



วิทยานิพนธ์

การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์

แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ

Bacillus circulans NT6.7

Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase

from *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and

Bacillus circulans NT 6.7

นางสาวสุภา สกุดศิริรัตน์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก

Bacillus amyloliquefaciens NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7

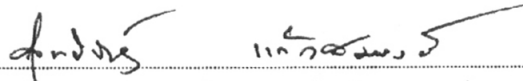
Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase from

Bacillus amyloliquefaciens NT6.3 and *Bacillus circulans* NT6.7

นามผู้วิจัย นางสาวสุภา สกฤตศิริรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ



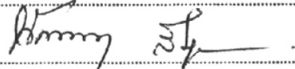
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ



(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

กรรมการ



(อาจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา



(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 21 เดือน มกราคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก
Bacillus amyloliquefaciens NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7

Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase from
Bacillus amyloliquefaciens NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7

โดย

นางสาวสุภา สกุลศิริรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2551

สุภา สกฤติศิริรัตน์ 2551: การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์
แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7 ปริญญาวิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 134 หน้า

เอนไซม์แมนนาเนส สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ สำหรับใช้เป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ (probiotic) เอนไซม์แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายแหล่ง ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่าย และมีต้นทุนการผลิตต่ำ ทำให้สามารถนำไปสู่การผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7 เพื่อตรวจสอบชนิดและคุณสมบัติของยีน โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการวิเคราะห์ลำดับเบส และหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนโดยเทคนิค PCR walking เพื่อนำไปสู่การทำนายโครงสร้างสามมิติ และบริเวณเร่งของเอนไซม์แมนนาเนส จากการวิจัย พบยีนดีเอ็นเอขนาด 786 และ 771 คู่เบส ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (EC 3.2.1.78) ที่จัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลสสกุลที่ 26 (GH26) ตระกูล GH-A มีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนบางส่วน เท่ากับ 45.8 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนทางด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยเทคนิค PCR walking พบว่า ไม่สามารถหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนได้ จึงนำลำดับเบสบางส่วนที่ได้จาก *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไปทำนายโครงสร้างสามมิติด้วยวิธี homology modeling เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณเร่ง โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จาก *Cellvibrio japonicus* (lodz) เป็นต้นแบบ พบว่าโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะเป็น (β/α)-barrel โดยมีกรดอะมิโน Asp79, His101, Glu163 และ Tyr238 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ Asp74, His96, Glu158 และ Tyr233 ใน *B. circulans* NT6.7 เป็นบริเวณเร่ง Asp79 และ Asp74 ทำหน้าที่เป็น nucleophile โดยสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Tyr238 และ Tyr233 ขณะที่ Glu163 และ Glu158 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst โดยมี His101 และ His96 มีบทบาทในการจับกับสารตั้งต้นที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า Asp79 และ Asp74 มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนที่เป็น nucleophile ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จากแหล่งอื่น ผลการวิจัยที่ได้ก่อให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ต่อไป

สุภา สกฤติศิริรัตน์
ลายมือชื่อนิติ

151 20.151
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Supa Sakulsirirat 2008: Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase from *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 and *Bacillus circulans* NT6.7. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 134 pages.

