



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเตสจากเมทิลโอโทโรฟิเคียสต์ทนร้อน
Ogataea siamensis N22

Cloning and Characterization of Xylose Reductase Gene (*XYL1*) from Thermotolerant
Methylotrophic Yeast *Ogataea siamensis* N22

นามผู้วิจัย นางสาวกัญญา กอแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์สาวตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเตสจากเมทิลโอโทรฟิเคียสต์ทนร้อน
Ogataea siamensis N22

Cloning and Characterization of Xylose Reductase Gene (*XYL1*) from Thermotolerant
Methylotrophic Yeast *Ogataea siamensis* N22

นามผู้วิจัย นางสาวกัญญา กอแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์สาวตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเตส
จากเมทิลโดโทรอฟิกีสต์ทนร้อน *Ogataea siamensis* N22

Cloning and Characterization of Xylose Reductase Gene (*XYL1*) from
Thermotolerant Methylotrophic Yeast *Ogataea siamensis* N22

โดย

นางสาวกัญญา กอแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2554

กัญญา กอแก้ว 2554: การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเทสจากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์
หนรื้อน *Ogataea siamensis* N22 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยา
ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.
121 หน้า

โคลนยีนไซโลสรีดักเทส (*XYL1*) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์หนรื้อน *Ogataea siamensis* N22 จากยีน-
มิกดีเอ็นเอและคัดลอกโคลนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้โคลนรหัส pOSXR2-88 ที่มียีนไซโลสรีดักเทสความยาว 835
นิวคลีโอไทด์แทรกอยู่ในพลาสมิดแต่ยังขาดส่วนของยีนด้าน 3' จึงตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3'
ของยีนด้วยวิธี 3' RACE เมื่อรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากทั้งสองวิธีเข้าด้วยกัน ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด
ของยีนไซโลสรีดักเทสความยาว 960 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์
ลำดับนิวคลีโอไทด์พบตำแหน่ง TATA box-like คือ ⁻¹¹²TATAA⁻¹⁰⁸ ห่างจาก start codon ขึ้นไปทางปลาย 5' และ
พบตำแหน่ง polyadenylation signal คือ ⁹⁷⁴AATAAA⁹⁷⁹ อยู่ห่างจาก stop codon ไปทางด้าน 3' ได้ฝากลำดับนิว-
คลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. FJ763639)
การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22
คล้ายคลึงกับอัลโดสรีดักเทสของยีสต์ *Candida boidinii* มากที่สุด เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับ
กรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 พบว่ามีความแตกต่างจากไซโลสรีดักเทสของ
ยีสต์อื่นอยู่ 3 ตำแหน่ง แต่ไม่ใช่บริเวณ active site และพบว่ามีลำดับกรดอะมิโน IPKS ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของ
บริเวณ active site เช่นเดียวกับไซโลสรีดักเทสของยีสต์อื่น

เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสในยีสต์ *O. siamensis* N22 ด้วยการสร้างพลาสมิดลูกผสม
pPICOSXR และ pGAPOSXR ภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน alcohol oxidase (*AOX*) และ glyceraldehyde-3-
phosphate dehydrogenase (*GAP*) ตามลำดับ พลาสมิดลูกผสมจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์เข้าบ้าน
การศึกษากการแสดงออกของยีนจากกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่ได้รับ
พลาสมิด pPICOSXR มีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.044 ถึง 0.098 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งยีสต์สายพันธุ์
ดัดแปลง N22-pPICOSXR30 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 0.098 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น
2.2 เท่าของค่าที่ตรวจพบจากยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPOSXR พบ
ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.062 ถึง 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยยีสต์สายพันธุ์ N22-
pGAPOSXR3 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 1.5 เท่าของยีสต์
สายพันธุ์ตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจาก *O. siamensis* N22 และสายพันธุ์ดัดแปลงใช้
NADPH เป็นโคเอนไซม์เท่านั้น

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Kanya Kokaew 2011: Cloning and Characterization of Xylose Reductase Gene (*XYL1*) from Thermotolerant Methylophilic Yeast *Ogataea siamensis* N22. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Nantana Srisuk, Ph.D. 121 pages.

Xylose reductase gene (*XYL1*) of the thermotolerant methylophilic yeast, *Ogataea siamensis* N22, was cloned from genomic DNA and screened by PCR. The positive clone namely pOSXR2-88 was found to carry 835 bp of partial *XYL1* with 3' end missing. The 3' end of *XYL1* was then cloned from cDNA using 3' RACE and sequenced. The two sequences were then contiged and a 960 bp open reading frame encoding 319 amino acids was found. Nucleotide sequence analysis showed a TATA box-like sequence, ⁻¹¹²TATAA⁻¹⁰⁸, upstream from start codon and polyadenylation signal, ⁷⁴AATAAA⁷⁹, downstream from stop codon. The sequence of *O. siamensis* N22 *XYL1* was submitted to GenBank (accession number FJ763639). Alignment of deduced amino acids sequence showed that xylose reductase of *O. siamensis* N22 is closely related to aldose reductase of *Candida boidinii* with 72% similarity. The deduced amino acid sequence of *O. siamensis* N22 xylose reductase showed 3 different positions, excluded from enzyme active site, from those of other yeasts. However, the conserved sequence of xylose reductase active site, IPKS, was found.

To overexpress the *XYL1* in *O. siamensis* N22, the recombinant plasmid pPICOSXR and pGAPOSXR were constructed under the *AOX* and *GAP* promoters, respectively and integrated into host chromosome. Study of gene expression via enzyme activity assay was carried out. The original N22 strain and recombinants revealed specific xylose reductase activity of 0.044-0.098 U/mg protein. The recombinant designated N22-pPICOSXR30 possessed 0.098 U/mg protein which is 2.2 folds of the activity found in the original N22 strain. The pGAPOSXR recombinants showed specific enzyme activity of 0.062-0.093 U/mg protein and the recombinant namely N22-pGAPOSXR3 showed 0.093 U/mg protein which is 1.5 folds of that observed in the original N22 strain. Additionally, xylose reductase of *O. siamensis* N22 and transformants studied were found to use NADPH as a preference coenzyme.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. นันทนา สีสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ให้คำแนะนำ ปรึกษา และปรับปรุงการวิจัย การเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในเรื่อง เป็นอย่างดีมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง กรรมการสาขาวิชาเอก ที่กรุณาให้คำปรึกษา เอื้อเฟื้ออุปถัมภ์ในการวิจัย และให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย และข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาดังต่าง ๆ ตลอดจนการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. บัณฑิต ผึ้งสินธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สาวิตร์ ตระกูลนำเดื่อมใส ประธานในการสอบครั้งนี้ ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษาในงานวิจัย และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์ในการวิจัย เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และอบรมสั่งสอนให้แก่ข้าพเจ้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ และน้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

กัญญา กอแก้ว

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	96
สรุป	96
ข้อเสนอแนะ	98
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	99
ภาคผนวก	110
ภาคผนวก ก	111
ภาคผนวก ข	114
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	121

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ในยีสต์ชนิดต่างๆ	11
2	Degenerated primers ที่ใช้ในการตามหายีนไซโลสรีดักเทสใน <i>O. siamensis</i> N22	51
3	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ที่ได้จากการ แปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของ <i>O. siamensis</i> N22 กับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BlastX	70
4	ความแตกต่างของกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสระหว่าง <i>O. siamensis</i> N22 กับยีสต์ทั้ง 12 ชนิด	77
5	ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์จากยีนโนมิก ดีเอ็นเอของ <i>O. siamensis</i> N22	79
6	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ N22 (<i>O. siamensis</i> N22) และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR เมื่อใช้ NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยา	91
7	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจากยีสต์ N22 (<i>O. siamensis</i> N22) และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPZ B และ pGAPOSXR เมื่อใช้ NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยา	94
ตารางผนวกที่		
ข1	การเตรียม โปดัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	117
ข2	การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความ เข้มข้นต่าง ๆ	119

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลดี-ไซโลส โดยยีสต์	10
2	โครงสร้างทางเคมีของไซลิทอล	13
3	หลักการทํางานของวิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) 3' RACE-PCR เป็นการหาลำดับเบสทางด้าน 3' ของ cDNA และ 5' RACE-PCRเป็นการหาลำดับเบสทางด้าน 5' ของ cDNA	22
4	แผนภาพพลาสมิด pJET1.2/blunt (2,947 เบส) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการ จำลองดีเอ็นเอ = rep (pMB1), ampicillin resistant gene = bla (Ap ^R), lethal gene = <i>eco47IR</i> , P _{lacUV5} โปรโมเตอร์สำหรับ <i>eco47IR</i> gene และ T7 promoter	30
5	แผนภาพพลาสมิด pPICZ B (3.3 กิโลเบส) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการ จำลองดีเอ็นเอในแบคทีเรีย = pUC ori, Zeocin resistant gene = Zeocin, โปรโมเตอร์สำหรับการแสดง ออกของยีน = 5' <i>AOX1</i> และ terminator region ของการแสดงออกของยีน = <i>AOX1</i> TT	39
6	แผนภาพพลาสมิด pGAPZ B (2.9 กิโลเบส) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการ จำลองดีเอ็นเอในแบคทีเรีย = pUC ori, Zeocin resistant gene = Zeocin, โปรโมเตอร์สำหรับการแสดง ออกของยีน = P _{GAP} และ terminator region ของการแสดงออกของยีน = <i>AOX1</i> TT	40
7	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ <i>O. siamensis</i> N22 แบบไม่สมบูรณ์ ด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ	45
8	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีขนาด 1-3 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bsp143I</i> แบบไม่สมบูรณ์	46
9	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจากยีสต์ 8 ชนิด	47
10	ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของยีนไซโลสรีดักเทส เลือกมาออกแบบ ไพรเมอร์หัวยีน และไพรเมอร์ท้ายยีน และแปลงลำดับกรดอะมิโนไปเป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์	48

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
11	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจหาชิ้นไซโลสรีดักเทศบางส่วนที่เพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 ด้วยเทคนิค gradient PCR ที่อุณหภูมิ annealing	53
12	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613	54
13	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจหาชิ้นไซโลสรีดักเทศจากพลาสמיד pOSXR ของโคลนหมายเลข 1-240 ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr61	55
14	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจหาชิ้นไซโลสรีดักเทศจากพลาสמיד pOSXR	56
15	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสמיד pOSXR1-208 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bgl</i> II	57
16	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จากพลาสמיד pOSXR1-208 ความยาวเท่ากับ 1,051 นิวคลีโอไทด์	58
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นไซโลสรีดักเทศบนพลาสמיד pOSXR1-208 ความยาว 680 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลโดสรีดักเทศ จาก <i>Candida boidinii</i> ด้วยโปรแกรม ClustalW	59
18	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดระหว่าง pOSXR1-208 และ pOSXR2-88 ด้วยโปรแกรม ClustalW	62
19	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอทั้งหมดของ <i>O. siamensis</i> N22	64
20	ตำแหน่งของไพรเมอร์ OsXRf633 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นไซโลสรีดักเทศบางส่วนจาก pOSXR2-88 อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ OSXRf633 ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของยีน	65
21	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 414 นิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธี 3' RACE จาก cDNA ของ <i>O. siamensis</i> N22	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	<p>ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีนไซโลสรีดักเทสของ <i>O. siamensis</i> N22 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี 3' RACE (OSXR) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลโดสรีดักเทสทางด้านปลาย 3' จาก <i>Candida boidinii</i> ด้วยโปรแกรม clustalW</p>	67
23	<p>(ก) การเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE อักษรที่ขีดเส้นใต้ ATG แสดงบริเวณ start codon และ TAA แสดงบริเวณ stop codon</p> <p>(ข) แสดงการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเทคนิค 3' RACE</p>	68
24	<p>Open reading frame ของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ <i>O. siamensis</i> N22 ความยาว 960 นิวคลีโอไทด์ และแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม ORF Finder</p>	71
25	<p>วิเคราะห์ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนไซโลสรีดักเทสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE จำนวน 1,334 นิวคลีโอไทด์</p>	72
26	<p>Phylogenetic tree ของยีนไซโลสรีดักเทสจาก <i>O. siamensis</i> N22 และ ยีสต์ 12 ชนิด ที่สร้างด้วยวิธี neighbor-joining โดยมีค่า bootstrap = 1,000 (แสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์)</p>	73
27	<p>เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไซโลสรีดักเทสของ <i>O. siamensis</i> N22 กับไซโลสรีดักเทสของยีสต์ 12 ชนิด ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม ClustalW ได้แก่ <i>C. boidinii</i>, <i>Candida</i> sp., <i>C. albicans</i>, <i>C. tropicalis</i>, <i>Candida</i> sp. GCY2005, <i>C. dubliniensis</i>, <i>C. tenuis</i>, <i>C. parapsilosis</i> <i>D. hansenii</i>, <i>P. stipitis</i>, <i>K. lactis</i> และ <i>M. guiliermondii</i></p>	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบรูณ์ของ <i>O. siamensis</i> N22 จากการทำปฏิกิริยาด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ และ MgCl ₂ แตกต่างกัน	81
29	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959	82
30	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสจาก pOSXR2-88 ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE กับ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959	83
31	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสบนพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B (ก) ตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสบนพลาสมิดสายผสม pPICOSXR (ข) ตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสบนพลาสมิดสายผสม pGAPOSXR	86
32	การเจริญของ <i>O. siamensis</i> N22 สายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR บนอาหาร YPD เต็ม Zeocin™ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	88
33	การเจริญของ <i>O. siamensis</i> N22 สายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPGAPZ B และ pGAPOSXR บนอาหาร YPD เต็ม Zeocin™ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	89
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	120

การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเทส
จากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนร้อน *Ogataea siamensis* N22

**Cloning and Characterization of Xylose Reductase Gene (XYL1) from
Thermotolerant Methylophilic Yeast *Ogataea siamensis* N22**

คำนำ

เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นไซลิตอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแรกในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลส โดยใช้ NADH หรือ NADPH เป็นโคเอนไซม์ พบว่ามียีสต์เพียงไม่กี่ชนิดที่ใช้น้ำตาลไซโลสได้ เช่น *Pichia guilliermondii*, *P. stipitis*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. tenuis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pachysolen tannophilus*, *C. boidinii* และ *Hansenula polymorpha* และในจำนวนนี้ก็มียีสต์เมทิลโลโทรฟิเคียสต์รวมอยู่ด้วย ซึ่งเมทิลโลโทรฟิเคียสต์หมายถึง ยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ ประโยชน์ของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์มีหลากหลาย เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การผลิตกรดอะมิโน การผลิตกรดซิตริก และการผลิตโคเอนไซม์ เป็นต้น นอกจากนี้เมทิลโลโทรฟิเคียสต์บางชนิดยังสามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตคือไซลิตอล ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารให้ความหวานเทียบเท่ากับน้ำตาลซูโครส ปัจจุบันไซลิตอลได้รับความนิยมในทวีปยุโรป และอเมริกา โดยใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล นอกจากนี้ยังมีการนำไซลิตอลมาใช้ทางการแพทย์ด้วย เนื่องจากไซลิตอลเป็นสารที่ให้แคลอรีต่ำ สามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ ปัจจุบันการผลิตไซลิตอลในระดับอุตสาหกรรมใช้กระบวนการทางเคมี โดยใช้วัตถุดิบจากไซเลนและลิกโนเซลลูโลส แต่ผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อย การทำให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ไซลิตอลที่ขายในท้องตลาดจึงมีราคาแพง ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการผลิตไซลิตอล จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิตอลได้มากที่สุด คือ ยีสต์ (Sampaio *et al*, 2008) และพบว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสต์บางสายพันธุ์ สามารถผลิตไซลิตอลโดยใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นได้ ซึ่งการผลิตไซลิตอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ในสภาวะที่เหมาะสม อาจนำมาใช้ทดแทนกระบวนการผลิตทางเคมีได้ เนื่องจากทำให้ได้ผลผลิตที่มีปริมาณสูง และต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี

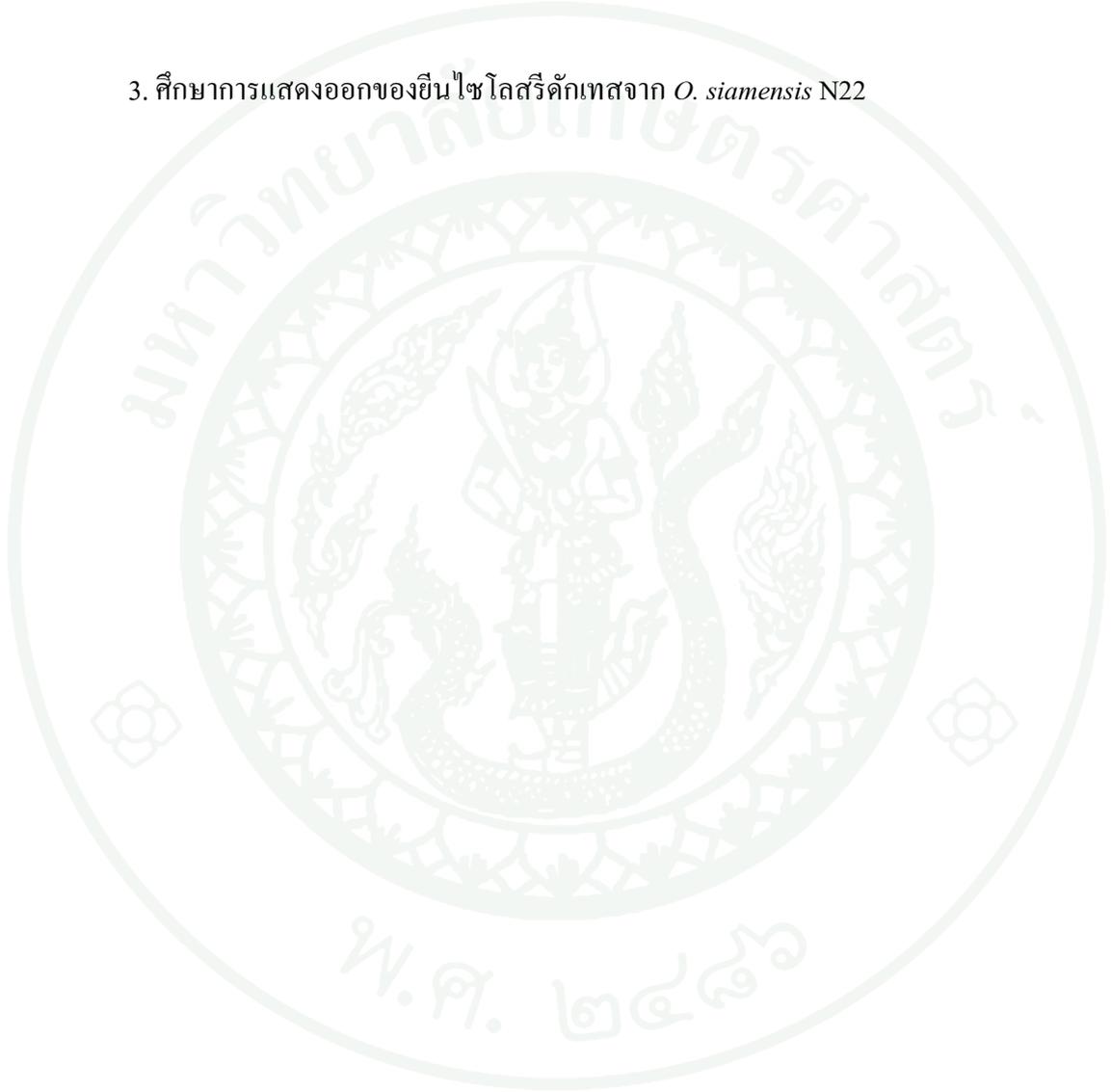
นอกจากประโยชน์ของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่กล่าวข้างต้นแล้ว การใช้ประโยชน์จากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น เนื่องจากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์มีส่วน โปรโมเตอร์ของยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นได้ดี ตัวอย่างของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่มีการพัฒนามาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านทางการค้า คือ *Pichia pastoris* และ *P. methanolica* โดยบริษัท InVitrogen (USA)

มีรายงานการค้นพบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนร้อนหลายสายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ในประเทศไทย และบางสายพันธุ์ก็พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ด้วย ซึ่ง *Ogataea siamensis* N22 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ก็เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้ในประเทศไทยเช่นกัน (Limtong *et al.*, 2004 ; Limtong *et al.*, 2008) มีรายงานว่า *Ogataea siamensis* N22 สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้ที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 37 ถึง 40 องศาเซลเซียส (พันธิธิดา, 2549) ซึ่งสูงกว่าในเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ชนิดอื่นๆ

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์สายพันธุ์นี้ให้มีการผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ซึ่งจะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น และมีการสร้างเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสเพิ่มขึ้น เพื่อให้ยีสต์สามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอลได้มากขึ้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ ทั้งในแง่ของการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ทนร้อนสปีชีส์ใหม่สายพันธุ์ไทย และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนากระบวนการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีนไซโลสรีดักเทศจากยีสต์ *Ogataea siamensis* N22
2. ศึกษาลักษณะเฉพาะของยีนไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22
3. ศึกษาการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22



การตรวจเอกสาร

เมทิลโลโทรฟิเคียสต์

เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ คือ ยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญได้ การใช้เมทานอลเพื่อการเจริญอาจพบได้ในยีสต์ไม่กี่สายพันธุ์ (Nakagawa *et al.*, 2005) อาจแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ได้จากธรรมชาติ เช่น พีช ดิน น้ำ เป็นต้น เพราะแหล่งธรรมชาติ เช่น ใบไม้ มีการปลดปล่อยเมทานอล ออกมาสู่บรรยากาศได้ ซึ่งยีสต์หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะนำเมทานอลที่พืชปล่อยออกมาในบรรยากาศไปใช้ได้ นอกจากนี้แหล่งเมทานอลจากธรรมชาติที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง คือ เพคติน ซึ่งถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ pectin methylesterase (PME) ไปเป็นเมทานอล และ polygalacturonate ได้ (Nakagawa *et al.*, 2005)

มีรายงานการคัดแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จากธรรมชาติในประเทศไทย โดยคัดแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์สปีชีส์ใหม่ได้จากยางไม้ และในดิน ได้แก่ *Ogataea chonburiensis*, *O. nakhonphanomensis*, *O. thermomethanolica*, *O. siamensis*, *Candida krabiensis* และ *C. sithepensis* นอกจากนี้พบว่ายีสต์ทั้งหมดเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนร้อนด้วย เนื่องจากสามารถเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียส และต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Limtong *et al.*, 2004; Limtong *et al.*, 2008)

Ogataea siamensis N22 เป็นเมทิล โล โทรฟิเคียสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้จากยางไม้ในประเทศไทย ซึ่งสามารถใช้เมทานอลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 37 องศาเซลเซียส (พันธรัธิดา, 2549)

เมทานอลเมแทบอลิซึมในเมทิลโลโทรฟิเคียสต์

เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทั่ว ๆ ไปมีวิถีการใช้เมทานอลคล้ายคลึงกัน ปฏิกิริยาแรกของกระบวนการเมทานอลเมแทบอลิซึมในเมทิล โล โทรฟิเคียสต์ คือ การออกซิไดส์เมทานอล (CH_3OH) ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ (HCHO) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีเอนไซม์เมทานอลออกซิเดส (methanol oxidase, MOX) พบใน *Hansenula polymorpha* หรือเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase, AOD หรือ AOX, EC1.1.3.13) ซึ่งพบใน *Candida boidinii* และ *Pichia pastoris* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส

สังเคราะห์ในไซโทซอล แต่เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ในทันที เมื่อเซลล์ขนส่งเอนไซม์นี้เข้ามาในเพอร์ออกซิโซม เอนไซม์จึงจะอยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ พบว่าในระหว่างที่เมทิลโลโทรฟิยีสต์มีการเจริญในเมทานอล จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ แอลกอฮอล์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งทำให้มีฟอร์มัลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์จะกำจัดได้โดยเอนไซม์ คตะเลสที่อยู่ในเพอร์ออกซิโซม (peroxisomal catalase, CAT, EC1.11.1.6) เกิดเป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นเป็นสารตัวกลางของเมทานอลเมแทบอลิซึม และอาจเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกันถ้าสะสมในปริมาณมาก แต่ฟอร์มัลดีไฮด์จะเข้าสู่วิถีแอสลิมิเลชันและวิถีคีสลิมิเลชัน ซึ่งเกิดขึ้นในไซโทซอลต่อไป วิถีคีสลิมิเลชันของเมทานอล เริ่มจากการที่ฟอร์มัลดีไฮด์ เกิดปฏิกิริยากับกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) ไปอยู่ในรูป S-hydroxymethylglutathione (S-HMG) จากนั้นเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (FLD) จะใช้ S-HMG เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง S-formylglutathione (S-FG) ต่อจากนั้น S-FG ถูกไฮโดรไลซ์ โดยเอนไซม์ S-formylglutathione hydrolase ไปเป็น GSH และฟอร์มเมท ในที่สุดฟอร์มเมทจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ FLD ส่วนวิถีแอสลิมิเลชันของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิยีสต์ เป็นการเปลี่ยนฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอน 1 อะตอมกับ xylulose-5-phosphate (Xu5P) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ได้เป็นสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม 2 ชนิด คือ dihydroxyacetone (DHA) และ glyceraldehydes-3-phosphate (GAP) ปฏิกิริยานี้จะเกิดในเพอร์ออกซิโซม และจะเคลื่อนที่ออกจากเพอร์ออกซิโซมมายังไซโทซอล ต่อมา DHA จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตกลายเป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) DHAP จะทำปฏิกิริยากับ GAP ได้ผลผลิตเป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยมีเอนไซม์ fructose bisphosphatase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และจะได้ Xu5P ที่สร้างขึ้นใหม่ ซึ่งจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตต่อไป ส่วน 1 ใน 3 โมเลกุลของ DHAP ที่เหลือ จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการ gluconogenesis ต่อไป (Gellissen, 2002 ; Hartner and Glieder, 2006 ; Klei *et al.*, 2006)

การนำเมทิลโลโทรฟิยีสต์ไปใช้ประโยชน์

1. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เพราะเมทานอลหาได้ง่าย ละลายน้ำได้ มีความบริสุทธิ์สูง มีความปลอดภัยมากกว่ามีเทน และสามารถกำจัดออกจากเซลล์ได้ง่าย การผลิตโปรตีน

เซลล์เดี่ยวของยีสต์ มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย ได้แก่ การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่ายโดยการกรองหรือปั่นเหวี่ยง เพราะเซลล์มีขนาดใหญ่ ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำ และพบปริมาณของกรดนิวคลีอิกต่ำกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย (7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งในยีสต์ กับ 10-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งแบคทีเรีย) ค่าพีเอชที่ใช้ในกระบวนการผลิตต่ำ (4.0-5.5) จึงช่วยลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ ดังนั้น โปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์จึงได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าแบคทีเรีย (Verachtert and De Mot, 1990)

2. การผลิตกรดอะมิโน

เมทิลโลโทรฟิเคียสเป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอะมิโนหลายชนิด ตัวอย่าง ได้แก่ สิทธิบัตรของ Okumura *et al.* (1970) ที่อธิบายการใช้เมทิลโลโทรฟิเคียส *Hansenula polymorpha* ผลิตกรดอะมิโน L-alanine, L-glutamic acid, L-lysine, L-threonine, L-valine และ aromatic amino acid (L-tryptophan) จากเมทานอล

3. การผลิตโคเอนไซม์

เมทิลโลโทรฟิเคียส มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสอยู่มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดภายในเซลล์ และเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต flavin adenine dinucleotide (FAD) และ flavin mononucleotide (FMN) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์โคเอนไซม์ พบว่าเมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิเคียส 4 วัน ในอาหารที่มี AMP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ AMP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น FAD 45.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นกระบวนการผลิต riboflavin และ FMN ในสภาวะที่เหมาะสม (Brooke *et al.*, 1980)

4. การผลิตกรดซิตริก

เมื่อเลี้ยง *Candida boidinii* ในอาหารเมทานอลที่เติม fluoroacetate ลงไปด้วย พบว่ามีการปล่อยกรดซิตริกออกมาที่ความเข้มข้นประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาสายพันธุ์กลายของยีสต์ *Candida sp.* Y-1 ซึ่งมีความต้านทานต่อ fluoroacetate พบว่ามีการปล่อยกรดซิตริกออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นประมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Tani, 1984)

5. การใช้เอนไซม์ของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ในปี ค.ศ. 1975 บริษัท Hankel ได้จดสิทธิบัตร การผลิต เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่ปราศจากเอนไซม์คะตาเลส (catalase-free alcohol oxidase) เป็นของแข็งในรูปเม็ด เพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำยาซักฟอก (Baratti *et al*, 1978 ; Tanaka *et al.*, 1978) นอกจากนี้ ยังสามารถใช้กระบวนการทางเคมีในการผลิตฟอร์มัลดีไฮด์จากเมทานอลได้ด้วย ซึ่งแอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดส์เมทานอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะใช้อัลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ให้ได้ผลผลิตเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ (Tani *et al.*, 1987)

6. การใช้เมทิลโลโทรฟิเคียสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น

Cregg *et al.* (2000) กล่าวถึงเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ดี สำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น เนื่องจากส่วนโปรโมเตอร์ของยีน ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส ที่มีประสิทธิภาพในการกำหนดการแสดงออกของยีน ปัจจุบันมีความสำเร็จในการใช้ยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้แสดงออกในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ เป็นต้น ในปัจจุบันมีโปรตีนจากแหล่งอื่นมากกว่า 200 ชนิดที่สามารถผลิตได้ในยีสต์ *P. pastoris* จึงสามารถใช้เมทิลโลโทรฟิเคียสต์เป็นเครื่องมือในการศึกษาพัฒนาสายพันธุ์ใหม่และดีเอ็นเอพาหะต่อไป

มีการใช้ยีสต์ *Hansenula polymorpha* เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น และประสบความสำเร็จในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ซึ่งใน *H. polymorpha* มีโปรโมเตอร์ของยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นแบบต่อเนื่อง และยังยอมให้ยีนจากแหล่งอื่นสามารถแทรกเข้าไปในจีโนมของ *H. polymorpha* ได้ด้วย จึงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นได้เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติมเมทานอล นอกจากนี้การสะสมผลผลิตที่ได้ไว้ในเพอร์ออกซิโซมยังช่วยป้องกันการปรับแต่งของสายโปรตีน เช่น proteolytic processing หรือ glycoylation เป็นต้น จากข้อดีดังกล่าวของ *H. polymorpha* ทำให้มีการพัฒนาเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ใหม่ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ (Dijk *et al.*, 2000)

เมแทบอลิซึมของดี-ไซโลส

ดี-ไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันได้ด้วยพันธะ เบตา-1,4 เกิดเป็นโพลิเมอร์ในรูปไซแลน ยีสต์และราบางชนิด สามารถแอสลิมิเลตไซโลสเข้าไปใช้ในเซลล์ได้ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยพบว่ายีสต์ 297 สปีชีส์ จาก 466 สปีชีส์ หรือประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ สามารถแอสลิมิเลตดี-ไซโลส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศได้ (Barnett, 1976) เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์นั้นแตกต่างจาก กระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรีย ในขั้นตอนของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส โดยแบคทีเรีย ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลส ด้วยปฏิกิริยาไอโซเมอเรชัน โดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส ในขณะที่ยีสต์ใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน เกิดฟอสโฟริเลชันในการเปลี่ยน ไซโลสไปเป็นไซลูโลส โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส, ซิลิทอลดีไฮโดรจีเนส และไซลูโลไคเนส ยีสต์บางชนิดจะใช้ดี-ไซโลสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล (Verachtert and De Mot, 1990)

