำแหน่งที่จับสับสเตรท โดยหมู่ไทออกของซิสทีโอนีนจะจับกับคาร์บอนของสับสเตรท หากเปลี่ยนเป็นอะลานีนสับสเตรทจะไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ รวมทั้งตำแหน่ง C294 อยู่ระหว่างตำแหน่ง NAD^+ binding site กับ substrate channel อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกเตอร์ โดยแขนงด้านข้างของกรดอะมิโนหดสั้นลงจากเดิมที่เป็นซิสทีโอนีนแทนที่ด้วยอะลานีน แสดงดังภาพ 21 (ข)



ภาพที่ 21 แสดงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A โดยทำ Homology modeling ระหว่างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A กับ BADH จาก ถั่วลิ้นเตา (PDB code: 3IWJ) โดย (ก) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ (ข) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A

2. การกลายพันธุ์โดยส่งได้แสงอัลตราไวโอเลต และใช้เทคนิค Error prone PCR เป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่มเพื่อศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม และความจำเพาะต่อการจับสับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบกับ BADH2 ดั้งเดิม โดยคาดว่า ผลจากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะทำให้เอนไซม์ BADH2 เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ซึ่งอาจส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเอนไซม์อาจมีกิจกรรมมากขึ้น หรือลดลง ซึ่งจากกลไกการทำงานของ polyamine พบว่าหากเอนไซม์ BADH2 ทำงานในสภาวะปกติจะเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald เป็นสาร GABA และหากเอนไซม์ BADH2 เกิดสูญเสียหน้าที่การทำงานเดิมไป จะทำให้เกิดการสะสมสารหอม 2AP ขึ้น ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงทำการกลายเอนไซม์ BADH2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไป

6. การกลายพันธุ์

6.1 การกลายพันธุ์ของยีน

การกลายพันธุ์ของยีนพบว่าจะเกิดจากหลายสาเหตุ โดยสามารถแบ่งตามสาเหตุการเกิดได้ 2 แบบ คือแบบที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หรือเกิดโดยการชักนำ เช่น จากระงสี และสารเคมี ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมีภายในยีน โดยการกลายพันธุ์จะส่งผลในระดับโมเลกุล เช่น เกิดการกลายพันธุ์เพียงจุดเดียว (Point mutation) การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเพิ่ม หรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (Insertion mutation and Deletion mutation) การกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน (Missense mutation) การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดรหัสของกรดอะมิโนหยุดปลอม (Nonsense mutation) การกลายพันธุ์โดยเกิดการแทนที่เบส (Base substitution) และการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ที่ส่งผลให้แก้ผลของการกลายพันธุ์ในครั้งแรก (Reversion mutation)

Direct Evolution เป็นวิธีทางพันธุวิศวกรรมวิธีหนึ่ง เพื่อกำหนดทิศทาง และคุณสมบัติตามที่ต้องการ สามารถทำได้ 4 วิธี คือ

1. การกลายพันธุ์โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutator strain) เช่น *E.coli* XL red ที่มีความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซม เมื่อยีนเกิดกลายพันธุ์
2. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV irradiation) เช่น การใช้แสงจากหลอดยูวีมาเชื้อโรค (germicide lamp) โดยแสง UVC ที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร
3. การกลายพันธุ์โดยสารเคมี (Chemical method) เช่น Deamination Alkalation และ Base-Analog mutagens เป็นต้น
4. การกลายพันธุ์โดยใช้พีซีอาร์ (PCR method) ซึ่งการกลายพันธุ์โดยใช้พีซีอาร์ทำได้ 3 วิธีคือ
 1. DNA shuffling
 2. Site Directed Mutagenesis
 3. Error prone PCR เป็นต้น

โดยในงานวิจัยนี้สนใจทำการกลายพันธุ์ 3 วิธีคือ

1. Site-Directed Mutagenesis
2. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
3. Error prone PCR

6.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis

การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis หรือการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่ง เป็นวิธีกลายพันธุ์ที่เกิดในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยวัตถุประสงค์ของการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของหน้าที่ และโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง 2 สาย มีตำแหน่งที่ต้องการทำกลายพันธุ์อยู่ตรงกลางของสาย ไพรเมอร์ประมาณ 10-15 เบส และมีลำดับเบสคู่สมกันกับลำดับเบสของยีน BADH2 ที่อยู่บนสายของพลาสมิด
2. ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบควรมีความยาวประมาณ 25 ถึง 45 เบส ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่านี้ อาจจะนำมาใช้ได้ แต่จะทำให้เกิดการสร้างเป็น โครงสร้างทุติยภูมิของไพรเมอร์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการกลายพันธุ์
3. ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบมีค่า melting temperature (T_m) ≥ 78 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการทำกลายพันธุ์ โดยค่า T_m หาได้จากสูตรด้านล่าง

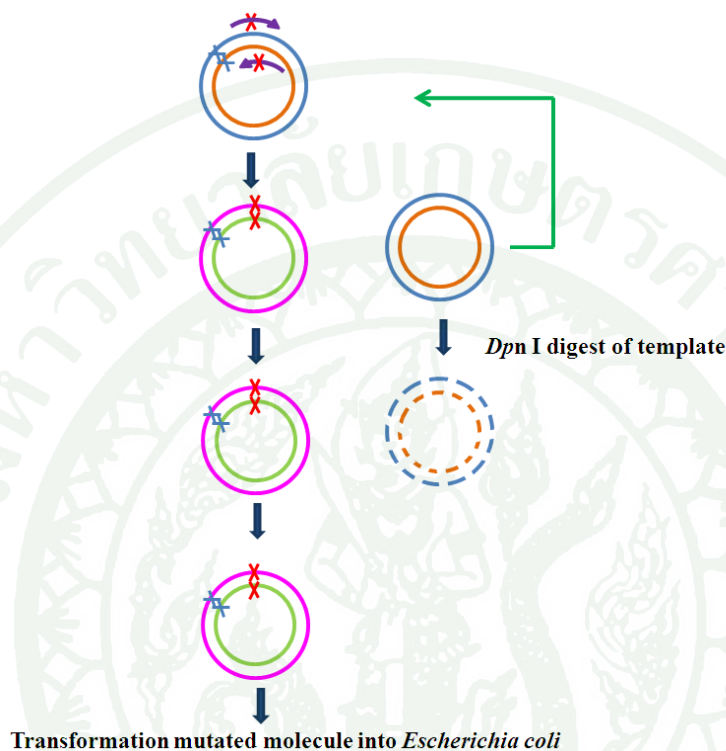
$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$
 โดยที่ N คือ จำนวนเบสของไพรเมอร์
4. ไพรเมอร์ที่ดีควรมี % GC อย่างน้อยประมาณ 40 % และควรมีเบส C หรือ G จำนวน 1 เบส หรือมากกว่านั้น อยู่ทางด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์

หลังจากทำกลายพันธุ์โดยวิธีนี้เสร็จ จะกำจัดดีเอ็นเอทิ้ง ด้วยเอนไซม์ *DpnI* ที่จะตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีหมู่เมทิลบริเวณ GA[↓]TC ของดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งไม่พบในผลิตภัณฑ์ แสดงดังภาพที่ 22

โดยข้อดีของการกลายพันธุ์วิธีนี้คือ สามารถทำได้ง่าย และเมื่อกลายพันธุ์แล้วสามารถบอกความสัมพันธ์ของหน้าที่ และโครงสร้างของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปได้ แต่ข้อจำกัดคือ ไม่เหมาะกับยีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 กิโลเบส

มีงานวิจัยที่ได้กลายพันธุ์โดยวิธี Site Directed Mutagenesis เช่น การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ Alkaline protease ที่ตำแหน่ง H176 และ E177 เป็น L และ Q ตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา โดยผลของการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในการจับกับ Zn ได้ดีขึ้น (Miyajima *et al.*, 1997)

และ การกลายพันธุ์อื่น MurG โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดอะมิโนอะลานีน เพื่อศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าว โดยพบว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่ทำการกลายพันธุ์ไปทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียไป (Crouvoisier *et al.*, 2007) เป็นต้น



ภาพที่ 22 แผนภาพแสดงการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (Site-Directed Mutagenesis) โดยการ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

6.3 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

รังสีอัลตราไวโอเลต หรือ รังสียูวี หรือในชื่อภาษาไทยว่า รังสีเหนือม่วง เป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงที่มองเห็น แต่ยาวกว่ารังสีเอกซ์ มีความยาวคลื่นในช่วง 10- 400 นาโนเมตร และมีพลังงานในช่วง 3-124 eV โดยคลื่นรังสีดังกล่าวเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูงกว่าคลื่นที่มนุษย์มองเห็นเป็นสีม่วง และจัดเป็นรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing) ซึ่งรังสีนี้จะมีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถจำแนกเป็น 3 ชนิดคือ UVA UVB และ UVC โดยมีความยาวคลื่นของรังสีที่มีความยาวคลื่นต่างๆ โดยรังสี UVA มีความยาวคลื่น 315- 400 นาโนเมตร รังสี UVB มีความยาวคลื่น 280- 315 นาโนเมตร และรังสี UVC มีความยาวคลื่น 100- 280นาโนเมตร

อันตรายที่เกิดจากการได้รับรังสี สามารถทำให้คอลลาเจนในผิวหนังเสื่อมสภาพได้ และเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดริ้วรอยก่อนวัย โดยรังสี UVA มีความรุนแรงน้อยที่สุด รังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วง UVB ทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า arc eye คือรู้สึกเหมือนมีทรายเข้าตา หรือมีอาการที่รุนแรงก็อาจทำให้เป็นโรคต้อกระจก รังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วง UVC มีพลังงานสูงที่สุด และที่สำคัญคืออันตรายที่สุด การรับรังสีอัลตราไวโอเล็ตมากเกินไป ก่อให้เกิดอันตรายกับระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ แต่พบได้น้อยในบรรยากาศ แต่จะพบได้ในเครื่องมือหลายชนิด เช่น เครื่องมือฆ่าเชื้อในน้ำดื่ม ตู้ฆ่าเชื้อที่ใช้ทำความสะอาดพื้นผิว เป็นต้น

รังสี UVC นิยมใช้ในหึ่งปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยหลอดยูวีที่ใช้ในการส่องสว่างจะมีความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งรังสีดังกล่าวทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุลของยีนได้ เช่น ทำให้เกิดไคเมอร์โดยเกิดพันธะโควาเลนต์ที่พันธะระหว่างหมู่คาร์บอน (c=c double bonds) ของนิวคลีโอไทด์ เช่น ไทมีนไคเมอร์ หรือ ไพริมิดีนไคเมอร์ หากเซลล์ได้รับความเสียหายจะมีกลไกการซ่อมแซมความผิดปกติ เช่น ในโปรคาริโอตจะมีกลไก photoreactivation หรือ nucleotide excision repair และในยูคาริโอตจะมีกลไก global genome NER (GG-NER) เป็นต้น

ข้อดีของการกลายพันธุ์แบบสุ่มจากวิธีนี้คือ ได้ผลของการกลายพันธุ์หลายแบบ และข้อจำกัดคือไม่สามารถทราบตำแหน่งใดในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไป จะทราบเมื่อนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์

6.4 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR

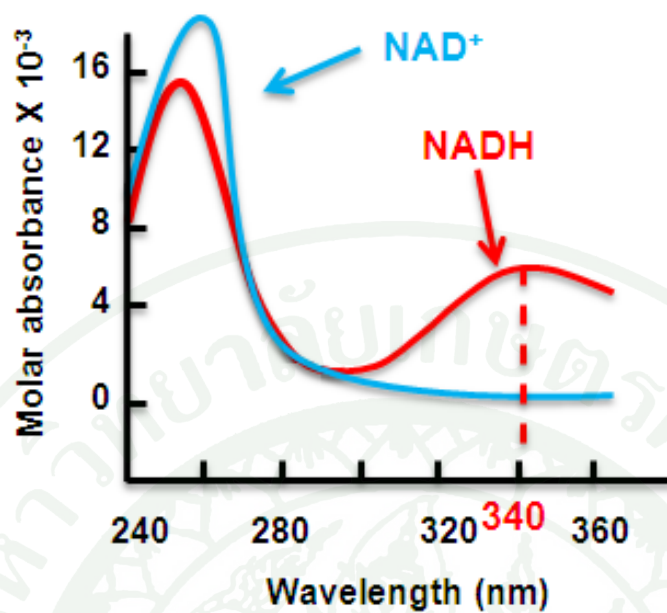
Error prone PCR เป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่มที่อาศัยการรบกวนระบบ โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้มาก หรือน้อยเกินจำเป็น เช่น ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ขาดคุณสมบัติของ 3'-5' exonuclease ซึ่งเป็นขั้นตอนการตรวจสอบและแก้ไขนิวคลีโอไทด์ที่นำมาต่อติดกับสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะมีความผิดพลาดอยู่ในช่วง 0.1×10^4 ถึง 2×10^4 ต่อนิวคลีโอไทด์ (Eckert and Kunkel, 1990; Ling *et al.*, 1991) โดย *Taq* DNA polymerase ทำให้เกิดความผิดพลาดในการเพิ่มจำนวนจากนิวคลีโอไทด์ AT เป็น GC (Keohavong and Thilly, 1989) หรือการใช้ Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ DNA polymerase แทน Mg^{2+} ซึ่ง Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ที่มีประสิทธิภาพต่ำ (Beckman *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1989) หรือการเพิ่มความเข้มข้นของ dNTP ทั้ง 4 ชนิด ให้มีความเข้มข้นไม่เท่ากัน ซึ่ง dNTP บางตัวจะหมดก่อนทำให้เอนไซม์ DNA polymerase จะนำเอา dNTP ที่ผิดมาต่อบนสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์ (Cadwell and Joyce, 1992)

มีงานวิจัยที่ได้กลายพันธุ์โดยวิธี Error prone PCR เช่น การกลายพันธุ์ยีน alkaline lipase จาก *Proteus vulgaris* T6 พบว่าผลจากการทำกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์เกิดแทนที่ของกรดอะมิโน 3 ตำแหน่ง ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นมากกว่าเอนไซม์ดั้งเดิม 3.5 เท่า (Fang *et al.*, 2009) การกลายพันธุ์โดยวิธี Error prone PCR ยังนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของยีน *glmS* ใน *E. coli* เพื่อให้ผลิต glucosamine ในปริมาณมากขึ้น ซึ่งจากผลพบว่า เมื่อยีนเกิดการกลายพันธุ์ไปทำให้ผลิต glucosamine ในปริมาณมากขึ้น (Deng *et al.*, 2006)

ข้อดีของการกลายพันธุ์โดยวิธี Error prone PCR คือ สามารถทำกลายพันธุ์ได้โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนที่ต้องการทำให้เกิดการกลายโดยละเอียด (Kim *et al.*, 2003) ผลจากการทำ error prone PCR อาจทำให้โปรตีนมีคุณสมบัติบางอย่างที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยข้อจำกัดของการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้คือ ไม่สามารถทราบตำแหน่งใดในลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงไป จะทราบเมื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

7. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Betaine Aldehyde Dehydrogenase 2 (BADH2)

การตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 ซึ่งใช้ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อเกิดปฏิกิริยา NAD^+ จะถูกรีดิวซ์เป็น NADH ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา แทนค่าในสมการที่ (1) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ NADH ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ NADH ที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา จะได้กราฟเส้นตรง และหาความชันจากกราฟเส้นตรงดังกล่าว ซึ่งค่าความชันที่ได้คือ อัตราเร็วของปฏิกิริยา นำค่าดังกล่าวแทนในสมการ Michaelis-Menten (2) เพื่อหาค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m และ V_{max}) (ภาพที่ 24) ด้วยโปรแกรม Origin6



ภาพที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

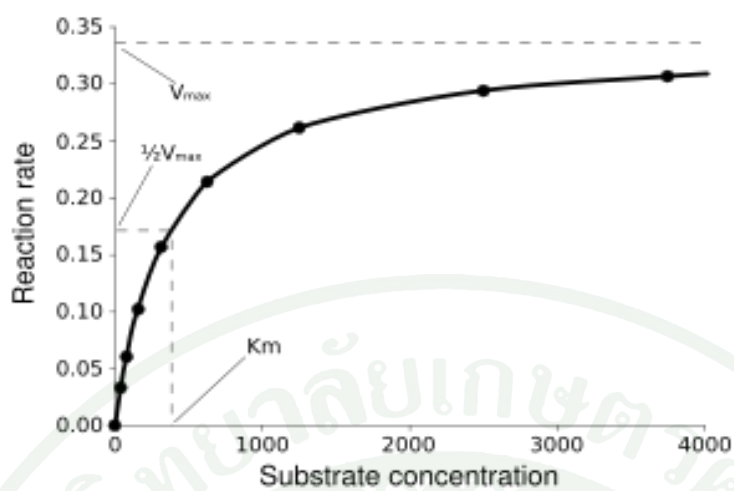
โดย

- A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร
- ϵ คือ ค่า molar absorption หรือ extinction coefficient (โมลาร์⁻¹ เซนติเมตร¹) ของ NADH มีค่าเท่ากับ 6220 โมลาร์⁻¹ เซนติเมตร¹
- b คือ ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง หรือความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร)
- c คือ ความเข้มข้นของสาร (โมลาร์)

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

โดย

- V_0 คือความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (ไมโคร โมลต่อนาที)
- $V_{\max}$ คือความเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยา (ไมโคร โมลต่อนาที)
- K_m คือค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (มิลลิโมลาร์)
- [S] คือความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรท (มิลลิโมลาร์)



ภาพที่ 24 แสดงกราฟของ Michaelis-Menten ใช้หาค่า V_{max} และ K_m

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (*recA1 supE44 endA1 gyrA96 relA1 thi-1 (lac-proAB)* *F'*[*traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15*])

1.2 แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) (*F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3))

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเหลว Luria Bertani (LB)

2.2 อาหารแข็ง LB

3. สารปฏิชีวนะ

3.1 แอมพิซิลิน

3.2 คานามัยซิน

4. เอนไซม์

4.1 *Dream Taq* DNA polymerase จากบริษัท Fermentas

4.2 *EX Taq* DNA polymerase จากบริษัท Takara

4.3 *Pfu Taq* DNA polymerase จากบริษัท Promega

4.4 Restriction enzyme จากบริษัท Fermentas

5. ชุดสกัดพลาสมิด และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Kit)

5.1 GeneJET Plasmid miniprep Kit จากบริษัท Fermentas

5.2 Nucleospin[®] DNA Extract II จากบริษัท Macherey-Nagel

6. เครื่องมือ

รายการเครื่องมือ	ชื่อบริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่งน้ำหนักแบบ 3 ตำแหน่ง	Denver Instrument Company
เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน	Labnet international
เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนแบบความคมอุณหภูมิต่ำ	Sorvall
เครื่องฟิชอาร์	Applied biosystems
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย	Mettler Toledo2
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบยูวี-วิส	Shimazu
เครื่องสเปกโตรแบบลูมิเนสเซนซ์	Perkin Elmer
เครื่องอเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล	Amersham Biosciences
ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์	Augustin
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sandenintercol
ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	ThermoScientific
ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส	Gallenkamp
ตู้บ่มแบบเขย่า (-30 องศาเซลเซียส)	Vision scientific
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ	Astell
หัวโพรบสำหรับเครื่องโซนิเคท	Misonix
อ่างควบคุมอุณหภูมิตั้งค่าอุณหภูมิได้แบบตัวเลข	Labnet international
Fast protein liquid chromatography (FPLC) system	GE Healthcare
Gel documentation	DNr Bio-Imaging system
Hitrap Chelating HP column	GE Healthcare
Microplate reader	Tecan
Nano Drop Spectrophotometer ND-100	Nano Drop
Super loop	GE Healthcare

วิธีการทดลอง

1. การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จ GeneJET Plasmid Miniprep

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะตามความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่เครื่องบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คูลเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนของเหลวทิ้ง พลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จ GeneJET Plasmid Miniprep ตามวิธีการที่ระบุในชุดสกัด และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบยีน BADH2 ในพลาสมิด pET28b ทำได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในการโคลนยีนดังกล่าวใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *XhoI* และ *NdeI* ที่ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด และไพรเมอร์รีเวิร์ส ตามลำดับ ดังนั้น หากใช้เอนไซม์ดังกล่าวตัดพลาสมิดที่มียีน BADH2 จะพบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b_ BADH2 (300 นาโนกรัม)	3
10x บัฟเฟอร์ R	1
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XhoI</i>	1
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i>	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4
ปริมาตรรวม	10

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี โคลนียูพีซีอาร์ (Colony polymerase chain reaction)

โคลนียูพีซีอาร์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบยีน (BADH2 กลายพันธุ์) ในดีเอ็นเอพาหะ โดยการนำโคลนียูพีซีอาร์ที่ต้องการตรวจสอบเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์ โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสภาวะในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับโคลนียูพีซีอาร์

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
โคลนียูพีซีอาร์	-
ไพรเมอร์ ฟอว์เวิร์ส (10 ไมโครโมลาร์)	1
ไพรเมอร์ รีเวิร์ส (10 ไมโครโมลาร์)	1
10x บัฟเฟอร์	1
สารผสม dNTP 2 มิลลิโมลาร์	1
<i>Dream Taq</i> DNA polymerase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	5.8
ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับโคลนียูพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	95	1 นาที	
Annealing	55	30 วินาที	30
Extension	72	2 นาที (1 นาทีต่อ 1 กิโลเบส)	
Final extension	72	5 นาที	1

เมื่อทำปฏิกิริยาฟิชีอาร์เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค เจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และส่องไฟแสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

4. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis หรือ SDS-PAGE)