Mannanase was an important enzyme for producing valuable manno-oligosaccharides known as prebiotic which were useful for the growth of intestinal probiotic. Mannanase has been isolated from a wide range of organisms. Bacterial source is preferred when large amounts of enzyme are required. Comparative studies of the bacterial mannanases showed that the hydrolyzing efficiency of the enzymes differed from species to species and even between the different strains of the same species. In this research, mannanases of *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 and *Bacillus circulans* NT6.7 were cloned and structurally analysed. The detection of mannanase genes was done by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were cloned, sequenced and subjected to BLAST search at NCBI. The result revealed that partial sequences were 786 and 771 base pairs long in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7, respectively. These partial sequences were putative β -mannanase genes which classified into glycoside hydrolase family 26 (GH26) and belonged to clan GH-A. Comparison of nucleotide and amino acid sequences between *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7 showed 45.8 and 67.4 % sequence identities, respectively. Homology modeling was used in protein structure prediction from amino acid sequence by using Swiss-Model, DSViewerPro and SPDBV. Three-dimensional structure of β -mannanase from *Cellvibrio japonicus* was used as template model. Models of two *Bacillus* species were (β/α_8)-barrel shape. Corresponding amino acids contributing to the active site of β -mannanase were Asp79, His101, Glu163 and Tyr238 in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and Asp74, His96, Glu158 and Tyr233 in *B. circulans* NT6.7. Asp79 and Asp74 were nucleophile which formed hydrogen bond with Tyr238 and Tyr233, Glu163 and Glu158 constituted acid/base catalyst and His101 and His96 played an important role in substrate binding as polysaccharide through hydrogen bonds between the imidazole ring and the sugar hydroxyl groups in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7, respectively. In addition, Asp79 and Asp74 which were nucleophile, differed from β -mannanase in GH26 from another genus. The result presented here was preliminary study of partial β -mannanase sequences of *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7. This could be basic for future study on β -mannanase to apply in prebiotic preparation.

สุภา สักกุลศิริวัฒน์

Student's signature

S. Keawsompong

Thesis Advisor's signature

15, Jan, 2008.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำอบรมสั่งสอนในทุกเรื่องตลอดการทำงานวิจัย และการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.มังกร โรจน์ประภากร กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.นันทนา สีสุข กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และดร.วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล ที่ให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในส่วนของการทำ Homology modeling เป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ (พ.ศ. 2549)

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเพื่อนร่วมรุ่นปริญญาโททุกคน ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ และร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมา ขอขอบคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่คอยสนับสนุน ให้ความรัก และให้กำลังใจในทุก ๆ เรื่อง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุภา สกุลศิริรัตน์

พฤศจิกายน 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	41
อุปกรณ์	41
วิธีการ	43
ผลและวิจารณ์	50
สรุป	101
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	102
ภาคผนวก	114
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	115
ภาคผนวก ข เทคนิคทางชีวโมเลกุล	118
ภาคผนวก ค ข้อมูลจากการทดลอง	125
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	134

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส	8
2	แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนซิเดส	9
3	แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส	11
4	ตัวอย่างฐานข้อมูลทางชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต	34
5	ตัวอย่างเว็บไซต์ที่ให้บริการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล	36
6	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบชนิดและ สังเคราะห์ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส และไพรเมอร์สำหรับ การทำ PCR walking	42
7	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนจากลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิต เอนไซม์แมนนาเนสจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 ที่ได้จากการทดลอง กับ ลำดับเบสในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.17 [Aug-26-2007]	55
8	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนจากลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิต เอนไซม์แมนนาเนสของ <i>B. circulans</i> NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับ เบสในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.17 [Aug-26-2007]	56
9	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปล รหัสจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.17 [Aug-26-2007]	57
10	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปล รหัสจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสของ <i>B. circulans</i> NT6.7 ที่ ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.17 [Aug-26-2007]	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]	61
12	ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก <i>B. circulans</i> NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]	62
13	ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) จากโปรแกรม Swiss-Model	77
14	ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1) และ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1) กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) จากโปรแกรม Swiss-Model	77
15	ผลการคัดเลือก template ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสสกุลที่ 26 (GH26) จากฐานข้อมูลโปรตีน	80
16	ตำแหน่งของบริเวณเร่ง (active site) บนโมเดลของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3, <i>B. circulans</i> NT6.7, <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1) และ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1) เปรียบเทียบกับ บริเวณเร่งจากเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสของ <i>Cellvibrio japonicus</i> (PDB code: 1odz) ที่ใช้เป็น template	86
17	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3	88
18	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. circulans</i> NT6.7	88
19	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	88
20	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1)	88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	สารเคมีและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (pGEM-T Easy Vector)	120
ข2	สารเคมี และปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาหลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาหลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ	122