เมแทบอลิซึมของดี-ไซโลสในยีสต์

กระบวนการหมักดี-ไซโลส ในยีสต์เกิดขึ้นโดยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ปฏิกิริยาแอสลิมิเลชันของดี-ไซโลส เริ่มจากการรีดิวซ์ ดี-ไซโลสเป็นไซลิทอลโดย เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase) หรือ อัลโดสรีดักเทส (aldose reductase) และมี NADPH หรือ NADH เป็นโคเอนไซม์ ต่อมาไซลิทอลถูกออกซิไดส์เป็นดี-ไซลูโลส โดยเอนไซม์ ซิลิทอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase) และมี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นดี-ไซลูโลสถูกฟอสโฟริเลตไปอยู่ในรูป D-xylulose-5-phosphate โดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) (Verachtert and De Mot, 1990; Jeffries and Shi, 1999) D-xylulose-5-phosphate ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เพื่อให้ผลผลิตคือ glyceraldehyde-3-phosphate และ fructose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) ต่อไป เพื่อผลิตไพรูเวต ไพรูเวตอาจถูกรีดิวซ์โดยปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase และ alcohol dehydrogenase ตามลำดับ ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล หรืออีกทางหนึ่ง ไพรูเวตอาจเข้าวัฏจักรกรด ไทโรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไป นอกจากนี้ D-xylulose-5-phosphate จะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตแล้ว ยังสามารถเข้าสู่ phosphoketolase bypass ได้อีกทางหนึ่ง โดยมี glyceraldehyde-3-phosphate และ acetyl phosphate เป็นผลผลิตโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ xylulose-5-phosphate phosphoketolase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วิถี EMP ในขณะที่ acetyl phosphate จะเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยการทำงานของเอนไซม์ acetate kinase ได้ผลผลิตคือ อะซิเตต ซึ่งอะซิเตตอาจเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้เป็น acetyl CoA โดยการเร่ง

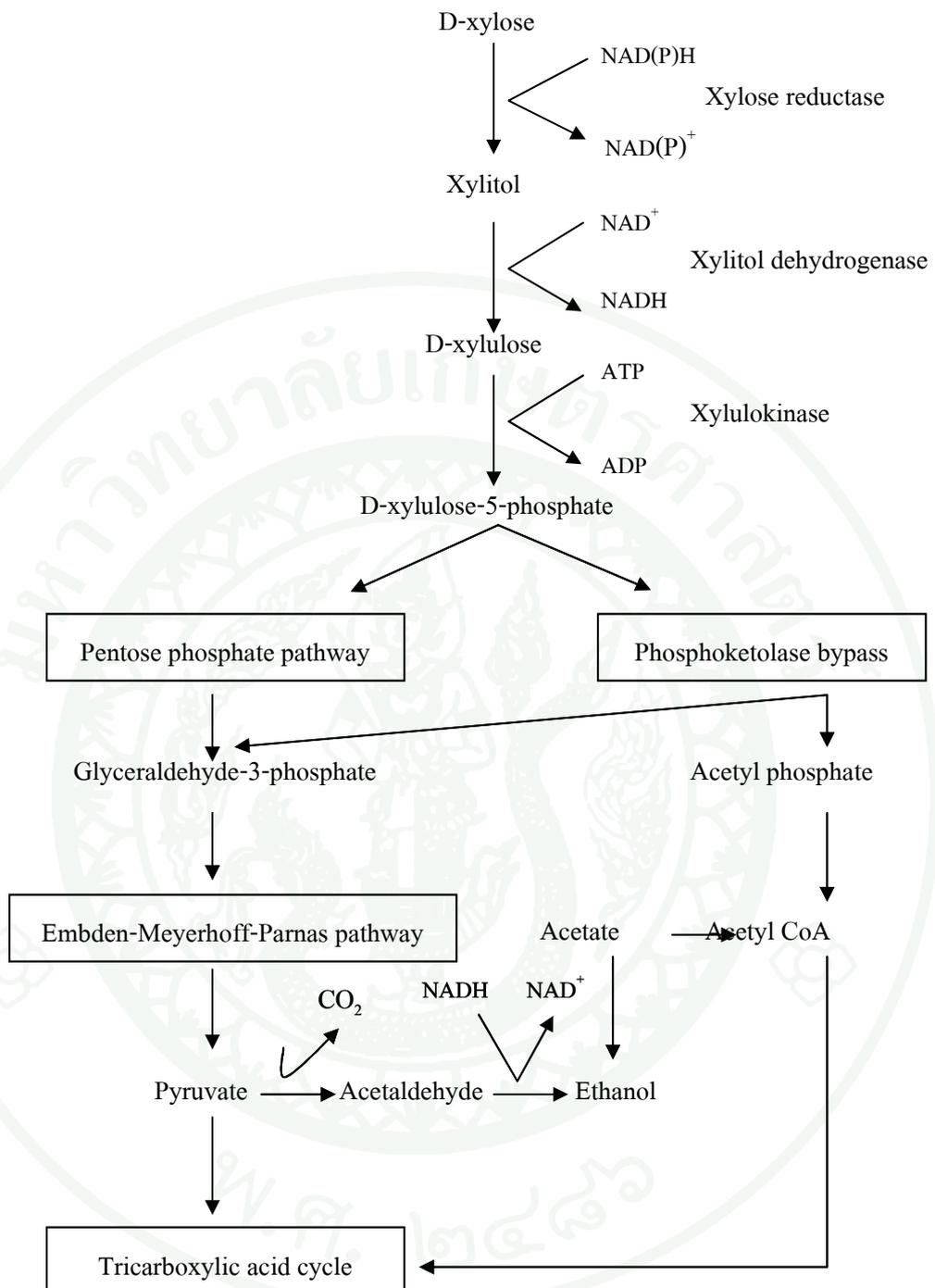
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ acetyl CoA synthase และ acetyl CoA จะเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป หรืออะซิเตทอาจเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ (Winkelnausen and Kuzmanova, 1998) ดังแสดงในภาพที่ 1

เอนไซม์สำคัญในเมแทบอลิซึมของน้ำตาลดี-ไซโลสในยีสต์

Jeffries and Shi (1999) ได้รวบรวมรายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการเปลี่ยนแปลงดี-ไซโลสของยีสต์ ดังนี้

1. เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR)

ไซโลสรีดักเทส หรือ สำหรับยีสต์ *Candida boidinii* เรียกชื่อว่า อัลโดสรีดักเทส (aldose reductase) (EC 1.1.1.21) มีหน้าที่ควบคุมการสร้างไซโลสรีดักเทส คือ *XYL1* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล เป็นขั้นตอนแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลส โดยยีสต์ ไซโลสรีดักเทส อาจใช้ NADPH หรือ NADH เป็นโคเอนไซม์ แต่พบว่าส่วนใหญ่จะใช้ NADPH มากกว่า NADH เช่น ในยีสต์ *P. stipitis* มีอัตราส่วนกิจกรรมของ NADH/NADPH เท่ากับ 0.7 (Hagedorn and Ciriacy, 1989) แต่ในยีสต์ *C. boidinii* มีอัตราส่วนกิจกรรมของ NADH/NADPH อยู่ระหว่าง 2.0-5.9 โดยขึ้นอยู่กับอัตราการให้อากาศด้วย (Vandeska *et al.*, 1995) เอนไซม์ไซโลสรีดักเทสถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยไซโลส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Yablochkova *et al.* (2003) ศึกษากิจกรรมและความจำเพาะต่อการใช้โคเอนไซม์ของไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ในยีสต์จีสต์ *Candida, Kluyveromyces, Pachysolen, Pichia* และ *Torulopsis* พบว่ายีสต์มีกิจกรรมของไซโลสรีดักเทสอยู่ระหว่าง 0.11 ถึง 10.37 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีกิจกรรมของไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 13.53 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แสดงในตารางที่ 1 ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ที่ผลิตไซลิทอล ได้แก่ *C. didensiae, C. intermediae, C. parapsilosis, C. silvanorum, C. tropicalis, K. fragilis, K. marxianus, P. guillermundii,* and *T. molishiana* มีความจำเพาะกับ NADPH ส่วนในยีสต์ที่ผลิตเอทานอล ได้แก่ *P. stipitis, C. shehatae,* and *Pa. tannophilus* สามารถใช้ทั้ง NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์



ภาพที่ 1 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลดี-ไซโลสโดยยีสต์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Winkelhausen and Kuzmanova (1998)

Hye *et al.* (2010) ศึกษาาระดับการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส ของยีสต์ *P. stipitis* เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีกลูโคสและไซโลส วัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR พบระดับการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง *P. stipitis* ในสภาวะที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่กลูโคสไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสอง พบว่าระดับการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไซโลสความเข้มข้น 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร แม้ว่าการแสดงออกของยีนไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสภาวะที่เติมไซโลส แต่การแสดงออกไม่เพิ่มขึ้นแม้ว่าจะเติมไซลิตอลลงไปในการเลี้ยงเชื้อก็ตามสรุปว่ายีนไซโลสรีดักเทสถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกโดยไซโลส

ตารางที่ 1 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสในยีสต์ชนิดต่างๆ

Yeast species and strain	Specific activity, $\mu\text{mol}/(\text{min mg protein})$			
	Xylose reductase		Xylitol dehydrogenase	
	NADPH	NADH	NAD ⁺	NADP ⁺
<i>Candida didensiae</i> , F-3	0.63	0.03	0.40	<0.01
<i>C. intermediae</i> , TabII (85)	4.74	0.16	3.62	0.21
<i>C. parapsilosis</i> , 42	0.90	0.04	0.01	<0.01
<i>C. silvanoru</i> , VGI-II	5.10	0.26	4.11	0.21
<i>C. tropicalis</i> , Y-456	6.43	0.14	1.10	0.06
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , Y-488	0.16	<0.01	0.04	<0.01
<i>Pichia guilliermondii</i> , Y-1017	0.61	0.02	0.18	<0.01
<i>Torulopsis molishiana</i> , 55	0.11	<0.01	0.01	<0.01
<i>Pachysolen tannophilus</i> , Y-1532, Y-1533, Y-1634	2.00-2.10	1.39-1.56	4.04-5.26	0.01-0.012
<i>C. shehatae</i> , Y-1632	3.40	4.93	13.53	0.42
<i>P. stipitis</i> , Y-2160	4.84	10.37	8.37	0.27

ที่มา: คัดแปลงจาก Yablochkova *et al.* (2003)

2. เอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH)

เอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (EC 1.1.1.9) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง ของไซโลสเมแทบอลิซึม ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสออกซิไดส์ไซลิตอลไปเป็นไซลูโลส ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนสที่พบในคน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของยีสต์ ยีนสำหรับควบคุมการสร้างไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส คือ *XYZ2* ดี-ไซโลสสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส แต่พบว่า แอล-อะราบิโนส จะกระตุ้นเฉพาะการแสดงออกของยีนไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสเท่านั้น (Kern *et al.*, 1996) ขณะที่พบว่าไซลิตอลไม่มีบทบาทในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสเลย เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida tenuis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดและเพปโตน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของไซโลสรีดักเทส และไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสได้ดีกว่า เมื่อใช้ยูเรียและแอมโมเนียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน (Kern *et al.*, 1997) ในยีสต์ *Pichia stipitis* นั้นพบว่าการทำงานของไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสลดลง เมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนจำกัด เมื่อเลี้ยงยีสต์ *C. shehatae* ในสภาวะที่จำกัดปริมาณออกซิเจน จะมีผลต่อการทำงานของไซโลสรีดักเทส และไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสเพียงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงเซลล์ของ *C. shehatae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส จะยับยั้งการทำงานของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส แต่เอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส ยังคงทำงานได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีทั้งไซโลสและกลูโคส และมีประสิทธิภาพเท่ากับเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแต่ไซโลสเพียงอย่างเดียว (Skoog and Hahn-Hagerdal, 1990) อย่างไรก็ตาม กลูโคสอาจยับยั้งวิถีเมแทบอลิซึมของไซโลส เนื่องจากเซลล์ยีสต์จะยังไม่นำไซโลสเข้าไปในเซลล์ จนกว่าจะใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดก่อน นอกจากสารอาหารแล้วพบว่า ปริมาณของออกซิเจนและโคแฟกเตอร์ มีผลในการควบคุมการทำงานของไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส เช่นเดียวกัน

3. เอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase, XK)

เอนไซม์ไซลูโลไคเนส (EC 2.7.1.17) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สามของวิถีไซโลสเมแทบอลิซึม โดยจะเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ไซลูโลส แล้วเปลี่ยนไปเป็น xylulose-5-phosphate ยีนสำหรับควบคุมการสร้างเอนไซม์ไซลูโลไคเนส คือ *XKS1*

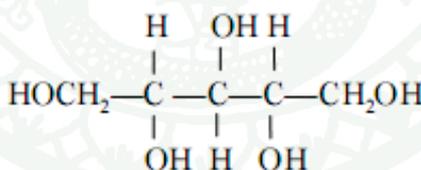
4. เอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase)

เอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส เป็นเอนไซม์ที่พบมากในแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* ซึ่งจะใช้เอนไซม์นี้ ในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลส มีรายงานการพบเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสใน aerobic yeast บางชนิดที่ใช้ไซโลสได้ และยีสต์ *Candida* sp. สายพันธุ์ที่มีการสะสมไขมัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนของเอนไซม์นี้ ในการผลิตเอทานอลจากไซโลสโดยยีสต์

ไซลิทอล

1. คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์โมเลกุลเดี่ยวของไซโลส โครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอนห้าอะตอม (ภาพที่ 2) สูตรโมเลกุล คือ $C_5H_{12}O_5$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 152.1 ลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว รสชาติหวาน ไม่มีกลิ่น และไม่มีคุณสมบัติเบี่ยงเบนแสง ไซลิทอลจัดเป็นสารมัลติคาร์โบไฮเดรตเมแทบอลิซึมของมนุษย์และสัตว์ และอาจพบไซลิทอลทั่วไปในพืชหลายชนิด (Emodi, 1978)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของไซลิทอล

ที่มา: Emodi (1978)

ไซลิทอลมีความหวานมากกว่าแมนนิทอล 2.5 เท่า และมากกว่าซอร์บิทอล 2 เท่า โดยเมื่อเปรียบเทียบกับซูโครสแล้ว ไซลิทอลมีความหวานเท่ากับ 0.85-1.25 เท่าของซูโครส ไซลิทอลมีประโยชน์ทางด้านอาหาร เกษตรกรรม และทันตกรรม เช่น ใช้เป็นสารให้ความหวานในหมากฝรั่ง เครื่องดื่ม ไอศกรีม และสามารถใช้กับคนที่เป็นโรคเบาหวาน เป็นต้น เนื่องจากเป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีต่ำ คือ ไซลิทอล 1 กรัม ให้พลังงานเท่ากับ 4.06 กิโลแคลอรี (สาวิตรี, 2549;

Emodi, 1978; Kim *et al.*, 1998) ในด้านทันตกรรมนั้น ไซลิทอลเป็นสารที่เบคทีเรียในช่องปาก *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้และไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดได้ จึงเป็นการช่วยรักษาค่าพีเอชในช่องปากให้มีความสมดุล ช่วยลดสาเหตุของฟันผุและป้องกันการทำลายสารเคลือบฟันได้ (Sellman, 2003) ในทางเภสัชกรรม ไซลิทอลช่วยรักษาโรค Osteoporosis ช่วยเพิ่มความหนาแน่นของกระดูก เนื่องจากไซลิทอลจะส่งเสริมการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้ และยังมีการศึกษาการใช้หมากฝรั่งที่มีส่วนผสมของไซลิทอลช่วยรักษาอาการหูดักเสบในเด็กได้ (Sellman, 2003; Uhari *et al.*, 1996)

2. การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

ไซลิทอลพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น พืช และผลไม้ เป็นต้น แต่มีปริมาณของไซลิทอลน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสที่พบในน้ำอ้อยและหัวผักกาดหวาน ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตไซลิทอลจากสารสกัดในธรรมชาติเป็นไปได้ยาก กระบวนการผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเคมี และชีววิทยาจะให้ปริมาณไซลิทอลมากกว่า (Nigam and Singh, 1994)

กระบวนการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเคมี จากวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบของดี-ไซโลส ได้แก่ ไซแลน และลิกโนเซลลูโลส ได้ผลผลิตเพียง 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และการทำผลผลิตให้บริสุทธิ์ต้องใช้กระบวนการหลายขั้นตอน ส่วนการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ โดยเฉพาะในยีสต์ *Candida* และ *Debaryomyces* จะต้องมีกระบวนการหมักในสภาวะที่เหมาะสม จึงทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ได้แก่ สารตั้งต้น, โคซับสเตรต, ออกซิเจน และอุณหภูมิ (Sampaio *et al.*, 2003)

การผลิตไซลิทอลโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายของ *Candida tropicalis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตไซลิทอลจากดี-ไซโลส ได้ผลผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ โดยในกระบวนการผลิตมีการใช้กลีเซอรอลเป็นโคซับสเตรต พบว่าเมื่อใช้ดี-ไซโลส 50 กรัมต่อลิตร และกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไซลิทอลได้ 3.2 กรัมต่อลิตร หรือ 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอัตราการให้ออกซิเจนจะส่งผลให้อัตราการผลิตเพิ่มขึ้น (Ko *et al.*, 2006)

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับไซโลสเมแทบอลิซึมของยีสต์

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ในไซโลสเมแทบอลิซึมของยีสต์ ได้แก่ ยีนไซโลสรีดักเทส, ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส และไซลูลโคเคนส โดยเฉพาะไซโลสรีดักเทสที่มีการศึกษาคูณสมบัติศึกษาการโคลนและแสดงออกของยีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ไซโลสได้เพิ่มขึ้น ดังนี้

Billard *et al.* (1995) ศึกษา ยีนไซโลสรีดักเทส-ของยีสต์ *Kluyveromyces lactis* โดยการเชื่อมต่อยีนไซโลสรีดักเทสเข้ากับพลาสมิดที่มีส่วนของยีน *lacZ* อยู่ พบว่า ยีนไซโลสรีดักเทสที่ศึกษา ประกอบด้วย 987 นิวคลีโอไทด์ และแปลไปเป็นกรดอะมิโนจำนวน 329 กรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส จาก *K. lactis* นั้นคล้ายคลึงกับของ *Pichia stipitis* ประมาณ 62 เปอร์เซ็นต์ และถ้าทำให้ยีน *XYL1* สูญเสียการทำงานไป ยีสต์จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไซโลส

Yokoyama *et al.* (1995) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Candida tropicalis* พบ open reading frame ของยีนนี้มีความยาวเท่ากับ 927 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 324 กรดอะมิโน ประกอบเป็นสายโปรตีนที่มีขนาด 36 กิโลดาลตัน และพบว่ายีนไซโลสรีดักเทสมีความคล้ายคลึงกับยีนไซโลสรีดักเทสของ *P. stipitis* เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์

Kristine *et al.* (1996) ศึกษา ยีนไซโลสรีดักเทส ของยีสต์ *Pichia stipitis* แล้วแทรกเข้าไปใน พลาสมิด pXOR และเพิ่มจำนวนใน *P. stipitis* จากนั้นนำ *P. stipitis* ที่มีพลาสมิด pXOR และ *P. stipitis* ที่มีพลาสมิด pJM6 (ไม่มียีนไซโลสรีดักเทส) มาเลี้ยงบนอาหารที่มีไซโลส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ พบว่าสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pXOR จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสเพิ่มขึ้นมากกว่าในสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pJM6 1.8 เท่า และปริมาณของออกซิเจนที่จำกัด จะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และจำกัดปริมาณออกซิเจน พบว่า ในสายพันธุ์ที่มี pXOR มีกิจกรรมของไซโลสรีดักเทส มากกว่าสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pJM6 ถึง 10 เท่า แต่พบว่าการผลิตเอทานอลไม่เพิ่มขึ้นและผลิตได้น้อยลงกว่าเดิมเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ควบคุม

Walfridsson *et al.* (1997) ทดลองถ่ายโอนยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นยีนสำหรับการสังเคราะห์ไซโลสรีดักเทส (XR) และไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (XDH) ตามลำดับ ของ *Pichia stipitis* CBS 6054 ไปยังยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยยีนไซโลสรีดัก-

เทศ และไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ถูกแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ Yep24 ซึ่งมีส่วนโปรโมเตอร์ของยีนสำหรับสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 1 (ADHI) และ ฟอสโฟกลีเซอเรตไคเนส (PGKI) เป็นส่วนควบคุมการทำงานของยีนไซโลสรีดักเทศและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ทำให้ได้ยีสต์สายพันธุ์ Yep-XYL1-XYL2 ที่แตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะ โดยวัดได้จากความแตกต่างของกิจกรรมจำเพาะของไซโลสรีดักเทศและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ผลการถ่ายโอนยีนทั้งสอง เข้าใน *S. cerevisiae* พบว่า *S. cerevisiae* ที่มียีนไซโลสรีดักเทศและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส มีอัตราการใช้ไซโลสเพิ่มขึ้นจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ดั้งเดิม และยีสต์สายพันธุ์ที่มียีนไซโลสรีดักเทศและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส นั้นยังส่งเสริมให้มีการแสดงออกของยีนสำหรับสร้างเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และ ทรานส์แอลโดเลส เพิ่มขึ้นอีกด้วย

Handumrongkul *et al.* (1998) ศึกษาลักษณะเฉพาะของยีนไซโลสรีดักเทศจาก *Candida guilliermondii* โดยการโคลนยีนและให้มีการแสดงออกของยีนใน *P. pastoris* พบ open reading frame ของยีนเท่ากับ 954 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 317 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 36 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนไซโลสรีดักเทศของ *C. guilliermondii* มีความคล้ายคลึงกับ *P. stipitis* เท่ากับ 70.4 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ ไรคอมบิแนนท์สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 7.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตได้มากกว่า *C. guilliermondii* เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศ

Suzuki *et al.* (1999) ศึกษายีนไซโลสรีดักเทศของ *C. tropicalis* โดยการโคลนยีนไซโลสรีดักเทศเข้าไปในพลาสมิด pUC19 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชื่อ pXRA จากนั้นทำให้ยีนไซโลสรีดักเทศแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* JM109 ซึ่งลักษณะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ใช้ไซโลสเป็นซับสเตรต และ NADPH เป็นโคเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *C. tropicalis* แต่เอนไซม์จากรีคอมบิแนนท์สามารถทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ใน *C. tropicalis* การแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทศใน *E. coli* สามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอลได้ จากความเข้มข้นของไซโลส 50 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังเติม IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย ทำให้ *E. coli* ที่มียีนไซโลสรีดักเทศ สามารถผลิตไซลิทอลได้ 13.3 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 20 ชั่วโมง

Jin *et al.* (2002) ศึกษาการขัดขวางการแสดงออกของยีนไซลูโลไคเนส (xylulokinase) จาก *P. stipitis* พบว่า *P. stipitis* สายพันธุ์กลายที่ถูกขัดขวางการแสดงออกของยีนไซลูโลไคเนสไม่

สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลสได้ แต่ยังคงใช้ไซโลสได้ในอัตราที่ช้าลง มีการสะสมไซลิตอลและอะราบิโนทอล เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนไซลูโลโคเนสและไซโปรโมเตอร์ของยีนไซลูโลโคเนส จาก *P. stipitis* ในรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ใช้ไซลูโลสได้เพิ่มขึ้น 3 เท่า และผลิตเอทานอลจากไซโลสและไซลูโลสได้ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ (ไม่ถูกแทรกด้วยยีนไซลูโลโคเนสจาก *P. stipitis*) มีการผลิตไซลิตอลเท่านั้น กิจกรรมของไซลูโลโคเนสในรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีพลาสมิดของยีนไซลูโลโคเนสแบบหลายชุด (multi-copy) มีกิจกรรมมากกว่า รีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีพลาสมิดของยีนไซลูโลโคเนสแบบชุดเดียว (single-copy) ถึง 6 เท่า แต่พบว่าการผลิตเอทานอลจะลดลง เมื่อมีจำนวนยีนไซลูโลโคเนสเพิ่มขึ้นในพลาสมิด

Lee *et al.* (2003) ศึกษาเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Candida parapsilosis* KFCC-10875 ที่สามารถผลิตไซลิตอลได้สูง พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ถูกควบคุมโดยยีนไซโลสรีดักเทส โดยไซโลสรีดักเทส ประกอบด้วย 324 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 36,629 ดาลตัน แต่การเลือกใช้โคเอนไซม์ (NADH หรือ NADPH) นั้นส่งผลต่อปริมาณของการผลิตไซลิตอล จึงศึกษายีนไซโลสรีดักเทส ของ *C. parapsilosis* KFCC-10875 โดยแทรกในพลาสมิด pAUR123 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยอาศัยไซโปรโมเตอร์ของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากนั้นทำให้มีแสดงออกของยีนในยีสต์ *C. tropicalis* ได้สายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ *C. tropicalis* BN-1 ที่สามารถผลิตไซลิตอลได้มากกว่า สายพันธุ์เดิมประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ และสร้างผลผลิตพลอยได้ คือ เอทานอลและกลีเซอรอล ลดลง นอกจากนี้พบว่าไซโลสรีดักเทสของ *C. tropicalis* BN-1 มีความจำเพาะต่อโคเอนไซม์ NADH และ NADPH เท่ากัน

Wang *et al.* (2007) ศึกษายีนไซโลสรีดักเทส (*XYL1*) จาก *C. shehatae* ที่นำมาโคลน และเหนี่ยวนำให้แสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยใช้พลาสมิด pMD-18T ได้รีคอมบิแนนท์ pMD-*XYL1* และทำเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี His6-tagged fusion protein โดยพบว่าใช้ดี-ไซโลสเป็นซับสเตรตได้ดีที่สุด และใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ได้ดีกว่า NADPH เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ 35 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 6.5

Zhang *et al.* (2009) ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทส เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *C. tropicalis* โดยโคลนยีนไซโลสรีดักเทสและทำให้แสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 หลังจากทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาศึกษาลักษณะเฉพาะของไซโลสรีดักเทส พบว่าเอนไซม์มีค่า K_m สำหรับ NADPH และ NADH เท่ากับ 45.5 และ 161.9 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไซโลสรีดักเทสของ *C. tropicalis* สามารถใช้ทั้ง NADPH

และ NADH เป็นโคเอนไซม์ และมีค่าประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic efficiency, kcat) สูงที่สุดในกลุ่มเอนไซม์อัลโดสรีดักเทส

นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงยีสต์ให้สามารถผลิตเอทานอลจากกลีโคเซอโลสได้ โดยส่วนใหญ่จะใช้แหล่งของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไซโลสเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่ใช้ไซโลสได้ โดยการโคลนยีนและทำให้มีการแสดงออกของยีนในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ดังนี้

Karhumaa *et al.* (2007) ปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* TMB3057 เพื่อให้ใช้ไซโลสได้ โดยทำให้มีการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสจาก *P. stipitis* และนอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในวิถี non-oxidative pentose phosphate พบว่ารีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* TMB3057 ผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นและสะสมไซลิตอลน้อยลง และยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในวิถี non-oxidative pentose phosphate ที่เพิ่มขึ้นนั้น ส่งผลให้มีอัตราการใช้ไซโลสเพิ่มขึ้นด้วย

Watanabe *et al.* (2007) ปรับปรุงให้รีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสจาก *P. stipitis* ผลิตเอทานอลจากไซโลสได้เพิ่มขึ้น โดยทำให้เกิดการกลายของยีนไซโลสรีดักเทส ด้วยวิธี site-direct mutagenesis เพื่อให้ไซโลสรีดักเทสสามารถใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ได้ดีขึ้น พบว่าสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น 5.1 เปอร์เซ็นต์ และผลิตไซลิตอลลดลง 31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่ไม่เกิดการกลายของยีนไซโลสรีดักเทส

Zhang *et al.* (2010) ศึกษาการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสในรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* เพื่อกระบวนการหมักเอทานอลจากไซโลส โดยใช้ยีนไซโลสรีดักเทสของ *C. shehatae* และยีนไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสของ *P. stipitis* กิจกรรมของไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสของรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* สูงกว่าของ *C. shehatae* และ *P. stipitis* รีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสจาก *C. shehatae* มีการผลิตเอทานอลสูงกว่า รีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสและไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส แต่ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่าเล็กน้อย และมีการผลิตไซลิตอลเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากไซโลสรีดักเทสใน *C. shehatae* ใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์มากกว่า NADH ในขณะที่

ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสใช้ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ จึงทำให้เกิด redox imbalance ส่งผลให้มีการสะสมไซลิทอลมากขึ้น

การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอล

วิธีการปรับปรุงยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอล โดยการโคลนยีนยีนที่ควบคุมสร้างเอนไซม์ในกระบวนการไซโลสเมแทบอลิซึมในยีสต์ ได้แก่ ยีนไซโลสรีดักเทส ด้วยการเพิ่มจำนวนชุดของยีน, ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส และไซลูโลโคเนส ด้วยการขัดขวางการทำงานของยีนทั้งสอง ดังนี้

Chung *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตไซลิทอลของรีคอมบิแนนท์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสจาก *P. stipitis* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH* promoter) และ *GAPDH* terminator ซึ่งใช้ดีเอ็นเอพาหะ 2 ชนิด ได้แก่ pD-neo ที่เป็นดีเอ็นเอพาหะที่แทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *S. cerevisiae* และพลาสมิด pY2 เป็นพลาสมิดที่เพิ่มจำนวนแบบอิสระ เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกทั้งสองแบบเพื่อผลิตไซลิทอลในอาหารที่มีกลูโคสแบบจำกัด พบว่ารีคอมบิแนนท์ที่มียีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่บนโครโมโซมมีการผลิตไซลิทอลมากกว่ารีคอมบิแนนท์ที่มียีนไซโลสรีดักเทสในพลาสมิด pY2 ถึง 1.7 เท่า จากรายงานนี้พบว่าสามารถพัฒนาสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ที่มียีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่บนโครโมโซมทำให้ยีนไซโลสรีดักเทสนั้นมีความเสถียรและมีระดับการแสดงออกของยีนสูง

Jin *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตไซลิทอลของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Pichia stipitis* ที่ถูกขัดขวางการแสดงออกของยีนไซลูโลโคเนส (Jin *et al.*, 2002) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสในสภาวะที่มีอากาศและให้ออกซิเจนอย่างจำกัด สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีขึ้นและผลิตเอทานอลได้เพียงเล็กน้อย และมีอัตราการใช้ไซโลสเพิ่มขึ้น 5 เท่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหายใจของเซลล์ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ไซโลสในเซลล์เพิ่มขึ้น สายพันธุ์กลาย *P. stipitis* สามารถผลิตไซลิทอลได้ 26 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.22 กรัมไซลิทอลต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

Ko *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตไซลิทอลจากคี-ไซโลส โดยยีสต์สายพันธุ์กลาย *Candida tropicalis* ที่มีส่วนของยีน *XYL2* สำหรับผลิตเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ซึ่งยีนถูกขัดขวางการแสดงออกโดยวิธี Ura-blasting พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย BSXDH-3 ไม่สามารถเจริญบนอาหาร minimal medium ที่เติมไซโลสได้ และตรวจไม่พบกิจกรรมของไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส การผลิตไซลิทอลจะใช้น้ำตาลกลูโคสและกลีเซอรอลเป็นโคซับสเตรต ซึ่งพบว่ากลีเซอรอลเป็นโคซับสเตรตที่ดีที่สุด และยีสต์สายพันธุ์กลาย BSXDH-3 ผลิตไซลิทอลได้ 30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอลถึง 98 เปอร์เซ็นต์