เทคนิค SDS-PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้ในการแยกโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ ที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยโปรตีนได้ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน เทคนิค SDS-PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยมีการเติมสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งมีผลทำให้การเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดเพียงอย่างเดียว โดย SDS ที่เติมมีความเป็นประจุลบสูงมาก ทำหน้าที่เข้าไปจับประจุบวกภายในโมเลกุลของโปรตีน มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายออกมาเป็นเส้นตรง และประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นลบทั้งหมด นอกจากนั้น β -mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์จะเข้าไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่จับระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน ดังนั้นโปรตีนที่แยกได้จึงเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยนำโปรตีนมา 10 ไมโครลิตร เติมนัฟเฟอร์ 6x loading จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นตัวอย่างจะถูกหยอดลงในช่องของอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล 12% ที่หล่อด้วยบัฟเฟอร์ ในขั้นตอนการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสีของ loading dye อยู่นอกปลายของเจล หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน Coomassie brilliant blue R-250 ประมาณ 5 นาที และล้างด้วยสารละลายล้างสีย้อม (destaining solution) เป็นเวลา 30 นาที และตามด้วยน้ำกลั่น จนเห็นแถบขนาดโปรตีน

5. การสร้างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

5.1 การทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ที่ตำแหน่งจำเพาะ

การทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 โดยยีน BADH2 ดังเดิมอยู่ในรูป pET28b-BADH2 วิธีทำกลายพันธุ์ โดยจะเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน หรือ เพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ เข้าไปในตำแหน่งที่สนใจ วิธีนี้จะใช้ชุดเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่มีความแม่นยำในการเพิ่มจำนวนของยีน และใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ

ให้มีตำแหน่งที่ต้องการกลายพันธุ์อยู่กลางไพรเมอร์ และใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอพลาสมิด ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ต้องการ หลังจากได้ pET28b_BADH2 ที่เกิดการกลายพันธุ์ แล้ว จะใช้เอนไซม์ *DpnI* เพื่อกำจัด pET28b_BADH2 แม่แบบออกไป

ขั้นตอนการทำพีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ ตามตารางที่ 4 โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่มีความแม่นยำในการเพิ่มจำนวนของยีน การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีส่วนประกอบ และสถานะแสดงดังตาราง 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงรายการไพรเมอร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ

รายการไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
BADH2_Y420_F	GGCCAACGATACTCATTATTATGGTCTGGCTGGTGCTGTGC
BADH2_Y420_R	GCACAGCACCAGCCAGACCATAATAATGAGTATCGTTGGCC
BADH2_N162A_F	GGTTGATCACACCTTGGGCCTATCCTCTCCTGATGGC
BADH2_N162A_R	GCCATCAGGAGAGGATAGGCCCAAGGTGTGATCAACC
BADH2_E260A_F	GTTAAGCCTGTTTCACTGGCACTTGGTGGAAAAAGTCC
BADH2_E260A_R	GGACTTTTTCCACCAAGTGCCAGTGAAACAGGCTTAAC
BADH2_C294A_F	GGACCAATGGCCAGATTGCCAGTGCAACATCGCGTC
BADH2_C294A_R	GACGCGATGTTGCACTGGCAATCTGGCCATTGGTCC

หมายเหตุ: อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่มีการกลายพันธุ์

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดของยีน BADH2 (ปริมาณ 50 นาโนกรัม)	5
ไพรเมอร์ ฟอว์เวิร์ส (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5
ไพรเมอร์ รีเวิร์ส (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5
10x บัฟเฟอร์	5
สารผสม dNTP 2 มิลลิโมลาร์	5
<i>Pfu</i> DNA polymerase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ¹	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	24
ปริมาตรรวม	50

ตารางที่ 6 แสดงสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	55	20 นาที	18
Extension	68	20 นาที (2 นาทีต่อ 1 กิโลเบส)	
Final extension	72	20 นาที	1

เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดถูกต้องแล้ว ทำการเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน เพื่อย่อยดีเอ็นเอต้นแบบ

5.2 การถ่ายโอน BADH2 กลายพันธุ์เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* (DH5 α)

เมื่อได้รับคอมปิแนนท์พลาสมิดที่มียีน BADH2 กลายพันธุ์แล้ว ทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) โดยใช้เทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน โดยนำรีคอมปิแนนท์ พลาสมิด ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมลงในคอมพิเทนต์เซลล์ของ *E.coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที และบ่มบนน้ำแข็งทันทีอีก 3 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นปั่นเก็บตะกอนเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ออกให้เหลือปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใช้ที่ปผสม ตะกอนกับส่วนใสให้เข้ากันนำไป สเปรด (spread) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน โดยกลับจานอาหารคว่ำลงทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยการสีกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด สำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NdeI* ทำการตรวจวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจสอบด้วยวิธี โคโลนีพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบขนาดของยีนที่คาดไว้ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงรายการไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ทั้ง 4 แบบ

รายการไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
BADH2_Y420_check_F	GGCCAACGATACTCATTATTAT
BADH2_XhoI_R	CCGCTCGAGTTACAGCTTGGAAGGGGATT
BADH2_N162A_check	GGTGTAGTTGGGTTGATCACACCTTGGGC
BADH2_XhoI_R	CCGCTCGAGTTACAGCTTGGAAGGGGATT
BADH2_E260A_check	GCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGC
BADH2_XhoI_R	CCGCTCGAGTTACAGCTTGGAAGGGGATT
BADH2_C294A_check	GGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGC
BADH2_XhoI_R	CCGCTCGAGTTACAGCTTGGAAGGGGATT

หมายเหตุ: อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่มีการกลายพันธุ์

5.3 การถ่ายโอน BADH2 กลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* (BL21)

เมื่อได้ยีน BADH2 ที่กลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง นำพลาสมิดของยีนดังกล่าวถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* (BL21) ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน โดยเทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีน และสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit เมื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดถูกต้องได้แล้ว นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งไปทำการวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อตรวจสอบว่ายีน BADH2 ที่ได้ เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้องตามที่ต้องการ

6. การผลิตเอนไซม์ และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* BL21 ที่ได้รับการถ่ายโอน BADH2 กลายพันธุ์ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เช้าให้มีความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 จากนั้นเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 มิลลิโมลาร์ นำมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เช้าให้มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ข้ามคืน นำเซลล์ที่ได้ มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำเฉพาะส่วนเซลล์มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ไลซิส ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องปั่นแตกเซลล์ (sonicator) จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกส่วนใส และตะกอน แล้วนำส่วนสารละลายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์นิกเกิล ซึ่งเป็นโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะจับกับฮิสแทกซ์ที่ปลายเอ็นของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน BADH2 โดยใช้สารละลายคอลัมน์บัฟเฟอร์ และสารละลายอีลูชันบัฟเฟอร์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทำการรวมหลอดเก็บโปรตีน ที่มีแถบโปรตีนที่ถูกต้องเข้าด้วยกัน จากนั้นนำเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน มาหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่าปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยค่า Extinction coefficients ของ ยีน BADH2 มีค่าเท่ากับ 88765 โมลาร์⁻¹ เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งค่า Extinction coefficients ของโปรตีนคำนวณค่าโดยใช้โปรแกรม ProtParam (www.expasy.org/tools/protparam.html) จากนั้นนำเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่แยกได้ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE อีกครั้ง และนำไปทดสอบกิจกรรมจำเพาะต่อไป

7. การหาการจับกันอย่างจำเพาะ (binding affinity) ของ BADH2 กลายพันธุ์

การหาการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ โดยใช้เทคนิคการจับกันอย่างจำเพาะ (binding affinity) อาศัยหลักการคือ ตรวจสอบค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทริปโตเฟน โดยการให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ไปกระตุ้น (Excitation) กรดอะมิโนทริปโตเฟนในเอนไซม์ที่มีความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร เนื่องจากเป็นช่วงที่กระตุ้นกรดอะมิโนดังกล่าวได้ดี และวัดค่าการปลดปล่อยพลังงาน (Emission) จากทริปโตเฟน หากมีการเติมโคแฟกซ์เตอร์ลงในเอนไซม์ค่าการปลดปล่อยพลังงานของทริปโตเฟนที่ถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนไป เนื่องจากการเติมโคแฟกซ์เตอร์อาจส่งผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง โดยอาจบดบังหรือเปิดรับตำแหน่งการกระตุ้นของทริปโตเฟน ดังนั้นเมื่อตรวจวัดค่าการปลดปล่อยพลังงานจะได้ค่าที่เปลี่ยนแปลง หรือแตกต่างจากค่าเดิมที่ไม่มีการเติมโคแฟกซ์เตอร์ ซึ่งเทคนิคนี้ ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์

จากการทดลองนี้ ได้ใช้เทคนิคการจับกันอย่างจำเพาะของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ในการหาการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH เพื่อหาประสิทธิภาพในการจับกันของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ โดยตรวจสอบจากการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากการกระตุ้นกรดอะมิโนทริปโตเฟนในเอนไซม์ เมื่อเติมโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADH โดยจะวัดค่าการปลดปล่อยพลังงานที่มีความยาวคลื่น 300 ถึง 450 นาโนเมตร โดยพบว่าพลังงานที่ถูกปลดปล่อยสูงสุดที่มีความยาวคลื่น 353.09 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงของพลังงานที่ถูกปลดปล่อยนำมาวิเคราะห์หาค่า K_d ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการจับกันของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์

ปฏิบัติการการจับกันอย่างจำเพาะของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ประกอบด้วยเอนไซม์ 68.35 มิลลิกรัม (ต่อ 400 ไมโครลิตร) ปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 400 ไมโครลิตรด้วยบัฟเฟอร์ HEPES-KOH ที่ pH 8.0 ลงในคิวเวต จากนั้นเติมโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADH ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 12 24.8 37.2 49.5 61.7 73.9 85.9 98 110 121.95 133.81 145.63 157.38 169.68 180.72 238.09 348.8 454.5 และ 555.55 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบฟลูออเรสเซนซ์ จากบริษัท perkinElmer แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง $\% \Delta F$ (แกนแนวตั้ง) กับความเข้มข้นของ NAD^+ หรือ NADH (แกนแนวนอน) ซึ่งสามารถหาค่า K_d ของโคแฟกซ์เตอร์แต่ละตัว จากสมการ (3) ด้วยโปรแกรม Enzfitter

$$\% \Delta F_{\text{obs}} = \frac{\Delta F_{\text{max}}[L]_0}{K_d + [L]_0} \quad (3)$$

8. การตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์

การตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์ปกติทำได้โดยใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 500 250 125 62.5 31.25 15.63 และ 7.81 ไมโครโมลาร์ วัดการทำกิจกรรมของเอนไซม์กับสับสเตรทที่เวลา 0 9 18 27 36 45 54 63 72 และ 81 วินาที ตามลำดับ โดยวัดการเพิ่มของ NADH ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรปฏิกิริยาการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 5 ไมโครโมลาร์ NAD⁺ 5 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาตรรวมทั้งหมดให้ได้ 100 ไมโครลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ HEPES-KOH ที่ pH 8.0 ที่มีเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเติมสับสเตรทของเอนไซม์คือ Bet-ald หรือ AB-ald ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยทุกปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร หลังจากเติมเอนไซม์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Microplate reader แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของ NADH กับเวลา จากนั้นหาค่า K_m และ V_{max} k_{cat} และ k_{cat}/K_m จากสมการ Michaelis-Menten (4) และ (5) ซึ่งสามารถหาค่า K_m และ V_{max} จากโปรแกรม Origin6

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{E_t} \quad (5)$$

โดย	V_0	คือความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (ไมโครโมลต่อวินาที)
	V_{ma}	คือความเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยา (ไมโครโมลต่อวินาที)
	K_m	คือค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (มิลลิโมลาร์)
	[S]	คือความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรท (มิลลิโมลาร์)
	E_t	คือจำนวนโมลของเอนไซม์ทั้งหมด (ไมโครโมล)
	k_{cat}	คือความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเอนไซม์ต่อเวลา (วินาที ⁻¹)

9. การตรวจหาสาร γ -aminobutyric acid (GABA) ในเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้สำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ และตรวจวิเคราะห์เพื่อบอกชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการให้สารตัวอย่างผ่านไปในระบบซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่อยู่กับที่ และส่วนที่เคลื่อนที่ โดยส่วนเคลื่อนที่อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวซึ่งพาสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านไปบนสารอยู่กับที่ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลว สารต่างๆ ที่ปนกันอยู่ในสารตัวอย่างจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับทั้งส่วนเคลื่อนที่ และส่วนอยู่กับที่ได้แตกต่างกัน จะทำให้เกิดการกระจายตัวของสารในส่วนเคลื่อนที่และส่วนอยู่กับที่ในอัตราส่วนที่ไม่เท่ากัน สารที่เกิดอันตรกิริยากับส่วนอยู่กับที่ได้ดี จะกระจายตัวอยู่ในส่วนอยู่กับที่ได้นาน ส่วนสารที่เกิดอันตรกิริยากับส่วนอยู่กับที่ได้ไม่ดี จะกระจายตัวอยู่ในส่วนอยู่กับที่ได้ไม่นาน แต่จะกระจายตัวในส่วนเคลื่อนที่ได้ดีกว่า และจะถูกพาออกจากระบบได้เร็วกว่า ทำให้สามารถแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ ซึ่งโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นโครมาโตกราฟีบนแผ่นเคลือบ หรือ Thin Layer Chromatography (TLC) ทำโดยใช้วัสดุแผ่นแบน เช่น แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม มาเคลือบด้วยวัสดุเนื้อละเอียด เช่น พงซิลิกา พงเซลลูโลส จากนั้นหยดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแผ่นเคลือบ แล้วนำแผ่นเคลือบไปใส่ในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะค่อยๆ นำสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกจากกันตามความสามารถในการแบ่งละลายของสารบนแผ่น TLC สารแต่ละชนิดมีค่าคงที่การแบ่งละลายต่างกัน จึงเคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน สำหรับการแยกสารที่มีประจุหรือสารที่ละลายน้ำได้ดี เช่น กรดอะมิโน และน้ำตาล นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วมาก เช่น บิวทานอลผสมกับน้ำ และเติมกรดอินทรีย์หรือแอมโมเนียม เพื่อให้สารมีประจุที่เราต้องการแยกละลายน้ำได้ดีขึ้น และตรวจสอบสาร GABA ด้วยสารละลายนินไฮดริน ซึ่งนินไฮดรินจะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนปฐมภูมิ โดยจะปรากฏเป็นสีม่วงอมชมพู

การตรวจหาสาร GABA ในเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ ด้วยวิธี TLC ทำการทดลองโดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมหรือกลายพันธุ์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยนำตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตรจุดลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60 F254 Aluminium sheets (Merck, Germany)) ที่ใช้เป็นเฟสคงที่ โดยในการทดลองใช้เฟสคงที่(stationary phase) คือ แผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกา จุดสารตัวอย่างจนครบปริมาตร 3 ไมโครลิตร รอจนสารละลายที่จุดบนแผ่น TLC แห้ง จากนั้นนำไปใส่ลงในบีกเกอร์ ที่บรรจุตัวทำละลายปริมาตร 100 ถึง 125 มิลลิลิตร แต่ต้องให้ท่วมสูงจากด้านล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 0.5-0.7 เซนติเมตร ปิดฝาบีกเกอร์ ในระหว่างที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านแผ่น TLC ไม่ควรขยับบีกเกอร์ โดยให้ ตัวทำละลายวิ่งผ่านแผ่น TLC ประมาณ 7 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากตัวทำละลายรอจนสารทำละลายแห้ง โดยนำแผ่นซิลิกาเจลออกมาวางเอียงไว้ในตู้ดูด

ควั่นเพื่อปล่อยให้แห้งประมาณ 2 ถึง 3 นาที เมื่อแห้งแล้วจึงฉีดยาด้วย สารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในเอทานอลให้ทั่วแผ่น รอจนสารละลายที่ฉีดพ่นแห้งโดยนำแผ่นซิลิกาเจลออกมาวางเอียงไว้ในตู้ดูดควันเพื่อปล่อยให้แห้งประมาณ 2 ถึง 3 นาทีแล้วนำไปเข้าตู้อบไอร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นเป็นแถบจุดสีม่วงอมชมพูปรากฏขึ้น จากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจลที่ปรากฏผลการทดลองไปถ่ายภาพ และบันทึกข้อมูลเก็บผล (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงแผนภาพการแยกของสารตัวอย่างด้วยวิธี TLC

10. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutagenesis)

10.1 การกลายพันธุ์ขึ้นด้วยวิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ต

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ต จัดเป็นการกลายพันธุ์โดยการชักนำด้วยรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน ซึ่งรังสีนี้จะมีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายระดับดีเอ็นเอ เช่น การเกิดไทมีนไดเมอร์ หรือ ไซโทซีนไดเมอร์ โดยหลักการ คือ หากเซลล์แบคทีเรียเกิดการชักนำโดยการกลายพันธุ์แบบนี้แล้วไม่มีกลไกมาซ่อมแซมจะทำให้เกิดความผิดปกติของลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอ ในการงานวิจัยนี้จะใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตจากหลอดยูวีฆ่าเชื้อโรค (germicidal lamp) ซึ่งเป็นแสง UVC ที่ใช้มีความยาวคลื่นเท่ากับ 253.7 นาโนเมตร โดยนำจานเชื้อ *E. coli* ที่มีการถ่ายโอนยีน BADH2 เข้าไป นำไปส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที

10.1.1 สกัดพลาสมิด pET28b ที่มียีน BADH2 อยู่จากโคลนที่ได้รับจาก ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5α ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อนดังวิธีตามข้อที่ 5.2 โดยทำทั้ง 3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

10.1.2 นำจานอาหารที่มีการถ่ายโอนยีน BADH2 ทั้ง 3 จาน นำไปส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที

10.1.3 สุ่มเลือกโคลนบนจานอาหารที่ทำการกลายพันธุ์จากเวลาต่างๆที่ใช้กลายพันธุ์ ช่วงเวลาละ 5 โคลน จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธีอัลคาลีย์ไลซิส และทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* BL21 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน โดยเทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อนดังวิธีตามข้อที่ 5.2 เมื่อได้โคลนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน BADH2 บนจานอาหารแล้ว สุ่มเลือกโคลนบนจาน โดยเลือกมา 10 โคลนจากแต่ละจานอาหารเพื่อมาผลิตโปรตีน

10.1.4 นำแต่ละโคลนที่คัดเลือกจากข้อ 10.1.3 มาผลิตโปรตีนเพื่อตรวจสอบว่าการกลายพันธุ์ไม่ทำให้ยีนเกิดรหัสหยุดก่อน โดยโปรตีนที่ได้ต้องมีขนาดประมาณ 58 กิโลดาลตันโดยการชักนำให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์

10.1.5 นำโคลนที่ผลิตโปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน ไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยนำตะกอน (crude) เซลล์แบคทีเรียมาเติมบัฟเฟอร์ไลซิส 30 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็ง 10 นาทีระหว่างนั้นนำไปผสมด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์วัดความเข้มข้นสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สับสเตรท AB-ald ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 ไมโครโมลาร์ ผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์ไปด้วยวิธีสองได้แสดงอัลตราไวโอเลตอาจมีกิจกรรมมากกว่า หรือน้อยกว่ายีน BADH2 ดั้งเดิมโดยคัดเลือกโคลนจำนวน 4 โคลน ที่มีกิจกรรมแตกต่างจาก BADH2 ดั้งเดิม มาทำบริสุทธิ์และนำไปผลิตโปรตีนตามวิธีข้อ 6 และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 8

10.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี Error prone PCR ทำโดยการคัดแปลงจากวิธีการของ Miyazaki และคณะ (1999) โดยทำการศึกษาสภาวะของสารละลายที่เหมาะสมในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้ $MnCl_2$ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ สำหรับทำ Error prone PCR โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และความเข้มข้นของ $MnCl_2$ แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดของยีน BADH2 (ปริมาณ 50 นาโนกรัม)	1
ไพรเมอร์ ฟอเวอร์ส BADH2_ <i>NdeI</i> _F (10 ไมโครโมลาร์) -	1
ไพรเมอร์ รีเวอร์ส BADH2_ <i>XhoI</i> _R (10 ไมโครโมลาร์)	1
10x บัฟเฟอร์	1
สารผสม dNTP 2 มิลลิโมลาร์	1
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2
$MnCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	
โดยปรับเข้มข้นสุดท้ายให้เท่ากับ 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ 0.1 หรือ 0.2 หรือ 0.3	
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4.7 หรือ 4.6 หรือ 4.5
ปริมาตรรวม	50

ตารางที่ 9 แสดงสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	40
Annealing	50	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	

10.2.1 ทำกลายพันธุ์ยีน BADH2 ด้วยวิธี Error prone PCR โดยการทำให้พีซีอาร์ ซึ่งใช้ส่วนประกอบของปฏิกิริยาที่แสดงดังตารางที่ 8 และสถานะในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 9 เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดถูกต้องแล้ว จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอจากการทำให้พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Nucleospin® DNA Extract II (Macherey-Nagel, Germany)

10.2.2 นำผลิตภัณฑ์จากการตัดแถบดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำไปวัดปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Nano Drop

10.2.3. นำดีเอ็นเอจากการทำให้บริสุทธิ์ มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์ตามตารางที่ 5 โดยใช้เอนไซม์ *Ex Taq* polymerase โดยการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนนี้ เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตจากการทำกลายพันธุ์จากการทำ Error prone PCR ให้เพียงพอที่จะเชื่อมต่อกับ pGEM-T easy vector

10.2.4 การเชื่อมต่อยีน BADH2 กับ pGEM-T easy vector

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ของยีน BADH2 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบขนาดและปริมาณ จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอจากการทำให้พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin® DNA Extract II (Macherey-Nagel, Germany) นำผลผลิตจากการทำให้บริสุทธิ์จาก 1% อะกาโรสเจล มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy

ด้วยอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยใช้ส่วนประกอบแสดงดังตาราง 10 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบของการเชื่อมต่อยีน BADH2 กับ pGEM-T easy vector