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนใน locust bean gum (ก) guar gum (ข) และ กากมะพร้าว (ค)	6
2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแบบ inversion (ก) และ retention (ข)	15
3 โครงสร้างของส่วนที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส แบบ pocket (ก) cleft (ข) และ tunnel (ค)	18
4 การเรียกชื่อหน่วยย่อยที่จับกับน้ำตาลตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส	18
5 การจัดลำดับความเหมือน (alignment) ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 บางชนิดจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต	20
6 โครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่จัดอยู่ใน GH5 จากเชื้อรา <i>T.reesei</i>	21
7 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)	23
8 แผนภูมิเทคนิค PCR walking	30
9 แผนภูมิเทคนิค inverse PCR	31
10 แผนภูมิเทคนิค ligation-mediated PCR (LMPCR)	32
11 โครโมโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	51
12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF/BMR ของแบคทีเรีย <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	52
13 ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 บนโครโมโซมดีเอ็นเอ ขนาด 786 คู่เบส	54
14 ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก <i>B. circulans</i> NT6.7 บนโครโมโซมดีเอ็นเอ ขนาด 771 คู่เบส	54
15 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนาเนสใน frame -1 ที่ได้จาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 ประกอบด้วย 262 กรดอะมิโน	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนาเนสใน frame +2 ที่ได้จาก <i>B. circulans</i> NT6.7 ประกอบด้วย 256 กรดอะมิโน	60
17 ผลการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จำนวน 10 ตัวอย่างที่สืบค้นจากฐานข้อมูล กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนาเนสจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	64
18 ผลการทำ pairwise alignment ของลำดับเบสระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	66
19 ผลการทำ pairwise alignment ของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	67
20 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำPCR walking ทางด้านปลาย 5' (5'-walking)	68
21 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำPCR walking ทางด้านปลาย 5' โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 (ก) และ <i>B. circulans</i> NT6.7 (ข) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ	71
22 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำPCR walking ทางด้านปลาย 3' โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 (ก) และ <i>B. circulans</i> NT6.7 (ข) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ	74
23 โมเดลที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 (ก) <i>B. circulans</i> NT6.7 (ข) <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1) (ค) และ <i>B. subtilis</i> G1(ABC61374.1) (ง) โดยโปรแกรม Swiss-Model	78
24 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 เปรียบเทียบกับ template 1odz	82
25 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ <i>B. circulans</i> NT6.7 เปรียบเทียบกับ template 1odz	83
26 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1) เปรียบเทียบกับ template 1odz	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
27 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1) เปรียบเทียบกับ template lodz	85
28 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3	89
29 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. circulans</i> NT6.7	89
30 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	90
31 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ <i>B. subtilis</i> G1(ABC61374.1)	90
32 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	92
33 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	93
34 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> G1 (ABC61374.1)	94
35 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. circulans</i> NT6.7 และ <i>B. circulans</i> G1 (ABC61374.1)	95
36 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. circulans</i> NT6.7 และ <i>B. circulans</i> A33 (ABB91433.1)	96
37 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง <i>B. circulans</i> A33 (ABB91433.1) และ <i>B. circulans</i> G1 (ABC61374.1)	97

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 ตำแหน่งของคูไพร์เมอร์ BMR และ BMR จากบริเวณ consensus sequence ของการทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW (1.83)	126
ค2 ตำแหน่งของคูไพร์เมอร์ MR และ MR จากบริเวณ consensus sequence ของการทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW (1.83)	127
ค3 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. circulans</i> NT6.7	128
ค4 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	129
ค5 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3 และ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1)	130
ค6 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. circulans</i> NT6.7 และ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1)	131
ค7 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. circulans</i> NT6.7 และ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	132
ค8 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ <i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1) และ <i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1)	133

การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก

Bacillus amyloliquefaciens NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7

Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase from

Bacillus amyloliquefaciens NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7

คำนำ

กากมะพร้าว เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกะทิ ซึ่งปีหนึ่งมีกากมะพร้าวสูงถึง 1.4 ล้านตัน โดยนำไปเป็นอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตาม กากมะพร้าวให้คุณค่าทางโภชนาการกับสัตว์ต่ำ เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนสูงกว่ากากมะพร้าว 19-23 เปอร์เซ็นต์ (NRC, 1998) ในอีกทางหนึ่ง กากมะพร้าวมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของกาแลคโตแมนแนน ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าในรูปของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ สำหรับใช้เป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ เช่น เชื้อ Bifidobacteria และ *Lactobacillus* sp. (Zakaria *et al.*, 1998) และยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จะมีคุณสมบัติเป็น receptor analogue สำหรับการยึดจับของเชื้อก่อโรค ทำให้เพิ่มพื้นที่ผนังลำไส้สำหรับเชื้อ probiotic ได้ (Hardy, 2003) ขณะเดียวกัน สารดังกล่าวสามารถช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเสริมสุขภาพของคน และสัตว์กระเพาะเดียว

การสังเคราะห์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากแมนแนน สามารถสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ endo- β -1,4-D mannanase โดยเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า 1,4 ที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแมนโนส ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของแมนแนนในลักษณะส้อม ทำให้ได้ผลผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (Cann *et al.*, 1999) นอกจากนี้ เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการสกัดกาแฟ ช็อกโกแลต และโกโก้ เนื่องจากเอนไซม์จะเข้าไปช่วยลดความหนืดในระหว่างกระบวนการสกัด ทำให้สามารถสกัดสารได้ในปริมาณที่สูงขึ้น (Zakaria *et al.*, 1998)

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Yanhe *et al.*, 2004) ทำให้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส สกุลที่ 5 และ 26 (GH5 และ GH26) (Deborah *et al.*, 2003) การตรวจสอบความแตกต่างที่สำคัญในโครงสร้างระดับโมเลกุล และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 และ GH26 จะทำให้ทราบถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาการทำงานของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 โดยการหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติ ทำให้สามารถประยุกต์ใช้กับการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบชนิด และคุณสมบัติของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)
2. เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 และวิเคราะห์บริเวณเร่ง โดยการทำให้ homology modeling

การตรวจเอกสาร

1. แหล่งและโครงสร้างทางเคมีของแมนแนน (mannan)

แมนแนนเป็นสารประกอบจำพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ซึ่งพบในส่วนของผนังเซลล์พืช เช่น พืชไม้เนื้ออ่อน (softwoods) โดยพบอยู่ระหว่างชั้นของเซลลูโลส (cellulose) และ ลิกนิน (lignin) (Ethier *et al.*, 1998) แบ่งแมนแนนจากพืชตามโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 Heterogeneous backbone

เป็นกลุ่มของแมนแนนที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ กลูโคส และ แมนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 เรียกว่า กลูโคแมนแนน (glucomannan) (Ethier *et al.*, 1998) โดยน้ำตาลกลูโคสในโครงสร้างหลักของกลูโคแมนแนน มีการจัดเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย อัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กลูโคส ในโครงสร้างหลักอยู่ในช่วง 4:1 ไปจนถึง 1:1 (Meier *et al.*, 1982) ตัวอย่างของกลูโคแมนแนนที่รู้จักกันเป็นอย่างดี คือ แมนแนนในหัวบุก (konjac glucomannan) ซึ่งแยกได้จากส่วนหัวที่อยู่ใต้ดินของบุก (*Amorphophallus konjac*) โดยแมนแนนในหัวบุกมีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กลูโคส เป็น 16:1 และมีอันดับของการเกิดโพลิเมอร์ (Degree of polymerization:DP) มากกว่า 6000 (Nishinari *et al.*, 1992)