Yoon *et al.* (2010) ศึกษาการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ *C. tropicalis* โดยการแทนที่ยีนไซโลสรีดักเทสดั้งเดิมของ *C. tropicalis* ซึ่งผลิตเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่ใช้ L-arabinose เป็นซับสเตรตได้ ถูกแทนที่ด้วยยีนไซโลสรีดักเทสจาก *Neurospora crassa* ที่มีความจำเพาะต่อการใช้ไซโลสเป็นซับสเตรต และแทรกยีนที่สร้างเอนไซม์ L-arabinose isomerase, L-ribulokinase และ L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase จากแบคทีเรีย เพื่อให้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้สามารถใช้ไซโลสจากลิกโนเซลลูโลสเพื่อผลิตไซลิทอล และใช้อะราบินโนสจากลิกโนเซลลูโลสโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ถูกแทรกเข้าไป เมื่อวิเคราะห์กระบวนการผลิตไซลิทอลพบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายสามารถผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้น 16 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

นอกจากการควบคุมยีนที่สร้างเอนไซม์ในกระบวนการไซโลสเมแทบอลิซึมโดยการโคลนยีนแล้ว ยังมีรายงานปรับปรุงยีสต์ให้ผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นได้ โดยการใช้รังสียูวีเพื่อให้เกิดสายพันธุ์กลายที่ผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้น

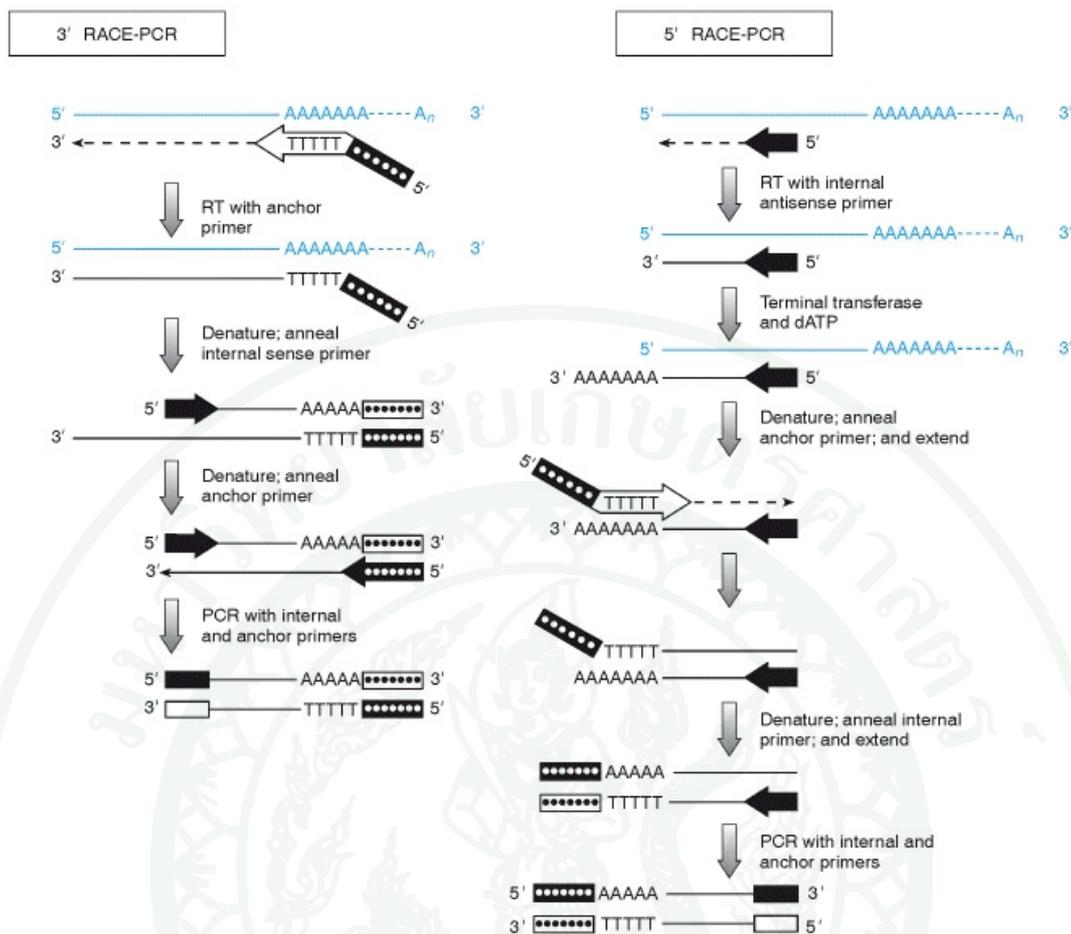
Rao *et al.* (2006) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ *C. tropicalis* โดยทำให้เกิดการกลายด้วยรังสียูวี และสาร *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitroso guanidine (MNNG) พบสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสียูวีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ UV1 ผลิตไซลิทอลได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งผลิตไซลิทอลได้ 0.81 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ต่อมานำ UV1 มาทำให้เกิดการกลายด้วย MNNG ได้สายพันธุ์กลาย CT-OMV5 ผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 0.85 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในอาหาร YEPX (ยีสต์สกัด, เปปโตน และไซโลส) และผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.87 กรัมต่อกรัมไซโลส ในอาหารสำหรับกระบวนการหมักไซโลสที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สายพันธุ์กลาย CT-OMV5 มีคุณสมบัติแตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทั้งทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบกิจกรรมเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของสายพันธุ์กลาย CT-OMV5 เท่ากับ 12.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมากกว่า สายพันธุ์ดั้งเดิมที่พบกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 9.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Kumar *et al.* (2010) ปรับปรุงยีสต์ *C. tropicalis* OVC5 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอล โดยการเหนี่ยวนำให้ยีสต์เกิดการกลายด้วยรังสียูวี พบสายพันธุ์กลาย CT-UV₂₀ ผลิตไซลิทอลได้มากที่สุดเท่ากับ 0.78 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส เมื่อนำสายพันธุ์กลาย CT-UV₂₀ มาทำให้เกิดการกลายซ้ำด้วย *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso guanidine (MNNG) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างไซลิทอลดีไฮโดรจีนเนส ได้สายพันธุ์กลายจำนวน 5 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไซลิทอลพบว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการกลายซ้ำด้วย MNNG ผลิตไซลิทอลได้ระหว่าง 0.1 ถึง 0.24 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ซึ่งน้อยกว่าสายพันธุ์กลาย CT-UV₂₀ แต่เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายที่ทำให้เกิดการกลายด้วย MNNG ในอาหารที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้นเป็น 0.59 ถึง 0.89 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส

การโคลนยีนด้วยวิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) ในยีสต์

วิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) เป็นวิธีการที่พัฒนาเทคนิคทางพีซีอาร์ เพื่อการโคลนบริเวณปลายด้าน 5' และ 3' ของ cDNA ที่ยังไม่รู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ต้องรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ที่สนใจศึกษา เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในการโคลนหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนที่สนใจได้ (Schaefer, 1995) ดังภาพที่ 3

มีการใช้เทคนิค RACE มาใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทส ได้แก่ Lee *et al.* (2003) ศึกษาไซโลสรีดักเทสจากยีสต์ *Candida parapsilosis* โดยใช้เทคนิค 5' and 3' RACE แล้วพบ open reading frame ของยีนไซโลสรีดักเทสที่มีความยาวเท่ากับ 975 นิวคลีโอไทด์ แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 324 กรดอะมิโน Fernandes *et al.* (2009) ศึกษายีนไซโลสรีดักเทสของ *Talaromyces emersonii* ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนไซโลสรีดักเทสด้วยวิธี 5' and 3' RACE โดยพบ open reading frame ขนาดเท่ากับ 960 นิวคลีโอไทด์ แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 320 กรดอะมิโน และในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) จากเชื้อรา *Orpinomyces* โดย Madhavan *et al.* (2008) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสไอโซเมอเรส เมื่อใช้วิธี 5' and 3' RACE ขนาดเท่ากับ 1,314 นิวคลีโอไทด์ และแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 437 กรดอะมิโน



ภาพที่ 3 หลักการทำงานของวิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) 3' RACE-PCR เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ของ cDNA และ 5' RACE-PCR เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ cDNA

ที่มา: Strachan and Read (1999)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิค RACE มาศึกษากับยีนไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ได้แก่ Ko *et al.* (2006) ศึกษาการขัดขวางการแสดงออกของยีนไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสของยีสต์ *C. tropicalis* ATCC 20913 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอล ซึ่งต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสก่อน ด้วยวิธี 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับ 5' RACE และ 3' RACE จากนั้นจึงขัดขวางการแสดงออกของยีนไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Ura-blasting

การศึกษาของ Zhang *et al.* (2008) ใช้วิธี 5' and 3' RACE ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ω^3 -fatty acid desaturase ของเมทิลโดโทรฟิคีสต์ *Pichia pastoris* เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' RACE และ 3' RACE พบ open reading frame ความยาว 1,248 นิวคลีโอไทด์ และแปลลงเป็นกรดอะมิโนได้ 415 กรดอะมิโน



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 ยีสต์ *Ogataea siamensis* N22 ใช้เป็นแหล่งของโครโมโซม เพื่อใช้ในการโคลนและเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนไซโลสตรัคเทส

1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli* XL1-blue ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนไซโลสตรัคเทส

1.3 พลาสมิด pJET1.2/blunt vector (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับการโคลนยีนไซโลสตรัคเทส เข้าสู่ *E. coli* XL1-blue

1.4 แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B

1.5 พลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Dr. Hiroya Yurimoto, Kyoto University, Japan) เป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกของยีนไซโลสตรัคเทสในยีสต์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

2.1 yeast extract peptone dextrose (YPD) broth

2.2 yeast extract peptone dextrose (YPD) agar

2.3 yeast extract peptone dextrose with sorbitol (YPDS) agar

2.4 yeast extract peptone + 2 % xylose (YPX) broth

2.5 Luria-Bertani (LB) broth

2.6 Luria-Bertani (LB) agar

3. สารเคมี

3.1 สารละลาย SZB (ภาคผนวก)

3.2 สารละลาย SDS-TE (ภาคผนวก)

- 3.3 สารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์
- 3.4 สารละลาย ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์
- 3.5 สารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์
- 3.6 สารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 5 โมลาร์
- 3.7 Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) (ภาคผนวก)
- 3.8 Isopropanol
- 3.9 Absolute ethanol
- 3.10 70% ethanol
- 3.11 dNTPs (Fermentas, USA)
- 3.12 6x loading buffer (fermentas, USA)
- 3.13 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA)
- 3.14 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA)
- 3.15 Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (ภาคผนวก)
- 3.16 Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (ภาคผนวก)
- 3.17 Ampicillin
- 3.18 สารละลาย solution I, II และ III (ภาคผนวก)
- 3.19 สารละลาย transformation and storage solution (TSS) (ภาคผนวก)
- 3.20 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, USA)
- 3.21 สารละลาย sorbitol ความเข้มข้น 1 โมลาร์
- 3.22 Phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ 0.05 โมลาร์
- 3.23 สารละลาย D-xylose ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์
- 2.24 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์
- 2.25 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์

4. เอนไซม์

- 4.1 Zymolyase 20T (Seikagaku biobusiness, Japan)
- 4.2 *Bsp*143I (Fermentas, USA)
- 4.3 T4 DNA ligase (Fermentas, USA)
- 4.4 Taq DNA polymerase (Fermentas, USA)
- 4.5 Expand High fidelity (Roch, Germany)

4.6 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan)

4.7 *Bgl*III (Fermentas, USA)

4.8 *Sfi*I (Fermentas, USA)

4.9 *Eco*RI (Fermentas, USA)

5. อุปกรณ์อื่นๆ

5.1 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

5.2 CloneJetTM PCR Cloning Kit (Fermentas, USA)

5.3 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Germany)

5.4 Gradient PCR (PX2 Thermo Cycle, Thermo electron corporation, USA)

5.5 GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied biosystem, USA)

5.6 เครื่องถ่ายภาพเจล Transilluminator MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel)

5.6 Mini beads beater (Biospec Product, Japan)

5.7 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ visible light (GENESYS 20 Thermo Spectronic, USA)

5.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ UV light (UV-800 spectrophotometer, Hitachi, Japan)

5.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Labnet, USA)

5.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (CR3i, Jouan, USA)

5.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Spectrafuge, Labnet, USA)

5.12 ตู้ปลอดเชื้อ

5.13 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (JEIO TECH, Korea)

5.14 ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Mettler, Germany)

5.15 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Sanyo, Japan)

วิธีการ

1. การตามหาอินไซโลสรีดักเทศจากยีนอมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22

1.1 การตัดยีนอมิกดีเอ็นเอของ *Ogataea siamensis* N22 ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

1.1.1 การสกัดยีนอมิกดีเอ็นเอ

นำเซลล์ยีสต์มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Higgin and Cregg (1998) เพาะยีสต์ *O. siamensis* N22 ในอาหารเหลว YPD (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ควรได้ความเข้มข้นของเซลล์ ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 5-10 OD₆₀₀ U/ml) เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย SZB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ถึง 40 นาที เติมสารละลาย SDS-TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที ตกตะกอนโปรตีนด้วย 5 โมลาร์ potassium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสหลอดใหม่ ตกตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วยการเติม 5 โมลาร์ ammonium acetate ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ 100 เปอร์เซ็นต์ isopropanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ใน -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 18 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ตกตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยการเติม RNaseA (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จากนั้นกำจัดโปรตีนโดยการเติม 5 โมลาร์ sodium chloride ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ protenaseK (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที แล้วเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใสหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์ sodium acetate พีเอช 5.3 ปริมาตร 0.1 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่า แช่สารละลายใน -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปราศจากนิวคลีเอส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.2 การตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 แบบกึ่งสมบูรณ์

นำยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ที่ได้จากข้อ 1.2.1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* หรือ *Sau3AI* (Fermentas, USA)

1.1.2.1 การหาอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส

เจือจางยีนโนมิกดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ *Bsp143I* และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยบรรจุหลอดแรกปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหลอดที่ 2-9 ปริมาตรหลอดละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Bsp143I* ความเข้มข้น 5 ยูนิต ในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายส่วนผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากหลอดที่ 1 ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ถ่ายส่วนผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดถัดไปจนครบ จากนั้นบ่มส่วนผสมทั้ง 9 หลอด ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.1.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมในปริมาณมาก

ทำการย่อยยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* ตามอัตราส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 1.3.1.1 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบสให้จำนวนมากขึ้น ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอจากเจลต่อไป

1.1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเจล

สกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วยชุด Gel/PCR DNA fragments extraction kit (GeneAid, Taiwan) โดยนำชิ้นเจลที่ตัดได้ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม DF buffer 500

ไมโครลิตร บ่มบอย่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 10 นาที หรือจนกว่าจะละลายหมด คูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน DF column ที่สวมอยู่บน 2 มิลลิลิตร collection tube หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย ใส่ DF column กลับเข้าที่เดิม เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย หมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที ถ่าย DF column ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากนิวคลีเอส 20-30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที ทิ้ง DF column และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส เข้าเซลล์แบคทีเรีย

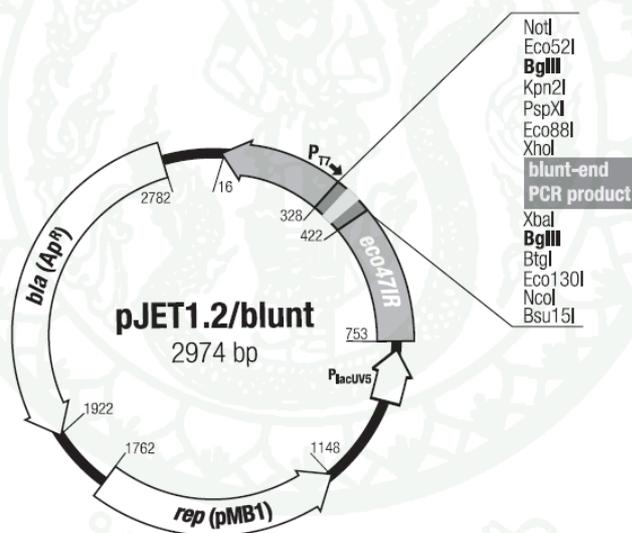
นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบสที่สกัดได้จากข้อ 1.1.3 เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pJET1.2/blunting cloning vector (Fermentas, USA) และถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* XL1 Blue ดังนี้

1.2.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* XL1 Blue

ทำตามวิธีของ Chung et al. (1989) โดยเพาะเลี้ยง *E. coli* XL1 blue ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที จนได้ความเข้มข้นของเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.3-0.6 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง แช่ในน้ำแข็ง 20 นาที ปั่นเหวี่ยงเซลล์ ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยอาหารเหลว LB 2 ครั้ง เติม TSS (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพิเทนต์เซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสม

ใช้อุปกรณ์ CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) ทำตามวิธีการในคู่มือ เตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โคลนให้เป็นดีเอ็นเอปลายทู่ โดยผสม 2X reaction buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ชิ้นดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรเป็น 18 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอไซด์ผสมให้เข้ากัน บ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม pJET1.2/blunting cloning vector (แผนภาพพลาสมิดแสดงในภาพที่ 4) ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที



ภาพที่ 4 แผนภาพพลาสมิด pJET1.2/blunt (2,947 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ = rep (pMB1), ampicillin resistant gene = bla (Ap^R), lethal gene = *eco47IR*, P_{lacUV5} โปรโมเตอร์สำหรับ *eco47IR* gene และ T7 promoter

ที่มา: คู่มือสำหรับการใช้งาน CloneJet™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA)

1.2.3 ถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *E. coli* XL1 blue โดยใช้วิธี heat-shock (Sambrook *et al.*, 1989) นำพลาสมิดสายผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับคอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* XL1Blue ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมหอาหารเหลว LB จนครบ 1 มิลลิลิตร บ่มเขย่าเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารไว้ศึกษาต่อไป

1.2.4 สกัดพลาสมิดจาก *E. coli*

สกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) โดยเฉพาะเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย เติมสารละลาย solution I (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที เติมสารละลาย solution II (ภาคผนวก ข) ที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย solution III (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 3 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรเท่าส่วนใส หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสข้างบนใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหรือข้ามคืน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเอทานอลที่เย็นจัดความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ดูดของเหลวทิ้ง ตกตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโลสรีดักเทศ

1.3.1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (amino acid alignment) ของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศ จากยีสต์ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia guilliermondii*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tenuis*, *Kluyveromyces lactis* และ *Pachysolen tannophilus* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ที่เว็บไซต์ <http://ncbi.nlm.nih.gov> โดยเลือกบริเวณอนุรักษ์หัวและท้าย (5' และ 3') ของยีนไซโลสรีดักเทศ

1.3.2 ลด degeneracy ของการออกแบบไพรเมอร์โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน โดยเลือกใช้ codon usage เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนไซโลสรีดักเทศ ของยีสต์จากฐานข้อมูล เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนหัว (ปลาย 5') ออกแบบเป็น forward primer และลำดับนิวคลีโอไทด์ท้ายยีน (ปลาย 3') ออกแบบเป็น reverse primer

1.3.3 วิเคราะห์สมบัติของไพรเมอร์ ได้แก่ ค่า Tm (melting temperature), GC content, โครงสร้าง hair pin ด้วยโปรแกรม NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/servlet/com.pbi.crm.clientside.FreeToolLoginServlet>)

1.4 การเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศบางส่วนจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *Ogataea siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

1.4.1 การเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนไซโลสรีดักเทศ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง gradient PCR (PX2 Thermo Cycle, Thermo electron corporation, USA) และเครื่อง GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied biosystem, USA) ปฏิบัติการประกอบด้วย ยีนโนมิกดีเอ็นเอ จากข้อ 2.1 ปริมาณ 20 นาโนกรัม, 10x PCR buffer, MgCl₂ 1.5-4 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ (ไพรเมอร์หัวยีนและท้ายยีน) อย่างละ 10 พิโคโมล และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) 0.5 ยูนิต ทำให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอเอส

สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 5 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	46-59 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2	จำนวน 30 รอบ
ขั้นตอนสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส 4 นาที

1.5 การตรวจหาอินไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.5.1 ตรวจหาอินไซโลสรีดักเทสบนพลาสติกสายผสม

ตรวจสอบอินไซโลสรีดักเทสบนพลาสติกสายผสมจากข้อ 1.2.4 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากโปรแกรม OsXRf55 และ OsXRr613 หรือ OsXRf55 และ OsXRr570 โดยใช้รอบพีซีอาร์ดังนี้

สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 5 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	50 หรือ 59 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2	จำนวน 30 รอบ
ขั้นตอนสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส 10 นาที

1.5.2 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer (fermentas, USA) แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder หรือ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA) โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อมใน ethidium bromide และ

ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง transilluminator MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel)

1.5.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดสายผสมทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base จำกัด ประเทศมาเลเซีย

1.5.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกันในฐานะข้อมูลใช้โปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) เมื่อต้องการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ ทำโดยการคัดเลือกข้อมูลในฐานะข้อมูลจำนวนหนึ่งมาทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) วิเคราะห์ความเหมาะสมของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) การประเมิน open reading frame โดยใช้โปรแกรม ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) การแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Translation tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>) เปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นสายคู่สมโดยโปรแกรม Reverse Complement (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/revcomp.html>) การหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://www.Firstmarket.com/cutter/cut2.html>) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้โปรแกรม VecScreen (www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html)

2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทศทางปลาย 3' จาก cDNA ของ *Ogataea siamensis* N22

2.1 การสังเคราะห์ cDNA

2.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด

สกัดอาร์เอ็นเอด้วย TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, USA) ตามวิธีในคู่มือของ TRIzol[®] Reagent Total RNA Isolation Reagent (Life technologies[™], USA) โดยเลี้ยง *O. siamensis* N22 ในอาหารเหลว YPX (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติม TRIzol[®] Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ เติม glass beads ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 ใน 3 ของ TRIzol[®] Reagent ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง mini beads beater (Biospec Product, Japan) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที 3 นาที ทำสลับกัน 5-6 รอบ หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดสารละลายใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จาก TRIzol[®] Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ด้วยมือประมาณ 15 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ตากตะกอนอาร์เอ็นเอประมาณ 10 ถึง 15 นาที (อย่าให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งจนเกินไป) จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอใช้ RNase away[™] (Molecular BioProducts, USA) ทำความสะอาดอุปกรณ์ เพื่อกำจัด RNase

2.2.2 สังเคราะห์สาย cDNA

นำอาร์เอ็นเอของ *O. siamensis* N22 มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดอุปกรณ์ 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Germany) องค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA synthesis buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร deoxynucleotide mixture ปริมาตร 2 ไมโครลิตร oligo dT-

anchor primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอสกัดได้จากข้อ 2.1.1 ความเข้มข้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัม transcriptor reverse transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำปราศจาก RNase ให้เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มส่วนผสมบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนยีน ไซโลสรีดักทีสทางปลาย 3' จาก cDNA ต่อไป

2.2 การเพิ่มจำนวนยีนยีนไซโลสรีดักทีสทางด้าน 3' ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

เพิ่มจำนวนยีนยีนไซโลสรีดักทีสทางด้าน 3' ด้วยเทคนิค 3' RACE จาก cDNA โดยใช้ ชุดอุปกรณ์ 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Germany) ปฏิกริยาประกอบด้วย cDNA จาก ข้อ 4.2.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, PCR anchor primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, OsXRf633 primer (ความเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, deoxynucleotide mixture ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Expand High fidelity ความเข้มข้น 3.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Roche, Germany) ปริมาตร 0.714 ไมโครลิตร, Expand High fidelity buffer ที่ผสม 15 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และปรับปริมาณด้วยน้ำปราศจาก nuclease ให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 5 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	63 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด โดยใช้ชุดอุปกรณ์ CloneJetTM PCR Cloning Kit สกัดพลาสมิดและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3. การแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสของ *Ogataea siamensis* N22 ในยีสต์

3.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์จากยีนโนมิกดีเอ็นเอ

3.1.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไซโลสรีดักเทสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน เพื่อเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์จากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ได้แก่ไพรเมอร์คู่ OsXRf-78 และ OsXRr959 ซึ่งเติมนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SfuI* เข้าไปที่ด้าน 5' ของไพรเมอร์ OsXRf-78 และเติมนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* เข้าไปที่ด้าน 5' ของไพรเมอร์ OsXRr959 วิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ ได้แก่ ค่า Tm (melting temperature), GC content, โครงสร้าง hair pin ด้วยโปรแกรม NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>)

3.1.2 การเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์จากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของยีนไซโลสรีดักเทส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied biosystem, USA) ประกอบด้วย 10X Ex TaqTM Buffer (ที่มี MgCl₂ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs Mixture (TaKaRa, Japan) (แต่ละ dNTPs เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ OsXRf-78 และ OsXRr959 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ชนิดละ 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.13 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณส่วนผสมทั้งหมดให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอเอส

สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 5 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	63 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ

ขั้นตอนสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด โดยใช้ชุดอุปกรณ์ CloneJet™ PCR Cloning Kit สกัดพลาสมิดและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2 การเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับพลาสมิดที่ใช้เพื่อการแสดงออกของยีนในยีสต์

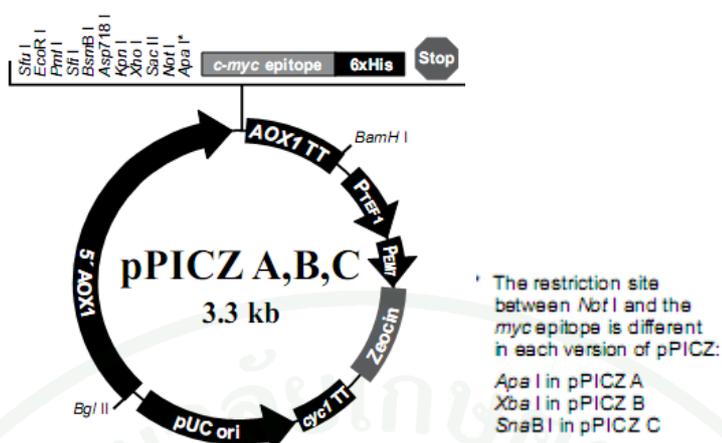
3.2.1 เชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์และพลาสมิดเพื่อการแสดงออก

3.2.1.1 การตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* และ *EcoRI* ปฏิกริยาประกอบด้วย 1X FastDigest® Green buffer ปริมาตร 13 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, FastDigest® *SfuI* (Fermentas, USA) และ FastDigest® *EcoRI* (Fermentas, USA) อย่างละ 1.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอไซด์ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกริยาโดยบ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที แยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดอุปกรณ์ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

3.2.1.2 การตัดพลาสมิดเพื่อการแสดงออก

พลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทส คือ pPICZ B (Invitrogen, USA) และ pGAPZ B (Invitrogen, USA) แผนภาพพลาสมิดแสดงดังภาพที่ 5 และ 6 ตามลำดับ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* และ *EcoRI* เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 และแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดอุปกรณ์ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

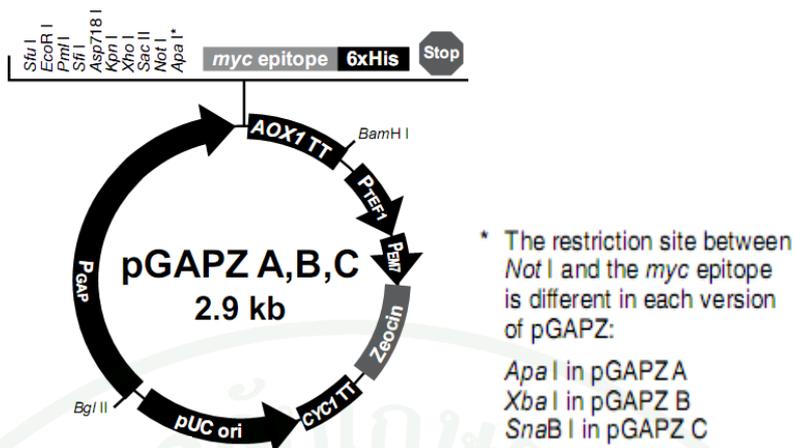


ภาพที่ 5 แผนภาพพลาสมิด pPICZ B (3.3 กิโลเบส) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลอง ดีเอ็นเอในแบคทีเรีย = pUC ori, Zeocin resistant gene = Zeocin, โปรโมเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน = 5' AOX1 และ terminator region ของการแสดงออกของยีน = AOX1TT

ที่มา: คู่มือสำหรับการใช้งาน pPICZ A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of recombinant proteins (Invitrogen, USA)

3.2.1.3 การเชื่อมต่อยีนไซโลสรีดักเทสกับพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B

นำยีนไซโลสรีดักเทส พลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 มาเชื่อมต่อกัน เพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมโดยให้อัตราส่วนชิ้นโคลนต่อพลาสมิดเท่ากับ 3 ต่อ 1 ปฏิบัติโดยประกอบด้วย 10x ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, ชิ้นยีนไซโลสรีดักเทส ความเข้มข้น 600 นาโนกรัม, พลาสมิด pPICZ B หรือ pGAPZ B ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม, T4 DNA ligase (Fermentas, USA) (ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสผสมให้เข้ากัน บ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที



ภาพที่ 6 แผนภาพพลาสมิด pGAPZ B (2.9 กิโลเบส) ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอในแบคทีเรีย = pUC ori, Zeocin resistant gene = Zeocin, โพรโมเตอร์สำหรับการแสดง ออกของยีน = P_{GAP} และ terminator region ของการแสดงออกของยีน = AOX1 TT

ที่มา: คู่มือสำหรับการใช้งาน pGAPZ A, B, and C pGAPZ A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins (Invitrogen, USA)

3.2.1.4 เพิ่มจำนวนพลาสมิดสายผสมใน *E. coli*

นำพลาสมิดสายผสมที่ได้จากข้อ 3.2.1.3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถ่ายโอนเข้าสู่คอมพิเทนตแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α วิธีการเตรียมคอมพิเทนตเซลล์และการถ่ายโอนพลาสมิด ตามวิธีในข้อ 1.2.1 และ 1.2.3 ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ Zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดสาย-ผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OsXRF-78 และ OsXRr959 ตามวิธีในข้อ 3.1.2

3.2.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าเซลล์ยีสต์

3.2.2.1 การเตรียมคอมพิเทนตเซลล์ยีสต์

เตรียมคอมพิเทนตเซลล์ยีสต์ตามวิธีในคู่มือของ pPICZ A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of recombinant proteins

(Invitrogen, USA) โดยเพาะเลี้ยง *O. siamensis* N22 ในอาหาร YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หรือจนเซลล์มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.3-1.5 เก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เย็นจัด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เย็นจัด ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1 โมลาร์ sorbitol ปลอดเชื้อที่เย็นจัด ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1 โมลาร์ sorbitol ปลอดเชื้อที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บเซลล์ไว้ในน้ำแข็ง

3.2.2.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *O. siamensis* N22

การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *O. siamensis* N22 โดยวิธี

electroporation ตามวิธีในคู่มือของ pPICZ A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of recombinant proteins (Invitrogen, USA) ผสมคอมพิเทนต์เซลล์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 กับ พลาสมิดสายผสมที่ได้จากข้อ 3.2.1.4 (ความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัม) ปริมาตรรวมเท่ากับ 80 ไมโครลิตร และถ่ายลงใน electroporation cuvette ขนาด 0.2 เซนติเมตร ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง แล้วแช่ cuvette ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ต่อมานำ cuvette ใส่ในเครื่อง Bio-Rad gene pulser (Bio-Rad, USA) ให้กระแสไฟฟ้าที่อัตรา 25 ไมโครฟารัด (μF), 2.5 กิโลโวลต์ เดิม 1 โมลาร์ sorbitol ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน cuvette ทันที ถ่ายสารใน cuvette ทั้งหมดลงในหลอดที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วบ่มหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง นำเชื้อจากหลอดมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เคลี่ยลงบนอาหารแข็ง YPDS (ภาคผนวก ก) ที่เติมยาปฏิชีวนะ Zeocin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน หรือจนกว่าโคโลนีเจริญ ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และทำให้บริสุทธิ์ (โคโลนีเดี่ยว) บนอาหารแข็ง YPD ที่เติม Zeocin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส

3.3.1 การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

เพาะเลี้ยง *O. siamensis* N22 บนอาหารเหลว YPD ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPX (ภาคผนวก ก) (เติมเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีสต์ที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

3.3.2 การเก็บตัวอย่างและเตรียมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (ประเสริฐ, 2546)

เก็บเซลล์จากข้อ 3.3.1 โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) พีเอชเท่ากับ 7.0 เตรียมเซลล์แขวนลอยด้วย 0.1 โมลาร์ phosphate buffer พีเอช 7.0 ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเม็ดแก้วปลอดเชื้อปริมาณ 1 ใน 3 ของปริมาณแขวนลอย นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง mini-beadbeater (Biospec Product, Japan) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลาประมาณ 1 นาที ทำสลับกัน 5-7 ครั้ง หรือจนกว่าเซลล์แตกประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด หลังจากผ่านการทำให้เซลล์แตกแล้ว ต้องเก็บสารสกัดเซลล์ในน้ำแข็งตลอดเวลา แยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

3.3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสตามวิธีของ Lee *et al.* (2003) (ภาคผนวก ข)

สารสกัดจากเซลล์ข้อ 3.3.2 นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส วัดอัตราการลดลงของ NAD(P)H ต่อนาที ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADPH 1 ไมโครโมลต่อนาที กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสให้แสดงเป็นหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน

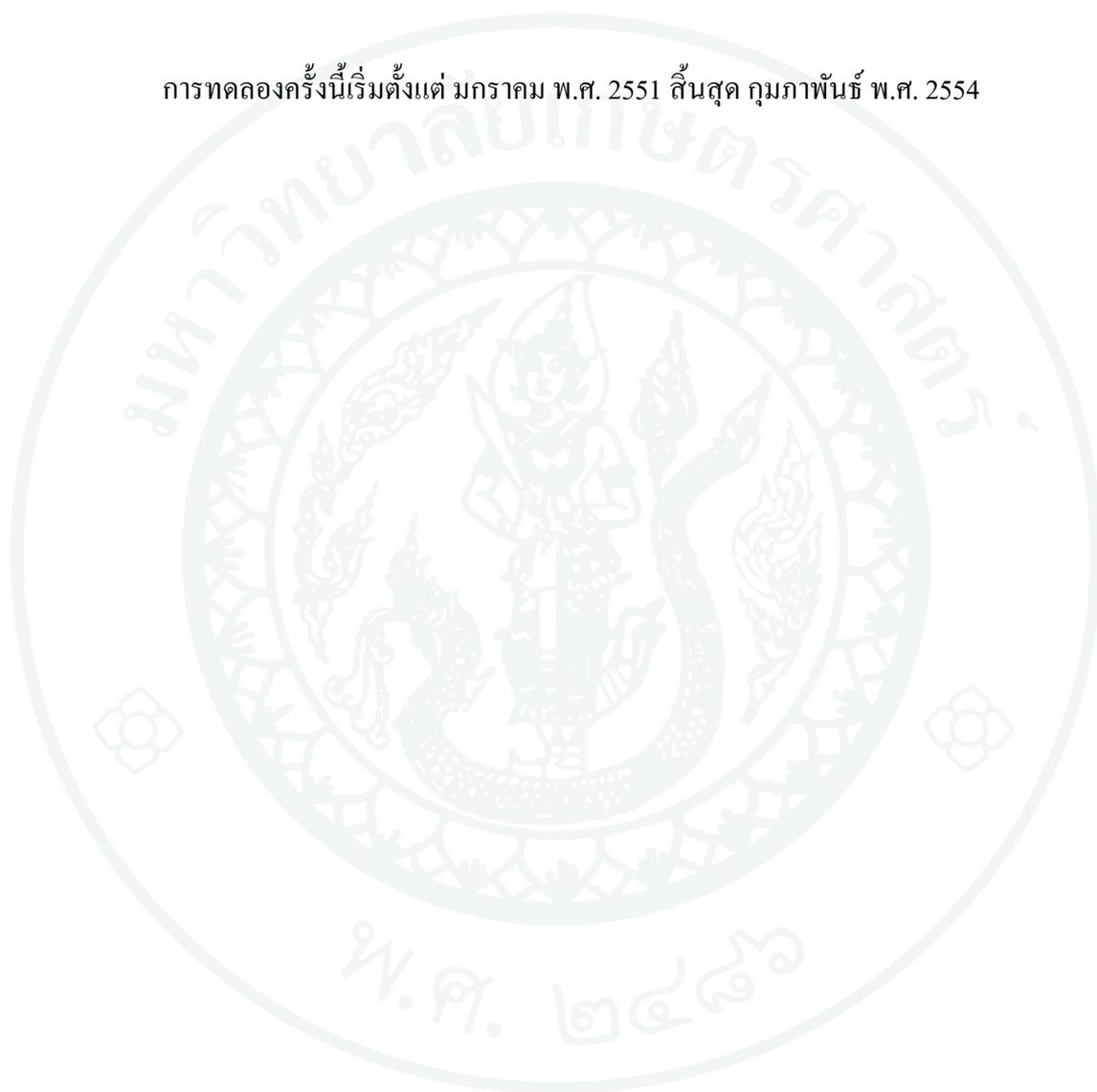
3.3.5 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์โดยวิธี Bradford (1976) (ภาคผนวก ข)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2551 สิ้นสุด กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554



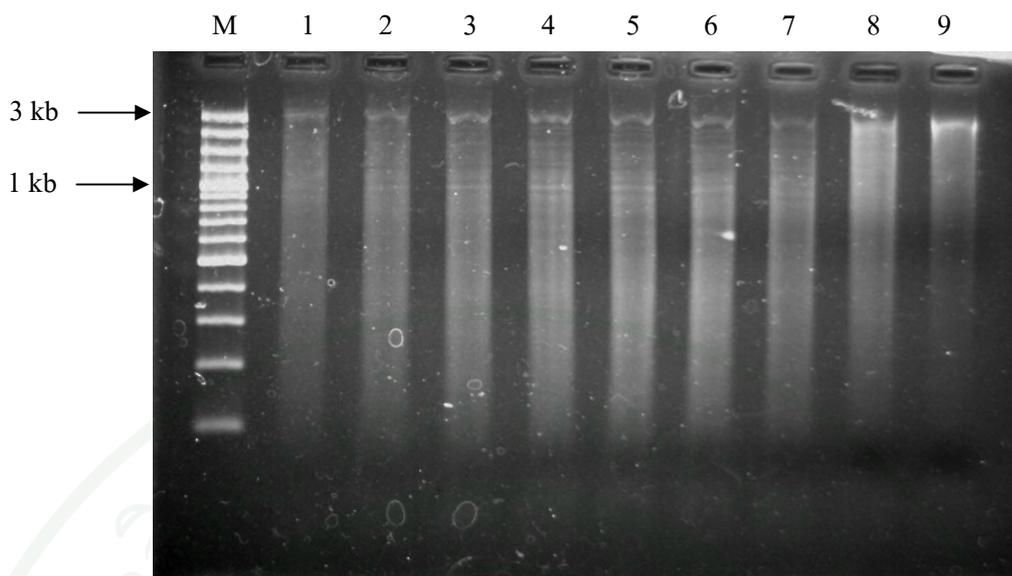
ผลและวิจารณ์

1. การตามหาชิ้นไซโลสรีดักเทศจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *Ogataea siamensis* N22

การตามหาชิ้นไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 โดยวิธี genomic DNA cloning คือ การตัดต่อยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่ได้จากการตัดโครโมโซมของยีสต์ด้วยเอนไซม์ มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ แล้วตรวจหาชิ้นไซโลสรีดักเทศด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ดังนี้

1.1 การตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *Ogataea siamensis* N22 ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

ทำการตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I เพื่อสร้างยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส ซึ่งจะใช้เป็นแหล่งของยีนไซโลสรีดักเทศจากยีนโนมิกดีเอ็นเอ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตัดด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการในปริมาณมากๆ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.039 หน่วยต่อ 20 ไมโครลิตร เหมาะสมสำหรับการสร้างยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดตามต้องการ เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1-3 กิโลเบสเข้มกว่า เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นอื่น (ภาพที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.039 หน่วยต่อ 20 ไมโครลิตร สำหรับตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 แบบไม่สมบูรณ์ เพื่อใช้งานต่อไป ซึ่งเมื่อสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล แล้วนำมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเออีกครั้ง พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นกว่า 1 กิโลเบส ไปจนถึง 3 กิโลเบส และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมากที่สุดที่บริเวณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9-1.5 กิโลเบส ดังภาพที่ 8 ซึ่งเป็นขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งของยีนไซโลสรีดักเทศ เนื่องจากยีนไซโลสรีดักเทศที่สมบูรณ์มีความยาวประมาณ 1 กิโลเบส



ภาพที่ 7 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 แบบไม่สมบูรณ์ ด้วยเอนไซม์ *Bsp143I* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

M คือ 100 bp DNA ladder plus

แถวที่ 1 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 2 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 3 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 1.25 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 4 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.625 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 5 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.312 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 6 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.156 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 7 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.078 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

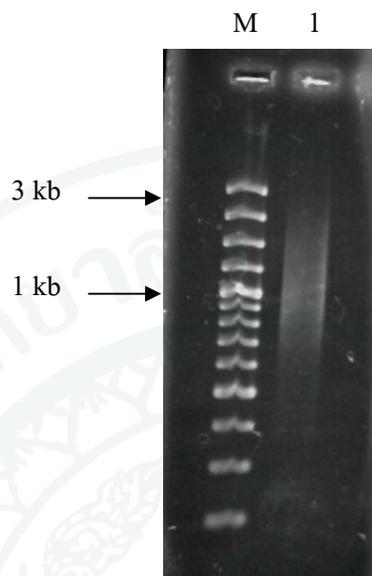
แถวที่ 8 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.039 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร และ

แถวที่ 9 คือ ตัดดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.0195 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร

1.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส เข้าเซลล์แบคทีเรีย

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอจากข้อ 1.3 เข้ากับพลาสมิด pJET 1.2/blunting vector (Fermentas, USA) แล้วจึงถ่ายโอนพลาสมิดสายผสม เข้าสู่เซลล์คอมพิเทนส์ *E. coli* XL1 blue และคัดเลือกโคลนที่เจริญบนอาหาร LA ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมอยู่จะเจริญได้บนอาหารดังกล่าว

ทำการตรวจนับ และเก็บ โคลนที่เจริญขึ้นมา เพื่อนำไปคัดเลือก โคลนที่มียีนไซโลสรีดักเทสแทรก อยู่ในพลาสมิดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป



ภาพที่ 8 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของยีนอมิกดีเอ็นเอไลบรารีขนาด 1-3 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์
M คือ 100 bp DNA ladder plus
แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโลสรีดักเทส

จากการสืบค้นข้อมูลยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ ในฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ได้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ 8 ชนิด ได้แก่ *Pichia guilliermondii* (Accession number: AAD09330.1), *P. stipitis* (Accession number: CAA42072.1), *Candida shehatae* (Accession number: AAF86345.1), *C. tropicalis* (Accession number: ABG49458.1), *C. parapsilosis* (Accession number: ABK32844.1), *C. tenuis* (Accession number: AAC25601.1), *Kluyveromyces lactis* (Accession number: AAA99507.1) และ *Pachysolen tannophilus* (Accession number: P78736.1) จึงนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบเพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) ดังแสดงในภาพที่ 9 แล้วเลือกบริเวณอนุรักษ์ส่วนหัวและท้ายของยีน (ปลายด้าน 5' และ 3' ของยีนตามลำดับ) ไปออกแบบไพรเมอร์

OSXRf55

Candida tropicalis MSTTPTIPTIKLNSGYEMPLVGFGCWKVNNETAADQIYNAIKTYRFLFDG 50
Candida parapsilosis MS-----IKLNSGHEMPVIGFVCWKVTNETAADQIYNAIKVGYRFLFDG 43
Pichia guilliermondii MS-----IKLNSGYDMPVSVGFVCWKVDNATCADTIYNAIKVGYRFLFDG 43
Candida shehatae MSPSP-IPAFKLNNGLEMPVIGFVCWKLDKSTAADQVYNAIKAGYRFLFDG 49
Candida tenuis MSAS--IPDIKLSGHLMPVIGFVCWKLANATAGEQVYQAIAKAGYRFLFDG 48
Pichia stipitis -----MPSIKLNSGYDMPAVGFVCWKVDVDTCEQIYRAIKTYRFLFDG 44
Pachysolen tannophilus MT---LQYYTTLNNGRKIPIAGMGCWKLEN--ADMVYAAIKVGYRFLFDG 44
Kluyvomyces lactis MT--YLAETVTLNNGEKMPLVGLGCWKMPNDVCADQIYEAIAIKTYRFLFDG 48
 *.**.* :* :*:****: ..: :* *** *****

Candida tropicalis AEDYNEKEVGEVINRAIKEGLVKREELFITSKLWNNFHDPKVNVTALNK 100
Candida parapsilosis AQDYNEKEVGEVINRAIDEGLVSRDELFFVSKLWNNYHDPKVNVTALNK 93
Pichia guilliermondii AEDYNEKEVGDGINRALDEGLVARDELFFVSKLWNSFHDPKVNVEKALDK 93
Candida shehatae AEDYNEQEVGEGVKRAIDEGIVTREEIFLTSKLWNNYHDPKVNVTALNK 99
Candida tenuis AEDYNEKEVGDGVKRAIDEGIVKREEIFLTSKLWNNYHDPKVNVTALNK 98
Pichia stipitis AEDYANEKLVGAGVKAIDEGIVKREDLFLTSKLWNNYHDPKVNVEKALNR 94
Pachysolen tannophilus ACDYNEKEVGEVINRAIKDGLVKRKDLFITSKLWNNFHAKENVKALMK 94
Kluyvomyces lactis AQDYANEKEVGGVNRAIKEGLVKREDLVVSKLWNSFHDPKVNVPALER 98
 * **.**: ** *::*:*:*:** * ..:*.****.*: * ** ** :

Candida tropicalis AEDYNEKEVGEVINRAIKEGLVKREELFITSKLWNNFHDPKVNVTALNK 100
Candida parapsilosis AQDYNEKEVGEVINRAIDEGLVSRDELFFVSKLWNNYHDPKVNVTALNK 93
Pichia guilliermondii AEDYNEKEVGDGINRALDEGLVARDELFFVSKLWNSFHDPKVNVEKALDK 93
Candida shehatae AEDYNEQEVGEGVKRAIDEGIVTREEIFLTSKLWNNYHDPKVNVTALNK 99
Candida tenuis AEDYNEKEVGDGVKRAIDEGIVKREEIFLTSKLWNNYHDPKVNVTALNK 98
Pichia stipitis AEDYANEKLVGAGVKAIDEGIVKREDLFLTSKLWNNYHDPKVNVEKALNR 94
Pachysolen tannophilus ACDYNEKEVGEVINRAIKDGLVKRKDLFITSKLWNNFHAKENVKALMK 94
Kluyvomyces lactis AQDYANEKEVGGVNRAIKEGLVKREDLVVSKLWNSFHDPKVNVPALER 98
 * **.**: ** *::*:*:*:** * ..:*.****.*: * ** ** :

Candida tropicalis TLSLDNLDYVDLFLIHFPVIAFKFVPIEEKYPPGFYCGDGD----NFHYED 146
Candida parapsilosis TLSLDNLEYLDFLIHFPVIAFKFVPIEEKYPPGFYCGDGD----KFHYEN 139
Pichia guilliermondii TSLDLKVDYLDLFLIHFPVIAFKFVPIEEKYPPGFYCGDGD----KFHYED 139
Candida shehatae TLKDLKVDYVDLFLIHFPVIAFKFVPIEEKYPPGFYCGDGD----NFVYED 145
Candida tenuis TLADLKVDYVDLFLIHFPVIAFKFVPIEEKYPPGFYCGDGN----NFVYED 144
Pichia stipitis TSLDLQVDYVDLFLIHFPVTFKFPVLEEKYPPGFYCGKGD----NFYDIED 140
Pachysolen tannophilus SLSDFNLDYFDLYLMHFPVIFKFPVLEEKYPPGFYCGDGD----KFHYED 140
Kluyvomyces lactis TSLDLQLDYVDIFYIHFPLAFKVPVDFEYPPGFYTGKEDAEAKGHIEEQ 148
 :* *::*:*:*:** * ..:*.****.*: * ** ** :

OSXRr570 OSXRr613

Candida tropicalis VPLLDTWKALEKLVKAGIKSIGISNFTGALIYDLIRGATIKPAVLQIEH 196
Candida parapsilosis VPLLDTWRALESVLQKGIKRSIGISNFGGLIYDLVRGAKIKPAVLQIEH 189
Pichia guilliermondii VPLIDTWRALEKLVKAGIKRSIGISNFGALIQDLLRSKIKPAVLQIEH 189
Candida shehatae VP ILETWKALEKLVKAGIKRSIGVSNFPGALLLDLFRGATIKPAVLQIEH 195
Candida tenuis VP ILETWKALEKLVKAGIKRSIGVSNFPGALLLDLFRGATIKPAVLQIEH 194
Pichia stipitis VP ILETWKALEKLVKAGIKRSIGVSNFPGALLLDLFRGATIKPSVLQIEH 190
Pachysolen tannophilus VPIIETWRAMENLVDEGLVKSIGVSNVSGGLEDLIIKARIKPASLQIEH 190
Kluyvomyces lactis VPLLDTWRALEKLVQKGIKSLGISNFGALIQDLLRGARIKPAVLQIEH 198
 :::*:*:** * ..:*.****.*: * ** ** :

Candida tropicalis HPYLQOPKLIIEYVQKAGIAITGYSSFGPQSFLELESKRALNTPTLFKHET 246
Candida parapsilosis HPYLQOPRLIEFVQSQGIAITGYSSFGPQSFLELESKALDTPTLFDHET 239
Pichia guilliermondii HPYLQOPRLVEYVQSQGIAITAYSSFGPQSFVELDHPRVKDVKPLFEHDV 239
Candida shehatae HPYLQOPKLIIEYAQKVGITVTAIYSSFGPQSFVEMNQGRALNTPTLFEHDV 245
Candida tenuis HPYLQOPKLIIEFAQKAGVITTAIYSSFGPQSFVEMNQGRALNTPTLFAHDT 244
Pichia stipitis HPYLQOPRLIEFAQSRGIAVTAIYSSFGPQSFVELNQGRALNTSPLFENET 240
Pachysolen tannophilus HPYLQONKLVYEAQLKGIIVVTGYSNFGPLSFLLELGNETAKKTQPLYENKT 240
Kluyvomyces lactis HPYLTQERLIKIVKNAGIQVVAIYSSFGPVSFLELENKALNTPTLFEHDT 248
 ***** :*::*:*:** * ..:*.****.*: * ** ** :

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศจากยีสต์ 8 ชนิด

* หมายถึง บริเวณลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน

อักษรในกรอบสีเทา หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนที่เลือกใช้ออกแบบไพรเมอร์

<i>Candida tropicalis</i>	IKSIADKHGKSPAQVLLRWATQRNIAVIPKSNPPERLAQNLVSD--FDLT	295
<i>Candida parapsilosis</i>	IKSIASKHKKSSAQVLLRWATQRGIAVIPKSNPDRLAQNLVSD--FELS	288
<i>Pichia guilliermondii</i>	IKSVAGKVKKTPAQVLLRWATQRGLAVIPKSNPDRLLSNLKVND--FDLS	288
<i>Candida shehatae</i>	IKATAAKHNKVPAEVLLRWSAQRGIAVIPKSNLPERLVQNRSFND--FELT	294
<i>Candida tenuis</i>	IKATAAKYNKTPAEVLLRWAAQRGIAVIPKSNLPERLVQNRSFNT--FDLT	293
<i>Pichia stipitis</i>	IKATAAKHKGKSPAQVLLRWSSQRGIAIIPKSNTPRLLNENKDVNS--FDLD	289
<i>Pachysolen tannophilus</i>	ITTAIAKHGKTPFQVLLRWVNQRGIAIIPKSTFPNTLAVNLHVDE--FDLT	289
<i>Kluyvomyces lactis</i>	IKSIASKHKVTPQVLLRWATQNGIAIIPKSSKLERLLDNLRLINDALTLT	298

.:. * . :***** *.:*:*****. * * . : *

OSXRr927

<i>Candida tropicalis</i>	KDDLNDIAKLDIGLRFNDPVDWDN--IPIFV	324
<i>Candida parapsilosis</i>	KEDLEAINKLDKGLRFNDPVDWDH--IPIFV	317
<i>Pichia guilliermondii</i>	QEDFQEISKLDIELRFNNPVDWDK--IPTFI	317
<i>Candida shehatae</i>	KEDFEEISKLDINLRFNDPVDWDN--IPIFV	323
<i>Candida tenuis</i>	KEDFEEIAKLDIGLRFNDPVDWDN--IPIFV	322
<i>Pichia stipitis</i>	EQDFADIAKLDINLRFNDPVDWDK--IPIFV	318
<i>Pachysolen tannophilus</i>	KEDFEEIAKLDRLRFNDPVDWDK--IPTFV	318
<i>Kluyvomyces lactis</i>	DDELKQISGLNQIRFNDPVEWLDNEFPPTFI	329

...: * *: :***:** * . :* *:

ภาพที่ 9 (ต่อ)

(ก)

XYL1

5'

3'

<i>Candida tropicalis</i>	FGCWKVN
<i>Candida parapsilosis</i>	FGCWKVT
<i>Pichia guilliermondii</i>	FGCWKVD
<i>Candida shehatae</i>	FGCWKLD
<i>Candida tenuis</i>	FGCWKLA
<i>Pichia stipitis</i>	FGCWKVD
<i>Pachysolen tannophilus</i>	MGCWKLE
<i>Kluyvomyces lactis</i>	LGCWKMP

Consensus sequence

F G C W K V D

Nucleotide code

TTCGGCTGCTGGAAAGTCG

T T

ภาพที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของยีนไซโลสรีดักเทส เลือกมาออกแบบไพรเมอร์

หัวยีน และไพรเมอร์ท้ายยีน และแปลงลำดับกรดอะมิโนไปเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์

- (ก) ออกแบบไพรเมอร์หัวยีน OSXRf55
- (ข) ออกแบบไพรเมอร์ท้ายยีน OSXRr927
- (ค) ออกแบบไพรเมอร์ท้ายยีน OSXRr613
- (ง) ออกแบบไพรเมอร์ท้ายยีน OSXRr570

(ข)

<i>XYLI</i>	5'	3'
<i>Candida tropicalis</i>	WDWDN	--IP
<i>Candida parapsilosis</i>	WDWDH	--IP
<i>Pichia guilliermondii</i>	WDWDK	--IP
<i>Candida shehatae</i>	WDWDN	--IP
<i>Candida tenuis</i>	WDWDN	--IP
<i>Pichia stipitis</i>	WDWDK	--IP
<i>Pachysolen tannophilus</i>	WTWDK	--IP
<i>Kluyveromyces lactis</i>	WEWLDNEFP	

Consensus sequence

W D W D K I P

Nucleotide code

TGGGACTGGGACAAGATTTCCT

Reverse complement

GGAATCTTGTCCCAGTCC

(ค)

<i>XYLI</i>	5'	3'
<i>Candida tropicalis</i>	EHHPYLQQ	
<i>Candida parapsilosis</i>	EHHPYLQQ	
<i>Pichia guilliermondii</i>	EHHPYLQQ	
<i>Candida shehatae</i>	EHHPYLQQ	
<i>Candida tenuis</i>	EHHPYLQQ	
<i>Pichia stipitis</i>	EHHPYLQQ	
<i>Pachysolen tannophilus</i>	EHHPYLQQ	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	EHHPYLTQ	

Consensus sequence

E H H P Y L Q Q

Nucleotide code

GAACACCACCCATACTTGACACCAA

Reverse complement

T T

 TTGCTGCAAGTAAGGGTGGTGT

T T

(ง)

<i>XYLI</i>	5'	3'
<i>Candida tropicalis</i>	HHPYLQQPK	
<i>Candida parapsilosis</i>	HHPYLQQPR	
<i>Pichia guilliermondii</i>	HHPYLQQPR	
<i>Candida shehatae</i>	HHPYLQQPK	
<i>Candida tenuis</i>	HHPYLQQPK	
<i>Pichia stipitis</i>	HHPYLQQPR	
<i>Pachysolen tannophilus</i>	HHPYLQQNK	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HHPYLTQER	

Consensus sequence

H H P Y L T Q E R

Nucleotide code
 CACCATCCATACTTGACCCAGGAAAGA
 T C ACC AG
Reverse complement
 CTTTCCTGGGTCAAGTATGGATGGTG
 T GGT G A

ภาพที่ 10 (ต่อ)

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ทั้ง 8 ชนิด พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความแตกต่างกันมากในยีสต์แต่ละชนิด จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีสไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Ogataeasiamensis* N22 ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดใหม่และยังไม่เคยมีการศึกษายีสไซโลสรีดักเทสมาก่อน โดยเลือกบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่มีความคล้ายคลึงกันในยีสต์ทั้ง 8 ชนิด แล้วออกแบบไพรเมอร์ส่วนหัวและท้ายของยีน (ปลายด้าน 5' และ 3') ได้ทั้งหมด 3 คู่ คือ OSXRf55 กับ OSXRr927 OSXRf55 กับ OsXRr613 และ OSXRf55 กับ OSXRr570 ให้อยู่ในรูปแบบ degenerated primer ที่มีความจำเพาะต่อยีสไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 (ภาพที่ 10) และวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ เช่น ค่า T_m ค่า GC content การเกิด cross dimer และ self dimer เป็นต้น ด้วยโปรแกรม NetPrimer พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มีความยาว 18-26 นิวคลีโอไทด์ มีค่า T_m อยู่ในช่วง 61.8-65.4 องศาเซลเซียส ค่า GC content อยู่ระหว่าง 47.8-57.8 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Degenerated primers ที่ใช้ในการตามหาชิ้นไซโลสรีดักเทศใน *O. siamensis* N22

ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (นิวคลีโอ- ไทด์)	Tm (°C)	GC content (%)	โครงสร้าง hairpin	Self- dimer	Cross-dimer
OSXRf55: 5' TTYGGCTGYTGAAAGTCG 3'	19	62.3	57.8	ไม่เกิด	ไม่เกิด	ไม่เกิดกับ OSXRr927, OSXRr613 และ OSXRr570
OSXRr927: 5'GGAATCTTGTCCCAGTCC 3'	18	62.4	55.56	เกิด	ไม่เกิด	ไม่เกิดกับ OSXRf55
OSXRr613: 5' TTGYTGCAAGTAWGGGTGGTGTT 3'	23	61.88	47.83	ไม่เกิด	เกิด	ไม่เกิดกับ OSXRf55
OSXRr570: 5' YTTKSYTGGGTCAAGTATGGRTGRTG 3'	26	65.4	48.1	ไม่เกิด	เกิด	ไม่เกิดกับ OSXRf55

หมายเหตุ: Y แทนนิวคลีโอไทด์ C หรือ T ; W แทนนิวคลีโอไทด์ A หรือ T

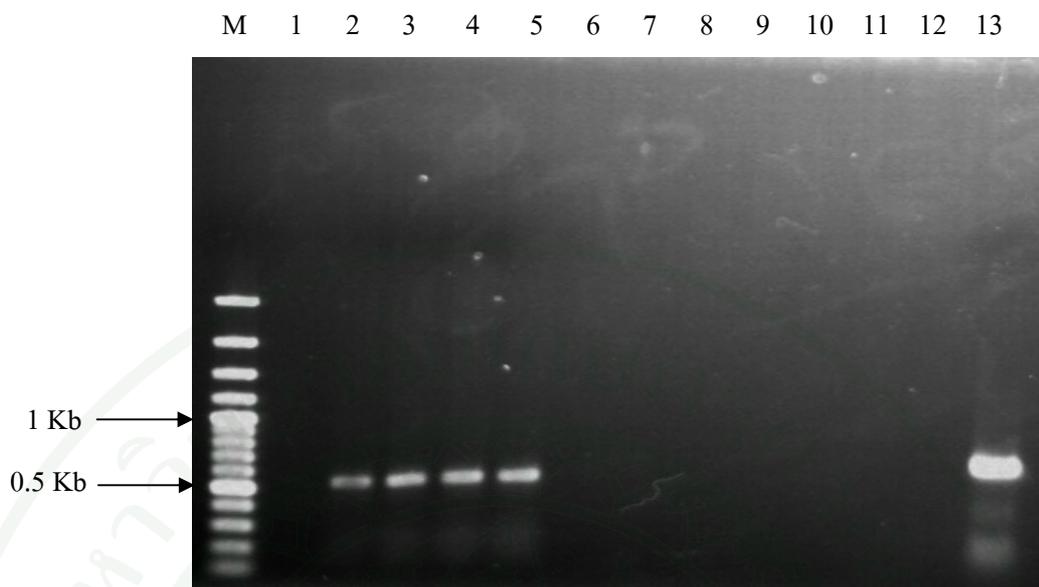
K แทนนิวคลีโอไทด์ G หรือ T ; S แทนนิวคลีโอไทด์ G หรือ C

R แทนนิวคลีโอไทด์ A หรือ G

1.4 การเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสบางส่วนจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *Ogataea siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

เมื่อทดลองเพิ่มจำนวนของยีนไซโลสรีดักเทสบางส่วนของยีสต์ *O. siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ที่ออกแบบได้ พบว่า ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง OSXRf55 และ OSXRr927 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสได้ เมื่อใช้อุณหภูมิสำหรับการเกิด annealing ช่วง 40-57 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเนื่องจากการที่ไพรเมอร์ OSXRr927 มีโอกาสเกิดโครงสร้าง hairpin (ตารางที่ 2) จึงอาจจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี และมีความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบต่ำ

เมื่อทดลองใช้ไพรเมอร์คู่ที่สอง คือ OSXRf55 และ OSXRr613 เพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสบางส่วน ด้วยเทคนิค gradient PCR โดยใช้อุณหภูมิสำหรับการเกิด annealing ตั้งแต่ 45-57 องศาเซลเซียส (โดยกำหนดอุณหภูมิดังนี้ 45.1, 45.4, 46.0, 47.2, 48.5, 50.1, 51.6, 53.3, 55.1, 56.2, 56.8 และ 57.2) จำนวน 12 หลอด ตามลำดับ และใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 ซึ่งเพิ่ม D1/D2 domain ของ 26S rDNA เป็นหลอดควบคุมของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลการใช้ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส เมื่อใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 45.4, 46.0, 47.2 และ 48.5 โดยพบว่าที่ 45.4 องศาเซลเซียสให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 11) เมื่อยืนยันผลการเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 พิโคโมล และใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 46 องศาเซลเซียส ยังคงพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (ภาพที่ 12) จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 11 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจหาชิ้นไซโลสรีดักเทศบางส่วน ที่เพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 ด้วยเทคนิค gradient PCR ที่อุณหภูมิ annealing ต่างๆ M คือ 100 bp DNA ladder plus