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ ** (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	3.5
บัฟเฟอร์ 2x ligation	5
pGEMT easy vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5
T4 DNA ligase (1ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นมาเชื้อ	-
ปริมาตรรวม	10

หมายเหตุ: ** ดีเอ็นเอจากการทำบริสุทธิ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

10.2.5 นำยีน BADH2 ที่คาดว่าเชื่อมต่อเข้ากับ Pgem-T easy vector นำไปถ่ายโอนเข้า *E.coli* DH5α ตามวิธีข้อ 5.2

10.2.6 สุ่มเลือกโคลนบนจานอาหาร 10 โคลน นำแต่ละโคลนที่คัดเลือก มาผลิตโปรตีน เพื่อตรวจสอบว่าการกลายพันธุ์ไม่ทำให้ยีนเกิดรหัสหยุดก่อน โดยโปรตีนที่ได้ต้องมีขนาดประมาณ 58 กิโลดาลตัน โดยการชักนำให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG เข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์

10.2.7 สกัดพลาสมิดจากโคลนที่มีขนาดโปรตีน 58 กิโลดาลตัน ที่ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* ตามข้อที่ 2 เพื่อนำชิ้นยีนที่คาดว่ากลายพันธุ์นำมาเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pET28b ด้วยอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยใช้ส่วนประกอบในการเชื่อมต่อยีนกับพลาสมิด pET28b แสดงดังตาราง 11 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาข้ามคืน

10.2.8 นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b_BADH2 ที่กลายพันธุ์ ถ่ายโอนเข้าสู่ *E.coli* BL21 ตามวิธีข้อที่ 6

10.2.9 สุ่มเลือกโคลนบนจานอาหาร จากนั้นนำไปชักนำให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์

10.2.10 นำโคลนที่ผลิตโปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน นำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อที่ 10.1.5

ผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR อาจมีกิจกรรมมากกว่า หรือน้อยกว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมโดยคัดเลือกโคลนจำนวน 4 โคลน ที่มีกิจกรรมแตกต่างจาก BADH2 ดั้งเดิม มาทำบริสุทธิ์ และนำไปผลิตโปรตีนตามวิธีข้อ 6 และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 8

ตารางที่ 11 แสดงส่วนประกอบของการเชื่อมต่อยีน BADH2 กับ pET28b vector

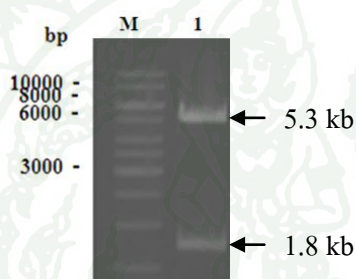
ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ ** (150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
pET28b vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
T4 DNA ligase (1ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
บัฟเฟอร์ T4 DNA ligase	1
ปริมาตรรวม	10

หมายเหตุ: ** ดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI*

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบโคลนของยีน BADH2

ตรวจสอบความถูกต้องของยีน BADH2 ที่ได้โคลนมาจาก ดร. ราตรี วงศ์ปัญญา โดยนำพลาสมิด pET28b_BADH2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 26 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 5.37 กิโลเบส และ 1.8 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดที่คาดไว้ แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบเบื้องต้นได้โคลนของยีน BADH2 ที่ถูกต้อง



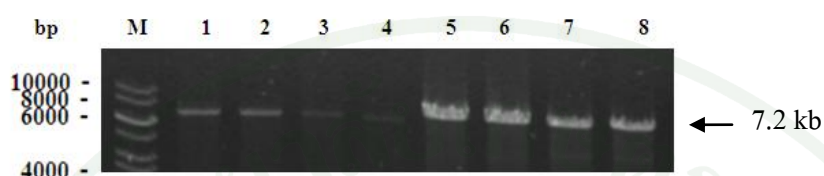
ภาพที่ 26 ผลการตัดพลาสมิด BADH2_pET28b ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส และช่องที่ 1 คือ pET28b_BADH2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI*

2. การสร้าง BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

2.1 การทำการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ที่ตำแหน่งจำเพาะโดยเทคนิคพีซีอาร์

การทำการกลายพันธุ์ยีน BADH2 ที่ตำแหน่งจำเพาะ Y420 เนื่องจากตำแหน่งที่เพิ่มเข้ามาทำให้ข้าวเกิดความหอม และทำการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนกรดอะมิโน N162 E260 และ C294 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน โดยกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งที่เปลี่ยนเป็นอะลานีน และกรดอะมิโนไทโรซีนที่เพิ่มเข้ามาที่ตำแหน่ง 420 พบว่าอยู่บริเวณ catalytic triad ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยเทคนิคพีซีอาร์ การตรวจสอบว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าแถบดีเอ็นเอของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ มีขนาดประมาณ 7.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหมาย (ภาพที่ 27) จากนั้นนำผลที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* ซึ่งจะย่อยดีเอ็นเอแม่แบบ โดยนำมาบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลที่ได้ ทำใหับริสุทธิ์ และถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรียต่อไป โดยเอนไซม์ *DpnI* จะย่อย รีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่เป็นดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งมีตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์อะดีนีน และจะตัดบริเวณ GA↓TC ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* จะตัดที่ตำแหน่งดังกล่าวของดีเอ็นเอแม่แบบเท่านั้น



ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ หลังจากทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยช่องที่ 1 3 5 และ 7 คือพลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* ตามลำดับ และช่องที่ 2 4 6 และ 8 คือ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* ตามลำดับ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.2 การโคลนยีน pET28b_BADH2 กลายพันธุ์เข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* (DH5 α) โดยเทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB pH 7 ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน พบโคโลนีของแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต ทำการคัดเลือก 10 โคโลนีในแต่ละชนิดของกลายพันธุ์ มาทำโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ (ตารางที่ 7) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์มีขนาด 286 1065 761 และ 595 bp ของยีน BADH2 กลายพันธุ์ Y420 N162A E260A และ C294A ตามลำดับ (ภาพที่ 28) จากนั้นนำโคลนที่มีขนาดที่ถูกต้องมาสกัดพลาสมิดอย่างละ 3 โคลน แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 29 พบว่า ทุกโคโลนีให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 5.3 กิโลเบส และ 1.8 กิโลเบสตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดที่คาดไว้ แสดงให้เห็นว่าโคโลนีที่ได้เป็นโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดทั้งหมด

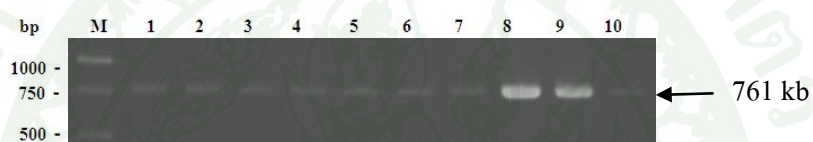
(ก) BADH2_Y420



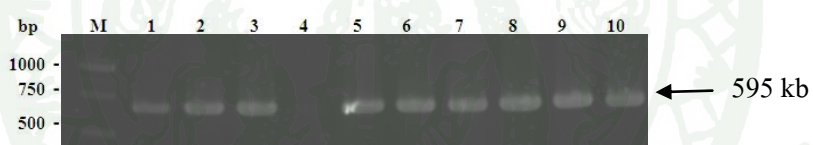
(ข) BADH2_N162A



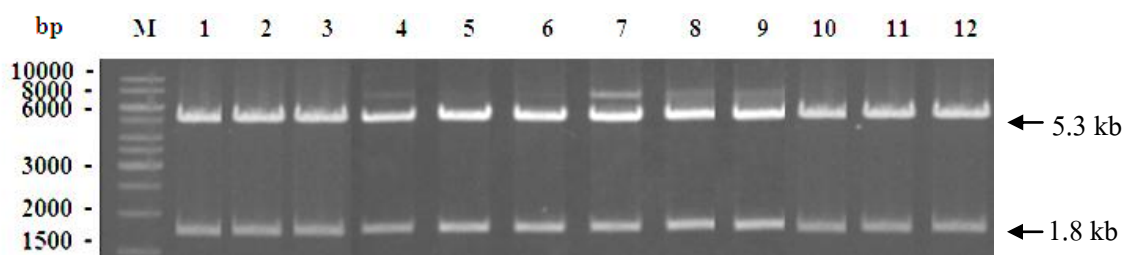
(ค) BADH2_E260A



(ง) BADH2_C294A



ภาพที่ 28 ผลการทำโคลนนิ่ง PCR ของยีน BADH2 กลายพันธุ์ 4 แบบ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะ เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ (ก) BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง Y420 โดยใช้ไพรเมอร์ BADH2_Y420_check_F กับ BADH2_XhoI_R (ข) BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง N162A โดยใช้ไพรเมอร์ BADH2_N162A_check_F กับ BADH2_XhoI_R (ค) BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง E260A โดยใช้ไพรเมอร์ BADH2_E260A_check_F กับ BADH2_XhoI_R (ง) BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง C294A โดยใช้ไพรเมอร์ BADH2_C294A_check_F กับ BADH2_XhoI_R M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน และ 1-10 คือ แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR



ภาพที่ 29 ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่ามียีน BADH2 กลายพันธุ์ 4 แบบ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* พลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง Y420 ช่องที่ 1-3 แสดงโคลนที่ 1-3 ตามลำดับ พลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง N162A โคลนที่ 1-3 ในช่องที่ 4 - 6 ตามลำดับ พลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ตำแหน่ง E260A โคลนที่ 1-3 ในช่องที่ 7 -9 ตามลำดับ และพลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A โคลนที่ 1-3 ในช่องที่ 10-12 ตามลำดับ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

นำพลาสมิดจากโคลนที่ 2 ของทุกโคลน BADH2 กลายพันธุ์มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ โดยจากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์แต่ละแบบ พบว่า ประสบความสำเร็จในการสร้างเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างถูกต้อง ในตำแหน่งที่ต้องการ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ เมื่อเปรียบเทียบกับยีน BADH2 ดั้งเดิม แสดงดังภาพที่ 30 และแสดงผลอย่างละเอียดในภาคผนวก ก

พลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์ Y420 มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีการเพิ่มขึ้น 3 นิวคลีโอไทด์ คือ TAT (รหัสกรดอะมิโนไทโรซีน)

พลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์ N162A มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก AAC (รหัสของกรดอะมิโนแอสพาราจีน) ไปเป็น GCC (รหัสกรดอะมิโนอะลานีน)

พลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์ E260A มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GAA (รหัสของกรดอะมิโนกลูตามิก) ไปเป็น GCA (รหัสกรดอะมิโนอะลานีน)

พลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์ C294A มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก TGC (รหัสของกรดอะมิโนซิสทีน) ไปเป็น GCC (รหัสกรดอะมิโนอะลานีน)

BADH2	GAATTGGCCA	ACGATACTCA	TTAT---	GGT	CTGGCTGGTG	CTGTGCTTTC
BADH2_Y420	GAATTGGCCA	ACGATACTCA	TTAT	TATGGT	CTGGCTGGTG	CTGTGCTTTC
BADH2	TATCGGTGTA	GTTGGGTTGA	TCACACCTTG	GAACATATCCT	CTCCTGATGG	
BADH2_N162A	TATCGGTGTA	GTTGGGTTGA	TCACACCTTG	G	GGCTATCCT	CTCCTGATGG
BADH2	CCTATGGTTA	AGCCTGTTTC	ACTGGA	ACTT	GGTGGAAAAA	GTCCTATAGT
BADH2_E260A	CCTATGGTTA	AGCCTGTTTC	ACTG	GCACTT	GGTGGAAAAA	GTCCTATAGT
BADH2	AATGGCCAGA	TTTGCAGTGC	AACATCGCGT	CTTATTCTTC	ATAAAAAAAT	
BADH2_C294A	AATGGCCAGA	TT	GCCAGTGC	AACATCGCGT	CTTATTCTTC	ATAAAAAAAT

ภาพที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ เปรียบเทียบกับยีน BADH2 ดั้งเดิม สีม่วง คือ ตำแหน่งกลายพันธุ์ Y420 สีเหลือง คือ ตำแหน่งกลายพันธุ์ N162A สีเขียว คือ ตำแหน่งกลายพันธุ์ E260A สีฟ้าคือ ตำแหน่งกลายพันธุ์ C294A

จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด BADH2 กลายพันธุ์แต่ละแบบ พบว่า ประสบความสำเร็จในการสร้างยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างถูกต้อง เมื่อถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่ายีน BADH2 ที่กลายพันธุ์ไปยังคงมีลำดับกรดอะมิโนที่ปลายคาร์บอกซิลเป็น เซอรีน ไลซีน และลิวซีน (SKL) ซึ่งเหมือนกับใน BADH2 ปกติ

2.3 การนำยีน BADH2 กลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* (BL21) เพื่อผลิตเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์

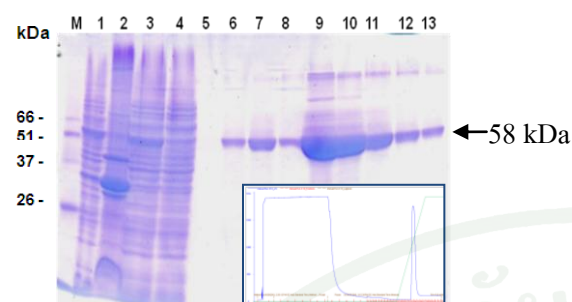
เมื่อนำพลาสมิด pET28b_BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งถูกต้องทั้ง 4 แบบ มาถ่ายโอนเข้าสู่ *E.coli* (BL21) ด้วยวิธีทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน เลี้ยงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน พบว่ามีโคโลนีเจริญประมาณ 100 โคโลนีในทุกๆ แบบของการกลายพันธุ์

จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์แต่ละแบบ โดยนำโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับถ่ายโอนยีน BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ มาแบบละ 3 โคโลนี เลี้ยงในจานอาหารที่มีอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อทำเป็นจานเชื้อต้นแบบ (master plate) จากนั้นนำโคโลนีที่ 2 จากทุกจานเชื้อต้นแบบนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อทำเป็นหัวเชื้อในการแสดงออกของโปรตีน ต่อไป

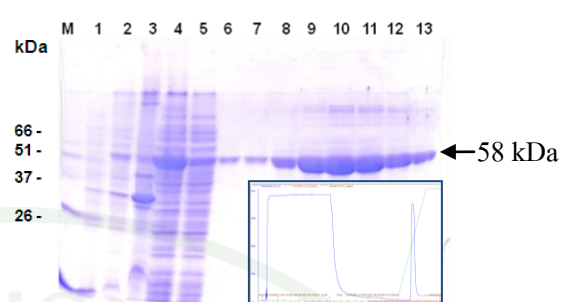
3. การผลิตและทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์ BADH2 กลายพันธุ์

นำโคโลนีแบคทีเรีย *E.coli* (BL21) ที่ได้รับการถ่ายยีน BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง ทุกการกลายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB pH 7.5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร เขย่าให้มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เตรียมไว้เพื่อทำเป็นหัวเชื้อในการแสดงออกของโปรตีน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้มีความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 จากนั้นเติม IPTG ให้มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ นำมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE พบว่าได้โปรตีนขนาดประมาณ 58 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 โดยเก็บโปรตีนหลังจากที่ชะด้วยอิมมูโนโกลบูลินเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 31) ได้โปรตีนขนาดประมาณ 58 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนจะถูกชะออกมาด้วยอิมมูโนโกลบูลินเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ในโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-CI เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยโปรตีนที่ถูกชะออกมาจะถูกวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร

(ก) BADH2



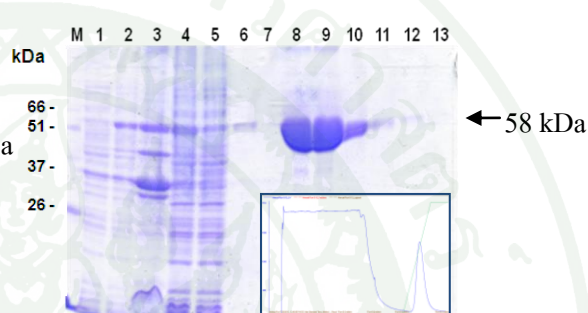
(ข) BADH2_Y420



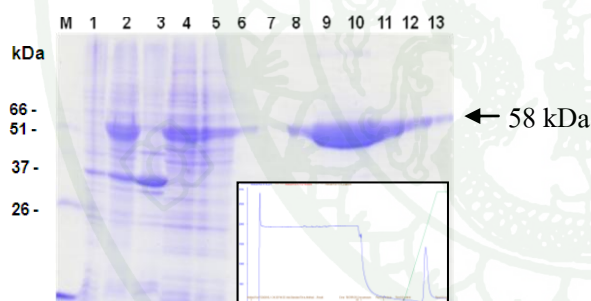
(ค) BADH_N162A



(ง) BADH2 E260A



(จ) BADH2_C294A



ภาพที่ 31 ภาพแสดงผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ ด้วย 6xHis-taq โดยคอลัมน์ Ni^{2+} -NT affinity โดยเครื่อง FPLC (ก) โปรตีน BADH2 ดั้งเดิม (ข) โปรตีน BADH2_Y420 (ค) โปรตีน BADH2_N162A (ง) โปรตีน BADH2_E260A และ (จ) โปรตีน BADH2_C294A M คือ โปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 1 คือ ก่อนการชักนำด้วย IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ ช่องที่ 2 คือหลังชักนำ IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ 16 ชั่วโมง ช่องที่ 3 คือตะกอนโปรตีนหลังจากทำให้เซลล์แตก ช่องที่ 4 คือส่วนใสของโปรตีนก่อนทำบริสุทธิ์ ช่องที่ 5 คือ flow through จากเครื่อง FPLC ช่องที่ 6-7 คือ ส่วนใสจากเครื่อง FPLC ช่องที่ 8-13 คือโปรตีนที่ถูกชะด้วยอิมิดาโซลเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

ทำการรวมหลอดที่มีแถบโปรตีนที่มีขนาดตามที่คาดไว้เข้าด้วยกัน นำไปไลอะไลซ์ด้วยถุงไลอะไลซิส ในบัฟเฟอร์ HEPES-KOH ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่ pH 8.0 ข้ามคืนเพื่อกำจัดอิมิดาโซล และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้พร้อมใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยสมการ $A = \epsilon bc$ โดยค่า Extinction coefficients (ϵ) ของ โปรตีน BADH2 BADH2_Y420 BADH2_N162A BADH2_E260A และ BADH2_C294A คือ 88765 90255 88765 88765 และ 88640 โมลาร์⁻¹เซนติเมตร⁻¹ตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่แยกได้ นำไปทดสอบการจับกันอย่างจำเพาะ ระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ต่อไป

4. การหาค่าการจับกันอย่างจำเพาะของ BADH2 กลายพันธุ์กับโคแฟกซ์เตอร์

จากการหาค่าการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH เพื่อหาประสิทธิภาพในการจับกันของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ โดยตรวจสอบการปลดปล่อยพลังงานแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเอนไซม์ เมื่อเติมโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADH วัดค่าการปลดปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 300 ถึง 450 นาโนเมตร พบว่าพลังงานถูกปลดปล่อยสูงสุดที่ความยาวคลื่น 353.09 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงของพลังงานที่ถูกปลดปล่อยนำมาวิเคราะห์หาค่า K_d ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการจับกันของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์

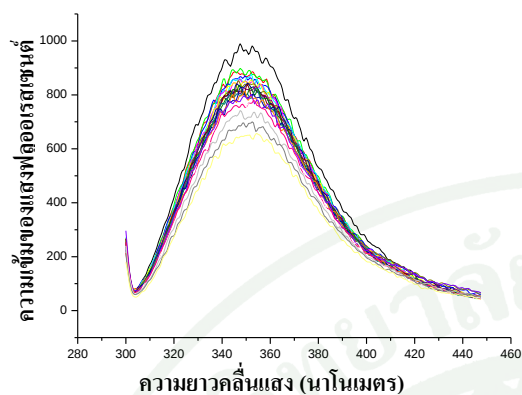
จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADH ลงในเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ (5 ไมโครโมลาร์) กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ NADH (0-555.55 ไมโครโมลาร์) โดยวัดการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ความยาวคลื่น 353.09 นาโนเมตร จะได้กราฟ Intrinsic fluorescence จากกราฟ แกนตั้งแสดงค่าการปลดปล่อยพลังงานของทริปโตเฟน และแกนนอนแสดงความยาวคลื่นแสงที่ใช้ตรวจสอบการปลดปล่อยพลังงาน เนื่องจาก NAD^+ หรือ NADH ที่เติมลงไปเอนไซม์มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง หรือไปบดบังแสงฟลูออเรสเซนซ์จากทริปโตเฟนในเอนไซม์ ทำให้ได้ระดับพลังงานที่ปลดปล่อยออกแตกต่างจากเดิมที่ไม่เติมโคแฟกซ์เตอร์

จากนั้นนำค่าความแตกต่างของค่าการปลดปล่อยพลังงาน เมื่อเติมโคแฟกซ์เตอร์ความเข้มข้นต่างๆ นำไปคำนวณหาค่า K_d ของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 32) โดยใช้สมการ

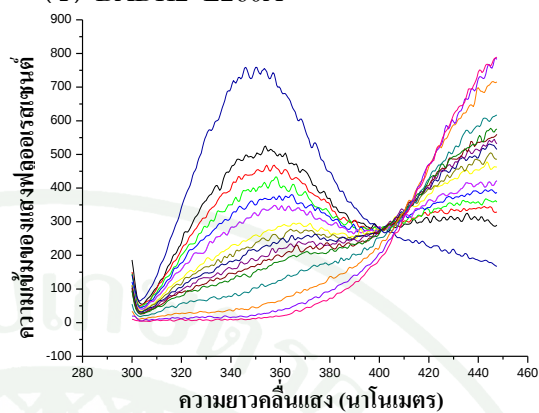
$$\% \Delta F_{\text{obs}} = \frac{\Delta F_{\text{max}}[L]_0}{K_d + [L]_0} \text{ ด้วยโปรแกรม Enzfitter}$$