1.2 Homogeneous backbone

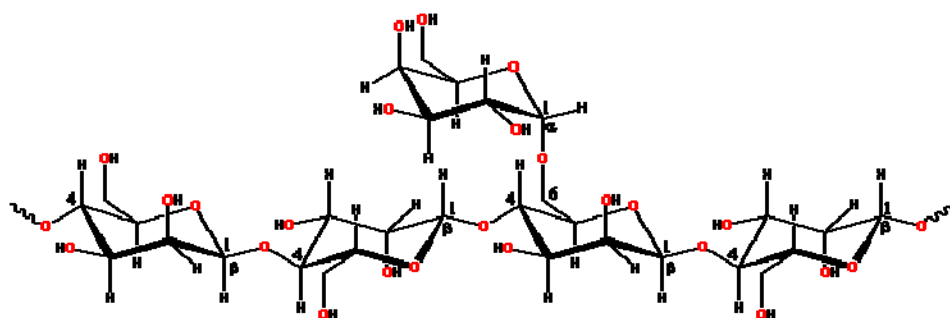
เป็นกลุ่มของแมนแนนที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสชนิดเดียวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 และส่วนของกิ่งแขนง (branch) เชื่อมน้ำตาลกาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนสด้วยพันธะแอลฟา 1,6 เรียกแมนแนนกลุ่มนี้ว่า กาแลคโตแมนแนน (galactomannan) (Ethier *et al.*, 1998 และ Ferreira and Filho, 2004) ซึ่งพบมากในเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว กากเมล็ดกาแฟ เนื้อในของเมล็ดปาล์ม และกากมะพร้าว เป็นต้น

กาแลคโตแมนแนนสองชนิดที่รู้จักกันเป็นอย่างดีพบใน locust bean gum และ guar gum ซึ่งแยกได้จากเมล็ดของ *Ceratonia siliqua* และ *Cyanaposis tetragonolobus* ตามลำดับ (Goldstein *et al.*, และ Rol, 1973) กาแลคโตแมนแนนใน locust bean gum และ guar gum มีความแตกต่างกันตรงบริเวณที่มีการเชื่อมน้ำตาลกาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนสด้วยพันธะแอลฟา 1,6

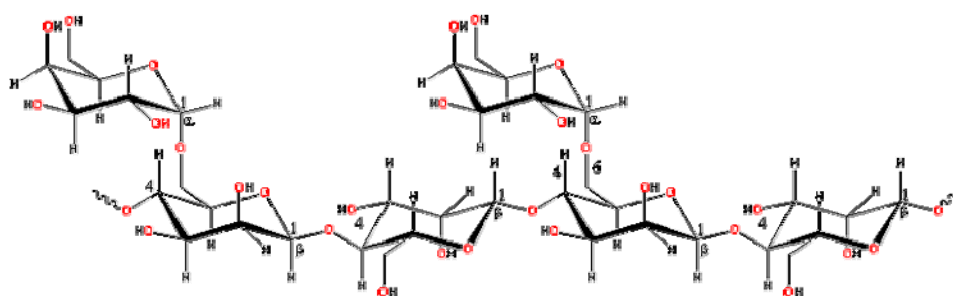
โดยกาแลกโตแมนแนนใน locust bean gum มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กาแลกโทส ประมาณ 5:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 310000 คาลตัน และจะเกิดพันธะแอลฟา 1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนส ประมาณ 3-4 โมเลกุล ในขณะที่กาแลกโตแมนแนนใน guar gum มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กาแลกโทส ประมาณ 2:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 220000 คาลตัน และจะเกิดพันธะ α -1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนส ประมาณ 1-2 โมเลกุล ดังภาพที่ 1