แถวที่ 1 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 45.1 องศาเซลเซียส

แถวที่ 2 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 45.4 องศาเซลเซียส

แถวที่ 3 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 46.0 องศาเซลเซียส

แถวที่ 4 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 47.2 องศาเซลเซียส

แถวที่ 5 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 48.5 องศาเซลเซียส

แถวที่ 6 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 50.1 องศาเซลเซียส

แถวที่ 7 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 51.6 องศาเซลเซียส

แถวที่ 8 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 53.3 องศาเซลเซียส

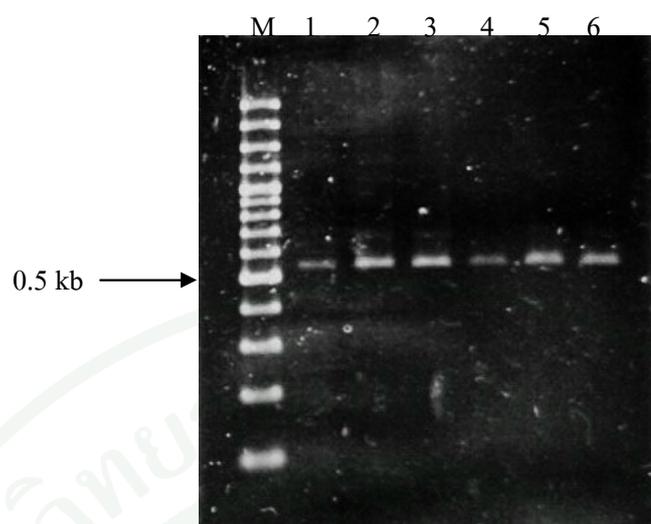
แถวที่ 9 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 55.1 องศาเซลเซียส

แถวที่ 10 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 56.2 องศาเซลเซียส

แถวที่ 11 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 56.8 องศาเซลเซียส

แถวที่ 12 คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 57.2 องศาเซลเซียส

แถวที่ 14 คือ positive control โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4



ภาพที่ 12 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613

M คือ 100 bp DNA ladder plus

แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 พิโคโมล

แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 50 พิโคโมล

แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมล

แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 พิโคโมล

แถวที่ 5 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 50 พิโคโมล

แถวที่ 6 คือ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 เท่า ไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมล

แถวที่ 1-3 ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 46 องศาเซลเซียส

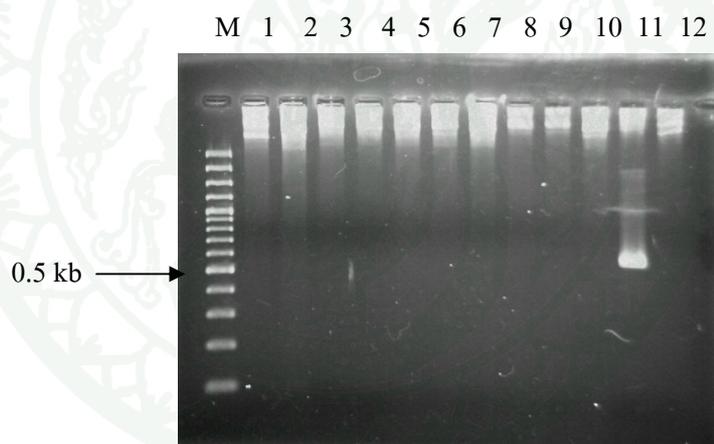
แถวที่ 4-6 ใช้อุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 47 องศาเซลเซียส

เมื่อโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิด pJET/1.2 blunt vector (Fermentas, USA) และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ของพลาสมิด pJET/1.2 blunt vector คือ pJET1.2 forward และ pJET1.2 reverse (Fermentas, USA) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ความยาว 568 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับไซโลสตรี้ดักเทศของยีสต์ในฐานข้อมูล โดยพบว่ามีค่าความเหมือน (identity) สูงสุด 67-75 เปอร์เซ็นต์ คือมีความคล้ายคลึงกับ อัลโดสตรี้ดักเทศ จาก *Candida boidinii* (accession number: AF451326.1) 75 เปอร์เซ็นต์ และมีความคล้ายคลึงกับไซโลสตรี้ดักเทศจาก *Kluyveromyces lactis*

(accession number: AAA99507.1) และ *Pichia guilliermondii* (accession number: AAD09330.1) เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน จึงเลือกใช้ไพรเมอร์คู่ OSXRf55 และ OSXRr613 และอุณหภูมิ annealing เท่ากับ 46 องศาเซลเซียส มาใช้ตามหายีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ต่อไป

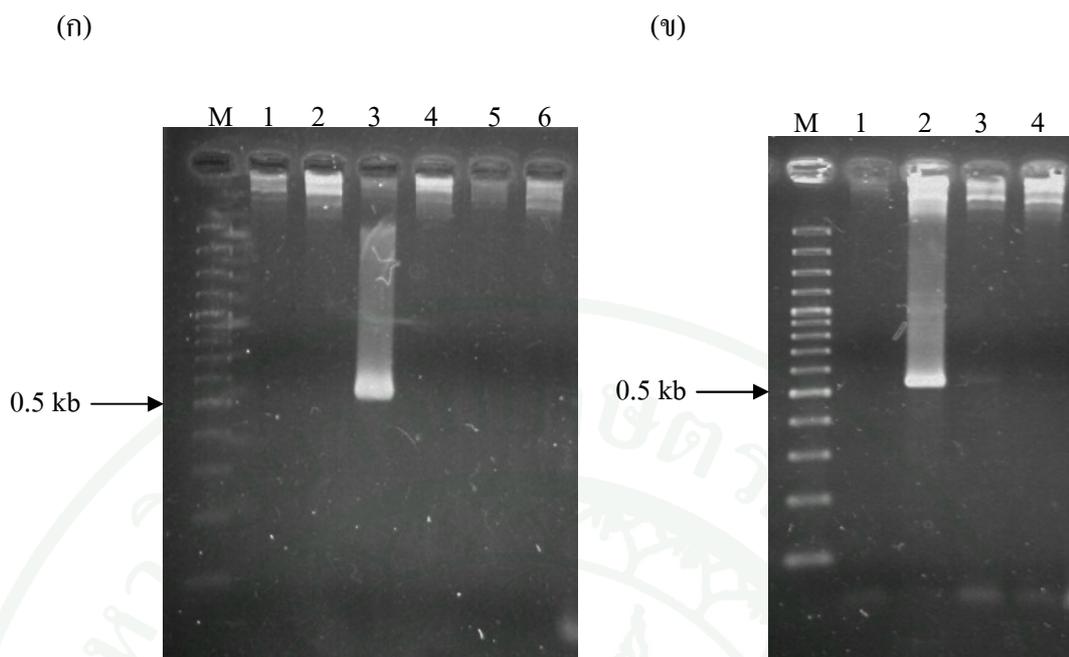
1.5 การตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสด้วยเทคนิคพีซีอาร์

แบ่งโคลนแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ กลุ่มละ 20 โคลน แล้วนำมาเลี้ยงรวมในคราวเดียวกัน ก่อนนำไปสกัดพลาสมิดของแบคทีเรียเชื้อผสมด้วยวิธี alkaline lysis นำพลาสมิดจากเชื้อผสมที่ได้มาตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 จากโคลนทั้งหมด 1,308 โคลน พบโคลนที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 568 นิวคลีโอไทด์ เกิดขึ้น เพียง 1 โคลน คือ โคลนรหัส pOSXR1-208 ซึ่งโคลนดังกล่าวคาดว่าจะมี ยีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่ (ภาพที่ 13 และ 14)



ภาพที่ 13 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสจากพลาสมิด pOSXR ของโคลนหมายเลข 1-240 ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613

M คือ 100 bp DNA ladder plus	แฉวที่ 1 คือ pOSXR1-1 ถึง 20
แฉวที่ 2 คือ pOSXR1-21 ถึง 40	แฉวที่ 3 คือ pOSXR1-41 ถึง 60
แฉวที่ 4 คือ pOSXR1-61 ถึง 80	แฉวที่ 5 คือ pOSXR1-81 ถึง 100
แฉวที่ 6 คือ pOSXR1-101 ถึง 120	แฉวที่ 7 คือ pOSXR1-121 ถึง 140
แฉวที่ 8 คือ pOSXR1-181 ถึง 200	แฉวที่ 11 คือ pOSXR1-201 ถึง 220
แฉวที่ 12 คือ pOSXR1-221 ถึง 240	



ภาพที่ 14 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจหายีนไซโลสรีดักเทสจากพลาสมิด pOSXR

(ก) pOSXR1-201 ถึง 220

M คือ 100 bp DNA ladder plus แถวที่ 1 คือ pOSXR1-201 ถึง 203

แถวที่ 2 คือ pOSXR1-204 ถึง 206 แถวที่ 3 คือ pOSXR1-207 ถึง 210

แถวที่ 4 คือ pOSXR1-211 ถึง 213 แถวที่ 5 คือ pOSXR1-214 ถึง 216

แถวที่ 6 คือ pOSXR1-217 ถึง 220

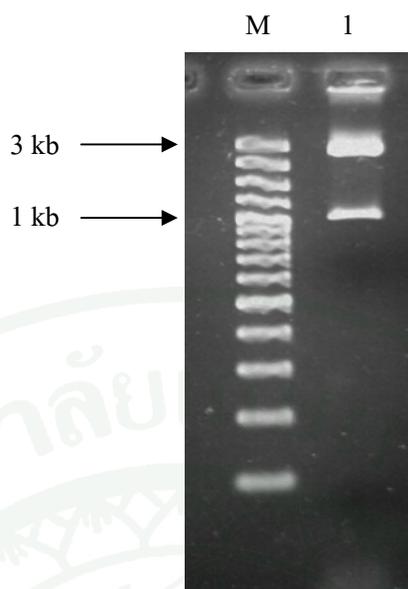
(ข) pOSXR1-207 ถึง 210

M คือ 100 bp DNA ladder plus แถวที่ 1 คือ pOSXR1-207

แถวที่ 2 คือ pOSXR1-208 แถวที่ 3 คือ pOSXR1-209

แถวที่ 4 คือ pOSXR1-210

เมื่อวิเคราะห์พลาสมิด pOSXR1-208 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*II ซึ่งมีตำแหน่งตัดบนพลาสมิด 2 ตำแหน่งบริเวณ multiple cloning site เพื่อวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกแทรกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอสองแถบ ขนาดประมาณ 2.9 กิโลเบส และ 1.2 กิโลเบส โดยคาดว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 2.9 กิโลเบสนั้น คือ พลาสมิด pJET1.2/blunt แสดงว่าพลาสมิด pOSXR1-208 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ที่คาดว่าจะเป็ยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์แทรกอยู่ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิด pOSXR1-208 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III

M คือ 100 bp ladder plus แถวที่ 1 คือ pOSXR1-208 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pOSXR1-208 โดยใช้ไพรเมอร์ pJET1.2 forward และ pJET1.2 reverse พบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,051 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ในฐานข้อมูล โดยพบว่า คล้ายคลึงกับเอนไซม์ aldose reductase ของยีสต์ *Candida boidinii* เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ของยีสต์ *Pichia guilliermondii* เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ มากที่สุดตามลำดับ (ภาพที่ 17) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสทั้งหมดด้วยโปรแกรม ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสบางส่วนเท่านั้น โดยพบว่ามีเพียงส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสความยาว 680 นิวคลีโอไทด์ โดยพบตำแหน่ง start codon (ATG) ของยีน แต่ไม่พบตำแหน่ง stop codon ของยีน นอกจากนี้ยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านหน้าซึ่งเป็นส่วนปลายด้าน 5' ของยีนด้วย ความยาว 371 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นข้อมูลในส่วนนี้อาจนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *O. siamensis* N22 ต่อไปได้

สำหรับยีนไซโลสรีดักเทศของยีสต์โดยทั่วไป ควรมีความยาวประมาณ 951 นิวคลีโอไทด์ (ยีสต์ *Pachysolen tannophilus*) จนถึง 987 นิวคลีโอไทด์ (ยีสต์ *Kluyveromyces lactis*) (Bolen *et al*, 1996; Billard *et al*, 1995)

> pOSXR1-208

```

CGGTATGTAGGAGACTTCTAGAAGTGATCCTCGGACTTCTCGGGATCTTCAACCACCCAT 60
CTAGAGCGCGCCTTGTCAAAAATACAAGTTGTCTGCTATATGCTTTGGAATGTCTTCAGGG 120
CGCACGCCTTGTATTTTCATCTTTTAAAGGCATGATACCATTTTTAATATCCGATAAGAA 180
TTATTTTTGTGCGAAAACTACTCCACCTCCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGCTATTG 240
GGGCGGTGAGGATATTCTTTATAAAGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATATTGTG 300
TGGGGAATTTCTTGGAAAAAACCCCTTACTGGAATTTATTTTTCAACCACCTTATTATTT 360
CTTGAAAGAAAAATGGTTTCTAAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAG 420
TTGGATTTGGCTGCTGGAAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTA 480
TCAAAGTCGGATACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATTG 540
GTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGGAATTGGTTATTG 600
TCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATCATCATCCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAG 660
TTCTGGATGACTTGAAGCTTGACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCTGTCGCTC 720
AAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTACTGTGGTCCTAATGGAT 780
GGGAGTATGAAGACGTTCCCTTTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTAGTTGAAG 840
AAGGTCTTGTTAAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTGAGGACCTGT 900
TGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCCAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTTGACCC 960
AGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTTCAGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCAT 1020
TCGGCCCGCAATCATTTGTTGAACTTGATCA 1051

```

ภาพที่ 16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิด pOSXR1-208 ความยาวเท่ากับ 1,051 นิวคลีโอไทด์ อักษร ATG ชิดเส้นใต้แสดงส่วนของ start codon ของยีน

```

pOSXR1-208 ATGTTTCTAAAACAGT---GAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAGTTGGATTT 57
C. boidinii ATG---TCAAGCCCACTTTTAACTTTAAACAATGGCTTAAAGATGCCACAAATCGGTTTT 57
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GGCTGCTGAAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTC 117
C. boidinii GGTGTTGGAAAAGTCGACAATGCCACTTGTGCCGAAACTATTTATGAAGCCATTAAAGTC 117
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GGATACCGTCTGTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATTGGTGAAGGC 177
C. boidinii GGTTACAGATTATTCGATGGTGTATGGATTACGGTAATGAAAAAGAAGTTGGTGAAGGT 177
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GTTGCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGCTCAAAG 237
C. boidinii GTTAACAAAGCGATCAAAGATGGTTAGTTAAAAGAGAAGAATTATTCATTGTTCAAAA 237
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 TTGTGGAACAGTTATCATCATCCGTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGAT 297
C. boidinii TTATGGAACAATTTCCATCATCCAGATTGAGTTAAACTAGCAATCAAAAAAGTTCTATCT 297
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GACTTGAAGCTTGACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCCCTGCTCGCTCAAAAATT 357
C. boidinii GATTAAATTTAGAATACATTGATTTATTTATCTATATGCATTCCCAATTGCTCAAAAATT 357
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GTGCCATTTGAAGAGAAGTATCCCTCCAGGGTGTACTGTGGTCCATAATGG---ATGGGAG 414
C. boidinii GTTCCAATTGAAAAGAAATATCCACCAAAATTTTATTGGTGTGGTATAAATGGAGT 417
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 TATGAAGACGTTCC---TTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTGTGGAAGAA 471
C. boidinii TTTGAAGATGCCCACTTTTAACA---ACTTGGAGAGCTATGGAAGAATTGGTTGAAGAA 474
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GGTCTTGTAAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTATTGAGACGTTGTTG 531
C. boidinii GGTTTAGTTAAATCAATTGGTATCTCTAACTTTGTGGTGTCTTGTGTTCAAGATTATTA 534
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 AGAGGATGCAAGATTAAGCCC-CAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTTGACCCA 590
C. boidinii AGAGGTTGTAATAATAGACCAGCAGTT-TTAGAAATTGAACATCACCCATATTTAGTTCA 593
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 GGAAAGATTGGTCAAGTATGTTTCAGGCTCAAGAAATGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATT 650
C. boidinii ACCAAGATTAATTGAATACGCTAAAACCTGAAGGTATTCACGTTACCGCATACTCTTCA 653
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 CGGCCCGCAATCATTGTTGAACCTGATCA----- 680
C. boidinii TGGTCCACAATCATTGTTGAATTAGACCATCTAAAGTTAAAGACTGTACCACCTATT 713
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
pOSXR1-208 -----
C. boidinii CAAACATGAAACAATTACTTCAATTGCTTCAGCTCATGACGTCCCTCCAGCTAAAGTCTT 773
-----
pOSXR1-208 -----
C. boidinii ATTGAGATGGGCTACTCAAAGAGGTTTAGCAGTTATCCCAAAATCTAATAAAAAGGAAAG 833
-----
pOSXR1-208 -----
C. boidinii ATTATTAGGTAATTTGAAAATTAATGATTTTGATTTAACTGAAGCTGAAGTTGAAAAAAT 893
-----
pOSXR1-208 -----
C. boidinii TGAGCATTAGATATTGGTTAAGATTTAATGATCCATGGACTTGGGGTTACAATATTCC 953
-----
pOSXR1-208 -----
C. boidinii AACATTTATTTAA 966

```

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสบนพลาสมิด pOSXR1-208

ความยาว 680 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลโดสรีดักเทส จาก *Candida boidinii* ด้วยโปรแกรม ClustalW

เมื่อทำการตามหายีนไซโลสรีดักเทสจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ *O. siamensis* N22 โดยการโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส เข้าพลาสมิด pJET1.2/blunt vector แล้วคัดเลือกโคลน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพิ่มเติม โดยแบ่งกลุ่มพลาสมิดของแบคทีเรียเชื้อผสมเป็นกลุ่มละ 20 โคลน เช่นเดิม และใช้ไพรเมอร์ OSXRr55 และ OSXRr613 ในการคัดเลือกพลาสมิด pOSXR ที่มียีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์แทรกอยู่ จากโคลนทั้งหมด 4,052 โคลน พบว่ามีเพียง 1 โคลน คือ โคลน

รหัส pOSXR1-453 ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไลโซสรีดักเทสบนฐานข้อมูล GenBank และเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pOSXR1-208 ที่มียีนไลโซสรีดักเทสบางส่วนแทรกอยู่ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 568 นิวคลีโอไทด์ บนพลาสมิด pOSXR1-453 นั้นไม่มีส่วนของยีนไลโซสรีดักเทสแทรกอยู่เลย ซึ่งผลที่ได้นี้ขัดแย้งกันกับผลจากการตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าคู่ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 ที่ใช้ในการคัดลอกพลาสมิด pOSXR นั้น ไม่จำเพาะต่อยีนไลโซสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ถึงแม้จะพบว่าคู่ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 สามารถเพิ่มจำนวนยีนไลโซสรีดักเทสบางส่วนจากยีนอมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ได้ตามที่ต้องการ และทำให้ได้ pOSXR1-208 ที่มียีนไลโซสรีดักเทสบางส่วนแทรกอยู่มาแล้วก็ตาม แต่เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นค่อนข้างต่ำ (46 องศาเซลเซียส) ซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะได้ โดยไพรเมอร์อาจสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะต่อยีนไลโซสรีดักเทสเท่านั้น อาจสามารถปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จาก 46 องศาเซลเซียส ให้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 57-62 องศาเซลเซียส ตามค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้งสองที่คำนวณได้จากโปรแกรมเท่ากับ 61 และ 62 องศาเซลเซียสได้ โดยอาจต้องปรับความเข้มข้นของส่วนประกอบในปฏิกิริยา ให้เหมาะสม ได้แก่ $MgCl_2$, ไพรเมอร์, DNA polymerase และ ดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งน่าจะส่งผลให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนไลโซสรีดักเทสเพิ่มขึ้นได้ Sadeghi *et al.* (2006) ได้ศึกษาความเหมาะสมของการเพิ่มจำนวนยีนไลเปส (lipase gene) จาก *Bacillus subtilis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยศึกษาอุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการทำพีซีอาร์ คือ เมื่อใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิขั้นตอน annealing เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้นต่ำเกินไป ตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไลโซสรีดักเทสคู่ที่สาม ได้แก่ OSXRf55 และ OSXRr570 (ตารางที่ 2) แล้วเพิ่มจำนวนยีนดีเอ็นเอของยีนไลโซสรีดักเทสบางส่วนจากยีนอมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ด้วยส่วนผสมปฏิกิริยาที่เหมาะสม และใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 59 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้น และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 545 นิวคลีโอไทด์ แม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ OSXRr570 มี degenerated base หลายนิวคลีโอไทด์ แต่อุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในขั้นตอนการทำพีซีอาร์สูงถึง 59 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าสูงกว่าไพรเมอร์คู่ OSXRf55 และ OSXRr613 ที่ใช้อุณหภูมิ annealing เพียง 46 องศาเซลเซียสเท่านั้น จึงส่งผลให้ไพรเมอร์คู่ OSXRf55 และ

OSXRr570 มีความจำเพาะต่อยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 มากกว่าคู่ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr613 จากนั้นนำไพรเมอร์คู่ดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือกพลาสมิด pOSXR ที่มียีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่

เมื่อทำการคัดเลือกพลาสมิด pOSXR จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-3 กิโลเบส ได้โคลนทั้งหมด 1,511 โคลน พบโคลนที่ให้ผลบวก คือ ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทสด้วยไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr570 จำนวน 12 โคลน คือโคลนรหัส pOSXR2-22, pOSXR2-23, pOSXR2-74, pOSXR2-88, pOSXR2-115, pOSXR2-119, pOSXR2-134, pOSXR2-201, pOSXR2-241, pOSXR2-348, pOSXR2-379 และ pOSXR2-390 จึงสกัดพลาสมิดจากโคลนทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่แทรกบนพลาสมิด pOSXR2-22, pOSXR2-23, pOSXR2-74, pOSXR2-115, pOSXR2-119, pOSXR2-134, pOSXR2-201, pOSXR2-241, pOSXR2-348, pOSXR2-379 และ pOSXR2-390 พบว่ามียีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่เพียงบางส่วน โดยมีความยาวตั้งแต่ 545-576 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าเป็นส่วนดีเอ็นเอที่สั้นกว่าชิ้นส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pOSXR1-208 (ภาพที่ 16) ที่ตรวจพบก่อนหน้านี้ โดยมีเพียงพลาสมิด pOSXR2-88 เท่านั้นที่ได้ส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสยาวกว่าที่พบใน พลาสมิด pOSXR1-208

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่แทรกบนพลาสมิด pOSXR2-88 ทำโดยการตัดพลาสมิด pOSXR2-88 ด้วยเอนไซม์ *Bgl*II และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.9 และ 2.5 กิโลเบส ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แทรกบนพลาสมิดพบว่ามีความยาว 1,122 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ORF Finder ในจำนวนนี้พบส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสอยู่เท่ากับ 835 นิวคลีโอไทด์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จาก pOSXR2-88 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลงได้นี้มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์อัลโดสรีดักเทส (aldose reductase) ของยีสต์ *Candida boidinii* และเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของ *Kluyveromyces lactis* 73 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของพลาสมิด pOSXR2-88 และ pOSXR1-208 มาเทียบเคียงกันด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสบางส่วนจาก pOSXR2-88 มีความยาวมากกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จาก pOSXR1-208 ถึง 155 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 18) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ายังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์อีกประมาณ 100-200 นิวคลีโอไทด์ จึงจะครบความยาวของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์ จึงเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pOSXR2-88 นี้ไว้ศึกษาในส่วนของติดตามลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีนต่อไป ในการตามหายีนไซโลสรีดักเทสด้วยวิธี genomic DNA cloning นั้น สาเหตุที่ไม่ได้ยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์อาจเนื่องจาก ยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่นำมาใช้โคลนยีน บางส่วนมีขนาดเล็กกว่า 1 กิโลเบส ซึ่งสั้นกว่าขนาดของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์ จึงส่งผลให้ได้ยีนไซโลสรีดักเทสที่ไม่สมบูรณ์

```

208      GCGTATGTAGGAGACTTCTAGAAGTGATCCTCGGACTTCTCGGGATCTTCAACCACCCAT 60
88      -----CTTTGAATTGTTCTTC-----CAGGG----CGCCACC--- 30
          * *.*** **:* **          *..*   *..*****
208      CTAGAGCGCGCCTTGTCAAATACAAGTTGTCTGTATATGCTTTGGAATGCTTTCAGGG 120
88      ----GC---CCTTGGTAATTTCCAT----- 48
          **   ***** *:.*:***:
208      CGCACGCCTTGTATTTTCATCTTTTAAAGGCATGATACC-ATTTTTAATATTCCG-ATAAG 178
88      ----CCTT-----TTAAAGGCCATGATACCCATTTTTAAAATCCGAATAAG 91
          ****          *:.*: * *****:***** *****
208      AATTATTTTTGTGCAAAAA--CTACTCCCACCTCCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGC 235
88      AATTATTTTTGTGCAAAAACTAACTTCCCACCTCCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGC 151
          *****:*****
208      TATTGGGGCGGTGAGGATATTCTTTATAAAGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATA 295
88      TATTGGGGCGGTGAGGATATTCTTTATAAAGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATA 211
          *****
208      TTGTGTGGGGAATTTCTTGGAAAAAACCCCTTACTGGAATTTATTTTTCAACCACCTTAT 355
88      TTGTGTGGGGAATTTCTTGGAAAAAACCCCTTACTGGAATTTATTTTTCAACCACCTTAT 271
          *****
208      TATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCC 415
88      TATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCC 331
          *****
208      AGTAGTTGGATTTGGCTGCTGGAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGA 475
88      AGTAGTTGGATTTGGCTGCTGGAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGA 391
          *****
208      AGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGA 535
88      AGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGA 451
          *****
208      AATTGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGT 595
88      AATTGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGT 511
          *****

```

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดระหว่าง pOSXR1-208 และ pOSXR2-88 ด้วยโปรแกรม ClustalW

208 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pOSXR1-208

88 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pOSXR2-88

* แสดงบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

```

208 TATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATCATCATCCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAG 655
88 TATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATCATCATCCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAG 571
*****
208 AAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGAAGCTTACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCCTGT 715
88 AAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGAAGCTTACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCCTGT 631
*****
208 CGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTACTGTGGTCCTAA 775
88 CGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTACTGTGGTCCTAA 691
*****
208 TGGATGGGAGTATGAAGACGTTCCCTTTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTAGT 835
88 TGGATGGGAGTATGAAGACGTTCCCTTTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTAGT 751
*****
208 TGAAGAAGGTCTTGTTAAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTTCAGGA 895
88 TGAAGAAGGTCTTGTTAAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTTCAGGA 811
*****
208 CCTGTTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTT 955
88 CCTGTTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTT 871
*****
208 GACCCAGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTCAAGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTC 1015
88 GACCCAGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTCAAGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTC 931
*****
208 -----
88 CCTATTGAAGCACGAAACCATTAACTCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTTTCACCTGCTCA 1051
-----
208 -----
88 AGTGCTGCTCAGATGGGCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAA 1111
-----
208 -----
88 GAAAGATTGC 1122

```

ภาพที่ 18 (ต่อ)

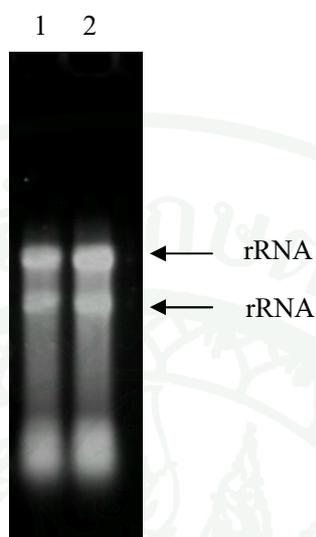
1.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3' ของยีนไซโลสรีดักเทส จาก cDNA ของ *Ogataea siamensis* N22

1.6.1 การสังเคราะห์ cDNA

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดของ *O. siamensis* N22 ที่สกัดด้วย TRIzol[®] (Invitrogen, USA) มาตรวจเช็คความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบแถบของ large subunit rRNA และ small subunit rRNA ชัดเจน แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี เหมาะสมในการนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ดังภาพที่ 19

นำอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มาสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ชุดอุปกรณ์ 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Germany) ซึ่งมี oligo dT-anchor primer ในชุดอุปกรณ์ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5' GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTV 3' เมื่อกำหนด ให้ V แทนนิวคลีโอไทด์ A, C หรือ G เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA เพราะไพร-

เมอร์จะจับกับบริเวณ poly (A) tail บนสายอาร์เอ็นเอของ *O. siamensis* N22 แล้วนำไปเพิ่มจำนวน ยีนไซโลสรีดักเทศทางด้าน 3' ต่อไป



ภาพที่ 19 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอทั้งหมดของ *O. siamensis* N22 ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TBE แลวที่ 1 คือ อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แลวที่ 2 คือ อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร

1.6.2 การเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศทางด้านปลาย 3' ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

เมื่อได้ cDNA แล้วนำมาเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศทางด้านปลาย 3' ด้วยวิธี 3' RACE โดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf633 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 เพราะเลือกมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีนไซโลสรีดักเทศบริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 633-652 จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่วิเคราะห์ได้จากพลาสมิด pOSXR2-88 ซึ่งได้เลือกออกแบบไพรเมอร์ให้ค่อนข้างไปทางด้านปลาย 3' ของยีน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดเล็ก และเพิ่มจำนวนได้ง่าย ไพรเมอร์ OSXRf633 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5' GTGGCTTACTCCTCATTCGGC 3' ความยาว 21 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 20) มีค่า T_m เท่ากับ 64 องศาเซลเซียส ค่า GC content เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบโครงสร้าง hairpin จึงเลือกใช้ไพรเมอร์นี้ในการเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศทางด้านปลาย 3' ของ *O. siamensis* N22 โดยใช้คู่กับ

PCR anchor primer ของชุดอุปกรณ์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5' GACCACGCGTATCGATG TCGAC 3'

```

ATGGTTTCTAAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAGTTGGATTTGGC 60
TGCTGGAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTACGAAGCTATCAAAGTCGGA 120
TACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATTGGTGAAGGCGTT 180
GCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTG 240
TGGAACAGTTATCATCATCCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGAC 300
TTGAAGCTTGACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCTGTGCTCAAAAATTTGTG 360
CCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTAAGTGTGGTCTAATGGATGGGAGTATGAA 420
GACGTTCCCTTTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTAGTTGAAGAAGGTCTTGTT 480
AAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTGAGGACCTGTTGAGAGGATGC 540
AAGATTAAGCCCCAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAGATTG 600
GTCAAGTATGTTTCAGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTCCGGCCCGCAA 660
TCATTTGTTGAACTTGATCATGCCAAGGCCAAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAA 720
ACCATTAACCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTTTACCTGCTCAAGTGTGCTCAGATGG 780
GCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGC 835

```

ภาพที่ 20 ตำแหน่งของไพรเมอร์ OsXRf633 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทส บางส่วนจาก pOSXR2-88 อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ OSXRf633 ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของยีน ลูกศรแสดงทิศทางของไพรเมอร์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 3' RACE มีขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 21 ซึ่งมีความมากกว่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ยังขาดหายไป (100-200 นิวคลีโอไทด์) ของยีนไซโลสรีดักเทสจากยีสต์ *O. siamensis* N22 ที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pJET1.2/blunt vector แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 414 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคาดว่าจะเป็นยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ โดยคล้ายคลึงกับบริเวณทางด้าน 3' ของยีนอัลโดสรีดักเทสของ *C. boidinii* และยีนไซโลสรีดักเทสของ *Debaryomyces hansenii* มากที่สุด เท่ากับ 70 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบตำแหน่ง TAA ซึ่งเป็น stop codon ของยีนไซโลสรีดักเทส อยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาด้วยวิธี 3' RACE (เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอ-

ไทด์ส่วน stop codon ของยีนไซโลสรีดักเทสในยีสต์อื่นๆ ที่ได้จากโปรแกรม BlastN ในฐานข้อมูล (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 414 นิวคลีโอไทด์ ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธี 3' RACE จาก cDNA ของ *O. siamensis* N22 เมื่อ M คือ 1 kb DNA ladder แถวที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากวิธี 3' RACE