หลังจากนั้น นำค่า $\% \Delta F$ ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบมาสร้างกราฟระหว่าง $\% \Delta F$ กับค่าความเข้มข้นของโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ หรือ $NADH$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังภาพที่ 33 จากผลการจับอย่างจำเพาะของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ ค่า K_d แสดงดังตารางที่ 12 โดยค่า K_d แสดงถึง ประสิทธิภาพในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ หาก K_d มีค่าน้อยแสดงว่าเอนไซม์จับกับโคแฟกซ์เตอร์ได้ดี โดยใช้เอนไซม์เพียงเล็กน้อยก็สามารถจับกับโคแฟกซ์เตอร์ได้ หากค่า K_d มากแสดงว่าเอนไซม์จับกับโคแฟกซ์เตอร์ได้ไม่ดี ต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมากจึงจับกับโคแฟกซ์เตอร์แล้วเกิดปฏิกิริยาได้ จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมจับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ ได้ดีกว่าเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A และ C294A โดยเปรียบเทียบจากค่า K_d มีค่าเท่ากับ 3.2 2.3 และ 8 เท่าตามลำดับ และเอนไซม์ BADH2_E260A มีความสามารถในการจับกับ NAD^+ ดีเทียบเท่ากับ BADH2 ดั้งเดิม และเมื่อใช้ $NADH$ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ พบว่าเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A จับกับโคแฟกซ์เตอร์ $NADH$ ได้ดีที่สุด ซึ่งมากกว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมถึง 6 เท่าและมากกว่าเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A และ E260A เท่ากับ 2 3.8 และ 6.2 เท่าตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวอาจจะผิดพลาด เนื่องจาก $NADH$ ที่ใช้เป็นโคแฟกซ์เตอร์ จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 340 นาโนเมตร ซึ่งมีความยาวคลื่นที่ได้มีความใกล้เคียงกับความยาวคลื่นแสงที่ทริปโตเฟนปลดปล่อยพลังงานออกมา จึงทำให้ค่าการปลดปล่อยพลังงานที่ปรากฏออกมาจากผลของการใช้โคแฟกซ์เตอร์ $NADH$ มีค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ

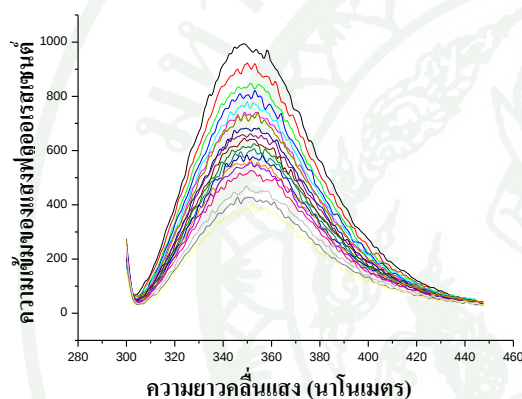
(ข) BADH2 E260A



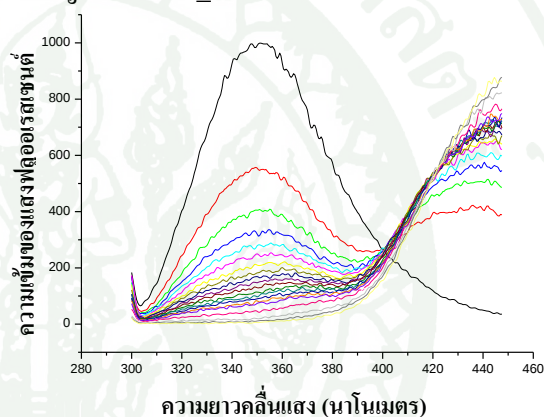
(ช) BADH2 E260A



(ฉ) BADH2_C294A

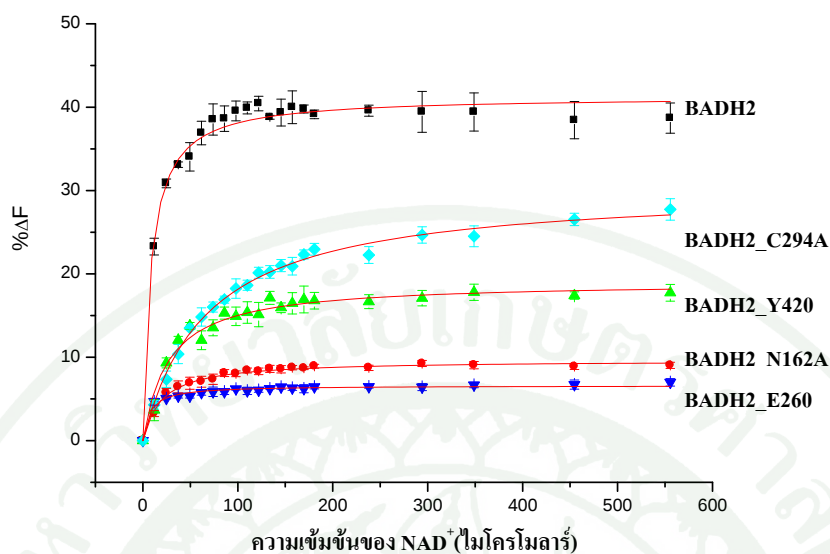


(ญ) BADH2_C294A

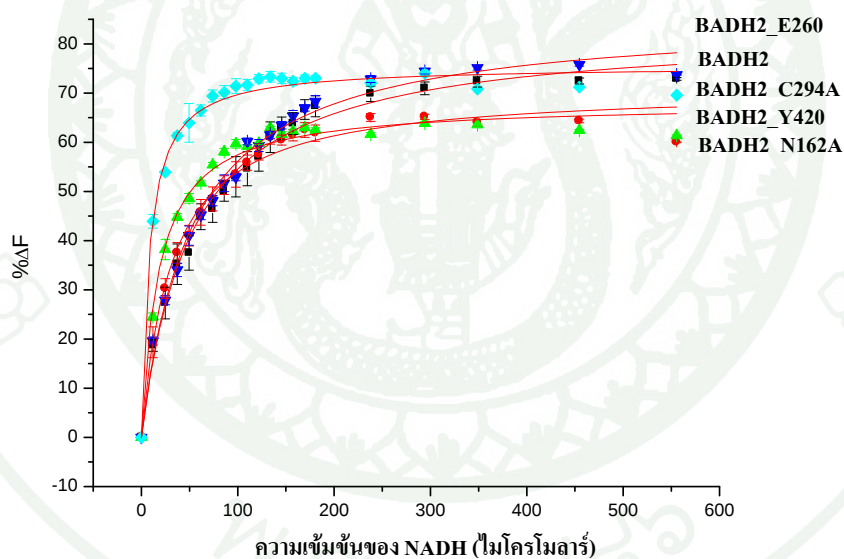


ภาพที่ 32 (ต่อ) กราฟแสดง Intrinsic fluorescence ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A โคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ [(ก) (ค) (จ) (ช) และ (ฉ)] หรือ NADH [(ข) (ง) (ฉ) (ซ) และ (ญ)] ตามลำดับ โดยเส้นสี / / / / / / / และ / คือกราฟของ NAD^+ หรือ NADH ที่ความเข้มข้น 0 12 24.8 37.2 49.5 61.7 73.9 85.9 98 110 121.95 133.81 145.63 157.38 169.68 180.72 238.09 348.8 454.5 และ 555.55 ไมโครโมลาร์

(ก) โคแฟกซ์เตอร์: NAD^+



(ข) โคแฟกซ์เตอร์: NADH



ภาพที่ 33 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ fluorescence titration ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ ในตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A (ก) และ (ข) NAD^+ และ NADH เป็น โคแฟกซ์เตอร์ ตามลำดับ โดย ■ ▲ ● ▼ และ ◆ คือ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ ในตำแหน่ง Y420 N162A E260A และ C294A ตามลำดับ

จากผลของค่า K_d ที่บอกถึงประสิทธิภาพการจับกันระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ พบว่าค่า K_d สอดคล้องกับผลกลไกการทำงานของเอนไซม์ โดยตำแหน่ง Y420 ที่เพิ่มเข้ามา และตำแหน่ง N162 และ E260 อยู่ใกล้กับตำแหน่ง NAD^+ binding site จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ เมื่อมีการเพิ่มเข้ามาของลำดับกรดอะมิโน หรือถูกแทนที่จากกรดอะมิโนเดิมให้เป็นกรดอะมิโนอะลานีน

ตารางที่ 12 แสดงค่า K_d ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH

เอนไซม์	$K_d \pm \text{S.E. (ไมโครโมลาร์)}$	
	NAD^+	NADH
BADH2	8.35 ± 0.79	51.84 ± 3.05
BADH2_Y420	26.77 ± 2.99	18.26 ± 1.39
BADH2_N162A	19.30 ± 1.21	31.54 ± 2.04
BADH2_E260A	7.11 ± 0.93	52.39 ± 3.04
BADH2_C294A	67.04 ± 3.20	8.30 ± 0.74

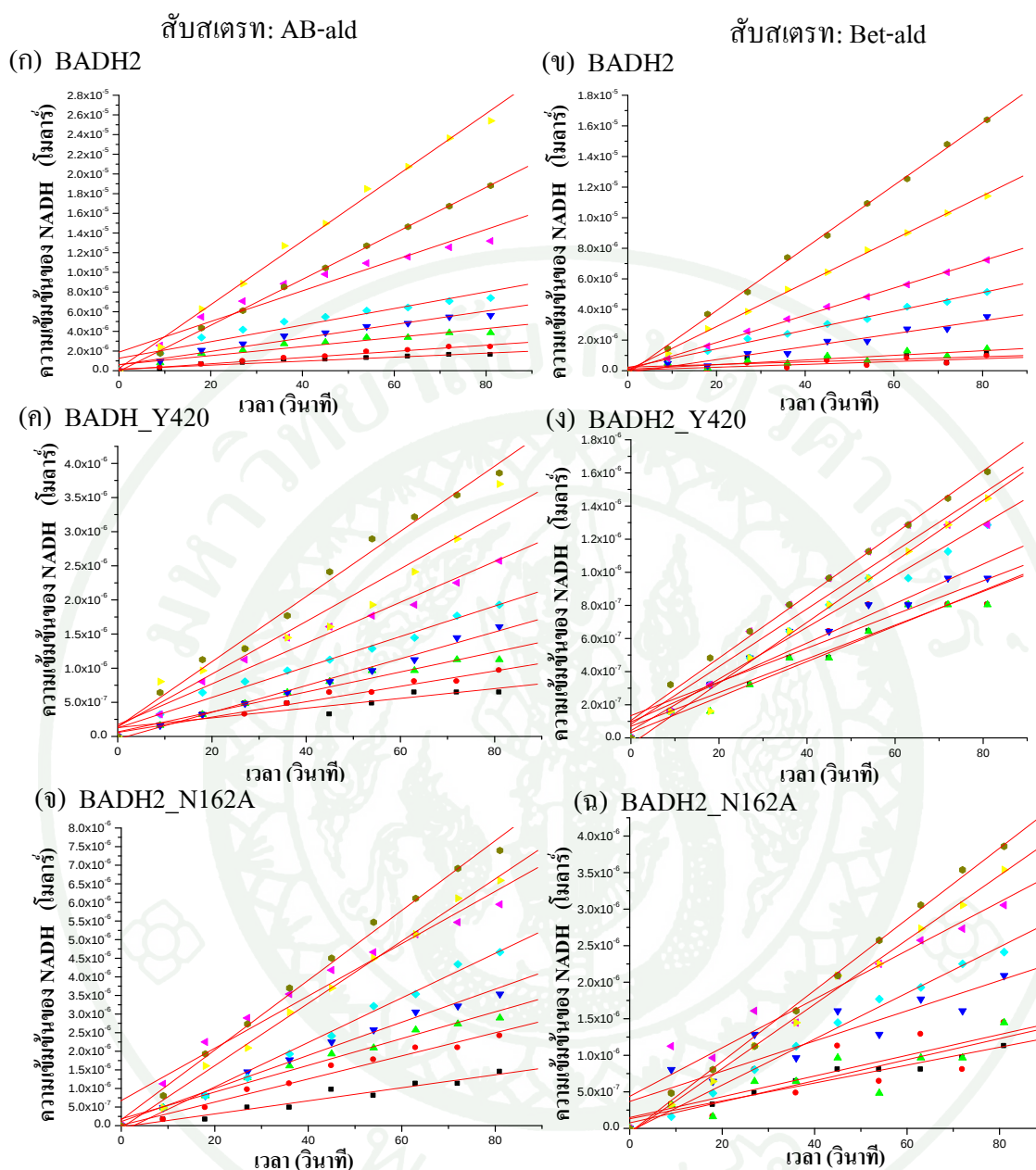
หมายเหตุ: S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

5. การตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์

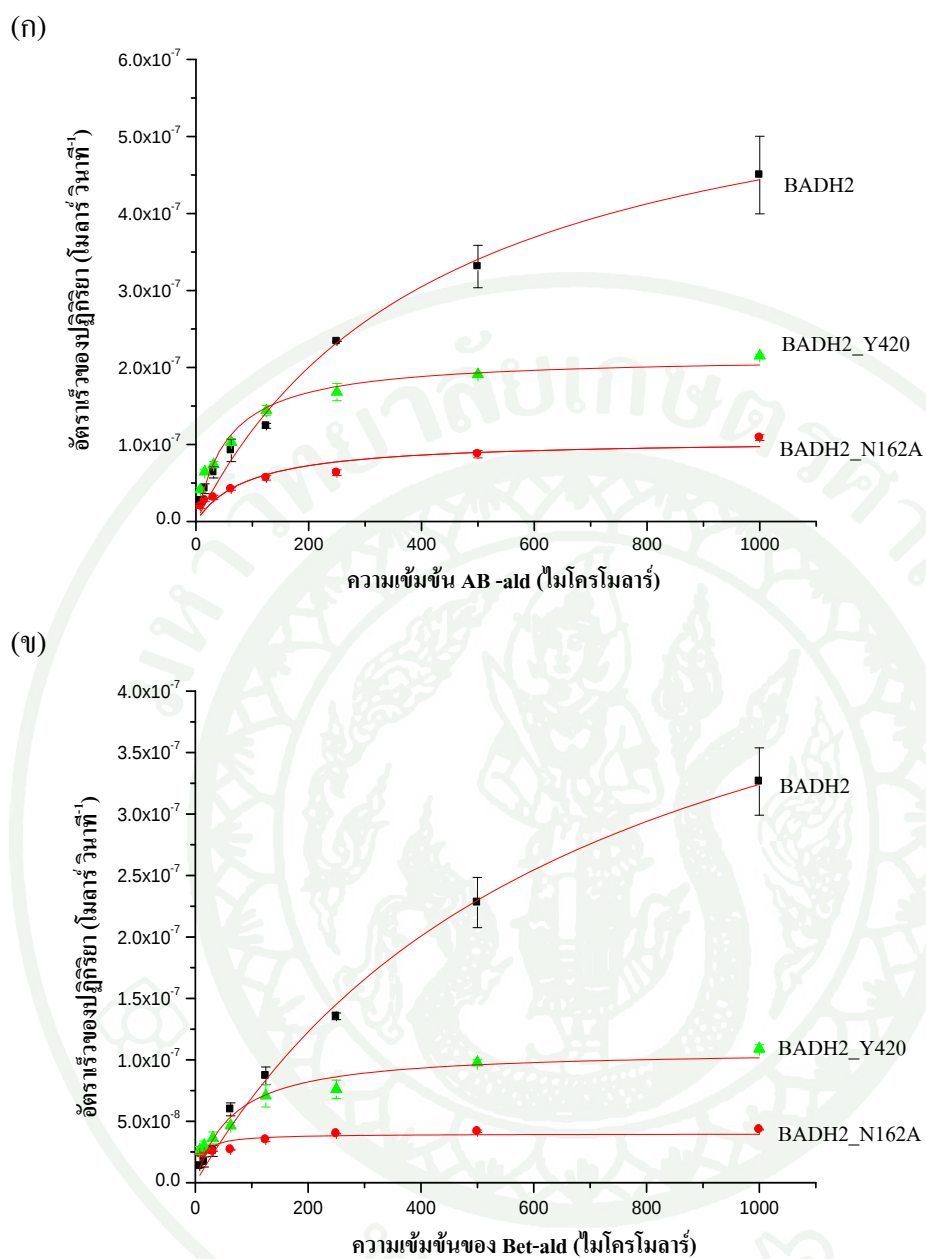
เอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว จะถูกนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ แต่เอนไซม์ BADH2_Y420 และ BADH2_N162A ใช้เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ไม่เห็นความแตกต่างในการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ และเอนไซม์ BADH2_E260A และ BADH2_C294A ใช้เอนไซม์เข้มข้นถึง 15 ไมโครโมลาร์ ก็ไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เนื่องจากเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบมีบริเวณที่กลายพันธุ์อยู่บริเวณ catalytic triad ซึ่งเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และการตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของ NADH ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มปริมาณของสับสเตรท สามารถหาค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยา จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ NADH ที่เกิด

ขึ้นกับเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา จะได้กราฟเส้นตรง โดยแกนตั้งแสดงความเข้มข้นของ NADH และแกนนอนแสดงเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 34 และหาความชันจากกราฟเส้นตรงดังกล่าว ซึ่งค่าความชันที่ได้คือ อัตราเร็วของปฏิกิริยา นำค่าดังกล่าวแทนในสมการ Michaelis-Menten ด้วยโปรแกรม Origin6 เพื่อหาค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m และ V_{max}) จะได้กราฟที่แกนตั้งแสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยา และแกนนอนแสดงความเข้มข้นของสับสเตรท (ภาพที่ 35)

จากกราฟสามารถคำนวณหาค่า K_m , V_{max} , k_{cat} และ k_{cat}/K_m โดยค่า K_m แสดงถึง ค่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่ปฏิกิริยาดำเนินไปที่ครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ($V_{max}/2$) หาก K_m มีค่ามากแสดงว่าสับสเตรทจับกับเอนไซม์ได้อ่อน ไม่แน่น แต่หาก K_m มีค่าน้อยแสดงว่าเอนไซม์กับสับสเตรทจับกันได้ดี และแน่น ส่วน V_{max} แสดงถึงอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์เปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ หาก V_{max} มีค่ามากแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดได้อย่างรวดเร็ว แต่หากมีค่าน้อยแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดได้ช้า ค่า k_{cat} แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อ จำนวนเอนไซม์ต่อเวลา (turn over number) หาก k_{cat} มีค่ามากแสดงว่าเกิดผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยามาก และหาก k_{cat} มีค่าน้อยแสดงว่าได้ผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาน้อยเช่นกัน เนื่องจากจำนวนสับสเตรทที่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์น้อย และ k_{cat}/K_m แสดงถึงประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (catalytic efficiency) หาก k_{cat}/K_m มีค่ามากแสดงว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้ดี แต่หาก k_{cat}/K_m มีค่าน้อยแสดงว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยได้น้อย



ภาพที่ 34 กราฟแสดงปริมาณ NADH ที่เปลี่ยนแปลงไปของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม กลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 และ N162A โดย (ก) และ (ข) กราฟแสดงปริมาณ NADH ที่เปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม โดยใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรท (ค) และ (ง) กราฟแสดงปริมาณ NADH ที่เปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง Y420 (จ) และ (ฉ) กราฟแสดงปริมาณ NADH ที่เปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง N162A โดยใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทตามลำดับ โดย ■ ● ▲ ▼ ◆ ◆ และ ● คือ AB-ald หรือ Bet-ald เข้มข้น 7.81 15.62 31.25 62.5 125 250 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ



ภาพที่ 35 กราฟแสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ใน ตำแหน่ง Y420 และ N162A โดยใช้ AB-ald (ก) และ Bet-ald (ข) เป็นสับสเตรท ตามลำดับ โดย ■ ▲ และ ● คือ เอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 และ N162A ตามลำดับ

จากการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบค่า V_{max} ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เอนไซม์ BADH2_Y420 และ BADH2_N162A กลายพันธุ์ เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรทมีค่า V_{max} มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 2 แบบ เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม พบว่า เอนไซม์มีความสามารถในการจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น แต่พบค่า k_{cat} ที่แสดงถึงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์มีค่าลดลงประมาณ 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่า k_{cat} ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม ส่วนค่า k_{cat}/K_m ที่เป็นค่าบอกถึงประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดมีความจำเพาะกับสับสเตรทมากขึ้น โดยจับกับสับสเตรทได้แน่นขึ้น แต่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแย่ง ซึ่งจากผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันเมื่อใช้ Bet-ald เป็นสับสเตรท และจากการเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรททั้ง 2 ชนิด พบว่า เอนไซม์ BADH2_Y420 กลายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรท Bet-ald ได้ดีกว่า AB-ald เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม (ตารางที่ 13) แสดงว่าในธรรมชาติ การกลายพันธุ์เอนไซม์ BADH2_Y420 ซึ่งเหมือนกับที่พบในข้าวหอมปทุม (badh2.8) นั้น ทำให้เอนไซม์สามารถใช้สับสเตรทชนิดอื่นได้ดีกว่า AB-ald ดังนั้น AB-ald จึงถูกเปลี่ยนเป็นสารหอม 2AP ในกลไกของ polyamine แทน