กากมะพร้าว เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกะทิ ซึ่งปีหนึ่งมีกากมะพร้าวสูงถึง 1.4 ล้านตัน ซึ่งนำไปเป็นอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตาม กากมะพร้าวให้คุณค่าทางโภชนาการกับสัตว์ต่ำ เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนสูงกว่ากากมะพร้าว 19-23 เปอร์เซ็นต์ (NRC, 1998) ในอีกทางหนึ่ง กากมะพร้าว มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของกาแลกโตแมนแนน ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าในรูปของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannooligosaccharide) สำหรับใช้เป็นสารพรีไบโอติก ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ เช่น เชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* sp. (Zakaria *et al.*, 1998) และยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จะมีคุณสมบัติเป็น receptor analogue สำหรับการยึดจับของเชื้อก่อโรค ทำให้เพิ่มพื้นที่ผนังลำไส้สำหรับเชื้อ probiotic ได้ (Hardy, 2003) ขณะเดียวกัน สารดังกล่าวสามารถช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเสริมสุขภาพของคน และสัตว์กระเพาะเดียว

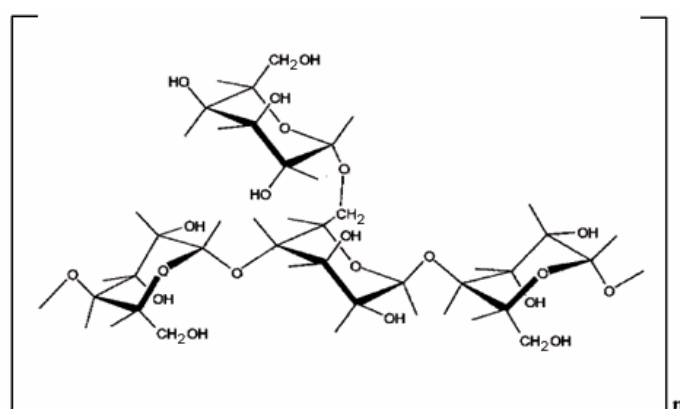
โครงสร้างของกากมะพร้าวนั้นประกอบไปด้วยแมนแนน กาแลกโตแมนแนน และเซลลูโลสในสัดส่วน 26:61:13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Balasubramaniam, 1976) โดยพบว่าส่วนของแมนแนน และกาแลกโตแมนแนน คิดเป็นสัดส่วน 25-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (Sundu *et al.*, 2006) และจากการที่โครงสร้างของกากมะพร้าวมีส่วนของโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharides, NSPs) ประกอบอยู่ด้วยนั้น จึงส่งผลให้กากมะพร้าวมีโครงสร้างที่แตกต่างจาก guar gum กล่าวคือ กาแลกโตแมนแนนในกากมะพร้าวจะมีความแข็ง เรียงตัวกันแบบผลึก (crystalline) และมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนส:น้ำตาลกาแลกโทส เท่ากับ 14:1 ในขณะที่ guar gum มีอัตราส่วนเท่ากับ 2:1 ด้วยเหตุนี้จึงทำให้กากมะพร้าว มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Sundu *et al.*, 2006) โครงสร้างของกาแลกโตแมนแนนในกากมะพร้าวแสดงดังภาพที่ 1



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 1 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนใน locust bean gum (ก) guar gum (ข) และ
กากมะพร้าว (ค)

ที่มา: Chaplin (2005)

2. ชนิด และแหล่งของเอนไซม์ในการย่อยสลายแมนแนน

การย่อยสลายแมนแนนในลักษณะสมบูรณ์ (complete hydrolysis) จะต้องประกอบด้วย เอนไซม์ย่อยสลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

2.1 เอนไซม์ Endo-1,4- β -D mannanase (β -mannanase, EC 3.2.1.78)

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า 1,4 ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาลแมนโนสในโครงสร้างหลัก การย่อยสลายที่ตำแหน่งดังกล่าวเป็นการย่อยแบบสุ่ม โดยจะย่อยสลายจากส่วนด้านในของโมเลกุล (Cann *et al.*, 1999) ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนไตรโอส (mannotriose) และแมนโนไบโอส (mannobiose) (Xu *et al.*, 2002)