Lee *et al* (2003) รายงานการใช้เทคนิค 5' RACE และ 3' RACE ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Candida parapsilosis* ที่มีความยาว 975 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังมีรายงานศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์ของเชื้อรา *Talaromyces emersonii* โดยใช้เทคนิค 5' RACE และ 3' RACE เช่นกัน ซึ่งรายงานการใช้เทคนิคนี้เหมาะสมสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสในเชื้อรา เพราะยีนไซโลสรีดักเทสของ *T. emersonii* มี 2 intron จึงต้องคัดแยกยีนโดยใช้ cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Fernades *et al*, 2009)

```

OSXR          GTGGCTTACTCCTCATTTCGGCCCGCAATCATTTGTTGAACTTGATCATGCCAAGGCCAAA 60
C. boidinii   ACCGCATACTCTTCATTTGGTCCACAATCATTTGTTGAATTAGACCATCTAAAGTTAAA 695
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          GACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAACCTCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTT 120
C. boidinii   GACTGTACCACTCTATTCAAACATGAAACAATTACTTCAATTGCTTCAGCTCATGACGTC 755
              ***          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          TCACCTGCTCAAGTGCTGCTCAGATGGGCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAG 180
C. boidinii   CCTCCAGCTAAAGTCTTATTGAGATGGGCTACTCAAAGAGGTTTAGCAGTTATCCCAAAA 815
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          TCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGAACGATTTCAATTTGAGTGAG 240
C. boidinii   TCTAATAAAAAGGAAAGATTATTAGGTAATTTGAAAATTAATGATTTTGGATTTAACTGAA 875
              ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          AAAGAGATTAAAGAAATCAGTGCCTTAAATCAGGATCTTAGATTTAATGATCCTTGGACT 300
C. boidinii   GCTGAACCTGAAAAAATGAAGCATTAGATATTGGTTTAAAGATTTAATGATCCATGGACT 935
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          TGGGAT---GAAATTCACCTTCATTTAACTAGAAACAGTAAATAAAGGCCAAAAGCT 357
C. boidinii   TGGGGTTACAATATTCACCATTTATTTAA----- 965
              **** *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSXR          TTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCAACATCGATACGCGTGGTC 414
C. boidinii   -----

```

ภาพที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี 3' RACE (OSXR) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลโดสรีดักเทสทางด้านปลาย 3' จาก *Candida boidinii* ด้วยโปรแกรม clustalW อักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่ง stop codon (TAA) ของยีนจากยีสต์ทั้งสองชนิด

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก pOSXR2-88 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีนไซโลสรีดักเทสบางส่วนแทรกอยู่ (แต่ยังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ไปจนถึง stop codon อีกประมาณ 100 ถึง 200 นิวคลีโอไทด์) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของพลาสมิด pOSXR2-88 มีตำแหน่งซ้อนเหลื่อมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE ได้ตามคาดหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ OSXR#633 ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 3' RACE นั้น เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของพลาสมิด pOSXR2-88 จึงควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ซ้อนเหลื่อม กับลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE เมื่อเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้งสองแหล่ง โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนเหลื่อมกันอยู่เท่ากับ 202 นิวคลีโอไทด์ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ pOSXR2-88 มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE จำนวน 414 นิวคลีโอไทด์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนไซโลสรีดักเทสจาก *O. siamensis* N22 ความยาวทั้งสิ้น 960 นิวคลีโอไทด์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อกันทั้งหมด 1,334 นิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในภาพที่ 23

(ก)

```

CTTTGGAATTGTTCTCCAGGGCCGCCACCGCCCTTGGTAATTTCCATCCTTTTAAAGGC 60
CATGATACCCATTTTTTAAAAATCCGAATAAGAATTATTTTTGTGCGAAAAATCTAACTTCC 120
CACCTCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGCTATTGGGGCGGTGAGGATATCTTTTATAA 180
AGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATATTGTGTGGGGAATTTCTTGAAAAAACC 240
CTTACTGGAATTTATTTTTCAACCACCTTATTATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAA 300
CAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCAGTAGTTGGATTGGCTGCTGGAAGTCG 360
AAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTCG 420
ATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATTGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCA 480
AAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATC 540
ATCATCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGCAT 600
ATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCCTGCTCGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGA 660
AGTATCTCCAGGGTTGACTGTGGTCTAATGGATGGGAGTATGAAGACGTTCTTTTAG 720
CAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTAGTTGAAGAAGGCTTGTAAATCGATTGGTA 780
TCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTCCAGGACCTGTTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCC 840
AATTGCTCAAATTTGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAAGATTGGTCAAGTATGTT 900
AGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTCCGCCCGCAATCATTGTTGAAC 960
TTGATCATGCCAAGGCCAAAGACACCGTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAACCTCAA 1020
TTGCTTCGGCTCATAAGGTTTACCTGCTCAAGTGCTGCTCAGATGGGCAACCCAAAGAA 1080
ACGTATTGGTTATTTCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGA 1140
ACGATTTCAATTTGAGTGAGAAAGAGATTAAGAAATCAGTGCTTTAAATCAGGATCTTA 1200
GATTTAATGATCCTTGGACTTGGGATGAAATCCAACCTTCATTTAAACTAGAAACAGTA 1260
AATAAAGGCCAAAAGCTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCAACAT 1320
CGATACGCGTGGTC 1334

```

(ข)

```

pOSXR2-88      ATGGTTTCTAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCAGTAGTTGGATTGGC 60
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      TGCTGGAAGTCAAAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGA 120
pOSXR633      -----
pOSXR2-88      TACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATTGGTGAAGGCGTT 180
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      GCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTG 240
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      TGGAACAGTTATCATCATCCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGAC 300
pOSXR633      -----

```

ภาพที่ 23 (ก) การเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE อักษรที่ขีดเส้นใต้ ATG แสดงบริเวณ start codon และ TAA แสดงบริเวณ stop codon

(ข) แสดงการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไซโลสรีดักเทสที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเทคนิค 3' RACE * แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนเหลื่อมกันระหว่างด้านปลาย 3' ของ pOSXR2-88 และปลายด้าน 5' ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE อักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่ง stop codon (TAA) ของยีน

```

pOSXR2-88      TTGAAGCTTGACTATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCTGTGCTCAAAAATTTGTG 360
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      CCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTACTGTGGTCTTAATGGATGGGAGTATGAA 420
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      GACGTTCCCTTTAGCAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTAGTTGAAGAAGGCTTTGTT 480
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      AAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTGAGGACCTGTTGAGAGGATGC 540
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      AAGATTAAGCCCCAATTGCTTCAAATTGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAGATTG 600
pOSXR633      -----

pOSXR2-88      GTCAAGTATGTTTCAGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTCGGCCCGCAA 660
pOSXR633      -----GTGGCTTACTCCTCATTCGGCCCGCAA 27
                        *****

pOSXR2-88      TCATTTGTTGAAGTTGATCATGCCAAGGCCAAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAA 720
pOSXR633      TCATTTGTTGAAGTTGATCATGCCAAGGCCAAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAA 87
                        *****

pOSXR2-88      ACCATTAAGTCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTTTACCTGCTCAAGTGTGCTCAGATGG 780
pOSXR633      ACCATTAAGTCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTTTACCTGCTCAAGTGTGCTCAGATGG 147
                        *****

pOSXR2-88      GCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGC----- 835
pOSXR633      GCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAG 207
                        *****

pOSXR2-88      -----
pOSXR633      AACTTATCGGTGAACGATTTCAATTTGAGTGAGAAAGAGATTAAGAAATCAGTGCTTTA 267
pOSXR2-88      -----
pOSXR633      AATCAGGATCCTTAGATTTAATGATCCTTGACTTGGGATGAAATTCCAACCTTCATTTAA 327
pOSXR2-88      -----
pOSXR633      ACTAGAAACAGTAAATAAAGGCCAAAAGCTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA 387
pOSXR2-88      -----
pOSXR633      AAAAAAGTCAACATCGATACGCGTGGTC 414

```

ภาพที่ 23 (ต่อ)

2. ลักษณะเฉพาะของยีนไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 จาก pOSXR2-88 ที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE จำนวน 1,334 นิวคลีโอไทด์ มาเปรียบเทียบกับยีนไซโลสรีดักเทศบนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่า ยีนไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศของ ยีสต์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank 65-72 เปอร์เซ็นต์ แสดงในตารางที่ 3 โดยมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์อัลโดสรีดักเทศ ของ *Candida boidinii* มากที่สุด เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ (Kang *et al*, 2003) รองลงมา คือ ไซโลสรีดักเทศ ของ *Meyerozyma guilliermondii* (หรือ *Pichia guilliermondii*) เท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ (Handumrongkul *et al*, 1998) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 1,334 นิวคลีโอไทด์มาหาส่วน open reading frame ได้ 960 นิวคลีโอไทด์ แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโน (ดังภาพที่ 24)

ทำการฟากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสจาก *O. siamensis* N22 จำนวน 1,334 นิวคลีโอไทด์ ไว้ในฐานข้อมูล GenBank มีรหัสในการสืบค้นข้อมูล (accession no.) คือ FJ763639

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ที่ได้จากการแปลรหัส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 กับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BlastX

ลำดับที่	เอนไซม์	ยีสต์	Accession No.	Identity (เปอร์เซ็นต์)
1	อัลโดสรีดักเทส	<i>C. boidinii</i>	AAL47846.2	72
2	ไซโลสรีดักเทส	<i>M. guilliermondii</i>	AAD09330.1	68
3	ไซโลสรีดักเทส	<i>Candida albicans</i>	EEQ446327.1	68
4	ไซโลสรีดักเทส	<i>Candida</i> sp.	AAW34373.1	67
5	อัลโดสรีดักเทส	<i>D. hansenii</i>	CAG89286	67
6	ไซโลสรีดักเทส	<i>C. tropicalis</i>	ABX60132	67
7	ไซโลสรีดักเทส	<i>Kl. lactis</i>	AAA99507	66
8	ไซโลสรีดักเทส	<i>C. dubliniensis</i>	CAX41651	66
9	ไซโลสรีดักเทส	<i>C. parapsilosis</i>	ABK32844	65

```

1 atggtttctaaaacagtggaagttgaacaatggcattgagatccca
M V S K T V K L N N G I E I P
46 gtagttggatttggctgctggaaagtcgaaaagtcaatctgctgct
V V G F G C W K V E K S I C A
91 gaccagatttacgaagctatcaaagtcggataccgtctgttcgat
D Q I Y E A I K V G Y R L F D
136 ggcgctatggattatggtaatgagaaggaattgggaagggcgtt
G A M D Y G N E K E I G E G V
181 gctagagcaatcaaagatggattggtaagagagaggaattgggtt
A R A I K D G L V K R E E L V
226 attgtctcaaagttgtggaacagttatcatcatcctgataacgtg
I V S K L W N S Y H H P D N V
271 aagaaggcaattagaagagttctggatgacttgaagcttgactat
K K A I R R V L D D L K L D Y
316 ctgcacatctttacatccattttcctgctcgtcgtcaaaaatttgtg
L D I F Y I H F P V A Q K F V
361 ccatgtgaagagaagtatcctccaggggttgactgtggctcctaat
P F E E K Y P P G L Y C G P N
406 ggatgggagatgaagacgttccttttagcagtcacatggaaggct
G W E Y E D V P L A V T W K A
451 atggaaggttagttgaagaaggtccttgtaaatcgattggtatc
M E G L V E E G L V K S I G I
496 tctaacttctctggagcactcattcaggacctgttgagaggatgc
S N F S G A L I Q D L L R G C
541 aagattaagcccaattgcttcaaattgaacaccatccatacttg
K I K P Q L L Q I E H H P Y L
586 acccagaaaagattgggtcaagtatgttcaggctcaagatattgca
T Q E R L V K Y V Q A Q D I A
631 gttgtggcttactcctcattcggcccgcaatcatttgttgaactt
V V A Y S S F G P Q S F V E L
676 gatcatgccaaaggccaaagacaccgtttccctattgaagcacgaa
D H A K A K D T V S L L K H E
721 accattaactcaattgcttcggctcataaggtttcacctgctcaa
T I N S I A S A H K V S P A Q
766 gtgctgctcagatgggcaacccaaagaaacgtattggttattcca
V L L R W A T Q R N V L V I P
811 aagtctaaccagaaggaaagattgctgcagaacttatcggtgaac
K S N Q K E R L L Q N L S V N
856 gatttcaatttgagtgagaaagattaagaaatcagtgcttta
D F N L S E K E I K E I S A L
901 aatcaggatcttagatttaatgatccttgacttgggatgaaatt
N Q D L R F N D P W T W D E I
946 ccaaccttcatttaa 960
P T F I *

```

ภาพที่ 24 Open reading frame ของยีนไซโลสรีดักเทศของยีสต์ *O. siamensis* N22 ความยาว 960 นิวคลีโอไทด์ และแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม ORF Finder

การตามหายีนไซโลสรีดักเทศด้วยวิธี genomic DNA cloning นั้น ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน upstream ของยีน จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้มาวิเคราะห์หาบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่บนพลาสมิด pOSXR2-88 เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเทคนิค 3' RACE ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 1,334 นิวคลีโอไทด์ โดยพบว่ามี 287 นิวคลีโอไทด์ อยู่ทางด้าน upstream ของยีน และพบตำแหน่ง TATA box-like

sequence ของยีน คือ $^{-112}$ TATAA $^{-108}$ ทางด้าน 5' ของ start codon (ATG) และพบตำแหน่งของ polyadenylation signal คือ 974 AATAAA 979 อยู่ห่างจาก stop codon (TAA) ไปทางด้าน 3' ดังแสดง ในภาพที่ 25

```

CTTTGGAATTGTTCTTCCAGGGCCGCCACCGCCCTTGGTAATTTCCATCCTTTTAAAGGC 60
CATGATACCCATTTTTTAAAATTCCGAATAAGAATTATTTTTGTGCGAAAAATCTAACTTCC 120
CACCTCCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGCTATTGGGGCGGTGAGGATATTCTTTTATAA 180
AGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATATTGTGTGGGGAATTTCTTGGAAAAAAC 240
CTTACTGGAATTTATTTTCAACCACCTTATTATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAA 300
CAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAGTTGGATTGGCTGCTGGAAAGTCG 360
AAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTCG 420
ATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAAATTGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCA 480
AAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATC 540
ATCATCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGACT 600
ATCTCGACATCTTTTACATCCATTTTCTGTGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGA 660
AGTATCTCCAGGGTTGTACTGTGGTCCTAATGGATGGGAGTATGAAGACGTTCTTTTAG 720
CAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTGTGGAAGAAGGCTTGTGTTAAATCGATTGGTA 780
TCTCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTCCAGGACCTGTTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCC 840
AATTGCTTCAAATGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAAGATTGGTCAAGTATGTTTC 900
AGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTGCGCCCGCAATCATTTGTTGAAC 960
TTGATCATGCCAAGGCCAAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAAC TCAA 1020
TTGCTTCGGCTCATAAGGTTTACCTGCTCAAGTGCTGCTCAGATGGGCAACCCAAAGAA 1080
ACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGA 1140
ACGATTTCAATTTGAGTGAGAAAGAGATTAAGAAATCAGTGTCTTTAAATCAGGATCTTA 1200
GATTTAATGATCCTTGGACTTGGGATGAAATTTCCAACCTTCATTTAAACTAGAAACAGTA 1260
AATAAAGGCCAAAAGCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCAACAT 1320
CGATACGCGTGGTC 1334

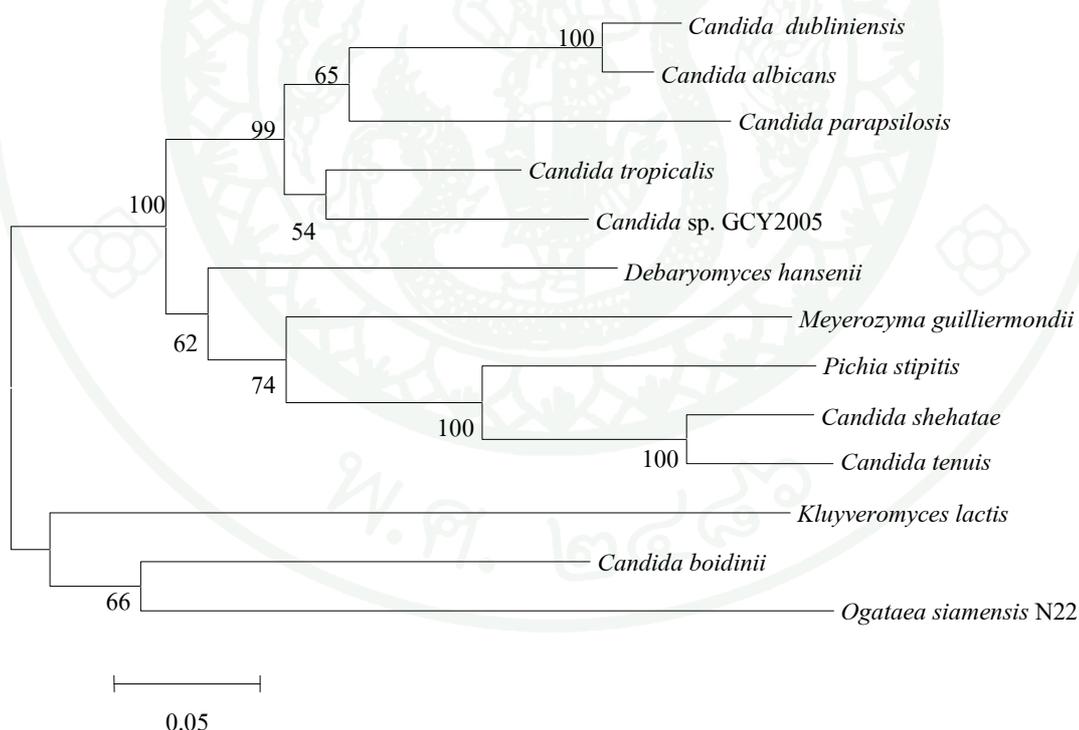
```

ภาพที่ 25 วิเคราะห์ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนไซโลสรีดักเทศจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บน พลาสมิด pOSXR2-88 เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก เทคนิค 3' RACE จำนวน 1,334 นิวคลีโอไทด์
 อักษรตัวหนา คือ open reading frame ของยีนไซโลสรีดักเทศ
 ATG จดเส้นใต้ คือ start codon
 TAA จดเส้นใต้ คือ stop codon
 TATAA จดเส้นใต้หนา คือ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน
 AATAA จดเส้นใต้หนา คือ ตำแหน่ง polyadenylation signal ของยีน

ได้มีรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ (TATA box) ของยีนไซโลสรีดักเทศ จาก *C. tropicalis* คือ TATAA และ *Kl. lactis* คือ TATATAA ที่บริเวณ upstream ของ ORF แต่ไม่พบตำแหน่งของ polyadenylation signal (Yokoyama *et al.*, 1995 ; Billard *et al.*, 1995)
 จากรายงานของ Amore *et al.* (1991) บริเวณเริ่มต้นการถอดรหัสของยีนไซโลสรีดักเทศจาก *P. stipitis* ได้แก่ TATAAA ซึ่งอยู่ก่อน start codon 81 เบส พบ CCAAT 2 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ก่อน start codon ไป 106 และ 146 เบส นอกจากนี้ยังมีรายงานตำแหน่ง TATA box ของยีนไซลิทอลดีไฮโดร-

จีโนมจาก *Arxula adenivorans* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์เพื่อทำงานต่อจากไซโลสตรี้ดัก-เทส ตำแหน่ง TATA-like sequence คือ CCATAAAGATGTGAA และยังพบ TATAATT ซึ่งน่าจะ เป็นตำแหน่งของ polyadenylation signal อีกด้วย (Boer *et al*, 2005)

จากผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining ที่ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ของยีนไซโลสตรี้ดักเทสของ *O. siamensis* N22 และยีสต์ชนิดอื่นอีก 12 ชนิด (ภาพที่ 26) พบว่ายีนไซโลสตรี้ดักเทสของ *O. siamensis* N22 มีความใกล้เคียงกับเอนไซม์อัลโดสตรี้ดักเทสของ *Candida boidinii* มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสตรี้ดักเทสของ *O. siamensis* N22 กับกรดอะมิโนของไซโลสตรี้ดักเทสในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BlastP พบว่าเอนไซม์ไซโลสตรี้ดักเทสของ *O. siamensis* N22 มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์อัลโดสตรี้ดักเทส ของยีสต์ *C. boidinii* มากที่สุด เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายกับเอนไซม์ไซโลสตรี้ดักเทส ของยีสต์ *Meyerozyma guilliermondii* เท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastX ที่ทำการวิเคราะห์ไปก่อนหน้านี้



ภาพที่ 26 Phylogenetic tree ของยีนไซโลสตรี้ดักเทสจาก *O. siamensis* N22 และ ยีสต์ 12 ชนิด ที่สร้างด้วยวิธี neighbor-joining โดยมีค่า bootstrap = 1,000 (แสดงเฉพาะ ค่า bootstrap ที่ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อใช้โปรแกรม BlastX เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 กับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์อื่นๆ แล้วคัดเลือกไซโลสรีดักเทสของยีสต์ 12 ชนิด ที่พบว่ามี ความคล้ายคลึงกันมากที่สุดจากโปรแกรม BlastP บนฐานข้อมูล ได้แก่ อัลโดสรีดักเทสของ *C. boidinii* ไซโลสรีดักเทสของ *C. shehatae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida* sp. GCY2005, *C. dubliniensis*, *C. tenuis*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii*, *P. stipitis*, *Kl. lactis* และ *M. guiliermondii* มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalW จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ต่างจากเอนไซม์ของยีสต์ทั้ง 12 ชนิดอยู่ 3 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 27 และตารางที่ 4 ได้แก่

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 ของ *O. siamensis* N22 คือ isoleucine แต่กรดอะมิโนของยีสต์อื่นเป็น methionine ซึ่งกรดอะมิโน isoleucine หมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนเป็นแบบไม่มีขั้ว และไม่ชอบน้ำ ส่วนกรดอะมิโน methionine หมู่ฟังก์ชันเป็นแบบมีขั้ว และชอบน้ำ

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 130 คือ leucine ขณะที่กรดอะมิโนของยีสต์อื่นคือ phenylalanine ซึ่งกรดอะมิโน leucine หมู่ฟังก์ชันเป็นแบบไม่มีขั้ว และไม่ชอบน้ำ ส่วน phenylalanine หมู่ฟังก์ชันเป็นอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 267 คือ leucine ขณะที่กรดอะมิโนของยีสต์อื่นคือ alanine ซึ่งทั้ง leucine และ alanine หมู่ฟังก์ชันเป็นแบบไม่มีขั้ว และไม่ชอบน้ำ

ความแตกต่างของกรดอะมิโนของไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 กับไซโลสรีดักเทสของยีสต์อื่น พบว่าอาจไม่มีผลต่อลักษณะของเอนไซม์ เพราะถึงแม้ว่าในบางตำแหน่งกรดอะมิโนจะมีหมู่ฟังก์ชันต่างกัน แต่ไม่ได้อยู่บริเวณตำแหน่งที่จะจับกับซับสเตรต และโคซับสเตรต ไม่น่าส่งผลให้การทำงานของไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 แตกต่างกับยีสต์ชนิดอื่น แต่ถ้ามีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่จะจับกับซับสเตรต และโคซับสเตรตแตกต่างกับยีสต์อื่น อาจส่งผลให้เอนไซม์จับกับซับสเตรต หรือ โคซับสเตรตแตกต่างกับเอนไซม์ของยีสต์ชนิดอื่นได้

<i>Candida albicans</i>	FYCG-DG---DKFHYENVPLDWTWKALEKLVNLGKIKSIGISNFGGLIYDLIRGATIKP	236
<i>C. dubliniensis</i>	FYCGDGGD-NKFHYENVPLDWTWKALEKLVNLGKIKSIGISNFGGLIYDLIRGATIKP	196
<i>C. tropicalis</i>	FYCG-DG---DNFHYEDVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	189
<i>Candida sp. GCY2005</i>	FYCG-DG---NNFHYENVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	186
<i>C. parapsilosis</i>	FYCG-DG---DKFHYENVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFGGLIYDLIRGATIKP	182
<i>M. guilliermondii</i>	FYCG-DG---DKFHYEDVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	182
<i>D. hansennii</i>	FYCG-DG---DKFHYENVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFGGLIYDLIRGATIKP	182
<i>C. shehatae</i>	FYCG-DG---DNFVYEDVPILETWKALEKLVKAGKIRSIGVSNFPGALLDLDLFRGATIKP	188
<i>C. tenuis</i>	FYCG-DG---NNFVYEDVPILETWKALEKLVQKGIKRSIGVSNFPGALLDLDLFRGATIKP	187
<i>P. stipitis</i>	FYCG-KG---DNFDYEDVPILETWKALEKLVKAGKIRSIGVSNFPGALLDLDLFRGATIKP	183
<i>O. siamensis</i> N22	LYCGP-----NGWEYEDVPLAVTWKAMEGLVEEGLVKSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	184
<i>Candida boidinii</i>	FYCGDG----DKWSFEDVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	185
<i>Kl. lactis</i>	FYTGKDEAKGHIEEQVPLDWTWKALEKLVQKGIKRSIGISNFTGALIYDLIRGATIKP	191
	:* * . :*: * :*: * * . * :*: * :*: * * :* * :* * . * :*	
<i>Candida albicans</i>	AVLQIEHHPYLQOPRLIEFVQNGQIAITAYSSFGPQSFLELQSKRALDPTLFEHETIKS	296
<i>C. dubliniensis</i>	AVLQIEHHPYLQOPRLIEFVQNGQIAITAYSSFGPQSFLELQSKRALDPTLFEHEI IKS	256
<i>C. tropicalis</i>	AVLQIEHHPYLQOPKLIYVQKAGIAITGYSSFGPQSFLELESKRALNPTLFFKHETIKS	249
<i>Candida sp. GCY2005</i>	SVLQIEHHPYLQOPKLIYVQKQNI AITAYSSFGPQSFLELESKRALDPTLFEHKT IKS	246
<i>C. parapsilosis</i>	AVLQIEHHPYLQOPRLIEFVQSQGIAITGYSSFGPQSFLELESKRALDPTLFDHETIKS	242
<i>M. guilliermondii</i>	AVLQIEHHPYLQOPRLIEFVQSQGIAITAYSSFGPQSFVELDHPRVKDVPLFEHDVIKS	242
<i>D. hansennii</i>	AVLQIEHHPYLQOPRLVEYVQSQNI AITGYSSFGPQSFLELKHKSKALDPTLFEHKT IKS	242
<i>C. shehatae</i>	AVLQVEHHPYLQOPKLIYVQKAGVITVAYSSFGPQSFVEMNQGRALNPTLFEHDV IKA	248
<i>C. tenuis</i>	AVLQVEHHPYLQOPKLIYVQKAGVITVAYSSFGPQSFVEMNQGRALNPTLFAHDT IKA	247
<i>P. stipitis</i>	SVLQVEHHPYLQOPRLIEFVQSQGIAITAYSSFGPQSFVELNQGALNPTLFEHNET IKA	243
<i>O. siamensis</i> N22	QLLQIEHHPYLQOPRLVQVQADIAVVAYSSFGPQSFVELDHAKAKDVTSLKKHETINS	244
<i>Candida boidinii</i>	AVLEIEHHPYLQOPRLIEYAKTEGIHVTAYSSFGPQSFVELDHPKVKDCTTLFKHETITS	245
<i>Kl. lactis</i>	VALQIEHHPYLQOPRLIKYVKNAGIQVVAYSSFGPQSFLELENKALNPTLFEHDT IKS	251
	*:***** * :*: : . : . :***** * :* : . : . : . * : . * :	
<i>Candida albicans</i>	IADKHGKSPAQVLLRWATQRNIAVIPKSNPDRLAQNLAQVVD-FDLTEEDLQAI SKLDIG	355
<i>C. dubliniensis</i>	IADKHGKSSAQILLRWATQRNIAVIPKSNPDRLAQNLAQVVD-FDLTDEDLQAI SKLDIG	315
<i>C. tropicalis</i>	IADKHGKSPAQVLLRWATQRNIAVIPKSNPRLAQNLSVVD-FDLTKDDLNDIAKLDIG	308
<i>Candida sp. GCY2005</i>	IAEKHGKTPAQVLLRWATQRNIAVIPKSNPARLAQNLSVVD-FDL SKEDIQEISALDIG	305
<i>C. parapsilosis</i>	IASKHKSSAQVLLRWATQRGIAVIPKSNPDRLAQNLSVVD-FELSKEDLEAINKLDKG	301
<i>M. guilliermondii</i>	VAGKVKKTPAQVLLRWATQRGLAVIPKSNPDRLLSNLKVNVD-FDLSQEDFQEI SKLDIE	301
<i>D. hansennii</i>	IANKNKTTPAQVLLRWASQRNIAVIPKSNPDRLQLNLEVND-FDLSKEDFEEI SKLDQE	301
<i>C. shehatae</i>	IAAKHNKVAEVLRLRWSAQRGIAVIPKSNLPERLVQNRSFND-FELTKEDFEEI SKLDIN	307
<i>C. tenuis</i>	IAAKYNKTPAEVLLRWAAQRGIAVIPKSNLPERLVQNRSFNT-FDLTKEDFEEI AKLDIG	306
<i>P. stipitis</i>	IAAKHGKSPAQVLLRWSSQRGIAVIPKSNTPRLLNENKDVNS-FDLDEQDFADI AKLDIN	302
<i>O. siamensis</i> N22	IASAHKVSPAQVLLRWATQRNVVIPKSNQKERLLQNLSVND-FNLSEKEIKEI SALNQD	303
<i>Candida boidinii</i>	IASAHDVPPAKVLLRWATQRGLAVIPKSNKERRLLGNLKIND-FDLTEAELEKIEALDIG	304
<i>Kl. lactis</i>	IASKHKVTPQVLLRWATQNGIAVIPKSKKERLLDNLRLINDALTLTDDDELKQISGLNQN	311
	:* . :*: * :* :* * . * * * . * . :* . :* * :	
<i>Candida albicans</i>	LRFNPDWDWK--IPIFV	371
<i>C. dubliniensis</i>	LRFNPDWDWK--IPIFV	331
<i>C. tropicalis</i>	LRFNPDWDWN--IPIFV	324
<i>Candida sp. GCY2005</i>	VRFNPDWDWN--IPIFV	324
<i>C. parapsilosis</i>	LRFNPDWDWH--IPIFV	317
<i>M. guilliermondii</i>	LRFNPDWDWK--IPTFI	317
<i>D. hansennii</i>	LRFNPDWDWK--IPIFA	317
<i>C. shehatae</i>	LRFNPDWDWN--IPIFV	323
<i>C. tenuis</i>	LRFNPDWDWN--IPIFV	322
<i>P. stipitis</i>	LRFNPDWDWK--IPIFV	318
<i>O. siamensis</i> N22	LRFNPDWTD--EIPFI	319
<i>Candida boidinii</i>	LRFNPDWTWGY-NIPTFI	321
<i>Kl. lactis</i>	IRFNPDWEWLDNEFPTFI	329
	:* * :* * * :* * :	

ภาพที่ 27 (ต่อ)

ตารางที่ 4 ความแตกต่างของกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสระหว่าง *O. siamensis* N22 กับยีสต์ทั้ง 12 ชนิด

	กรดอะมิโนตำแหน่ง 14	กรดอะมิโนตำแหน่ง 130	กรดอะมิโนตำแหน่ง 267
<i>O. siamensis</i> N22	isoleucine	leucine	leucine
<i>C. boidinii</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>Candida</i> sp. GCY2005	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. tropicalis</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. albicans</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. dubliniensis</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. tenuis</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. parapsilosis</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>C. shehatae</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>P. stipitis</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>M. guilliermondii</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>D. hansenii</i>	methionine	phenylalanine	alanine
<i>K. lactis</i>	methionine	phenylalanine	alanine

เมื่อนำลำดับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่ได้ไปวิเคราะห์และศึกษาตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส โดยใช้โปรแกรม ScanProsite (<http://au.expasy.org/tools/scanprosite/>) พบตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม มีลำดับเป็น IPKSNQKERLLQNLSV (ตำแหน่ง 269 ถึง 284) โดยมีลำดับกรดอะมิโน IPKS (ตำแหน่ง 269 ถึง 272) แสดงบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ในส่วน active site ของไซโลสรีดักเทสของยีสต์ (Yokoyama *et al.*, 1995; Bolen *et al.*, 1996; Dmytruk *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2009) แสดงดังภาพที่ 27

3. การแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทศของ *Ogataea siamensis* N22

3.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศที่สมบูรณ์จากยีนโนมิกดีเอ็นเอ

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนจากข้อ 2.2 ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไซโลสรีดักเทศเพื่อเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศจากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ห่างจากตำแหน่ง start codon หรือ ATG ไปทางด้าน 5' เท่ากับ 78 ตำแหน่ง มาออกแบบไพรเมอร์ OSXRf-78 ลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5' TATTGTGTGGGAATTTCTTG 3' และเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมด้าน 3' ของตำแหน่ง stop codon ของยีนหรือ TAA มาออกแบบไพรเมอร์ OSXRr 959 ลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5' GGCCTTTATTTACTGTTTCTAG 3' นอกจากนี้ยังได้เติมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* เข้าไปที่ด้าน 5' ของ OSXRf-78 และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* เข้าไปที่ด้าน 5' ของ OSXRr 959 เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อยีนไซโลสรีดักเทศที่เพิ่มจำนวนได้เข้ากับพลาสมิดที่จะใช้ในการแสดงออกของยีน ได้แก่ pPICZB และ pGAPZB (Invitrogen, USA) ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* และ *EcoRI* บริเวณ multiple cloning site

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเทศที่สมบูรณ์ของ *O. siamensis* N22 คือ OSXRf-78 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5' GCTTCGAATATTGTGTGGGAATTTCTTG 3' และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* และ OSXRr959 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5' CGGAATTCGGCCTTTATTTACTGTTTCTAG 3' และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* นอกจากนี้ได้เติมนิวคลีโอไทด์ GC และ CG เข้าไปที่ด้านหน้าของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SfuI* และ *EcoRI* ตามลำดับ เพื่อให้เอนไซม์เลือกตำแหน่งจดจำและตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะได้ง่ายขึ้น ลักษณะเฉพาะของไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 โพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนไซโตสรีดักเทสที่สมบูรณ์จากยีนโนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22

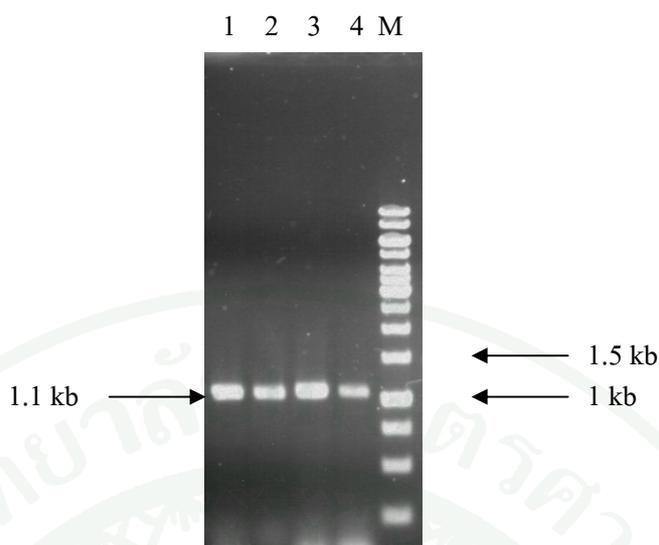
ชื่อโพรเมอร์	ความยาว (นิวคลีโอไทด์)	T _m (°C)	GC Content (%)	โครงสร้าง hairpin	Self-dimer	Cross-dimer
OSXRf-78: 5' GCTTCGAATATTGTGTGGGGAATTTCTTG 3'	29	64.6	41.4	ไม่เกิด	เกิด	เกิด
OSXRr959: 5' CGGAATTCGGCCTTTATTTACTGTTTCTAG 3'	30	64.6	40	ไม่เกิด	เกิด	เกิด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มจำนวนยีนไซโลสรีดักเตสจากยีนมิกดีเอ็นเอของ *O. siamensis* N22 ด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 และเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีน ประกอบด้วย 10X Ex Taq™ Buffer (ที่มี MgCl₂ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs Mixture (แต่ละ dNTPs เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ชนิดละ 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.13 ไมโครลิตร, ดีเอ็นดีเอ็นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอส

สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส 5 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	63 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส 10 นาที

จากสภาวะของการทำปฏิกิริยาข้างต้น พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส ดังภาพที่ 28 และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MgCl₂ จาก 1.5 มิลลิโมลาร์ เป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มากขึ้นเล็กน้อย และเมื่อวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เทียบกับขนาดของยีนไซโลสรีดักเตสของ *O. siamensis* N22 ทั้งหมดที่ทราบแล้วจากข้อ 2.2 พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ถ้าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ คือ ยีนไซโลสรีดักเตสของ *O. siamensis* N22 จะต้องมีความยาว 1,077 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิด pJET/1.2 blunt vector แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 28 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนไซโลสรีดักเทสที่สมบูรณ์ของ *O. siamensis* N22 จากการทำปฏิกิริยาด้วยไพรเมอร์ OSXRF-78 และ OSXRr959 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ และ $MgCl_2$ แตกต่างกัน
 แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอ เจือจาง 0.1 เท่า ความเข้มข้น $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์
 แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอ เจือจาง 0.01 เท่า ความเข้มข้น $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์
 แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอ เจือจาง 0.1 เท่า ความเข้มข้น $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์
 แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอ เจือจาง 0.01 เท่า ความเข้มข้น $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์
 M คือ 1 kb DNA ladder

ภาพที่ 29 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRF-78 และ OSXRr959 พบว่ามีขนาด 1,077 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสบนฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าคล้ายคลึงกับอัลโดสรีดักเทสของยีสต์ *C. boidinii* และไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *M. guiliermondii* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 72 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

OSXRf-78 →

GCTTCGAATATTGTGTGGGGAATTTCTTGAAAAAACCCCTTACTGGAATTTATTTTTCA 60
 ACCACCTTATTATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAACAGTGAAGTTGAACAATGGCA 120
 TTGAGATCCCAGTAGTTGGATTTGGCTGCTGGAAAGTCGAAAAGTCAATCTGCGCTGACC 180
 AGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTTCGATGGCGCTATGGATTATGGTA 240
 ATGAGAAGGAAATGGTGAAGCGTTGCTAGAGCAATCAAAGATGGATTGGTTAAGAGAG 300
 AGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATCATCATCTTGATAACGTGAAGA 360
 AGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGACTATCTCGACATCTTTTACATCC 420
 ATTTTCCTGTGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGAAGTATCCTCCAGGGTTGTACT 480
 GTGGTCTAATGGATGGGAGTATGAAGACGTTTCTTTAGCAGTACATGGAAGGCTATGG 540
 AAGGTTTAGTTGAAGAAGGCTTTGTTAAATCGATTGGTATCTCTAACTTCTCTGGAGCAC 600
 TCATTCAGGACCTGTTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCCAATTGCTTCAAATTGAACACC 660
 ATCCATACTTGACCCAGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTTCAAGGCTCAAGATATTGCAGTTG 720
 TGGCTTACTCCTCATTGCGCCCGCAATCATTTGTTGAACTTGATCATGCCAAGGCCAAAG 780
 ACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAAGTCAATTGCTTCGGCTCATAAGGTTT 840
 CACCTGCTCAAGTGCTGCTCAGATGGGCAACCCAAAGAAACGTATTGGTTATTCCAAAGT 900
 CTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGAACGATTTCAATTTGAGTGAGA 960
 AAGAGATTAAGAAAATCAGTGCTTTAAATCAGGATCTTAGATTTAATGATCCTTGGACTT 1020
 GGGATGAAATTCACCTTCATTTAAACTAGAAACAGTAAATAAAGGCCGAATTCG 1077

← OSXRr959

ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ ลูกศรแสดงทิศทางของไพรเมอร์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 มาเทียบเคียงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อกันของ pOSXR2-88 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันทุกนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ open reading frame ของยีนไซโลสรีดักเทส ดังภาพที่ 30 แสดงว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 คือ ยีนที่สมบูรณ์ของไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 และสามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกได้ และยังทราบอีกว่ายีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ไม่มีส่วนของ intron อยู่ภายในยีน เพราะสามารถเพิ่มจำนวนยีนโดยการเพิ่มจำนวนโดยตรงได้จากยีนอมิกดีเอ็นเอ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิดเพื่อใช้ในการแสดงออกต่อไป

pOSXR OSXR	CTTTGGAATTGTTCTTCCAGGGCCGCCACCGCCCTTGGTAATTTCCATCCTTTTAAAGGC -----	60
pOSXR OSXR	CATGATACCCATTTTAAAAATCCGAATAAGAATTATTTTTGTCGAAAAATCTAACTTCC -----	120
pOSXR OSXR	CACCTCCCCACCTTTGACCCCGAATTTTCGCTATTGGGGCGGTGAGGATATTCTTTATAA -----	180
pOSXR OSXR	AGTTTCCAGCTGAAGTAGCAATCTTGAGATATTGTGTGGGAATTTCTTGGAAAAAAC -----GCT-----TCGA-ATATTGTGTGGGAATTTCTTGGAAAAAAC *** * * *	240 39
pOSXR OSXR	CTTACTGGAATTTATTTTCAACCACCTTATTATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAA CTTACTGGAATTTATTTTCAACCACCTTATTATTTCTTGAAAGAAAATGGTTTCTAAAA *****	300 99
pOSXR OSXR	CAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAGTTGGATTTGGCTGCTGGAAGTCC CAGTGAAGTTGAACAATGGCATTGAGATCCCAGTAGTTGGATTTGGCTGCTGGAAGTCC *****	360 159
pOSXR OSXR	AAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTCC AAAAGTCAATCTGCGCTGACCAGATTTACGAAGCTATCAAAGTCGGATACCGTCTGTTCC *****	420 219
pOSXR OSXR	ATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCA ATGGCGCTATGGATTATGGTAATGAGAAGGAAATGGTGAAGGCGTTGCTAGAGCAATCA *****	480 279
pOSXR OSXR	AAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATC AAGATGGATTGGTTAAGAGAGAGGAATTGGTTATTGTCTCAAAGTTGTGGAACAGTTATC *****	540 339
pOSXR OSXR	ATCATCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGACT ATCATCTGATAACGTGAAGAAGGCAATTAGAAGAGTTCTGGATGACTTGAAGCTTGACT *****	600 399
pOSXR OSXR	ATCTCGACATCTTTACATCCATTTCCCTGTCGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGA ATCTCGACATCTTTACATCCATTTCCCTGTCGCTCAAAAATTTGTGCCATTTGAAGAGA *****	660 459
pOSXR OSXR	AGTATCCTCCAGGTTGTACTGTGGTCCTAATGGATGGGAGTATGAAGACGTTCCCTTAG AGTATCCTCCAGGTTGTACTGTGGTCCTAATGGATGGGAGTATGAAGACGTTCCCTTAG *****	720 519
pOSXR OSXR	CAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTGTGTTGAAGAAGGTTCTGTTAAATCGATTGGTA CAGTCACATGGAAGGCTATGGAAGGTTTGTGTTGAAGAAGGTTCTGTTAAATCGATTGGTA *****	780 579
pOSXR OSXR	TCCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTGAGACCTGTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCC TCCTAACTTCTCTGGAGCACTCATTGAGACCTGTGAGAGGATGCAAGATTAAGCCCC *****	840 639
pOSXR OSXR	AATTGCTTCAAATGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTT AATTGCTTCAAATGAACACCATCCATACTTGACCCAGGAAAGATTGGTCAAGTATGTTT *****	900 699

ภาพที่ 30 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทศจาก pOSXR2-88 รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE กับ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959

pOSXR คือ pOSXR2-88 รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค 3' RACE

OSXR คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959

เครื่องหมาย * แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกัน

```

pOSXR      AGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTTCGGCCCGCAATCATTTGTTGAAC 960
OSXR       AGGCTCAAGATATTGCAGTTGTGGCTTACTCCTCATTTCGGCCCGCAATCATTTGTTGAAC 759
*****
pOSXR      TTGATCATGCCAAGGCCAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAAC TCAA 1020
OSXR       TTGATCATGCCAAGGCCAAGACACCGTTTCCCTATTGAAGCACGAAACCATTAAC TCAA 819
*****
pOSXR      TTGCTTCGGCTCATAAGGTTTCACCTGCCTCAAGTGTCTCAGATGGGCAACCCAAAGAA 1080
OSXR       TTGCTTCGGCTCATAAGGTTTCACCTGCCTCAAGTGTCTCAGATGGGCAACCCAAAGAA 879
*****
pOSXR      ACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGA 1140
OSXR       ACGTATTGGTTATTCCAAAGTCTAACCAGAAGGAAAGATTGCTGCAGAACTTATCGGTGA 939
*****
pOSXR      ACGATTTCAATTTGAGTGAGAAAGAGATTAAAGAAATCAGTGCTTTAAATCAGGATCTTA 1200
OSXR       ACGATTTCAATTTGAGTGAGAAAGAGATTAAAGAAATCAGTGCTTTAAATCAGGATCTTA 999
*****
pOSXR      GATTTAATGATCCTTGGACTTGGGATGAAATCCAACCTTCATTTAAACTAGAAACAGTA 1260
OSXR       GATTTAATGATCCTTGGACTTGGGATGAAATCCAACCTTCATTTAAACTAGAAACAGTA 1059
*****
pOSXR      AATAAAGGCCAAAAGCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCAACAT 1320
OSXR       AATAAAGGCCGAA---TTCCG----- 1077
***** * * *
pOSXR      CGATACGCGTGGTC 1334
OSXR       -----

```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

3.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอพาหะเพื่อการแสดงออกของยีนในยีสต์

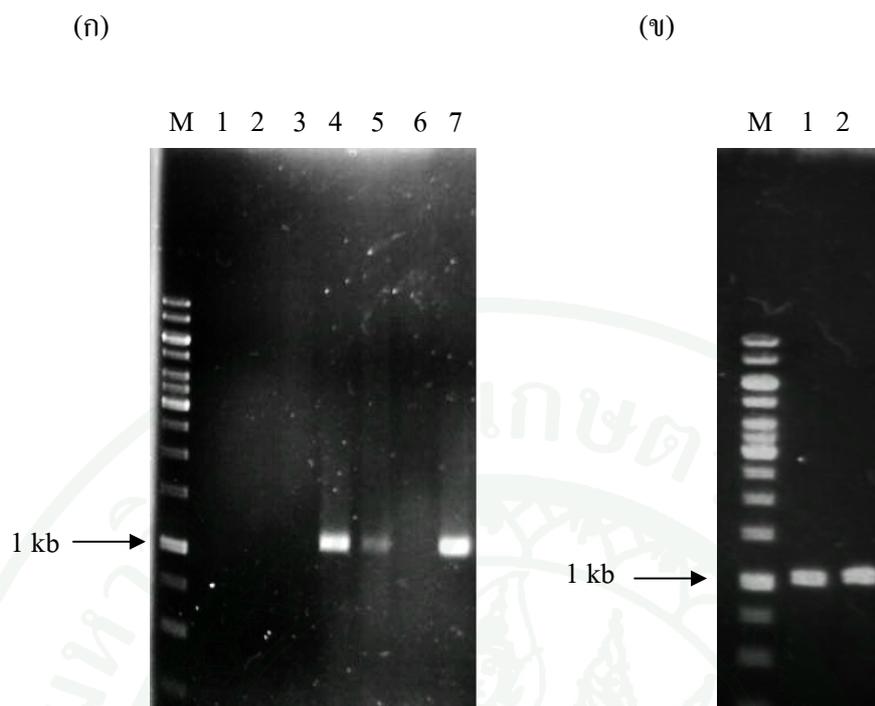
3.2.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนไซโลสรีดักเทศและดีเอ็นเอพาหะเพื่อการแสดงออก

ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr959 จากข้อ 3.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SfuI* และ *EcoRI* ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งจะตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ปลาย 5' และ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอตามลำดับ แล้วทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ก่อนนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการแสดงออก คือ พลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SfuI* และ *EcoRI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำในบริเวณ multiple cloning site จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้ว มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ได้เป็นพลาสมิดสายผสม ให้ชื่อว่า pPICOSXR และ pGAPOSXR ตามลำดับ แล้วถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียคอมพิเทนดท์ *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ZeocinTM (Invitrogen, USA) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบรีคอมบิแนนท์โคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม pPICOSXR ที่เจริญบนอาหาร LB ที่เติม ZeocinTM จำนวน 18 โคลน และพบรีคอมบิแนนท์โคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม pGAPOSXR จำนวน 20 โคลน จากนั้นสุ่มคัดเลือกโคลนมาคัดเลือกโคลนที่มียีนไซโลสรีดักเทศ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ OsXRf-78 และ OsXRr959 พบว่าได้

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส จากพลาสมิดสายผสม pPICOSXR และ pGAPOSXR ดังภาพที่ 31 จึงเลือกพลาสมิดสายผสม pPICOSXR และ pGAPOSXR ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ไปใช้ในเพื่อแสดงออกของเอนไซม์ไซโคลสรีดักเทสในยีสต์ต่อไป

3.2.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสม pPICOSXR และ pGAPOSXR เข้าสู่เซลล์ยีสต์

ตัดพลาสมิดสายผสม pPICOSXR no.4 ด้วยเอนไซม์ *SacI* ที่มีตำแหน่งตัดบนพลาสมิดเพียงตำแหน่งเดียว เพื่อให้พลาสมิดอยู่ในรูปเส้นตรง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4,377 นิวคลีโอไทด์ (pPICZ B ขนาด 3,300 นิวคลีโอไทด์ และไซโคลสรีดักเทสขนาด 1,077 นิวคลีโอไทด์) จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิด pPICOSXR no.4 และ pGAPOSXR no.2 ซึ่งมีขนาด 3,977 นิวคลีโอไทด์ (pGAPZ B ขนาด 2,900 นิวคลีโอไทด์ และไซโคลสรีดักเทสขนาด 1,077 นิวคลีโอไทด์) โดยใช้พลาสมิดความเข้มข้นประมาณ 1 ไมโครกรัม เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *O. siamensis* N22 ด้วยวิธี electroporation ใช้กระแสไฟฟ้า 2.5 กิโลโวลต์ นาน 8-10 วินาที แล้วคัดเลือกโคลนที่เจริญบนอาหาร YPDS (ภาคผนวก ก) ที่เติมสารปฏิชีวนะ Zeocin™ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 31 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจหายีนไซโตสรีดักเทสบนพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B

(ก) ตรวจหายีนไซโตสรีดักเทสบนพลาสมิดสายผสม pPICOSXR

M คือ 1 kb DNA ladder

แฉวที่ 1 คือ pPICOSXR no.1

แฉวที่ 2 คือ pPICOSXR no.2

แฉวที่ 3 คือ pPICOSXR no.3

แฉวที่ 4 คือ pPICOSXR no.4

แฉวที่ 5 คือ pPICOSXR no.5

แฉวที่ 6 คือ pPICOSXR no.6

แฉวที่ 7 คือ ยีนอมิกดีเอ็นเอ ใช้เป็น positive control

control

(ข) ตรวจหายีนไซโตสรีดักเทสบนพลาสมิดสายผสม pGAPOSXR

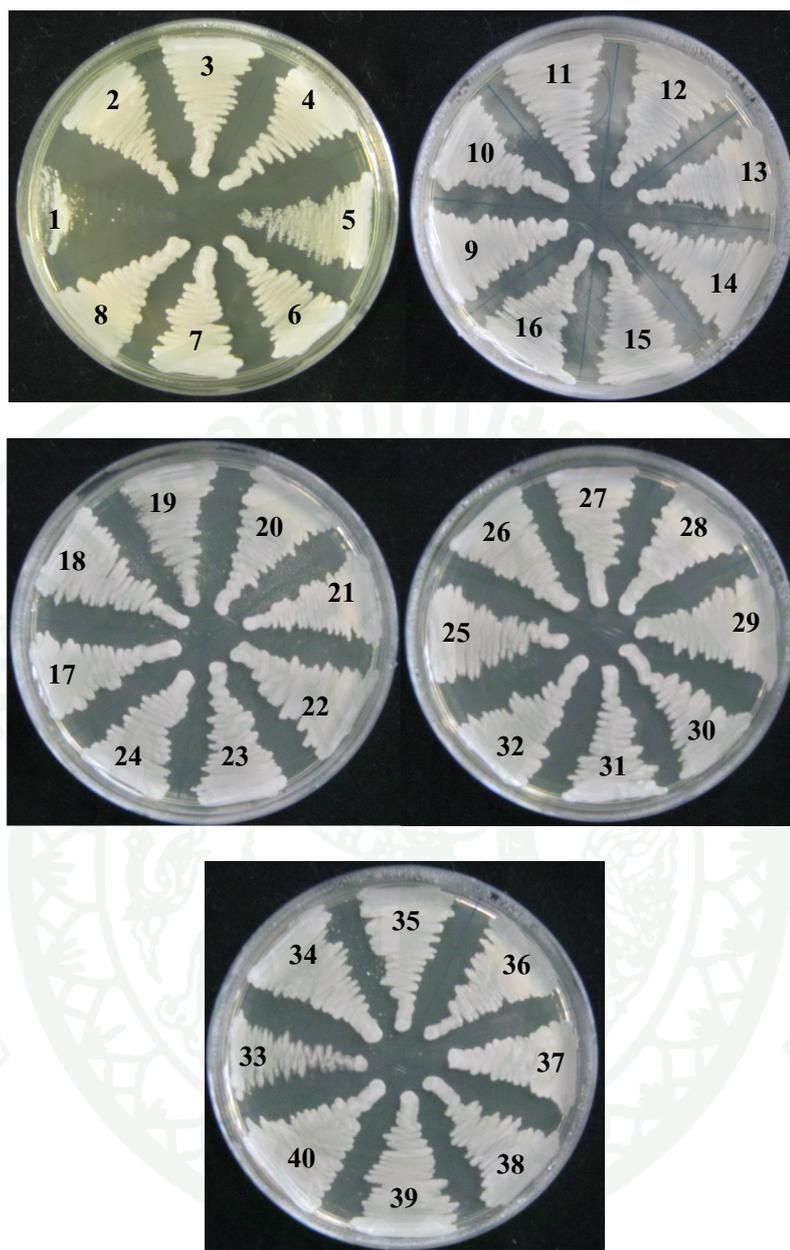
M คือ 1 kb DNA ladder

แฉวที่ 1 คือ pGAPOSXR no.1 แฉวที่ 2 คือ pGAPOSXR no.2

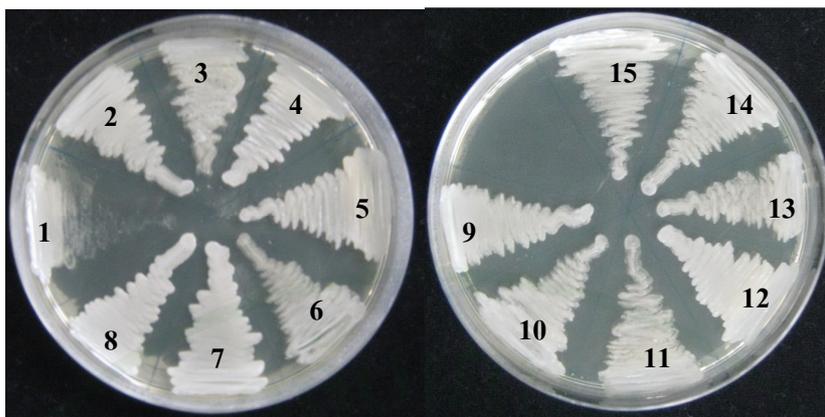
การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสม pPICOSXR และ pGAPOSXR เข้าในเซลล์ยีสต์ *O. siamensis* N22 นั้น พลาสมิดสายผสมทั้งสองชนิดจะแทรกบนโครโมโซมของยีสต์ *O. siamensis* N22 ที่ตำแหน่งปลาย 5' ของโปรโมเตอร์ *AOX* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ alcohol oxidase และที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของ *GAP* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ของยีสต์ ตามลำดับ เนื่องจากดีเอ็นเอพาหะ pPICZ B และ pGAPZ B ที่ใช้ในงานนี้ เป็นดีเอ็นเอพาหะชนิด integrative vector ผลการถ่ายโอนพลาสมิด

สายผสมเข้าเซลล์ยีสต์พบว่า คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง *O. siamensis* N22 ที่ได้รับพลาสมิด pPICOSXR no.4 เจริญบนอาหาร YPDS ที่เติม ZeocinTM ได้ทั้งหมด 38 โคลน ขณะที่ *O. siamensis* N22 สายพันธุ์ตั้งต้นไม่สามารถเจริญบนอาหารเดียวกันนี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 32 ตั้งชื่อยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง *O. siamensis* N22 ที่ได้รับพลาสมิด pPICOSXR ว่า N22-pPICOSXR1 ถึง N22-pPICOSXR38

การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสม pGAPOSXR no.2 เข้าในยีสต์ *O. siamensis* N22 ได้ยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงจำนวน 13 โคลนที่เจริญบนอาหาร YPDS ที่เติม ZeocinTM ขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นไม่สามารถเจริญบนอาหารเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 33 ตั้งชื่อยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงเหล่านี้ว่า N22-pGAPOSXR1 ถึง pGAPOSXR13 นอกจากนี้ได้ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pPICZ B และ pGAPZ B เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *O. siamensis* N22 ด้วย โดยตั้งชื่อยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงในกรณีนี้ว่า N22-pPIC และ N22-pGAP ตามลำดับ เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมในสภาวะที่มีพลาสมิด



ภาพที่ 32 การเจริญของ *O. siamensis* N22 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR บนอาหาร YPD เต็ม Zeocin™ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง
 1 คือ *O. siamensis* N22 2 คือ N22-pPIC
 3-40 คือ N22-pPICOSXR1-38 ตามลำดับ



ภาพที่ 33 การเจริญของ *O. siamensis* N22 สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPGAPZ B และ pGAPOSXR บนอาหาร YPD เดิม Zeocin™ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง
 1 คือ *O. siamensis* N22 2 คือ N22-pGAP
 3-15 คือ N22-pGAPOSXR1-13 ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสนั้น พบว่ายังไม่มีรายงานการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสในพลาสมิด pPICZ และ pGAPZ และใช้เซลล์เจ้าบ้านจากแหล่งเดียวกับยีนมาก่อน แต่มีรายงานการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Pichia stipitis* โดยใช้ พลาสมิดที่เพิ่มจำนวนอย่างอิสระ pXOR ที่มียีนไซโลสรีดักเทสแทรกอยู่ของยีสต์ *Pichia stipitis* และใช้ *P. stipitis* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของยีน พบว่า *P. stipitis* ที่ได้รับพลาสมิด pXOR มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม 1.8 เท่า (Kristine *et al.*, 1996)

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจากสายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPICOSXR และ N22-pGAPOSXR เปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น *O. siamensis* N22 รวมถึงกิจกรรมเอนไซม์สายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPIC และ N22-pGAP ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมในสถานะที่มีพลาสมิด โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPX ที่เติมไซโลสให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอาหาร 50 มิลลิลิตร สำหรับอาหารเลี้ยงยีสต์กลุ่มที่ได้รับ พลาสมิด pPICZ B หรือพลาสมิดสายผสมที่มีพลาสมิดนี้รวมอยู่ จะต้องเติมเมทานอลให้มีความเข้มข้น 2

เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน เนื่องจากพลาสมิด pPICZ B มีส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *AOX* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ชนิด inductive promoter ที่มีเมทานอลเป็นสารอาหารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ส่วนพลาสมิด pGAPZ B นั้นมีส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *GAP* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ชนิด constitutive promoter ที่ทำให้ยีนภายใต้การควบคุมมีการแสดงออกได้ตลอดเวลาที่เซลล์มีการเจริญ จึงไม่ต้องเติมสารเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน

ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. siamensis* N22, N22-pPIC, N22-pGAP, N22-pPICOSXR และ N22-pGAPOSXR ที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยการทำให้เซลล์แตก และนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส โดยใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้น และติดตามปริมาณ NADPH หรือ NADH ที่ถูกใช้ไป ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อ NADPH (Jeffries and Shi, 1999)

ตารางที่ 7 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสโดยใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ในยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น *O. siamensis* N22 และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR แทรกบนโครโมโซม พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPICOSXR มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.044 ถึง 0.098 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ชนิดอื่น ได้แก่ *Candida didensiae*, *C. intermediae*, *C. parapsilosis*, *C. silvanorum*, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus*, *Pichia guillemontii*, *Torulopsis molishiana*, *Pichia stipitis*, *C. shehatae* and *Pachysolen tannophilus* พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสแตกต่างกัน โดยมีค่า 0.11-6.43 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ ซึ่งยีสต์ *T. molishiana* และ *C. tropicalis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสต่ำและสูงที่สุด ตามลำดับ (Yablochkova et al, 2003) ใน *C. boidinii* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่จำเพาะต่อ NADPH เท่ากับ 0.078 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (Houry et al, 2009) กิจกรรมของเอนไซม์อัลโดสรีดักเทสในยีสต์ *C. tenuis* ที่จำเพาะต่อ NADPH เท่ากับ 1.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (Neuhauser et al, 1997)

จากการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICOSXR พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงส่วนใหญ่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งสายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPICOSXR30 มี

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด คือ 0.098 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 2.2 เท่า ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ตรวจพบจากยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์สายพันธุ์ N22-pPIC ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมนั้น ตรวจพบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าที่ตรวจพบในยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงคาดว่าพลาสมิด pPICZ B ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะนั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ดัดแปลง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ N22 (*O. siamensis* N22) และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR เมื่อใช้ NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยา

ยีสต์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	
	NADPH	NADH
N22	0.044	ND
N22-pPIC	0.050	ND
N22-pPICOSXR1	0.094	ND
N22-pPICOSXR2	0.071	NT
N22-pPICOSXR3	0.071	NT
N22-pPICOSXR4	0.096	ND
N22-pPICOSXR5	0.044	NT
N22-pPICOSXR6	0.079	NT
N22-pPICOSXR7	0.061	NT
N22-pPICOSXR8	0.071	NT
N22-pPICOSXR9	0.069	NT
N22-pPICOSXR10	0.063	NT
N22-pPICOSXR11	0.077	NT
N22-pPICOSXR12	0.061	NT
N22-pPICOSXR13	0.087	ND
N22-pPICOSXR14	0.069	NT
N22-pPICOSXR15	0.069	NT

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ยีสต์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	
	NADPH	NADH
N22-pPICOSXR16	0.079	NT
N22-pPICOSXR17	0.078	NT
N22-pPICOSXR18	0.058	NT
N22-pPICOSXR19	0.074	NT
N22-pPICOSXR20	0.068	NT
N22-pPICOSXR21	0.080	NT
N22-pPICOSXR22	0.069	NT
N22-pPICOSXR23	0.073	NT
N22-pPICOSXR24	0.062	NT
N22-pPICOSXR25	0.072	NT
N22-pPICOSXR26	0.064	NT
N22-pPICOSXR27	0.064	ND
N22-pPICOSXR28	0.074	NT
N22-pPICOSXR29	0.061	NT
N22-pPICOSXR30	0.098	ND
N22-pPICOSXR31	0.084	NT
N22-pPICOSXR32	0.075	NT
N22-pPICOSXR33	0.083	NT
N22-pPICOSXR34	0.078	NT
N22-pPICOSXR35	0.093	ND
N22-pPICOSXR36	0.094	ND
N22-pPICOSXR37	0.073	NT
N22-pPICOSXR38	0.078	NT