ตารางที่ 13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ

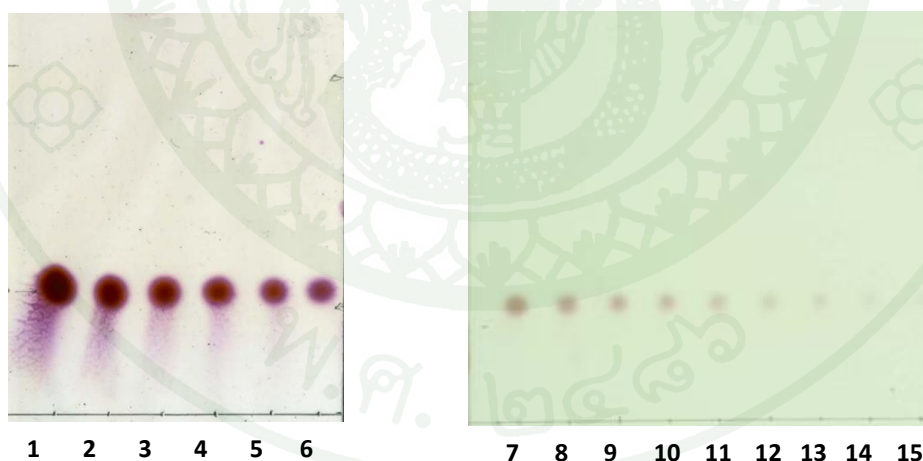
เอนไซม์	สับสเตรท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์			
		$V_{\max} \pm \text{S.E.}$	$K_m \pm \text{S.E. (ไมโครโมลาร์)}$	$k_{\text{cat}} (\text{วินาที}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{วินาที}^{-1} \text{โมลาร์}^{-1})$
BADH2	AB-ald	$6.38\text{E-}7 \pm 5.04\text{E-}8$	437.63 ± 74.75	0.128	292.48
BADH2_Y420	AB-ald	$1.06\text{E-}7 \pm 1.10\text{E-}8$	93.31 ± 32.02	0.011	117.89
BADH2_N162A	AB-ald	$2.15\text{E-}7 \pm 1.00\text{E-}8$	56.31 ± 9.91	0.022	390.69
BADH2_E260A	AB-ald	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BADH2_C294A	AB-ald	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BADH2	Bet-ald	$5.48\text{E-}7 \pm 4.05\text{E-}8$	694.07 ± 95.56	0.110	158.49
BADH2_Y420	Bet-ald	$4.03\text{E-}8 \pm 3.31\text{E-}9$	10.49 ± 4.27	0.004	381.32
BADH2_N162A	Bet-ald	$1.08\text{E-}8 \pm 8.00\text{E-}9$	63.65 ± 17.24	0.011	172.82
BADH2_E260A	Bet-ald	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BADH2_C294A	Bet-ald	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

หมายเหตุ: N.D คือหาค่าไม่ได้

6. การตรวจหาสาร γ -aminobutyric acid (GABA) จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

การทำ TLC เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่ใช้แยกสารให้บริสุทธิ์ และตรวจวิเคราะห์เพื่อบอกชนิดและปริมาณสารต่างๆ โดยในการทดลองนี้จะตรวจสอบสารที่แยกได้โดยการพ่นสารละลายนินไฮดรินเพื่อให้ปรากฏภาพ โดยสารละลายนินไฮดรินจะทำปฏิกิริยากับสารที่มีหมู่ เอมีนปฐมภูมิหรือ แอมโมเนียเท่านั้น เช่น สารจำพวกกรดอะมิโนชนิดต่างๆ หรือสาร GABA ที่มีหมู่เอมีนปฐมภูมิอยู่ ในการทดลองนี้ใช้ TLC ในการตรวจหาสาร GABA จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ วิธีทดลองโดยนำผลิตภัณฑ์จากการทำกิจกรรมของเอนไซม์มาจุดลงบนแผ่น TLC เมื่อใช้ AB-ald หรือ Bet-ald เป็นสับสเตรท จากกลไกการสร้าง 2AP เอนไซม์ BADH2 จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald เป็นสาร GABA

ผลจากการทำ TLC ของ GABA มาตรฐาน (ภาพที่ 36) ที่ปริมาณต่างๆ (0.002–30 ไมโครกรัม) พบว่าสามารถตรวจสอบ GABA ได้ที่ปริมาณต่ำสุด 0.004 ไมโครกรัม และจากผล TLC ของสับสเตรท AB-ald มาตรฐาน พบว่าสามารถตรวจสอบที่ปริมาณของ AB-ald ได้ต่ำสุดที่ 3.27 มิลลิกรัม (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 36 แสดงผล TLC ของ GABA มาตรฐาน โดยช่องที่ 1-15 คือ สาร GABA มาตรฐาน ปริมาณ 30 15 7.5 3.75 1.88 0.94 0.47 0.23 0.12 0.06 0.03 0.015 0.007 0.004 และ 0.002 ไมโครกรัม ตามลำดับ



ภาพที่ 37 แสดงผล TLC ของสับสเตรท AB-ald มาตรฐาน โดยช่องที่ 1-8 คือ สับสเตรท AB-ald มาตรฐาน ปริมาณ 13.07 6.53 3.27 1.63 0.82 0.41 0.20 และ 0.10 มิลลิกรัม ตามลำดับ

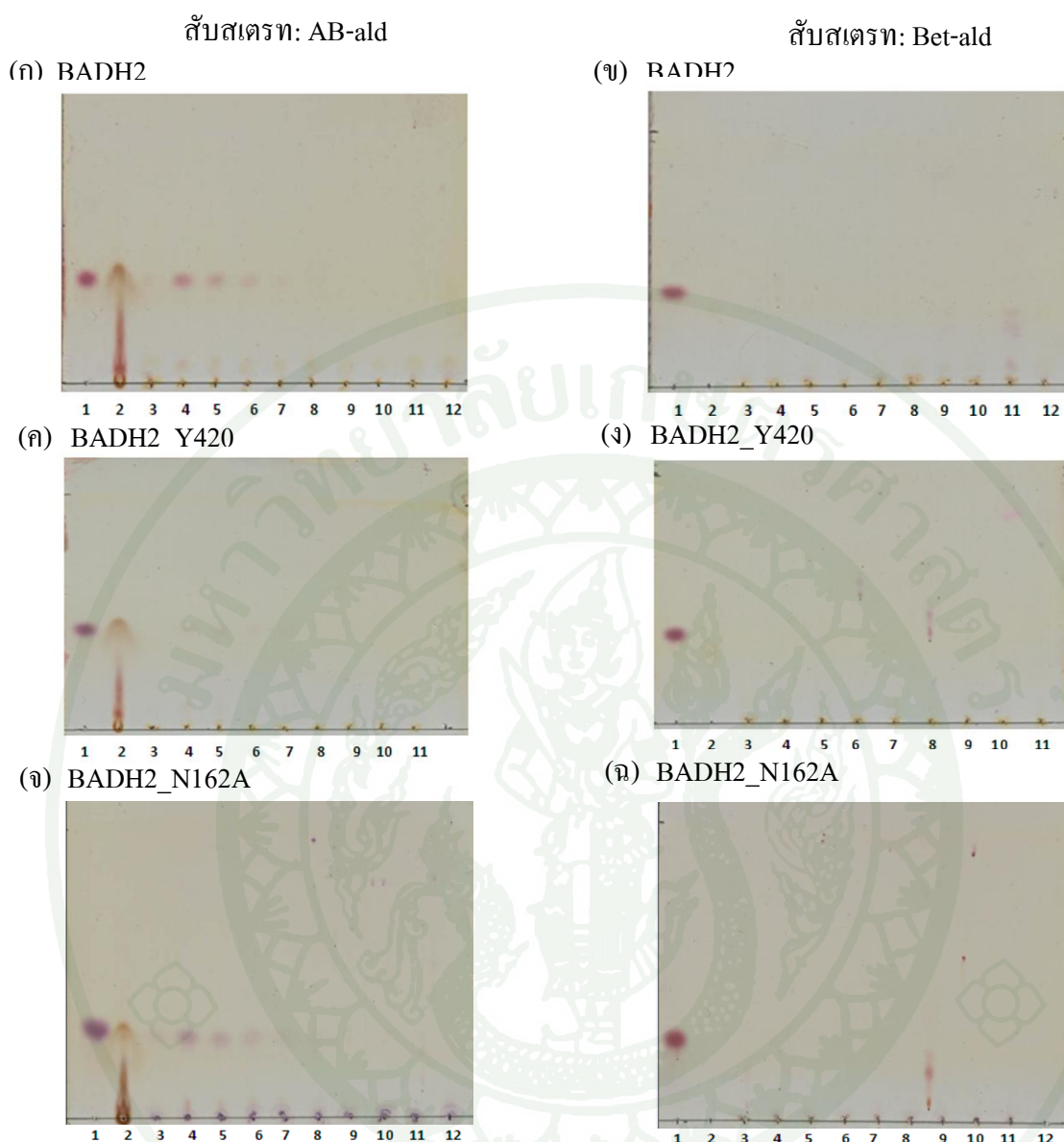
ผลจากการตรวจสอบผลผลิตด้วยการทำ TLC จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม โดยนำปฏิกิริยามาจุดบนแผ่น TLC จุดละ 3 ไมโครลิตร เมื่อใช้ AB-ald หรือ Bet-ald เป็นสับสเตรทโดยช่องที่ 1-3 และ 12 เป็นสารควบคุม (control) พบว่าผลจากการทำกิจกรรมโดยใช้ AB-ald เป็นสับสเตรทนั้นสามารถตรวจพบสารที่คาดว่าเป็น GABA จึงกล่าวว่า เอนไซม์สามารถเปลี่ยน AB-ald เป็นสาร GABA ได้ แต่เมื่อใช้ Bet-ald เป็นสับสเตรท พบว่าไม่สามารถตรวจสอบสารที่คาดว่าเป็นสาร GABA เนื่องจากเอนไซม์จะเปลี่ยน Bet-ald เป็น glycine betaine ซึ่งเป็นไปตามที่ผู้วิจัยคาดไว้ (ภาพที่ 38) โดยสามารถตรวจสอบการเกิดสาร GABA โดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท AB-ald ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125–1000 ไมโครโมลาร์ โดยปริมาณของ GABA ที่มากที่สุดตรวจสอบได้ประมาณ 0.12 ไมโครกรัม (อ้างอิงจาก GABA มาตรฐานในช่องที่ 9)

ผลจากการทำ TLC ของเอนไซม์ BADH2_Y420 (ภาพที่ 38 (ค)-(ง)) เมื่อใช้ AB-ald หรือ Bet-ald เป็นสับสเตรท ดังภาพที่ 38 โดยช่องที่ 1-3 และ 12 เป็นสารควบคุมพบว่าผลจากการทำกิจกรรมเหมือนกับของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม ที่สามารถตรวจสอบการเร่งการเปลี่ยนสาร AB-ald เป็นสาร GABA ได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบการเร่งการเปลี่ยนสาร Bet-ald เป็นสาร GABA โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการเกิดสาร GABA โดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท AB-ald ที่ความเข้มข้นระหว่าง 125–1000 ไมโครโมลาร์ โดยปริมาณของ GABA ที่มากที่สุดตรวจสอบได้ประมาณ 0.004 ไมโครกรัม (อ้างอิงจาก GABA มาตรฐานในช่องที่ 14) และอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ BADH2_Y420 เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald เป็นสาร 2AP แต่ได้สาร GABA ในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีการศึกษาเอนไซม์ BADH2 ในข้าว

ที่พบว่า เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald เป็นสาร GABA (Vanavichit *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008) และมีรายงานว่า BADH2_Y420 พบในข้าวหอมที่สร้างสารหอม (Kovach *et al.*, 2009) แต่ความหอมน้อยกว่าข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งอาจเนื่องจาก เอนไซม์สามารถเปลี่ยนสารตัวกลางไปเป็น GABA และ 2AP บางส่วนเท่านั้น

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ BADH2_Y420 มีตำแหน่งที่กลายพันธุ์ไป ซึ่งจากรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ของข้าวในทวีปเอเชีย พบว่าตำแหน่งดังกล่าวเมื่อกลายพันธุ์ไปจะทำให้ข้าวหอม (Kovach *et al.*, 2009) ดังนั้นจากผลการทดลองค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับสับสเตรท และค่าการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ แตกต่างจากเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม จึงอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอม 2AP ในข้าวได้

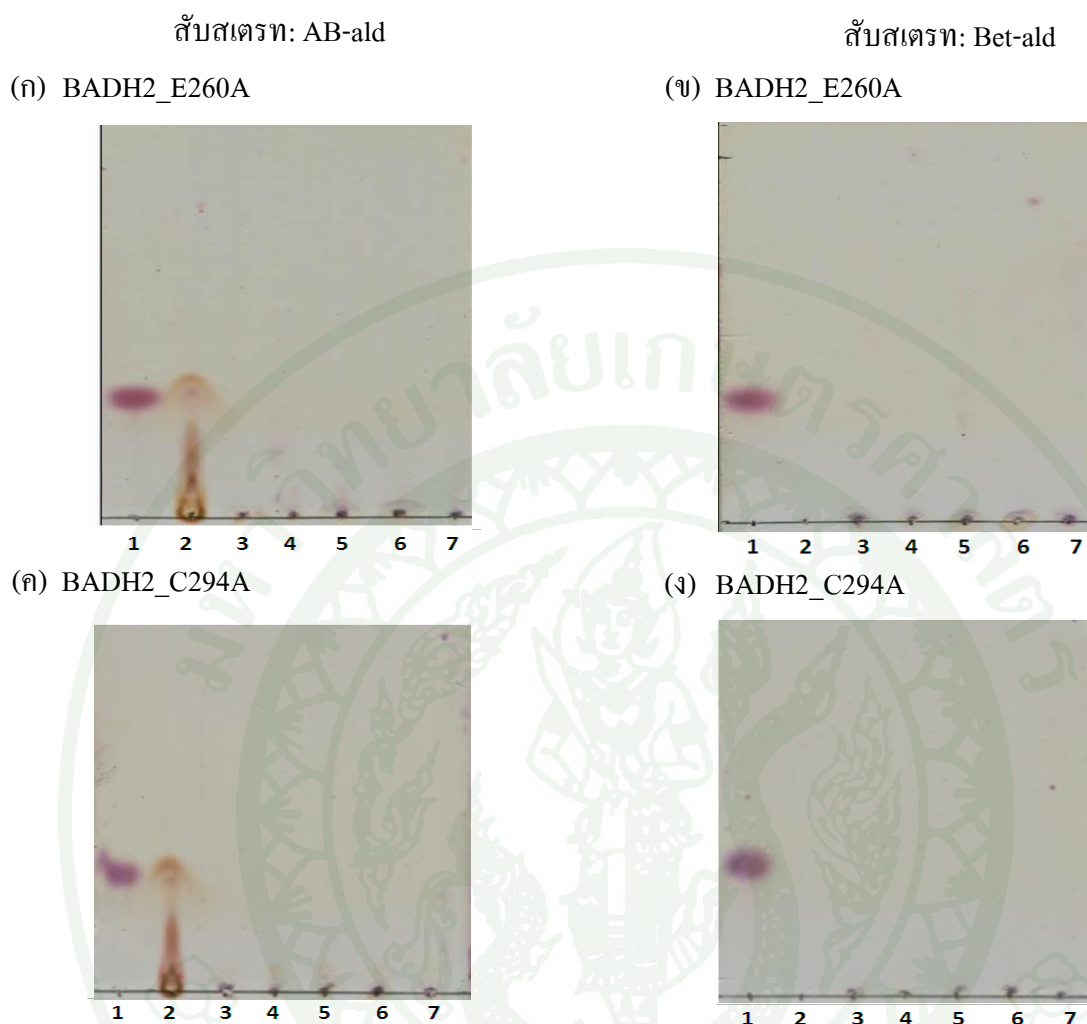
ผลจากการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_N162A (ภาพที่ 38 (จ)-(ฉ)) เมื่อใช้ AB-ald หรือ Bet-ald เป็นสับสเตรทดังภาพที่ 38 โดยช่องที่ 1-3 และ 12 เป็นสารควบคุม พบว่าผลจากการทำกิจกรรมเหมือนกับของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม ที่สามารถตรวจสอบการเร่งการเปลี่ยนสาร AB-ald เป็นสาร GABA ได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบการเร่งการเปลี่ยนสาร Bet-ald เป็นสาร GABA โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการเกิดสาร GABA โดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท AB-ald ที่ความเข้มข้นระหว่าง 125 – 1000 ไมโครโมลาร์ โดยความเข้มข้นของ GABA ที่มากที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ประมาณ 0.23 ไมโครกรัม (อ้างอิงจาก GABA มาตรฐานในช่องที่ 8)



ภาพที่ 38 แสดงผลการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากการทำกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420 และ N162A โดย (ก) (ค) และ (จ) แสดงผล TLC เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรท และ (ข) (ง) และ (ฉ) แสดงผล TLC เมื่อใช้ Bet-ald เป็นสับสเตรท ตามลำดับ โดยช่องที่ 1 คือ สาร GABA มาตรฐานปริมาณ 0.31 ไมโครกรัม ช่องที่ 2 คือ สับสเตรท AB-ald หรือ Bet-ald ปริมาณ 8.7 หรือ 13 มิลลิกรัม ตามลำดับ ช่องที่ 3 คือ ปฏิกริยาที่ไม่เติมสับสเตรท ช่องที่ 4-11 คือ ผลผลิตจากการทำกิจกรรมของเอนไซม์กับ สับสเตรท AB-ald หรือ Bet-ald ที่เข้มข้น 1000 500 250 125 62.5 31.125 15.625 และ 7.8 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ช่องที่ 12 คือ ปฏิกริยาที่ไม่เติม NAD^+

ผลจากการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E260A และ C294A (ภาพที่ 39 (ก)-(ง)) โดยใช้ AB-ald หรือ Bet-ald เป็นสับสเตรท ช่องที่ 1-3 และ 12 เป็นสารควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจพบ GABA หรือสารในกลุ่มเอมีนปฐมภูมิ

ผลจากการตรวจสอบการเกิดสาร GABA ด้วย TLC จากกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมและกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 และ N162A พบว่า เอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมสามารถเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald เป็น GABA ได้โดยตรวจสอบระดับของสาร GABA ได้ 0.12 ไมโครกรัม ส่วนเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 ได้ระดับ GABA 0.004 ไมโครกรัม และเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N162A ได้ระดับ GABA 0.23 ไมโครกรัม แต่เอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง E260A และ C294A ไม่สามารถตรวจสอบสาร GABA ได้จากสับสเตรททั้ง 2 ชนิดคือ AB-ald และ Bet-ald และหากต้องการทดสอบชนิดของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาอาจใช้วิธี Gas chromatography–mass spectrometry selective ion monitoring (GC-MS-SIM) ซึ่งเคยใช้ทดสอบสารในข้าวสายพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม (Yoshihashi *et al.*, 2002)

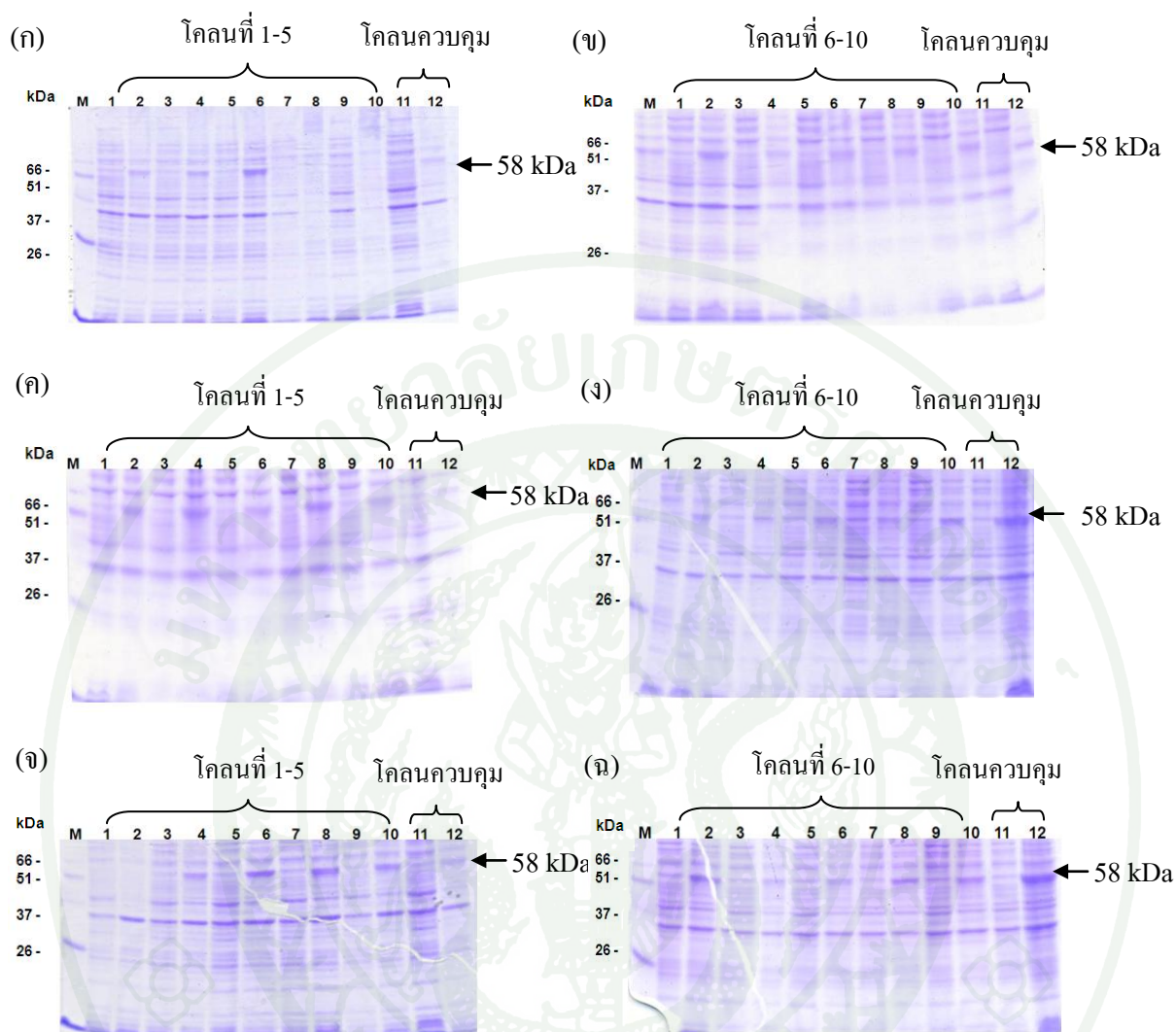


ภาพที่ 39 แสดงผลการตรวจสอบ GABA ด้วย TLC จากการทำกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง E260A และ C294A โดย (ก) และ (ค) แสดงผล TLC เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรท และ (ข) และ (ง) แสดงผล TLC เมื่อใช้ Bet-ald เป็นสับสเตรทตามลำดับ โดยช่องที่ 1 คือ สาร GABA มาตรฐานปริมาณ 0.31 ไมโครกรัม ช่องที่ 2 คือ สับสเตรท AB-ald หรือ Bet-ald ปริมาณ 8.7 หรือ 13 มิลลิกรัม ตามลำดับ ช่องที่ 3 คือ ปฏิกริยาที่ไม่เติมสับสเตรท ช่องที่ 4-6 คือ ผลผลิตจากการทำกิจกรรมของเอนไซม์กับสับสเตรท AB-ald หรือ Bet-ald ที่เข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 10 และ 15 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ช่องที่ 12 คือ ปฏิกริยาที่ไม่เติม NAD^+

7. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutagenesis)

7.1 การกลายพันธุ์ด้วยวิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต

ผลการทำให้ยีน BADH2 เกิดการกลายโดยใช้วิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่ม โดยนำแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pET28b_BADH2 มาส่องได้แสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ทำการกลายพันธุ์ ช่วงเวลาละ 5 โคลนนำมาสกัดพลาสมิด และถ่ายโอนยีน pET28b_BADH2 ที่คาดว่าจะกลายพันธุ์เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 จากนั้นคัดเลือกโคลนจากการส่องได้แสงยูวีที่ช่วงเวลาต่างๆ ช่วงเวลาละ 10 โคลน จาก 3 ช่วงเวลา จะได้ 30 โคลน มาผลิตโปรตีนโดยชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จากการชักนำให้โคลนที่เลือกมาผลิตโปรตีน พบว่าบางโคลนไม่สามารถผลิตโปรตีนได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงคาดว่าระยะเวลาที่ใช้ในการส่องแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์เพียงพอ โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีการแสดงออกโปรตีนที่มีขนาด 58 kDa แสดงดังภาพที่ 40 จากนั้นนำโคลนที่คัดเลือกมาผลิตโปรตีนและทำบริสุทธิ์ จากนั้นนำโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ BADH2 ดังเดิมเป็นตัวเปรียบเทียบ

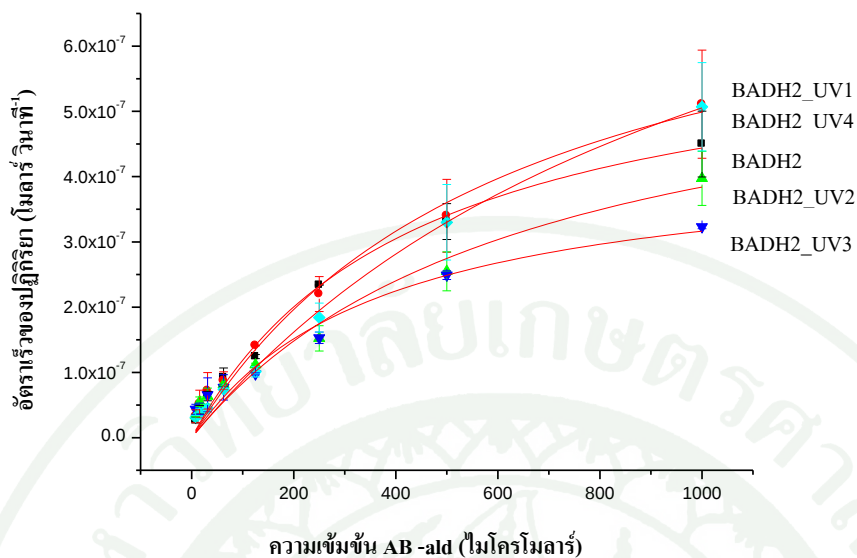


ภาพที่ 40 การแสดงออกของโปรตีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยวิธีส่องได้แสง อัลตราไวโอเลต (ก)-(ข) คือ โคลนที่ 1-10 ของโปรตีน BADH2 ที่กลายพันธุ์โดยส่องได้แสง อัลตราไวโอเลต 10 วินาที (ค)-(ง) คือ โคลนที่ 1-10 ของโปรตีน BADH2 ที่กลายพันธุ์โดยส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต 30 วินาที และ (จ)-(ฉ) คือ โคลนที่ 1-10 ของโปรตีน BADH2 ที่กลายพันธุ์โดยส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต 1 นาที โดยช่องที่ 1 3 5 7 9 และ 11 คือ โปรตีน ก่อนการชักนำด้วย IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ ช่องที่ 2 4 6 8 10 และ 12 คือ โปรตีน หลังการชักนำด้วย IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

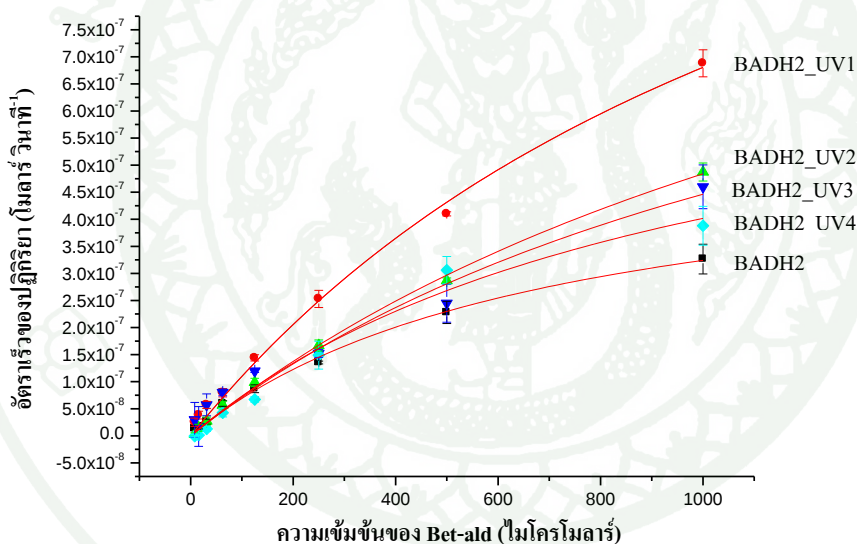
จากผลของกิจกรรมเอนไซม์กับสับสเตรททั้ง 2 ชนิด พบเอนไซม์ที่คาดว่าจะเกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี
ส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ต 4 แบบ ซึ่งมีค่ากิจกรรมแตกต่างจากเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม ที่ได้จากการส่อง
ได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลา 10 และ 30 วินาที

โดยจะเรียกชื่อโคลนที่คัดเลือกมาว่า BADH2_UV1 BADH2_UV2 BADH2_UV3 และ
BADH2_UV4 ตามลำดับ จากนั้นหาค่า K_m และ V_{max} k_{cat} และ k_{cat}/K_m ที่ได้จากกราฟแสดงอัตราเร็ว
เริ่มต้นมาแทนค่าในสมการ Michaelis-Menten เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ
กิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมกับกลายพันธุ์แสดงดังภาพที่ 41

(ก)



(ข)



ภาพที่ 41 กราฟแสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ กลายพันธุ์ด้วยวิธีสองได้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้ AB-ald (ก) และ Bet-ald (ข) เป็นสับสเตรท ตามลำดับโดย ■ ● ▲ ▼ และ ◆ คือ เอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และ BADH2_UV1-4 ตามลำดับ

จากการทดลองหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบค่า k_{cat} พบว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เมื่อใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทได้ค่า k_{cat} เท่ากับ 0.128 และ 0.110 วินาที⁻¹ ตามลำดับ และ เอนไซม์ BADH2_UV1 เมื่อใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทได้ค่า k_{cat} เท่ากับ 0.162 และ 0.322 วินาที⁻¹ตามลำดับ เอนไซม์ BADH2_UV2 เมื่อใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทได้ค่า k_{cat} เท่ากับ 0.127 และ 0.260 วินาที⁻¹ ตามลำดับ เอนไซม์ BADH2_UV3 เมื่อใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทได้

ค่า k_{cat} เท่ากับ 0.087 และ 0.218 วินาที⁻¹ ตามลำดับ และเอนไซม์ BADH2_UV4 เมื่อใช้ AB-ald และ Bet-ald เป็นสับสเตรทได้ค่า k_{cat} เท่ากับ 0.216 และ 0.160 วินาที⁻¹ ตามลำดับ

ซึ่งนำค่าดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม พบว่า เอนไซม์ BADH2_UV1-3 มีความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald ไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเอนไซม์ต่อเวลา (k_{cat}) ซึ่งมีความสามารถเทียบเท่ากับเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม (ตารางที่ 14) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสับสเตรท Bet-ald พบว่าเอนไซม์ BADH2_UV1-3 มีความสามารถเปลี่ยนสับสเตรทดังกล่าว ไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเอนไซม์ต่อเวลาได้ดีกว่า BADH2 ดั้งเดิม 2-3 เท่า แต่เอนไซม์ BADH2_UV4 มีความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรท AB-ald ไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเอนไซม์ต่อเวลามากกว่า BADH2 ดั้งเดิม 2 เท่า และเอนไซม์ดังกล่าวมีความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรท Bet-ald เทียบเท่ากับเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม

จากผลการหาค่ากิจกรรมจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดโดยเปรียบเทียบค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ BADH2_UV1-4 เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรท มีค่าเท่ากับ 292.48 258.49 192.42 232.68 และ 190.66 โมลาร์⁻¹ วินาที⁻¹ตามลำดับ จากค่าของ k_{cat}/K_m ของเอนไซม์แสดงว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม มีประสิทธิภาพดีกว่า BADH2_UV1-4 และ เมื่อใช้ Bet-ald เป็นสับสเตรท BADH2_UV1 มีประสิทธิภาพดีกว่า BADH2 กลายพันธุ์แบบอื่น และดีกว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม

จากผลค่า k_{cat} และ k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ด้วยวิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ด้วยวิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต น่าจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์

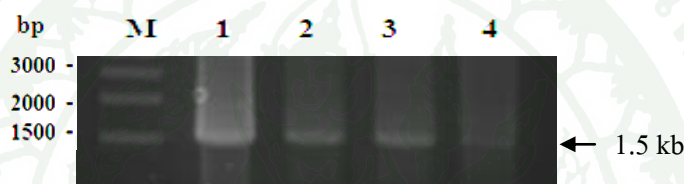
ดังนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบว่ายีน BADH2 เกิดการกลายพันธุ์จริง จากวิธีการกลายพันธุ์โดยส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต จึงทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งไปทำการวิเคราะห์ที่ MacroGen ประเทศเกาหลี จากผลการส่งวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BADH2 ทุกแบบที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สอดคล้องกับผลของกิจกรรมที่มีความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์

ตารางที่ 14 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม และเอนไซม์ที่กลายพันธุ์แบบสุ่ม ด้วยวิธีกลายพันธุ์โดยส่งได้แสงอัลตราไวโอเลต

เอนไซม์	สับสเตรท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์			
		$V_{\max} \pm \text{S.E.}$	$K_m \pm \text{S.E.}$ (ไมโครโมลาร์)	k_{cat} (วินาที ⁻¹)	k_{cat}/K_m (วินาที ⁻¹ โมลาร์ ⁻¹)
BADH2	AB-ald	$6.38\text{E-}7 \pm 0.50\text{E-}7$	437.63 ± 74.75	0.128	292.48
BADH2_UV1	AB-ald	$8.12\text{E-}7 \pm 1.05\text{E-}7$	626.72 ± 156.01	0.162	258.49
BADH2_UV2	AB-ald	$6.37\text{E-}7 \pm 1.38\text{E-}7$	660.01 ± 270.14	0.127	192.42
BADH2_UV3	AB-ald	$4.35\text{E-}7 \pm 0.64\text{E-}7$	373.90 ± 125.90	0.087	232.68
BADH2_UV4	AB-ald	$10.8\text{E-}7 \pm 1.57\text{E-}7$	1132.89 ± 264.84	0.216	190.66
BADH2	Bet-ald	$5.48\text{E-}7 \pm 0.40\text{E-}7$	694.07 ± 95.56	0.110	158.49
BADH2_UV1	Bet-ald	$16.1\text{E-}7 \pm 2.05\text{E-}7$	1364.60 ± 264.46	0.322	235.97
BADH2_UV2	Bet-ald	$13.0\text{E-}7 \pm 1.22\text{E-}7$	1693.78 ± 227.21	0.260	153.50
BADH2_UV3	Bet-ald	$10.9\text{E-}7 \pm 3.91\text{E-}7$	1436.09 ± 771.77	0.218	151.80
BADH2_UV4	Bet-ald	$7.99\text{E-}7 \pm 1.57\text{E-}7$	990.24 ± 324.83	0.160	161.58

7.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error prone PCR

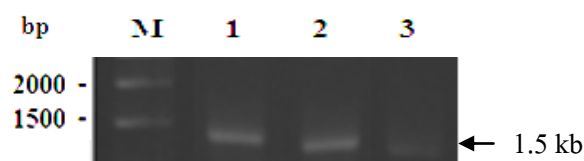
การทำกลายพันธุ์ BADH2 ด้วยวิธี Error prone PCR เนื่องจากต้องการให้ BADH2 เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม โดยทำการศึกษาสภาวะของสารละลายที่เหมาะสมในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้ $MnCl_2$ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า แถบดีเอ็นเอของเอนไซม์ที่คาดว่ากลายพันธุ์ มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหมาย (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 42 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี Error prone PCR โดยช่องที่ 1-4 คือแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากพีซีอาร์ที่ใช้ $MnCl_2$ เป็นโคแฟกซ์เตอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Nucleospin® DNA Extract II (Macherey-Nagel, Germany) นำดีเอ็นเอจากการทำบริสุทธิ์ มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ *Ex Taq* DNA polymerase โดยการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนนี้ เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตจากการทำกลายพันธุ์จากการทำ Error prone PCR ให้เพียงพอที่จะเชื่อมต่อกับ pGEM-T easy vector

จากการทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน BADH2 กลายพันธุ์จากที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Error prone PCR มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบขนาดและปริมาณ แสดงดังภาพที่ 43 พบว่ามีขนาดตามที่คาดไว้ คือ ประมาณ 1.5 กิโลเบส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin® DNA Extract II (Macherey-Nagel, Germany) นำผลผลิตจากการทำบริสุทธิ์ มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®- T easy ด้วยอัตราส่วน 2 ต่อ 1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง



ภาพที่ 43 แอมพลิฟิเคชันที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ *Ex Taq* polymerase โดยช่องที่ 1-3 คือแอมพลิฟิเคชัน โดยทำการศึกษาสภาวะของสารละลายโดยใช้ $MnCl_2$ เป็นโคแฟกเตอร์ที่ความเข้มข้น สุดท้าย 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

หลังจากนำยีน BADH2 ที่คาดว่าเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector นำไปถ่ายโอนเข้า *E.coli* DH5 α ผลปรากฏว่าไม่มีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าสาเหตุที่ทำให้การเชื่อมต่อขึ้นยีนจากพีซีอาร์ กับพลาสมิดไม่ได้ เนื่องจากมีปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอน้อยเกินไป จึงทำการเชื่อมต่อขึ้นยีนจากขั้นตอนการทำพีซีอาร์กับพลาสมิด pGEM[®] - T easy ด้วยอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ใหม่อีกครั้ง ผลปรากฏว่าไม่พบโคโลนีขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อหลังจากการนำชิ้นยีนที่คาดว่าเชื่อมต่อกับพลาสมิด และเนื่องจากเวลาในการทำงานวิจัยหมดลง ทางผู้วิจัยจึงหยุดการทำวิจัยนี้

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถสร้างยีน BADH2 กลายพันธุ์ 4 แบบคือ BADH2_Y420 BADH2_N162A BADH2_E260A และ BADH2_C294A ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis ได้โดยการเพิ่ม และแทนที่กรดอะมิโนได้สำเร็จ

2. สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ โดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ได้โปรตีนที่มีขนาด 58 กิโลดาลตัน

3. สามารถศึกษาสมบัติของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ

3.1 ผลการหาค่าจับกันอย่างจำเพาะของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์พบว่า เอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เอนไซม์กลายพันธุ์ BADH2_Y420 BADH2_N162A และ BADH2_E260A มีค่า K_d ต่อโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ เท่ากับ 8.35 26.77 19.30 และ 7.11 ไมโครโมลาร์ และมีค่า K_d เมื่อใช้โคแฟกซ์เตอร์ NADH มีค่าเท่ากับ 51.84 18.26 31.5 และ 52.39 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แต่เอนไซม์ BADH2_C294A มีค่า K_d ของเอนไซม์กับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH มีค่าเท่ากับ 67.04 และ 8.30 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

3.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์กับสับสเตรท AB-ald และ Bet-ald พบว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม BADH2_Y420 และ BADH2_N162A มีค่า k_{cat}/K_m เมื่อใช้สับสเตรท AB-ald เท่ากับ 292.48 117.89 และ 390.69 โมลาร์⁻¹ วินาที⁻¹ ตามลำดับ และค่า k_{cat}/K_m ต่อสับสเตรท Bet-ald มีค่าเท่ากับ 158.49 381.32 และ 172.82 โมลาร์⁻¹ วินาที⁻¹ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ BADH2_E260A และ BADH2_C294A กับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดได้

4. จากการทำ Homology modeling ของยีน BADH2 กับ ALDH2 พบว่า N162 C294 อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ และตำแหน่ง E260 เป็นบริเวณ substrate binding pocket ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับผลที่ทำการกลายพันธุ์ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นการกลายพันธุ์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรทเปลี่ยนไป

5. สามารถตรวจสอบสาร GABA จากผลผลิตของกิจกรรมเอนไซม์ BADH2 ตั้งเดิม BADH2_Y420 และ BADH2_N162A ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography ได้สาร GABA ที่ปริมาณ 0.12 0.004 และ 0.23 ไมโครกรัม ตามลำดับ

6. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ด้วยวิธีส่องได้แสงอัลตราไวโอเลต และด้วยวิธี Error prone PCR ยังไม่ประสบความสำเร็จ



ข้อเสนอแนะ

1. เอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้งหมดถูกผลิตใน *E. coli* โดยใช้ IPTG ที่เข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity ซึ่งปัญหาที่พบในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ คือ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงหากเก็บไว้นาน และควรใช้เอนไซม์ที่เตรียมใหม่ๆ ในการหา กิจกรรม โดยการทดลองนี้ได้เติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โปรตีเอสลงไปด้วย คือ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
2. จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ พบว่าโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Ni^{2+} -NTA affinity เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE ยังคงเห็นแถบโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งพบว่าเห็นแถบโปรตีนปนเปื้อนติดมาเป็นปกติเมื่อมีจำนวนโปรตีนมาก หากปริมาณโปรตีนน้อยแถบโปรตีนที่ปนเปื้อนดังกล่าวก็จะน้อยตาม โดยทางผู้ทำวิจัยได้พยายามที่จะลดการปนเปื้อนโดยล้างคอลัมน์ ก่อนการทำบริสุทธิ์เพื่อลดการปนเปื้อนจากแถบโปรตีนอื่นให้มากที่สุด
3. เพื่อที่จะทำบริสุทธิ์เอนไซม์ให้ได้ประสิทธิภาพมากที่สุด ผู้ทำการทดลองควรใช้อุปกรณ์ที่สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีเอส และใช้เวลาในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ให้สั้นที่สุด ควรตรวจสอบอุณหภูมิของตู้เย็นที่ใช้ ให้อยู่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวมถึงในขั้นตอนในการไดอะไลซ์ เพื่อเปลี่ยนบัฟเฟอร์และกำจัดอิมมิคาโซล และควรนำโปรตีนที่ติดค้างในถุงไดอะไลซ์ออกให้หมด รวมทั้งควรตรวจสอบถุงไดอะไลซ์ว่าเกิดการรั่วหรือไม่ เพื่อลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน
4. การหา กิจกรรมของเอนไซม์ มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรตต่าง ๆ คือ ขนาดของบริเวณช่องจับสับสเตรตของเอนไซม์ หรือความเกาะเกาะของแขนงข้าง ความเป็นไฮโดรโฟบิกของสภาพแวดล้อมบริเวณจับของเอนไซม์ การมีวนพับของเอนไซม์ และกรดอะมิโนตำแหน่งอื่น ๆ โดยในการสลายสับสเตรต จะเห็นว่ารูปร่างในบริเวณช่องจับสับสเตรตของเอนไซม์มีความสำคัญมาก อาจจะต้องมีการทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น หรือทำหลายๆ ตำแหน่งพร้อมกัน ซึ่งอาจจะช่วยให้รูปร่างในบริเวณจับสับสเตรตของเอนไซม์ มีความเหมาะสมที่จะจับ โดยงานวิจัยนี้ทำการแทนที่กรดอะมิโนแอสปารากีน กลูตามิก ซิสทีอีน ไปเป็นกรดอะมิโนอะลานีนซึ่งมีแขนงข้างสั้นกว่า อาจทำให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรตของเอนไซม์กว้างขึ้น ซึ่งอาจทำให้มีความเหมาะสมที่สลายสับสเตรตได้แย่ลง

5. จากผลการทำการกลายพันธุ์แบบสุ่มโดยวิธีการส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลของกิจกรรมไม่สอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยผลของกิจกรรมที่ต่างจากเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม น่าจะเกิดจากความใกล้เคียงกันของค่ากิจกรรมที่ไม่ได้แตกต่างจากเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมมากนัก (ค่า k_{cat} และ k_{cat}/K_m) ที่มีค่าใกล้เคียงกันโดยมีความแตกต่างของค่ากิจกรรม 1-2 เท่า ซึ่งหากมีการเกิดการเปลี่ยนไปของลำดับนิวคลีโอไทด์จริงควรแตกต่างกันถึง 10 เท่า ดังแสดงในการกลายพันธุ์โดยวิธี Site Directed Mutagenesis ที่เกิดความแตกต่างของค่ากิจกรรมเป็นอย่างมาก ดังนั้นหากต้องการทำการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ในอนาคตควรเพิ่มเวลาในการส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตให้มากขึ้น เพื่อจะได้เกิดการกลายพันธุ์ได้จริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Adams, A. and N. De Kimpe. 2007. Formation of pyrazines and 2-acetyl-1-pyrroline by *Bacillus cereus*. **Food Chem.** 101: 1230- 1238.
- Amarawathi, Y.R., A.K. Singh, V.P. Singh, T. Singh, Mohapatra and T.R. Sharma. 2008. Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa L.*). **Mol Breeding.** 21(1):49–65.
- Baishya, S., A. Sachdev, R.P. Johari and S.L. Mehta. 2009. RAPD analysis of aromatic and non-aromatic (*Oryza sativa L.*). **J Plant Biochem Biot.** 9: 23-26.
- Beckman, R.A., A.S. Mildvan and L.A. Loeb. 1985. On the fidelity of DNA replication: Manganese mutagenesis in vitro. **Biochemistry.** 24: 5810-5817.
- Berner, D. K. and B.J. Hoff . 1986. Inheritance of scent in American long grain rice. **Crop Sci N.** 26: 876-878.
- Bouche, N. and H. Fromm. 2004. GABA in plants: just a metabolite?. **Trends Plant Sci.** 9: 110-115.
- Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrance in rice. **Plant Biotechnol J.** 3: 363-370.
- _____, S.A. Gillies, D.J. Brushett, D.L.E. Waters and R.J. Henry. 2008. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. **Plant Mol Biol.** 68: 439–49.
- Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1982. Cooked rice aroma and 2-Acetyl-1-Pyrroline. **J Agr Food Chem.** 31: 823–826.