หมายเหตุ: ND คือ ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

NT คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น *O. siamensis* N22 และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPZ B และ pGAPOSXR โดยใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.062 ถึง 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยยีสต์สายพันธุ์ N22-pGAPOSXR8 และ N22-pGAPOSXR3 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.092 และ 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 1.5 เท่าของยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงอื่นนอกเหนือจากสองสายพันธุ์นี้ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าในยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นเพียงเล็กน้อย และยีสต์ N22-pGAP ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมก็พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นเช่นกัน แสดงในตารางที่ 7 จึงคาดว่าพลาสมิด pGAPZ B ที่แทรกอยู่บนโครโมโซมของยีสต์ *O. siamensis* N22 นั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ เช่นเดียวกับพลาสมิด pPICZ B ที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้

การศึกษาการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสในยีสต์ *Ogataea siamensis* N22 ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ระบบการแสดงออกของยีน แบบที่มีดีเอ็นเอพาหะชนิดที่ทำให้เกิดการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอลูกผสมเข้ากับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นระบบการแสดงออกที่ทำให้ดีเอ็นเอลูกผสมมีความเสถียรสูงในการจำลองตัวเองไปพร้อมๆ กับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน แต่อย่างไรก็ตามอาจพบข้อจำกัดในแง่จำนวนชุดของดีเอ็นเอลูกผสมที่จะแทรกเข้าที่โครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านที่อาจเพิ่มจำนวนชุดได้ไม่มากนัก จากผลการศึกษานี้ก็พบว่ามียีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น 1.5-2.2 เท่า ของค่ากิจกรรมที่พบในยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการเพิ่มการแสดงออกของยีนในระดับสูงมากกว่านี้ ควรเลือกใช้ดีเอ็นเอพาหะแบบเพิ่มจำนวนได้อย่างอิสระในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะส่งผลให้มีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาการโคลนยีนและการศึกษาลักษณะเฉพาะบางประการของยีนไซโลสรีดักเทสของเมทิลโลโทรฟิก-ยีสต์ทนร้อน *O. siamensis* N22 รวมทั้งการศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ในยีสต์ *O. siamensis* N22 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ไทยเป็นครั้งแรก ข้อมูลที่ได้จึงอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มผลผลิตไซลิทอลต่อไป

ตารางที่ 7 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจากยีสต์ N22 (*O. siamensis* N22) และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPZ B และ pGAPOSXR เมื่อใช้ NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยา

ยีสต์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	
	NADPH	NADH
N22	0.060	ND
N22-pGAP	0.061	ND
N22-pGAPOSXR1	0.062	ND
N22-pGAPOSXR2	0.085	NT
N22-pGAPOSXR3	0.093	ND
N22-pGAPOSXR4	0.088	NT
N22-pGAPOSXR5	0.082	NT
N22-pGAPOSXR6	0.060	ND
N22-pGAPOSXR7	0.090	ND
N22-pGAPOSXR8	0.092	ND
N22-pGAPOSXR9	0.088	NT
N22-pGAPOSXR10	0.073	ND
N22- pGAPOSXR11	0.070	NT
N22-pGAPOSXR12	0.076	NT
N22- pGAPOSXR13	0.86	ND

หมายเหตุ: ND คือ ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

NT คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสโดยใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ แสดงในตารางที่ 6 และ 7 ของยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม *O. siamensis* N22 และยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง ได้แก่ N22-pPIC, N22-pPICOSXR1, N22-pPICOSXR4, N22-pPICOSXR13, N22-pPICOSXR27, N22-pPICOSXR30, N22-pPICOSXR35, N22-pPICOSXR36, N22-pGAP, N22-pGAPOSXR1, N22-pGAPXR3, N22-pGAPOSXR6, N22-pGAPXR7, N22-pGAPXR8, N22-

pGAPOSXR10 และ N22-pGAPOSXR13 ไม่พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส เมื่อใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ ทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ดัดแปลง แสดงว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *O. siamensis* N22 มีความจำเพาะต่อ NADPH เท่านั้น เช่นเดียวกับไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Candida intermedia*, *C. guilliermondii* และ *Debaromyces hansenii* UFV-170 (Mayr *et al*, 2000; Sugai and Delgenes, 1995; Sampio *et al*, 2009) ซึ่งไซโลสรีดักเทสของยีสต์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อ NADPH มียีสต์บางชนิดที่สามารถใช้ทั้ง NADPH และ NADH ได้แก่ ไซโลสรีดักเทสจาก *P. stipitis*, *C. tenuis* และ *C. shehatae* ซึ่งมีความจำเพาะต่อ NADPH มากกว่า NADH (Verduyn *et al*, 1985; Neuhauser *et al*, 1997; Wang *et al*, 2007) ส่วนไซโลสรีดักเทสของ *C. parapsilosis* และ อัลโคสรีดักเทสของ *C. boidinii* มีความจำเพาะต่อ NADH มากกว่า NADPH (Lee *et al*, 2003; Kang *et al*, 2003)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การตามหาชิ้นไซโลสรีดักเทศจากยีสต์ *Ogataea siamensis* N22 โดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf55 และ OSXRr570 พบโคลน pOSXR2-88 ที่มีชิ้นไซโลสรีดักเทศความยาว 835 นิวคลีโอไทด์แทรกอยู่ในพลาสมิด โดยขาดส่วนของยีนด้าน 3' จึงตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของชิ้นไซโลสรีดักเทศด้วยวิธี 3' RACE โดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf633 ซึ่งอยู่ภายในชิ้นไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 กับ PCR anchor primer ของชุดสำเร็จรูป 3' RACE kit พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทางปลาย 3' ของยีนได้ครอบคลุมถึงบริเวณ stop codon ของยีนเมื่อรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากวิธี 3' RACE กับโคลน pOSXR2-88 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของชิ้นไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 ความยาว 960 นิวคลีโอไทด์ แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโน และพบตำแหน่ง TATA box-like sequence คือ ⁻¹¹²TATAA⁻¹⁰⁸ ทางด้าน 5' ของ start codon (ATG) และพบตำแหน่งของ polyadenylation signal คือ ⁹⁷⁴AATAAA⁹⁷⁹ อยู่ห่างจาก stop codon (TAA) ไปทางด้าน 3' การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นไซโลสรีดักเทศกับยีสต์ชนิดอื่นๆ พบว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศของ *O. siamensis* N22 คล้ายคลึงกับอัลโดสรีดักเทศของยีสต์ *Candida boidinii* มากที่สุดเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ จึงฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22 ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. FJ763639)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22 พบว่ามีกรดอะมิโนแตกต่างจากไซโลสรีดักเทศของยีสต์อื่น 12 ชนิดอยู่ 3 ตำแหน่ง แต่ไม่ใช่บริเวณตำแหน่งของ active site และพบว่าตำแหน่ง active site ของเอนไซม์มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ คือ IPKS (ตำแหน่งที่ 269 ถึง 272) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทศของยีสต์อื่น

การเพิ่มจำนวนชิ้นไซโลสรีดักเทศ เพื่อใช้ในการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากยีสต์ *O. siamensis* N22 โดยใช้ไพรเมอร์ OSXRf-78 และ OSXRr 959 ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 1,077 นิวคลีโอไทด์ ที่มีชิ้นไซโลสรีดักเทศที่สมบูรณ์ ศึกษาการแสดงออกของชิ้นไซโลสรีดักเทศจาก *O. siamensis* N22 โดยใช้พลาสมิด pPICOSXR และ pGAPOSXR เมื่อคัดเลือกรับอาหารที่เติม ZeocinTM พบสายพันธุ์ตัดแปลงที่มีพลาสมิด pPICOSXR แทรกบนโครโมโซมของ

O. siamensis N22 ซึ่งยีนมีการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน alcohol oxidase (AOX) จำนวน 38 โคลน และสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPOSXR แทรกบนโครโมโซมของ *O. siamensis* N22 ซึ่งยีนมีการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAP) จำนวน 13 โคลน เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในพลาสมิด pPICOSXR และ pGAPOSXR บนโครโมโซม โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไอโซลัสตรีคเทสของ *O. siamensis* N22 สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pPICZ B และ pPICOSXR พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.044 ถึง 0.098 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPICOSXR30 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 0.098 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีค่าคิดเป็น 2.2 เท่าของค่าที่ตรวจพบจากยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไอโซลัสตรีคเทสของ *O. siamensis* N22 สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPZ B และ pGAPOSXR พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.062 ถึง 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยยีสต์สายพันธุ์ N22-pGAPOSXR3 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.093 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งคิดเป็น 1.5 เท่าของยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อศึกษาการใช้โคเอนไซม์ในการเกิด ปฏิกิริยาพบว่าเอนไซม์ไอโซลัสตรีคเทสของ *O. siamensis* N22 และสายพันธุ์ดัดแปลง ใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์เท่านั้น เนื่องจากตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เลยเมื่อใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ เมื่อวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ตามหาชิ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยการโคลนชิ้นจากยีนโนมิกดีเอ็นเอนั้น ควรต้องออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของยีน และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นก็มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบของปฏิกิริยา ได้แก่ $MgCl_2$, dNTPs, ไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่จำเพาะตามต้องการ

2. การโคลนชิ้นจากยีนโนมิกดีเอ็นเอ ควรเลือกขนาดของยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการโคลนชิ้น หากเลือกยีนโนมิกดีเอ็นเอไลบรารีที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีนที่สนใจ อาจจะทำให้มีโอกาสได้ชิ้นแบบเต็มยีนน้อย และมักได้ชิ้นเพียงบางส่วน ทำให้ต้องคัดเลือกโคลนจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรเลือกดีเอ็นเอไลบรารีที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่าขนาดของยีนที่สนใจ

3. การเพิ่มการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสของยีสต์ *Ogataea siamensis* N22 พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นเพียง 1.5-2.2 เท่า เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอพาหะชนิดที่ทำให้เกิดการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอลูกผสมเข้ากับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นระบบการแสดงออกที่มีข้อจำกัดในแง่จำนวนชุดของดีเอ็นเอลูกผสมที่จะแทรกเข้าที่โครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านที่อาจเพิ่มจำนวนชุดได้ไม่มากนัก ดังนั้นหากต้องการเพิ่มการแสดงออกของยีนในระดับสูงมากกว่านี้ ควรเลือกใช้ดีเอ็นเอพาหะแบบเพิ่มจำนวนได้อย่างอิสระในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะส่งผลให้มีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า

4. เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนได้ในระดับสูงแล้ว อาจทำเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่สร้างโดยยีสต์ *O. siamensis* N22 ซึ่งเป็นเอนไซม์ของยีสต์ที่ร้อนที่ยังไม่ได้รับการศึกษามาก่อนนี้ ให้ได้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ แล้วศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ที่ได้ เช่น อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของการเร่งปฏิกิริยา ความจำเพาะของซับสเตรต รวมทั้งความเสถียรของเอนไซม์ เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ประเสริฐ สุดใจประภารัตน์. 2546. การคัดเลือกและศึกษาเอนไซม์สำคัญในวิถีการเปลี่ยนแปลงเมทานอลของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พันธ์ริดา ตรีขวง. 2549. การผลิตไซลิตอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาวิตรี ลีมทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Amore, R., P. Kötter, C. Küster, M. Ciriacy and C. P. Hollenberg. 1991. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (*XYL1*) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. **Gene**. 109: 89-97.
- Banett, J. A. 1976. The utilization of sugars by yeasts. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 32: 125-234.
- Baratti, J., R. Couderc, C. L. Cooney and D. I. C. Wang. 1978. Preparation and properties of immobilized methanol oxidation. **Biotechnol. Bioeng.** 20:333-348.
- Billard, P., S. Menart, R. Fler and M. Bolotin-Fukuhara. 1995. Isolation and characterization of the gene encoding xylose reductase from *Kluyveromyces lactis*. **Gene**. 162: 93-97.
- Boer E., T. Wartmann , S. Schmidt , R. Bode , G. Gellissen and G. Kunze. 2005. Characterization of the AXDH gene and the encoded xylitol dehydrogenase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 87: 233-243.

- Bolen, P. L., G. T. Hayman, and H. S. Shepherd. 1996. Sequence and analysis of an aldose (xylose) reductase gene from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. **Yeast**. 12:1367-1375.
- Bolsover, S. R., J. S. Hyams, S. Jones, E. A. Shephard and H. A. White. 1997. **From Gens to Cells**. John Wiley & Sons, Canada.
- Brooke, A. G., W. Dijkhuizen and W. Harder. 1986. Regulation of flavin biosynthesis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Arch. Microbiol.** 145:62-70.
- Cregg, J. M., J. L. Cereghino, S. Jianying and D. R Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnol.** 16(1): 23-52.
- Chung, Y. S., M. D. Kim, W. J. Lee, Y. W. Ryu, J. H. Kim and J. H. Seo. 2002. Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology.** 30: 809-816.
- Dijk, R., K. N. Faber, A. K. W Keil, J. M. Veenhuis and I. V. D. Klei. 2000. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 793-800.
- Dmytruk, O. V., K. V. Dmytruk¹, C. A. Abbas, A. Y. Voronovsky and A. A. Sibirny. 2008. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **Microbial cell factories**. doi: 10.1186/1475-2859-7-21.
- Emodi, A. 1978. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technol.** 32: 28-31.

- Fernandes, S., M. G. Tuohy and P. G. Murray. 2009. Xylose reductase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*: cloning and heterologous expression of the native gene (*Texr*) and a double mutant (*Texr*K271R + N273D) with altered coenzyme specificity. **J. Biosci.** 34: 881-890.
- Gellissen, G. 2002. ***Hansenula polymorpha: Biology and application.*** Wiley-VCH Verlage GmbH, Weinheim.
- Hagedorn, J., and M. Ciriacy. 1989. Isolation and characterization of *xyl* mutants in a xylose-utilizing yeast, *Pichia stipitis*. **Curr. Genet.** 16:27-33.
- Handumrongkul C., D.P. Ma and J.L. Silva. 1998. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (*xyl1*) in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 49:399-404.
- Hartner, F. S., and A. Glieder. 2006. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories.** 5: 39.
- Higgins, D. R. and J. M. Cregg. 1998. **Methods in molecular biology: *Pichia* Protocols.** Humana Press Inc, New Jersey.
- Hye, H. J., J. Y. Park, H. W. Kang, G. W. Choi, B. W. Chung and J. Min. 2010. Specific Expression Patterns of *xyl1*, *xyl2*, and *xyl3* in Response to Different Sugars in *Pichia stipitis*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 946-949.
- Jeffries, T. W. and N. Q. Shi. 1999. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Biochemical Engineering Biothechnology.** 65: 117-161.
- Jin, Y. S., S. Jones, N. Q. Shi and T. W. Jeffries. 2002. Molecular Cloning of *XYL3* (D-Xylulokinase) from *Pichia stipitis* and Characterization of Its Physiological Function. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 1232-1239.

- Jin, Y. S., J. Cruz and T. W. Jeffries. 2005. Xylitol production by a *Pichia stipitis* D-xylulokinase mutant. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 68: 42-45.
- Kamruzzaman, M. and M. Nishibuchi. 2007. Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in *Vibrio parahaemolyticus*. **Gene.** 409: 92-99.
- Kang, M. H., H. Ni and T. W. Jeffries. 2003. Molecular characterization of a gene for aldose reductase (*CbXYL1*) from *Candida boidinii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 105: 265-276.
- Karcher, S. J. 1995. **Molecular Biology a Project Approach.** Academic Press, California.
- Karhumaa, K., R. Fromanger, B. H. Hågerdal and M. F. G. Grauslund. 2007. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 73: 1039-1046.
- Kern, M., D. Haltrich, B. Nidetzky and K. D. Kulbe. 1996. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. **FEMS Microbiol. Lett.** 149: 31.
- _____, B. Nidetzky, K. D. Kulbe and D. Haltrich. 1997. Effect of nitrogen sources on the levels of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*. **Ferment. Bioeng.** 85: 19
- Khoury, G. A., H. Fazelinia, J. W. Chin, R. J. Pantazes, P. C. Cirino and C. D. Maranas. 2009. Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. **Protein Science.** 18: 2125-2138.

- Kim, Y. S., S. Y. Kim, J. H. Kim and S. C. Kim. 1999. Xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing multiple xylose reductase genes at chromosomal δ -sequences. **Biotechnology**. 67: 159-171.
- Klei, I.J., H. Yurimoto and M. Veenhuis. 2006. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. **Biochem. Biophys. Acta**. 1763: 1453-1462.
- Ko, B. S., C. H. Rhee and J. H. Kim. 2006. Enhancement of xylitol productivity and yield using a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis* under fully aerobic conditions. **Biotech. Lett.** 28: 1159-1162.
- _____, J. Kim and J. H. Kim. 2006. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis*. **App. Environ. Microbiol.** 72: 4207-4213.
- Kristine, M., D. P. D. Dahn, P. E. Pittman, W. R. Kenealy and T. W. Jeffies. 1996. Increased xylose activity in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by overexpression of *XYL1*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 57: 267-276.
- Kumar, S. J., M. S. Reddy and L. V. Rao. 2010. Strain improvement of *Candida tropicalis* OVC5 for xylitol production by random mutagenesis. **The IIOAB**. 1: 24-28.
- Lee, J. K., B. S. Koo and S. Y. Kim. 2003. Cloning and characterization of the *xy11* gene encoding an NADH-prefering xylose reductase from *Candida parapsilosis* and its Functional expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 69: 6179-6188.

- Limtong, S., N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp.nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 119-127.
- _____, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2005. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.** 55: 2225-2229.
- _____, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto and T. Nakase. 2008. *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov. thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 302-307.
- Madhavan A., S. Tamalampudi, K. Ushida, D. Kanai, S. Katahira, A. Srivastava, H. Fukuda, V. S. Bisaria and A. Kondo. 2009. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 82:1067-1078.
- Mayr, P., K. Bruggler, K. D. Kulbe and B. Nidetzky. 2000. D-Xylose metabolism by *Candida intermedia*: isolation and characterisation of two forms of aldose reductase with different coenzyme specificities. **J. Chromatogr. B.** 737: 195-202.
- Nakagawa, T., K. Yamada, S. Fujimura, T. Ito, T. Miyaji and N. Tomizuka. 2005. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. **Microbiology.** 151: 2047-2052.
- Neuhauser, W., D. Haltrich, K. D. Kulbe and B. Nidetzky. 1997. NAD(P)H-dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*. **J. Biochem.** 326: 683-692.

- Nigam, P., and D. Sigh. 1994. Solid-state (substrate) fermentation system and their application in biotechnology. **J. Basic. Microbiol.** 34: 405-423.
- Okumura, S., A. Yamanoi, R. Tsugawa and T. Nakase. 1970. **UK Patent Specification 1**, 210, 770.
- Rao, R. S., C. P. Jyothi, R. S. Prakasham, C. S. Rao, P. N. Sarma and L. V. Rao. 2006. Strain improvement of *Candida tropicalis* for the production of xylitol: biochemical and physiological characterization of Wild-type and mutant strain CT-OMV5. **Microbiology.** 44: 113-120.
- Rashi, A. S., N. D. Nelson and A. Goyal. 2004. Genome walking of large fragments: an Improved method. **J. Biotechnol.** 111: 9-15.
- Sadeghi, H. M. M., M. Yazdanian and F. Moazen. 2006. Optimization of a PCR Method for Detection of Lipase Gene in *Bacillus subtilis*. **IJPS.** 2: 31-34.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular cloning a laboratory manual volume 2.** Cold Spring Harbor, New York.
- Sampaio, F. C., W. B. Silveira, V. M. Chaves-Alves, F. M. Passos Lopes and J. L. C. Coelho. 2003. Screen of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. **Brazilian J. Microbiol.** 34: 325-328
- _____, V. M. Chaves-Alves, A. Converti, F. M. Lopes Passos and J. L. C. Coelho. 2008. Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. **Biortech.** 99: 502-508.
- _____, J. T. Faria, F. M. L. Passos, A. Converti and L. A. Minin. 2009. Optimal activity and thermostability of xylose reductase from *Debaryomyces hansenii* UFV-170. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36: 293-300.

- Schaefer B. C. 1995. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. **Analytical Biochemistry**. 227: 255-273.
- Sellman, S. 2003. Xylitol: Our Sweet Salvation. **The SPECTRUM**. 4: 23.
- Skoog, K., and B. Hahn-Hagerdal. 1990. Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 3389.
- Strachan, T., and A. P. Read. 1999. **Human Molecular Genetics, 2nd edition**. Bios Scientific, New York.
- Sugai, J. K. and J. P. Delgenes. 1995. Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. **Curr. Microbiol.** 31: 239-244.
- Suzuki, T., S. I. Yokoyama, Y. Kinoshita, H. Yamada, M. Hatsu, K. Takamizawa and K. Kawai. 1999. Expression of *xyrA* gene encoding for D-xylose reductase of *Candida tropicalis* and production of xylitol in *Escherichia coli*. **Bioscience and Bioengineering**. 87: 280-284.
- Tanaka, A., S. Yasuhara, G. Gelf, M. Osumi and S. Fukui. 1978. Immobilization of yeast microbodies and the properties of immobilized microbody enzymes. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 5: 17-28.
- Tani, Y. 1984. Microbiology and biochemistry of methylotrophic yeast., pp. 55-86. In C. T. Hou (Ed). **Methylotrophs, Microbiology, Biochemistry and Genetics**, CRC Press, Boca Ration, FL.

- Tani, Y., Y., Y. Yonehara, Y. Sakai, and B. D. Yoon. 1987. Microbiological synthesis from C1-compounds: Application of some methylotrophic functions to synthesis of useful chemicals., pp. 282-288. *In* H. W. van Verseveld and J. A. Duine (Eds.). **Microbial Growth on C1 compounds**, Nijhoff, Dordrecht.
- Uhari, M., T. Kontiokar, M. Koskela and M. Niemela. 1996. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomized trial. **BMJ**. 313: 1180-1183.
- Vandeska, E., S. Kuzmanova and T. W. Jeffries. 1995. Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. **J. Ferm. Bioengineer.** 80:513-516.
- Verachtert, H. and De Mot, R. 1990. **Yeast: Biotechnology and Biocatalysis**. Merckel Dekker, INC, New York.
- Verduyn, C., R. V. Kleef, J. Frank, H. Schreuder, J. P. V. Dijken. 1985. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochem. J.** 226: 669-667.
- Walfridsson, M., M. Anderlund, X. Bao and B. Hahn-Hagerdal. 1997. Expression of different Levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Sacharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilization. **Appl. Microbiol. Biotchnol.** 48: 218-224.
- Wang, X., B. Fang, J. Luo, W. Li and L. Zhang. 2007. Heterologous expression, purification, and characterization of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Biotechnol Lett.** 29: 1409-1412.

- Watanabe S., S.P. Pack , A.A Saleh,. N. Annaluru, T. Kodaki and K Makino. 2007. The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 71: 1365-1369.
- Winkelnhausen, E., and S. Kuzmanova. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** 86: 1-14.
- Yablochkova E. N., O. I. Bolotnikova, N. P. Mikhailova, N. N. Nemova, and A. I. Ginak. 2003. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Micorbiology.** 72: 414-417.
- Yokoyama, S. I., Y. Kinoshita, T. Suzuki, K. Kawai, H. Horitsu and K. Takamizawa. 1995. Cloning and sequencing of two D-xylose reductase genes (*xyrA* and *xyrB*) from *Candida tropicalis*. **Fermentation and Bioengineering.** 80: 603-605.
- Yoon, B. H. W. Y. Jeon, W. Y, Shim and J. H. Kim. 2010. L-Arabinose pathway engineering for arabitol-free xylitol production in *Candida tropicalis*. **Biotechnol Lett.** DOI 10.1007/s10529-010-0487-2.
- Zhang, X., M. Li, D. Wei and L. Xing. 2008. Identification and characterization of a novel yeast ω^3 -fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. **Yeast.** 25: 21-27.
- Zhang, F., D. Qiao, H. Xu, C. Liao. S. Li and Y. Cao. 2009. Cloning, expression, and characterization of xylose reductase with higher activity from *Candida tropicalis*. **Microbiol.** 47:351-357.

Zhang, J., M. Yang, S. Tian, Y. Zhang and X. Yang. 2010. Co-expression of xylose reductase gene from *Candida shehatae* and endogenous xylitol dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and the effect of metabolizing xylose to ethanol. **Appl. Biotchem. Microbiol.** 46: 456-461.







ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 1-8 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. อาหารแข็ง YPD

yeast extract	10	กรัม
peptone	20	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. อาหารเหลว YPD

ใช้สูตรเดียวกับอาหารแข็ง YPD แต่ไม่ได้ agar

3. อาหารแข็ง YPD เติมยาปฏิชีวนะ

ใช้สูตรเดียวกับอาหารแข็ง YPD หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ร่อนอาหารอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมยาปฏิชีวนะ Zeocin ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. อาหารแข็ง YPDS เติมยาปฏิชีวนะ

yeast extract	10	กรัม
peptone	20	กรัม
dextrose	20	กรัม
sorbitol	182.17	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอนอาหารอุณหภูมิตั้ง 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมยาปฏิชีวนะ Zeocin ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. อาหารเหลว YPX

yeast extract	10	กรัม
peptone	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอนอาหารอุณหภูมิตั้ง 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติม 40 เปอร์เซ็นต์ D-xylose ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความเข้มข้นของ D-xylose ในอาหารสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์

6. อาหารแข็ง LB

Tryptone	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

7. อาหารเหลว LB

ใช้สูตรเดียวกับอาหารแข็ง LB แต่ไม่ได้ agar ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารแข็ง LB เติมยาปฏิชีวนะ

ใช้สูตรเดียวกับอาหารแข็ง LB หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอนอาหารอุณหภูมิตั้ง 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

1. 50X TAE buffer

Tris-base	242	กรัม
glacial acetic acid	57.10	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA disodium salt, พีเอช 8.0	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เท่ากับ	1,000	มิลลิลิตร

2. SZB

น้ำกลั่น	2.3	มิลลิลิตร
2 โมลาร์ sorbitol	12.5	มิลลิลิตร
1 โมลาร์ sodium citrate	2.5	มิลลิลิตร
0.2 โมลาร์ EDTA disodium salt	7.5	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้เติม Zymolyase 15 มิลลิกรัม และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

3. Solution I (สำหรับสกัดพลาสมิด)

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl, พีเอช 8.0	25	มิลลิโมลาร์
EDTA disodium salt, พีเอช 8.0	10	มิลลิโมลาร์

4. Solution II (สำหรับสกัดพลาสมิด)

1 โมลาร์ NaOH	200	ไมโครลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ sodiumdodecyl sulfate	100	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	700	ไมโครลิตร

5. Solution III (สำหรับสกัดพลาสมิด)

5 โมลาร์ CH ₃ COOK	60	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

6. Transformation and storage solution (TSS)

Polyethylene glycol 6000	100	กรัม
LB	850	มิลลิลิตร
1 โมลาร์ MgCl ₂ , พีเอช 6.5	50	มิลลิลิตร

หลังจากนี้หมักเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7. Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Sambrook *et al.*, 1989)

ละลายกรด phenol ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับสมมูลของ phenol ด้วยการเติม บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ phenol กวนให้เข้ากัน 15 นาที จึงดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ phenol กวนให้เข้ากัน 15 นาที จึงดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซ้ำจนกว่าค่าพีเอชของสารละลาย phenol มีค่ามากกว่า 7.8 แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เติม β-mercaptoethanol ให้มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตร phenol เก็บสารละลายในขวดสีชา

ผสมสารละลาย chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปผสมกับ phenol ที่ปรับสมมูลแล้ว ให้ได้อัตราส่วน phenol:chloroform:isoamyl alcohol เท่ากับ 25:24:1 เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. 5X TBE

Tris-base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 โมลาร์ EDTA disodium salt, พีเอช 8.0	20	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เท่ากับ	1,000	มิลลิลิตร

9. โป้ตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายความเข้มข้นเริ่มต้น 1 โมลาร์

KH_2PO_4 136.09 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

K_2HPO_4 174.18 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมโป้ตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

พีเอช	1 โมลาร์ K_2HPO_4 (มิลลิลิตร)	1 โมลาร์ KH_2PO_4 (มิลลิลิตร)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

10. กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Lee *et al.*, 2003)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส เป็นการวิเคราะห์ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NAD(P)H ไปเป็น NAD(P)⁺

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 โมลาร์ potassium phosphate buffer พีเอช 7.0	0.5	มิลลิลิตร
0.2 โมลาร์ D-xylose	0.1	มิลลิลิตร
0.001 โมลาร์ NAD(P)H	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.15	มิลลิลิตร
สารละลายเอนไซม์	0.05	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	1	มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

- นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดยกเว้น NAD(P)H ใส่ใน quartz cuvet ผสมให้เข้ากัน
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-800 spectrophotometer, Japan) กำหนดไปที่ค่า auto zero
- เติม NAD(P)H ผสมให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่ลดลงต่อหน่วยเวลา ($\Delta A_{340}/\text{min}$) ในช่วงเวลา 0 ถึง 5 นาที (ตรวจวัดค่าทุกๆ 15 วินาที)

การคำนวณ

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = $(a / 6.22) \times (1/b) \times c \times d$ เมื่อ

$$a = \Delta A_{340}/\text{min}$$

b = ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้

c = ปริมาตรทั้งหมดของส่วนผสมของปฏิกิริยา

d = dilution factor

6.22 = extinction coefficient of NADH (mM) at 340 nm

11. ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์โดยวิธี Bradford (1976)

การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ ใช้วิธีของ Bradford ซึ่งใช้สีย้อม Coomassie เป็นตัวจับกับโปรตีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

สารเคมี

1. dye reagent concentrated (Coomassie Plus™ -The Better Bradford Assay Kit, USA)
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นดังตารางดังต่อไปนี้

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ

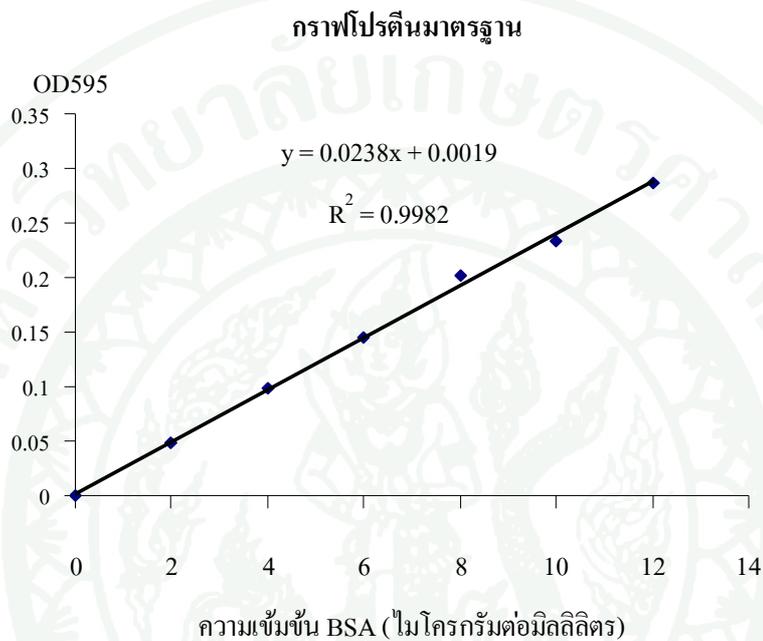
Vial	Volume of Diluent (ไมโครลิตร)	Volume of stock BSA (ไมโครลิตร)	Final BSA Concentration (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	5,000	0	0 = blank
2	4,500	500	2
3	4,000	1,000	4
4	3,500	1,500	6
5	3,000	2,000	8
6	2,500	2,500	10
7	2,000	3,000	12

การวิเคราะห์

1. นำสารละลายเอนไซม์และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 800 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติม dye reagent concentrated ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นา-

โนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(Thermo Scientific GENESYS 20 , USA)

4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ถ้าตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วัดได้



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาว กัญญา กอแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 มิถุนายน พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	จังหวัด อุบลราชธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Thai Journal of Genetics (2009) หัวข้อ Cloning and nucleotide sequence analysis of xylose reductase (XR) gene from thermotolerant methylotrophic yeast <i>Ogataea siamensis</i> N22
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปี 2552