- _____, B.O. Juliano and L. C.Ling. 1983. Identification of rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline in pandan leaves. **Chem Indust.** 20: 478.
- Cadwell, C. and G.F. Joyce. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **PCR Methods Appl.** 2: 28-33.
- Carrapiso, A.I., A. Jurado, M.L. Timon and C. Garcia. 2002. Odoractive compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. **J Agr Food Chem.** 50: 6453–6458.
- Chen, Y. Yang, W. Shi, Q. Ji, F. He, Z. Zhang, Z. Cheng, X. Liu and M. Xua. 2008 . Encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. **Plant Cell.**12: 349-356.
- Costanzo, L.D., G.A. Gomez and D.W. Christianson. 2007. Crystal Structure of Lactaldehyde Dehydrogenase from *Escherichia coli* and Inferences Regarding Substrate and Cofactor Specificity. **J Mol Biol.** 366: 481–493.
- Costello, P.J., TH. Lee and PA. Henschke. 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. **Aust J Grape Wine R.** 7: 160-167.
- Crouvoisier, M., G. Auger and D. Blanot. 2007. Role of the amino acid invariants in the active site of MurG as evaluated by site-directed mutagenesis. **Biochimie.** 89: 1498-1508.
- Deng, MD., AD. Grund, SL. Wassink, SS. Peng, KL. Nielsen, BD. Huckins, BL. Walsh and RP. Burlingame. 2006. Directed evolution and characterization of *Escherichia coli* glucosamine synthase. **Biochimie.** 88:419–429.
- Eckert, K.A. and T.A. Kunkel. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Res.** 18: 3739-3744.

- Falkenberg, P. and A.R. Strom. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. **Bioch Biophys Acta**. 1034: 253-259.
- Fang, Y., Y. Lu, F. Lv, X. Bie, H. Zhao, YuWang and Z. Lu. 2009. Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. **Enzyme Microb Tech**. 44: 84–88.
- Garland, S., L. Lewin, A. Blakeney, R. Reinke and R. Henry. 2000. PCRbased molecular markers for the fragrance gene in rice (*Oryza sativa*). **Theor. Appl Genet**. 101: 364–371.
- Gonzalez-Sagura, L., E. Rudino-Pinera, R.A. Munoz-Clares and E. Horjales. 2008. The Crystal Structure of A Ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2'-Phosphate of NADP⁺ and A Novel Cation Binding Site. **J Mol Biol**. 385: 542-557.
- Gruez, A., V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A. Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni and C. Cambillau. 2004. Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. **J Mol Biol**. 343: 29-41.
- Incharoensakdi, A., N. Matsuda, T. Hibino, YL. Meng, H. Ishikawa and A. Hara. 2000. Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. Structural and functional properties of wild-type, mutants and *E. coli* enzymes. **Eur J Biochem**. 267:7015–7023.
- Ishitani, M., K. Arakawa, K. Mizuno, S. Kishitani and T. Takabe. 1993. Betaine aldehyde dehydrogenase in the Gramineae. Levels in leaves of both betaine accumulating and non-accumulating cereal plants. **Plant Cell Physiol**. 34: 493–495.
- Jin, Q. S., D. Waters, G.M. Cordeiro, R.J. Henry and R.F. Reinke. 2003. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Sci**. 165: 359–364.

- Johansson. K., M. EL-Ahmad, S. Ramaswamy, L. Hjelmqvist, H. Jornvall and H. Eklund. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å⁰ resolution. **Protein Sci.** 7: 2106-2117.
- Keohavong, P. and W.G. Thilly. 1989. Fidelity of DNA polymerase in DNA amplification. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 86: 9253-57.
- Kim, YW., JH. Choi, JW. Kim, C. Park, JW. Kim, H. Cha, SB. Lee, BH. Oh, TW. Moon and KH. Park. 2003. Directed evolution of *Thermus maltogenic* amylase toward enhanced thermal resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 4866-4874.
- Kovach, J., N. Calingacion, A. Fitzgerald and R. Mcouch. 2009. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa*). **Pro Natl Acad Sci USA.** 106: 14444-14449.
- Kumazawa, K. and H. Masuda. 2002. Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique. **J Agric Food Chem.** 50: 5660-5663.
- Leung, D.W., E. Chen and D.V. Goeddel. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. **Technique.** 1: 11-15.
- Ling, L.L., P. Keohavong, C. Dias and W.G. Thilly. 1991. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: Modified T7, *Taq*, and *Vent* polymerase. **PCR Methods Appl.** 1: 63-69.
- Livingstone, JR., I. Yoshida, Y. Tarui, K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tsutui and E. Hirasawa. 2002. Purification and properties of aminoaldehyde dehydrogen from *Avena sativa*. **J Plant Res.** 115: 393-400.
- Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. **Theor Appl Genet.** 93: 1145-1151.

- Mann, C. J., and H. Weiner. 1999. Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. **Protein Sci.** 8: 1922-1929.
- Manyam, B. V., L. Katz, T.A. Hare, K. Kaniefski and R.D. Tremblay. 1981. Isoniazid induced elevation of cerebrospinal fluid (CSF) GABA levels and effects on chorea in Huntington's disease. **Ann Neurol.** 10: 35-37.
- Miyajima, Y., J. Fukushima, S. Kawamoto, Z. Okuda, Y. Shibano, Y. Hata and K. Morihara. 1997. Site-Directed Mutagenesis of His-176 and Glu-177 in *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease: Effect on Catalytic Activity. **J Ferment Bioeng.** 84: 588-590.
- Miyazaki, K. and F.H. Arnold. 1999. Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. **J. Mol. Evol.** 49: 716-720.
- Mohanty, A., H. Kathuria, A. Ferjani, A. Sakamoto, P. Mohanty and N. Murata. 2002. Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the codA gene are highly tolerant to salt stress. **Theor Appl Genet.** 106: 51-57.
- Moschou, P.N., K.A. Paschalidis and K.A. Roubelakis-Angelakis. 2008. Plant polyamine catabolism: the state-of the art. **Plant Signal Behav.** 3: 1061-1066.
- Nakamura, T., S. Yokota, Y. Muramoto, K. Tsutsui, Y. Oguri and K. Fukui. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. **Plant J.** 11: 1115-1120.
- _____, T., M. Nomura, H. Mori, A.T. Jagendorf, A. Ueda and T. Takabe. 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. **Plant Cell Physiol.** 42: 1088-1092.
- Niu, X.L., W.J. Zheng, B.R. Lu, G.J. Ren, W.Z. Huang and S.H. Wang. 2007. An unusual post-transcriptional processing in two Betaine aldehyde dehydrogenase loci of cereal crops directed by short, direct repeats in response to stress conditions. **Plant Physiol.** 143: 1929-1942.

- Oishi, H. and M. Ebina. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. **J Plant Physiol.** 162: 1077–1086.
- Petrov, M., M. Danzart, P. Giampaoli, J. Faureand and H. Richard. 1996. Rice aroma analysis: discrimination between a scented and a non-scented rice. **Sci Aliments.** 16: 347–360.
- Rasario, A., Munoz-Clares, G. Angel, Diaz-Sanchez, Gonzalez-Segura and C. Montiel. 2009. Kinetic and structure features of betaine aldehyde dehydrogenase: Mechanistic and regulatory implications. **Arch Biochem Biophys.** 493: 71-81.
- Reinke, R.F., L.A. Welsch, J.E. Reece, L.G. Lewin and A.B. Blakeney. 1991. Procedure for quality selection of aromatic rice varieties. **Int Rice Res News.**16: 10–1.
- Reumann, S. 2004. Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. **Plant Physiol.** 135: 783–800.
- Romanczyk, L.J., C.A. McClelland, L.S. Post and W.M. Aitken. 1995. Formation of 2-Acetyl-1-Pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from cocoa fermentation boxes. **J Agr Food Chem.** 43: 469–475.
- Rungsardthong, V. and A. Noomhoom . 2005. Production of 2-acetyl-1-pyrroline by microbial cultures. **Flavour Frag J.** 20: 710–714.
- Russell, BL., B. Rathinasabapathi and AD. Hanson. 1998. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. **Plant Physiol.** 116: 859–865.
- Sakthivel, K., R.M. Sundaram, N. Shobha Rani, S.M. Balachandran and C.N. Neeraja. 2009. Genetic and molecular basis of fragrance in rice. **Biotechnol Adv.** 27: 468–473.

- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, edn 3rd. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sanche, A. J., H. Riveros-Rosas, L.P. Martínez-Castilla, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, B. Plapp, R. Lindahl and E. Maser. 2007. Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism. **Adv Exp Med Biol.** 13: 64–76.
- Schieberle, P. 1995. Quantitation of important roast-smelling odorants in popcorn by stable-isotope dilution assays and model studies on flavor formation during popping. **J Agr Food Chem.** 43:2442–2448.
- Sebela, M., L. Luhova, F. Brauner, P. Galuszka, A. Radova and P. Pec. 2000. Light microscopic localization of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. **Plant Physiol Bioch.** 39: 831–839.
- Shi, W., Y. Yang, S. Chen and M. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. **Mol Breeding.** (Published Online).
- Shirasawa, K., T. Takabe and S. Kishitani. 2006. Accumulation of glycine betaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. **Ann Bot.** 98: 565–571.
- Shobha, N. Rani, M.K. Pandey, G.S.V. Prasad and I. Sudharshan. 2006. Historical significance, grain quality features and precision breeding for improvement of export quality basmati varieties in India. **Indian J Crop Sci.** 1: 29–41.
- Snowdon, E.M., M.C. Bowyer, P.R. Grbin and P.K. Bowyer. 2006. Mousy offflavor: a review. **J Agr Food Chem.** 54: 6465–6474.

- Srivong, P., P. Waisalong, P. Wangsomnuk and P. Pongdontri. 2007. Comparison of aroma level of Khao Dok Mali 105 and its mutants by expression level of partial BADH2 gene. Poster Presentation in 1st BMB conference: Biochemistry and molecular biology for the integration of life, April 26-27, 2007, Bangkok, Thailand: 48.
- Trossat, C., B. Rathinasabapathi and AD. Hanson. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethyl sulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. **Plant Physiol.** 113: 1457-1461.
- Tsybovsky, Y., H. Donato, N.I. Krupenko, C. Davies and S.A. Krupenko. 2007. Crystal Structures of the Carboxyl Terminal Domain of Rat10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase: Implications for the Catalytic Mechanism of Aldehyde Dehydrogenases. **Biochemistry.** 46: 2917-2929.
- Tylichova, M., D. Kopečný, S. Morera, P. Briozzo, R. Lenobel, J. Snegaroff and M. Sebel. 2010. Structural and function characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. **J Mol Biol.** 396: 870-882.
- Valenzuela Soto E.M. , R.V. García, C.M. Jiménez, L.G. Gonzalez, A. Rosario, M. Clares. 2003. Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. **Chem-Biol Interact.** 143: 139-148.
- Vanavichit, A., T. Yoshihashi, S. Wanchana, S. Areekit, D. Saengsraku, W. Kamolsukyonyong, J. Lanceras, T. Toojinda and S. Tragoonrung. 2006. Positional cloning of BADH2, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2- acetyl-1-pyrroline and gamma aminobutyric acid (GABA) in rice (abstract). In: 5th Int Rice Genet Symp. Manila, Philippines.
- Weretilnyk E.A. and A.D. Hanson. 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: Purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. **Arch Biochem Biophys.** 271: 56-63.

- Widjaja, R., J.D. Craske and M. Wootton. 1996. Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. **J Sci Food Agr.** 70: 151–161.
- Yajima, I., T. Yanai, M. Nakamura, H. Sakakibara and K. Hayashi. 1978. Volatile Flavor Components of Cooked Kaorimai (Scented Rice, *O. sativa japonica*). **Agr Biolo Chem.** 43: 2425-2429.
- Yoshihashi, T., T.T.H. Nguyen and H. Inatomi. 2002. Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. **J Agr Food Chem.** 67: 619-622.
- Zehentbauer, G. and W. Grosch. 1998. Crust aroma of baguettes – I. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. **J Cereal Sci.** 28: 81–92.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ลำดับเบส กรดอะมิโนของยีน BADH2 ดั้งเดิม และกลายพันธุ์

1. ลำดับเบส และกรดอะมิโนของยีน BADH2 ดั้งเดิม

ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGCGAGTGGCGCGCCCCCGCGCTCGGCCGCCGCTCCCGTCGTCACCCCCGC
CACCGAGTCCCCATCGGCAGATCCCGCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGCGCGTGGCGCGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGGAACC
GGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTG
GCTAGACTAGAGACGCTTGATTGTGGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTACTTTGCAGA
TCTTGCAGAAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATGGAAAACTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTG
TAGTTGGGTTGATCACACCTTGAACCTATCCTCTCTCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGTACAGCTGTACTA
AAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTGTTGGAGCTTGCTGATGTGTAAAGAGGTTGGTCTTCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGAC
TGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTCTATCACACCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAACTGGTAAAAAGA
TTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGGAAAAGTCTTATAGTGGTGTGATGATGTTGATGTTGAA
AAAGCTGTTGAGTGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTTATTCTCATAAAAAATCGC
TAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAATATTAAGGTGTGAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTGTGTA
GTGAAGGACAGTATGAGAAGATTGAACAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTGACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCAT
CTGGAGAAAGGTTTCTATATGAACCCACAATCATTACTGATGTGATACATCAATGCAAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTGGTCCAGTGCT
CTGTGTGAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATATGGTCTGGCTGGTGTGCTGCTTTCCGGTGACC
GCGAGCGATGCCAGAGATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTGTGCTGCAACCTGCTTCTGCAACCTGCTTCTGCAAGCTCCATGGGGC
GGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAACCTACCTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGA
TGACCGTGGGATGGTACAAATCCCTTCCAAGCTGTAA

MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREALKRNRGRDWARAPGAVRAKYLRAIAAKI IERKSEL
ARLETLDCKPLDEAAWMDMDVAGCFEYFADLAESLDKRNAPVSLPMENFKCYLRKEPIGVVGLITPWNYPLLMATWKVAPALAAGCTAVL
KPSELASVTCLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVAFTGSYETGKKIMASAPMVKPVSLLEGGKSPIVVFDDVDVE
KAVEWTLFGCFWNTNGQICSATSRLLHKKIAKEFQERMVAVAKNIKVSDPLEEGCRLGPPVSEGGYKIKQFVSTAKSQGATILTGVRPKH
LEKGFYIEPTIITDVTSMQIWREEVFGPVLCKEFTSTEEAIELANDTHYGLAGAVLSGDRERCQRLTEEIDAGI IWNCSQPCFCQAPWG
GNKRSGFRELGEIGIDNYLSVKQVTEYASDEPWGWYKSPSKL

2. ลำดับเบส และกรดอะมิโนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง Y420

ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGCGAGTGGCGCGCCCCCGCGCTCGGCCGCCGCTCCCGTCGTCACCCCCGC
CACCGAGTCCCCATCGGCAGATCCCGCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGCGCGTGGCGCGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGGAACC
GGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTG
GCTAGACTAGAGACGCTTGATTGTGGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTACTTTGCAGA
TCTTGCAGAAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTTCCAATGGAAAACTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTG
TAGTTGGGTTGATCACACCTTGAACCTATCCTCTCTCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGTACAGCTGTACTA
AAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTGTTGGAGCTTGCTGATGTGTAAAGAGGTTGGTCTTCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGAC
TGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTCTATCACACCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAACTGGTAAAAAGA
TTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGGAAAAGTCTTATAGTGGTGTGATGATGTTGATGTTGAA
AAAGCTGTTGAGTGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTTATTCTCATAAAAAATCGC
TAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAATATTAAGGTGTGAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTGTGTA
GTGAAGGACAGTATGAGAAGATTGAACAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTGACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCAT
CTGGAGAAAGGTTTCTATATGAACCCACAATCATTACTGATGTGATACATCAATGCAAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTGGTCCAGTGCT
CTGTGTGAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATATATAGTGTGCTGGCTGGTGTGCTTTCCGGTG
ACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAGTGAAGAGATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTGTGCTGCAACCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG
GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAACCTACCTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTC
CGATGAGCCGTGGGATGGTACAAATCCCTTCCAAGCTGTAA

MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREALKRNRGRDWARAPGAVRAKYLRAIAAKI IERKSEL
ARLETLDCKPLDEAAWMDMDVAGCFEYFADLAESLDKRNAPVSLPMENFKCYLRKEPIGVVGLITPWNYPLLMATWKVAPALAAGCTAVL
KPSELASVTCLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVAFTGSYETGKKIMASAPMVKPVSLLEGGKSPIVVFDDVDVE
KAVEWTLFGCFWNTNGQICSATSRLLHKKIAKEFQERMVAVAKNIKVSDPLEEGCRLGPPVSEGGYKIKQFVSTAKSQGATILTGVRPKH
LEKGFYIEPTIITDVTSMQIWREEVFGPVLCKEFTSTEEAIELANDTHYGLAGAVLSGDRERCQRLTEEIDAGI IWNCSQPCFCQAPW
GKNKRSGFRELGEIGIDNYLSVKQVTEYASDEPWGWYKSPSKL

หมายเหตุ: บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์

3. ลำดับเบส และกรดอะมิโนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง N162A

ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCGCTCGGCCGCCGCTCCCGTCGTCACCCCGC
CACCGAGTCCCCATCGGCAGATCCCGCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGCGCGTGGCGCGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGGAACC
GGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGGCCCGCTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTG
GCTAGACTAGAGACGCTTGATTGTGGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTACTTTGCAGA
TCTTGACAGATCCTTGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTCCAATGGAAAACCTTAAATGCTATCTTCGGAAGAGCCTATCGGTG
TAGTTGGGTTGATCACACCTTGGGCCATCCTCTCTCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGTACAGCTGTA
AAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTGTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAAGAGGTTGGTCTTCTCCTCAGGTGTGCTAAACATAGTGAC
TGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCTTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAACTGGTAAAAAGA
TTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGGAAAAAGTCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAA
AAAGCTGTTGAGTGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTTATTCTCATAAAAAATCGC
TAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAATATTAAGGTGTGAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTGTGTTA
GTGAAGGACAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTGACTGGTGGGGTTAGACCAAGCAT
CTGGAGAAAGGTTTCTATATGAACCCACAATCATTACTGATGTGATACATCAATGCAAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTGGTCCAGTGCT
CTGTGTGAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATATGGTCTGGCTGGTGTGCTGCTTTCCGGTGACC
GCGAGCGATGCCAGAGATTAACTGAGGAGATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGGGGC
GGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGCATTGACAACCTACCTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGA
TGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCCCTTCCAAGCTGTAA

MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREALKRNRGRDWARAPGAVRAKYLRAIAAKI IERKSEL
ARLETLDCKPLDEAAWMDVAGCFEYFADLAESLDKRNAPVSLPMENFKCYLRKEPIGVVGLITPWAYPLLMATWKVAPALAAGCTAVL
KPSELASVTCLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVFTGSYETGKKIMASAPMVKPVSLLEGGKSPVVFDDVDVE
KAVEWTLFGCFWNTNGQICSATSRLLHKKIAKEFQERMVAWAKNIKVSDPLEEGCRLGPVVSSEGQYKIKQFVSTAKSQGATILTGVRPKH
LEKGFYIEPTIITDVTSMQIWREEVFGPVLCKVEFSTEEAEIELANDTHYGLAGAVLSGDRERCQRLTEEDAGI IWNCSQPCFCQAPWG
GNKRSGFGRELGEIGIDNYLSVKQVTEYASDEPWGWYKSPSKL

หมายเหตุ: บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์

4. ลำดับเบส และกรดอะมิโนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง E260A

ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCGCTCGGCCGCCGCTCCCGTCGTCACCCCGC
CACCGAGTCCCCATCGGCAGATCCCGCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGCGCGTGGCGCGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGGAACC
GGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGGCCCGCTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTG
GCTAGACTAGAGACGCTTGATTGTGGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTACTTTGCAGA
TCTTGACAGATCCTTGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTCCAATGGAAAACCTTAAATGCTATCTTCGGAAGAGCCTATCGGTG
TAGTTGGGTTGATCACACCTTGGAACTATCCTCTCTCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGTACAGCTGTA
AAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTGTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAAGAGGTTGGTCTTCTCCTCAGGTGTGCTAAACATAGTGAC
TGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCTTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAACTGGTAAAAAGA
TTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGCACTTGGTGGAAAAAGTCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAA
AAAGCTGTTGAGTGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTTATTCTCATAAAAAATCGC
TAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAATATTAAGGTGTGAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTGTGTTA
GTGAAGGACAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTGACTGGTGGGGTTAGACCAAGCAT
CTGGAGAAAGGTTTCTATATGAACCCACAATCATTACTGATGTGATACATCAATGCAAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTGGTCCAGTGCT
CTGTGTGAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATATGGTCTGGCTGGTGTGCTGCTTTCCGGTGACC
GCGAGCGATGCCAGAGATTAACTGAGGAGATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGGGGC
GGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGCATTGACAACCTACCTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGA
TGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCCCTTCCAAGCTGTAA

MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAAVAAAREALKRNRGRDWARAPGAVRAKYLRAIAAKI IERKSEL
ARLETLDCKPLDEAAWMDVAGCFEYFADLAESLDKRNAPVSLPMENFKCYLRKEPIGVVGLITPWNYPLLMATWKVAPALAAGCTAVL
KPSELASVTCLELADVCKEVLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHPGVDKVFTGSYETGKKIMASAPMVKPVSLLEGGKSPVVFDDVDVE
KAVEWTLFGCFWNTNGQICSATSRLLHKKIAKEFQERMVAWAKNIKVSDPLEEGCRLGPVVSSEGQYKIKQFVSTAKSQGATILTGVRPKH
LEKGFYIEPTIITDVTSMQIWREEVFGPVLCKVEFSTEEAEIELANDTHYGLAGAVLSGDRERCQRLTEEDAGI IWNCSQPCFCQAPWG
GNKRSGFGRELGEIGIDNYLSVKQVTEYASDEPWGWYKSPSKL

หมายเหตุ: บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์

5. ลำดับเบส และกรดอะมิโนของยีน BADH2 กลายพันธุ์ในตำแหน่ง C294A

ATGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCGCTCGGCCGCCGCTCCCGTCGTCACCCCGC
CACCGAGTCCCCATCGGCGAGATCCCGCGGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGCGCGTGGCGCGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGGAACC
GGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGCGCGCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTG
GCTAGACTAGAGACGCTTGATTGTGGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTACTTTGCAGA
TCTTGCGAATCCTTGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTTCCAATGGAAAACCTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTG
TAGTTGGGTTGATCACACCTTGGAATATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGTACAGCTGTACTA
AAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTGGAGCTTGTGTGTGTAAAGAGGTTGGTCTTCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGAC
TGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCTTTGTCTATCACACCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAACTGGTAAAAAGA
TTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGGAAAAAGTCTATAGTGGTGTGATGATGTTGATGTTGAA
AAAGCTGTTGAGTGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGCCAGTGCAACATCGCGCTTATTCTTCATAAAAAAATCGC
TAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAATTAAGGTGTGAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTGTGTA
GTGAAGGACAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTGACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCAT
CTGGAGAAAGGTTTCTATATGAACCCACAATCATTACTGATGTCGATACATCAATGCAAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCT
CTGTGTGAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTATGGTCTGGCTGGTGTGCTTTCCGGTGACC
GCGAGCGATGCCAGAGATTAAGTGAAGAGATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGGGGC
GGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGCATTGACAACCTACCTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGA
TGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCCCTTCCAAGCTGTAA

MATAIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVVNPATESPIGEIPAGTAEDVDAVAAAREALKRNRGRDWARAPGAVRAKYLRAIAAKI IERKSEL
ARLETLDCKPLDEAAWMDMDVAGCFEYFADLAESLDKRONAPVSLPMENFKCYLRKEPIGVVGLITPWNYPLLMATWKVAPALAAGCTAVL
KPSELASVTCLELADVCKEYVGLPSGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHGVDKVAFTGSYETGKKIMASAAPMVKPVSLGLGKSPIVVFDVDVE
KAVEWTLFGCFWNTNGQIASATSRLLHKKIAKEFQERMVAWAKNIKVSDPLEEGCRLGPPVSEGGYKIKQFVSTAKSQGATILTTGGVPRPKH
LEKGFYIEPTIITDVTSMQIWREEVFGPVLCKEFTSTEEAIELANDTHYGLAGAVLSGDRERCQRLTEEIDAGI IWNCSQPCFCQAPWG
GNKRSGFRELGEIDNYLSVKQVTEYASDEPWGWYKSPSKL

หมายเหตุ: บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BADH2 ตั้งแต่ และกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ

BADH2	ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCG	60
BADH2_Y420	ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCG	60
BADH2_E260A	ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCG	60
BADH2_C294A	ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCG	60
BADH2_N162A	ATGGCCACGGCGATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCGCCGGCGAGTGGCGCGCCCCCGCG	60

BADH2	CTCGGCCGCCGCTCCCCGTCGTCAACCCCGCCACCGAGTCCCCCATCGGCGAGATCCCG	120
BADH2_Y420	CTCGGCCGCCGCTCCCCGTCGTCAACCCCGCCACCGAGTCCCCCATCGGCGAGATCCCG	120
BADH2_E260A	CTCGGCCGCCGCTCCCCGTCGTCAACCCCGCCACCGAGTCCCCCATCGGCGAGATCCCG	120
BADH2_C294A	CTCGGCCGCCGCTCCCCGTCGTCAACCCCGCCACCGAGTCCCCCATCGGCGAGATCCCG	120
BADH2_N162A	CTCGGCCGCCGCTCCCCGTCGTCAACCCCGCCACCGAGTCCCCCATCGGCGAGATCCCG	120

BADH2	GCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGGCGGTGGCGGCGGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGG	180
BADH2_Y420	GCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGGCGGTGGCGGCGGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGG	180
BADH2_E260A	GCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGGCGGTGGCGGCGGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGG	180
BADH2_C294A	GCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGGCGGTGGCGGCGGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGG	180
BADH2_N162A	GCGGGCACGGCGGAGGACGTGGACGCGGCGGTGGCGGCGGCGCGGGAGGCGCTGAAGAGG	180

BADH2	AACCGGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCA	240
BADH2_Y420	AACCGGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCA	240
BADH2_E260A	AACCGGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCA	240
BADH2_C294A	AACCGGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCA	240
BADH2_N162A	AACCGGGGCCGCGACTGGGCGCGCGCGCGGGCGCCGTCCGGGCCAAGTACCTCCGCGCA	240

BADH2	ATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAGACTAGAGACGCTTGATTGT	300
BADH2_Y420	ATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAGACTAGAGACGCTTGATTGT	300
BADH2_E260A	ATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAGACTAGAGACGCTTGATTGT	300
BADH2_C294A	ATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAGACTAGAGACGCTTGATTGT	300
BADH2_N162A	ATCGCGGCCAAGATAATCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAGACTAGAGACGCTTGATTGT	300

BADH2	GGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTAC	360
BADH2_Y420	GGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTAC	360
BADH2_E260A	GGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTAC	360
BADH2_C294A	GGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTAC	360
BADH2_N162A	GGGAAGCCTCTTGATGAAGCAGCATGGGACATGGACGATGTTGCTGGATGCTTTGAGTAC	360

BADH2	TTTGCAGATCTTGCAGAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATG	420
BADH2_Y420	TTTGCAGATCTTGCAGAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATG	420
BADH2_E260A	TTTGCAGATCTTGCAGAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATG	420
BADH2_C294A	TTTGCAGATCTTGCAGAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATG	420
BADH2_N162A	TTTGCAGATCTTGCAGAATCCTTGGACAAAAGGCAAAATGCACCTGTCTCTCTTCCAATG	420

BADH2	GAAAACCTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTGTAGTTGGGTTGATCACACCT	480
BADH2_Y420	GAAAACCTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTGTAGTTGGGTTGATCACACCT	480
BADH2_E260A	GAAAACCTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTGTAGTTGGGTTGATCACACCT	480
BADH2_C294A	GAAAACCTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTGTAGTTGGGTTGATCACACCT	480
BADH2_N162A	GAAAACCTTTAAATGCTATCTTCGAAAGAGCCTATCGGTGTAGTTGGGTTGATCACACCT	480

BADH2	TGGAACCTATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGT	540
BADH2_Y420	TGGAACCTATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGT	540
BADH2_E260A	TGGAACCTATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGT	540
BADH2_C294A	TGGAACCTATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGT	540
BADH2_N162A	TGGGCCTATCCTCTCCTGATGGCAACATGGAAGGTAGCTCCTGCCCTGGCTGCTGGCTGT	540
*** *****		

BADH2 ACAGCTGTACTAAAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTG 600
 BADH2_Y420 ACAGCTGTACTAAAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTG 600
 BADH2_E260A ACAGCTGTACTAAAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTG 600
 BADH2_C294A ACAGCTGTACTAAAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTG 600
 BADH2_N162A ACAGCTGTACTAAAACCATCTGAATTGGCTTCCGTGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTG 600

BADH2 TGTAAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAA 660
 BADH2_Y420 TGTAAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAA 660
 BADH2_E260A TGTAAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAA 660
 BADH2_C294A TGTAAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAA 660
 BADH2_N162A TGTAAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTGTGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAA 660

BADH2 GCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTAT 720
 BADH2_Y420 GCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTAT 720
 BADH2_E260A GCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTAT 720
 BADH2_C294A GCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTAT 720
 BADH2_N162A GCCGGTGCTCCTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTTGCATTTACTGGGAGTTAT 720

BADH2 GAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAA 780
 BADH2_Y420 GAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAA 780
 BADH2_E260A GAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGCA 780
 BADH2_C294A GAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAA 780
 BADH2_N162A GAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGCCTGTTTCACTGGAA 780
 ***** *

BADH2 CTTGGTGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGCTGTTGAG 840
 BADH2_Y420 CTTGGTGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGCTGTTGAG 840
 BADH2_E260A CTTGGTGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGCTGTTGAG 840
 BADH2_C294A CTTGGTGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGCTGTTGAG 840
 BADH2_N162A CTTGGTGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGTTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGCTGTTGAG 840

BADH2 TGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTT 900
 BADH2_Y420 TGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTT 900
 BADH2_E260A TGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTT 900
 BADH2_C294A TGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTT 900
 BADH2_N162A TGGACTCTCTTTGGTTGCTTTTGGACCAATGGCCAGATTGTCAGTGCAACATCGCGTCTT 900

BADH2 ATTCTTCATAAAAAAATCGCTAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAAT 960
 BADH2_Y420 ATTCTTCATAAAAAAATCGCTAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAAT 960
 BADH2_E260A ATTCTTCATAAAAAAATCGCTAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAAT 960
 BADH2_C294A ATTCTTCATAAAAAAATCGCTAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAAT 960
 BADH2_N162A ATTCTTCATAAAAAAATCGCTAAAGAATTTCAAGAAAGGATGGTTGCATGGGCCAAAAAT 960

BADH2 ATTAAGGTGTCAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTTGTTAGTGAAGGA 1020
 BADH2_Y420 ATTAAGGTGTCAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTTGTTAGTGAAGGA 1020
 BADH2_E260A ATTAAGGTGTCAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTTGTTAGTGAAGGA 1020
 BADH2_C294A ATTAAGGTGTCAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTTGTTAGTGAAGGA 1020
 BADH2_N162A ATTAAGGTGTCAGATCCACTTGAAGAGGGTTGCAGGCTTGGGCCCGTTGTTAGTGAAGGA 1020

BADH2 CAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTG 1080
 BADH2_Y420 CAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTG 1080
 BADH2_E260A CAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTG 1080
 BADH2_C294A CAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTG 1080
 BADH2_N162A CAGTATGAGAAGATTAAGCAATTTGTATCTACCGCCAAAAGCCAAGGTGCTACCATTCTG 1080

BADH2	ACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCATCTGGAGAAAGGTTTCTATATTGAACCCACAATCATT	1140
BADH2_Y420	ACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCATCTGGAGAAAGGTTTCTATATTGAACCCACAATCATT	1140
BADH2_E260A	ACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCATCTGGAGAAAGGTTTCTATATTGAACCCACAATCATT	1140
BADH2_C294A	ACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCATCTGGAGAAAGGTTTCTATATTGAACCCACAATCATT	1140
BADH2_N162A	ACTGGTGGGGTTAGACCCAAGCATCTGGAGAAAGGTTTCTATATTGAACCCACAATCATT	1140

BADH2	ACTGATGTCGATACATCAATGCAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCTCTGT	1200
BADH2_Y420	ACTGATGTCGATACATCAATGCAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCTCTGT	1200
BADH2_E260A	ACTGATGTCGATACATCAATGCAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCTCTGT	1200
BADH2_C294A	ACTGATGTCGATACATCAATGCAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCTCTGT	1200
BADH2_N162A	ACTGATGTCGATACATCAATGCAAATTTGGAGGGAAGAAGTTTTTGGTCCAGTGCTCTGT	1200

BADH2	GTGAAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTAT---	1257
BADH2_Y420	GTGAAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTATAT	1260
BADH2_E260A	GTGAAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTAT---	1257
BADH2_C294A	GTGAAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTAT---	1257
BADH2_N162A	GTGAAAGAATTTAGCACTGAAGAAGAAGCCATTGAATTGGCCAACGATACTCATTAT---	1257

BADH2	GGTCTGGCTGGTGCTGTGCTTTCCGGTGACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAC TGAGGAG	1317
BADH2_Y420	GGTCTGGCTGGTGCTGTGCTTTCCGGTGACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAC TGAGGAG	1320
BADH2_E260A	GGTCTGGCTGGTGCTGTGCTTTCCGGTGACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAC TGAGGAG	1317
BADH2_C294A	GGTCTGGCTGGTGCTGTGCTTTCCGGTGACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAC TGAGGAG	1317
BADH2_N162A	GGTCTGGCTGGTGCTGTGCTTTCCGGTGACCGCGAGCGATGCCAGAGATTAAC TGAGGAG	1317

BADH2	ATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG	1377
BADH2_Y420	ATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG	1380
BADH2_E260A	ATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG	1377
BADH2_C294A	ATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG	1377
BADH2_N162A	ATCGATGCCGGAATTATCTGGGTGAAGTCTCGCAACCCTGCTTCTGCCAAGCTCCATGG	1377

BADH2	GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAAC TAC	1437
BADH2_Y420	GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAAC TAC	1440
BADH2_E260A	GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAAC TAC	1437
BADH2_C294A	GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAAC TAC	1437
BADH2_N162A	GGCGGGAACAAGCGCAGCGGCTTTGGACGCGAGCTCGGAGAAGGGGGCATTGACAAC TAC	1437

BADH2	CTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGATGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCC	1497
BADH2_Y420	CTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGATGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCC	1500
BADH2_E260A	CTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGATGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCC	1497
BADH2_C294A	CTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGATGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCC	1497
BADH2_N162A	CTAAGCGTCAAGCAAGTGACGGAGTACGCCTCCGATGAGCCGTGGGGATGGTACAAATCC	1497

BADH2	CCTTCCAAGCTGTAA	1512
BADH2_Y420	CCTTCCAAGCTGTAA	1515
BADH2_E260A	CCTTCCAAGCTGTAA	1512
BADH2_C294A	CCTTCCAAGCTGTAA	1512
BADH2_N162A	CCTTCCAAGCTGTAA	1512

หมายเหตุ: บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์



1. การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ของ *E. coli* (DH5 α หรือ BL21)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5-1.0 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่เย็น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และนำเซลล์คอมพีเทนท์ที่ได้ แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร

2. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* โดยเทคนิคการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน

นำเซลล์คอมพีเทนท์ *E. coli* (DH5 α หรือ BL21) ที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ พลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณ 1-10 นาโนกรัม บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรูพรุนด้วยความร้อน เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเกิดรอยร้าวพลาสมิดจะเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และบ่มบนน้ำแข็งทันทีอีก 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อซ่อมแซมรอยร้าวของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนเชื้อ โดยเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอน ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ออกให้เหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตผสมตะกอนกับส่วนใสให้เข้ากันนำไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน โดยกลับจานอาหารคว่ำลง

3. การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีสกัดพลาสมิดด้วยเบส

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม และเติมสารละลาย II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงจนเห็นเป็นเมือกสีขาวขุ่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม (24 ต่อ 23) ปริมาตรเท่าตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนนำไปใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตรทเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่า และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2 เท่า ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนสีขาวกันหลอดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้งโดยดูดส่วนใสออกให้หมด เปิดฝาหลอดรอจนตะกอนกันหลอดแห้ง โดยตะกอนที่แห้งจะใส จากนั้นเติมน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส



การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

1. สารละลายอะคริลาไมด์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตรประกอบด้วย

อะคริลาไมด์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 60.0 กรัม

บิสอะคริลาไมด์ เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ 1.6 กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ในภาชนะสีชาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายบัฟเฟอร์ 4x Resolving gel ปริมาตร 200 มิลลิลิตรประกอบด้วย

Tris-Cl 36.3 กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 200 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น เก็บไว้ใน ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายบัฟเฟอร์ 4x Stacking gel ปริมาตร 50 มิลลิลิตรประกอบด้วย

Tris 3.0 กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เก็บไว้ใน ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรประกอบด้วย

SDS 1.0 กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรประกอบด้วย

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 มิลลิลิตร ควรเตรียมก่อนใช้ไม่ควรเก็บ

6. สารละลายบัฟเฟอร์ 2x Treatment ปริมาตร 10 มิลลิลิตรประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ 4x stacking gel	2.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
โบรโมฟินอลบลู	2.0	มิลลิลิตร
Dithiothreitol	0.31	กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

7. สารละลายบัฟเฟอร์ 10x loading ปริมาตร 500 มิลลิลิตรประกอบด้วย

Tris	15.14	กรัม
กลีเซอรอล	72.07	กรัม
SDS	10.0	กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. สารละลาย Staining ปริมาตร 500 มิลลิลิตรประกอบด้วย

Coomassie brilliant blue R-250	0.5	กรัม
เมทานอล	125.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	50.0	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. สารละลาย Destaining ปริมาตร 500 มิลลิลิตรประกอบด้วย

เมทานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	50.0	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. เจลเอสดีเอส-อะคริลาไมด์ เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์

สารละลาย Resolving gel ปริมาตร 7 มิลลิลิตรประกอบด้วย

น้ำกลั่น	2.31	มิลลิลิตร
อะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์	2.8	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ 4x Resolving gel	1.75	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.07	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.07	มิลลิลิตร
TAME	0.0028	มิลลิลิตร

Stacking gel เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรประกอบด้วย

น้ำกลั่น	1.4	มิลลิลิตร
อะคริลาไมด์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์	0.33	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ 4x Stacking gel	0.25	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.02	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.02	มิลลิลิตร
TAME	0.002	มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายสำหรับดีเอ็นเออิเล็กโตรโฟรีซิส

1. บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50x ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรประกอบด้วย

Tris-Base	240.2	กรัม
กรดอะซิติก	57.0	มิลลิลิตร
EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สีข้อมเจล 6x agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตรประกอบด้วย

EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.0	5.0	มิลลิลิตร
โบรโมฟินอลบลู เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์	5.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง



การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และยาปฏิชีวนะ

1. อาหารเหลว LB (Luria Bertani) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตเนน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. อาหารแข็ง LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตเนน	1.0	กรัม
ยีสต์สกัด	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	1.0	กรัม
วุ้นสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย	2.0	กรัม

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร และปรับ pH 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

สารละลายคานามัยซิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ยาปฏิชีวนะคานามัยซิน	1.0	กรัม
----------------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	1.0	กรัม
----------------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก จ
การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดพลาสติกด้วยเบส

การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิดด้วยเบส

1. สารละลาย I ปริมาตร 100 มิลลิลิตรประกอบด้วย

กลูโคส เข้มข้น 1 โมลาร์	5.0	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ pH 8.0	2.5	มิลลิลิตร
EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย II ปริมาตร 10 มิลลิลิตรประกอบด้วย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์	2.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 1 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับสุดท้ายให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลาย III ปริมาตร 130 มิลลิลิตรประกอบด้วย

โพแทสเซียมอะซิเตรท เข้มข้น 5 โมลาร์	90.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	11.5	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 130 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง



ภาคผนวก จ

การเตรียมสารสำหรับทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์ด้วยเครื่อง FPLC และการเตรียมสารสำหรับทำ TLC

การเตรียมสารสำหรับทำวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่อง FPLC

1. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับคอลัมน์ของเครื่อง FPLC ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH ที่ 8.0	15.0	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	150.0	มิลลิลิตร
อิมิดาโซล 30 มิลลิโมลาร์	75.0	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

2. สารละลาย บัฟเฟอร์สำหรับชะโปรตีนจากคอลัมน์ของเครื่อง FPLC ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.0	15.0	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	150.0	มิลลิลิตร
อิมิดาโซล 0.5 โมลาร์	4.5	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

การเตรียมสารสำหรับทำ TLC

1. สารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

นินไฮดริน	2.0	กรัม
-----------	-----	------

ละลายสารข้างต้นด้วยเอทานอล ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สารตัวทำละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

เอ็น-บิวทานอล	66.68	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	16.67	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนภาพร ธรรมชูเชาวรัตน์
วัน เดือน ปี เกิด	วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2525
สถานที่เกิด	นนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วทบ.สาขาชีววิทยา (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-
ไปสเตอร์	

Thamchuchaowarat, N., Wongpanya, R., Boonyalai, N., and Choowongkamon, K. 2010. Expression, Purification and Characterization of mutant BADH2. The 5th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. June 23th-25th 2010, Chulabhorn Research Institute Conference Center.