2.1.1 แหล่งของเอนไซม์

แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส ได้แก่ เมล็ดพืชขณะงอก แบคทีเรียทั้งชนิดต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ และเชื้อรา เป็นต้น ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรานี้ เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสอย่างหลากหลาย จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส แสดงไว้ดังตารางที่ 1

Puchart *et al.* (1999) นำเชื้อราจากสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosus* 17 สายพันธุ์ มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานาส เบต้า-แมนนาเนส อะราบินาส และเพคตินาส พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส คือ *T. lanuginosus* IMI 185749, *T. lanuginosus* CBS 218.34 และ *T. lanuginosus* IMI 131010 มีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 21.6, 14.8 และ 3.8 ยูนิตต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

Xu *et al.* (2002) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากระบบย่อยอาหารของ blue mussel (*Mytilus edulis*) ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี พบว่าเอนไซม์มีค่า pH ประมาณ 7.8 มีความคงตัวที่พีเอช 4.0-9.0 มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชประมาณ 5.2 อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส และเอนไซม์สามารถย่อยสลายกาแลกโตแมนแนน locust bean gum และแมนแนนจากเมล็ดของปาล์มได้อย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<u>แบคทีเรีย</u>	
<i>Bacillus</i> sp.	Ooi and Kikuchi, 1995
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Talbot and Sygusch, 1999
<i>Bacillus subtilis</i> KU-1	Zakaria <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	Mendoza <i>et al.</i> , 1995
<i>Caldocellum saccharlogticum</i>	Gibbs <i>et al.</i> , 1992
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Oda <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	Hogg <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas</i> sp.	Yamaura <i>et al.</i> , 1990
<i>Streptomyces</i> sp.	Takahashi <i>et al.</i> , 1984
<i>Thermomonospora fusca</i>	Hilge <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermotoga neapolitana</i> 5068	McCutchen <i>et al.</i> , 1997
<u>เชื้อรา</u>	
<i>Aspergillus niger</i>	Ademark <i>et al.</i> , 1998
	Lin and Chen, 2004
<i>Aspergillus auleatus</i>	Setati <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium hirsutum</i>	Bradner <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Park <i>et al.</i> , 1987
<i>Penicillium brasilianum</i> IPT 20888	Jorgensen <i>et al.</i> , 2003
<i>Trichoderma harzianum</i> T4	Ferreira and Filho, 2004
<i>Trichoderma reesei</i>	Stalbrand <i>et al.</i> , 1993
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Juhasz <i>et al.</i> , 2005
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Singh <i>et al.</i> , 2000
	Puchart <i>et al.</i> , 1999
	Gubitz <i>et al.</i> , 1996
	Sachslehner <i>et al.</i> , 1998
	Sachslehner and Haltrich, 1999
	Sachslehner <i>et al.</i> , 2000

2.2 เอนไซม์ 1,4- β -mannosidase (EC 3.2.1.25)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า 1,4 ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลแมนโนส โดยจะตัดจากส่วนด้านนอกสุดของโมเลกุลเข้าไปจากด้านปลายที่ไม่ใช่รีดิวซิง (non-reducing end) ของสับสเตรท ซึ่งเป็นพวกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ และไกลโคเปปไทด์ที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ (manno-containing glycopeptide) เรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า เอกโซไกลโคซิเดส (exoglycosidase) สารตั้งต้นส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น แมนโนไตรโอส (mannotriose) หรือ แมนโนไบโอส (mannobiose) ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ น้ำตาลแมนโนส โมเลกุลเดี่ยว (Ademark *et al.*, 2001)

2.2.1 แหล่งของเอนไซม์

เอนไซม์เบต้า-แมนโนซิเดสผลิตได้จากหลายแหล่งด้วยกัน เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนซิเดส

แหล่งของเอนไซม์	แหล่งอ้างอิง
<u>สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม</u>	
คน	Alkhatat <i>et al.</i> , 1998
Bovine	Chen <i>et al.</i> , 1995
<u>แบคทีเรีย</u>	
<i>Cellulomonas fimi</i>	Stoll <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus</i> sp.	Akino <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Oda <i>et al.</i> , 1993
<u>เชื้อรา</u>	
<i>Aspergillus niger</i>	Ademark <i>et al.</i> , 2001
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Takada <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermomyces lamuginosus</i>	Singh <i>et al.</i> , 2000
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Gubitz <i>et al.</i> , 1996

Akino *et al.*, (1998) ศึกษากระบวนการทำเอนไซม์เบต้า-แมนโนซิเดส จากเชื้อ *Bacillus* sp. AM-001 ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 94 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.5 ค่าอุณหภูมิ และพีเอช ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ และยังพบว่าอนุมูลของโลหะกลุ่ม Ag^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

จากการศึกษาของ Singh *et al.*, (2000) พบว่าเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* SSBP เมื่อใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้างเอนไซม์เบต้า-แมนโนซิเดสได้ และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 80 องศาเซลเซียส มีความเสถียรที่ pH เป็นกลาง

2.3 เอนไซม์ α -galactosidase (EC 3.2.1.22)

เอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส ทำหน้าที่ในการย่อยที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,6 ของน้ำตาลกาแลคโตส โดยจะย่อยสลายจากส่วนปลายสุดของกาแลคโตแมนแนน หรือ กาแลคโตกลูโคแมนแนน และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น สารประกอบเมลิไบโอส (melibiose) แรฟฟิโนส (raffinose) และสตาคชิโอส (stachyose) เป็นต้น ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ น้ำตาลกาแลคโตส (Ademark *et al.*, 2001)

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์

แหล่งของเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส พบในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยพบมากในเมล็ดพืช ใน *E. coli* สามารถพบทั้งแอลฟา-กาแลคโตซิเดส (α -galactosidase) และเบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส แสดงไว้ดังตารางที่ 3

Luonteri *et al.* (1998) พบเชื้อ *Penicillium simplicissimum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดสปริมาณมากขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี locust bean gum หรือมีส่วนของไม้เนื้ออ่อนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ไร่ข้าวสาลี หรือ เปลือกของเมล็ดข้าวโอ๊ต เป็นต้น เมื่อนำน้ำเพาะเลี้ยงมาผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ พบว่า มีเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดสอยู่ 3 ไอโซเมอร์ คือ AGL I, AGL II และ AGL III มีค่า pI เท่ากับ 5.2, 4.4 และ 7.0 น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 61, 84

และ 61 กิโลคาลตัน ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ AGL I และ AGL II อยู่ระหว่าง 3.0 และ 4.5 ขณะที่ AGL III อยู่ที่ 4.0-5.0

ตารางที่ 3 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<u>แบคทีเรีย</u>	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Talbot <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NUB 3621	Fridjonsson <i>et al.</i> , 1999
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Van den Broek <i>et al.</i> , 1999
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hart <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas fluorescen</i> subsp. <i>Cellulose</i>	Halstad <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptococcus mutans</i>	Aduse-Opoku <i>et al.</i> , 1991
<i>Thermus brockianu</i> ITI 360	Fridjonsson <i>et al.</i> , 1999
<u>เชื้อรา</u>	
<i>Aspergillus tamari</i>	Civas <i>et al.</i> , 1984
<i>Aspergillus niger</i>	Manzanres <i>et al.</i> , 1998
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Shibuya <i>et al.</i> , 1998
<i>Penicillium simplicissimum</i>	De vries <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium ochrochloron</i>	Luonteri <i>et al.</i> , 1998
	Dey <i>et al.</i> , 1998
<i>Trichoderma reesei</i>	Golubev <i>et al.</i> , 1993
	Margolles <i>et al.</i> , 1993
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Zeilinger <i>et al.</i> , 1993

2. เอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus* sp.

เอนไซม์แมนนาเนสผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายแหล่ง ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์นั้น แบคทีเรียจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่าย และมีต้นทุนการผลิตต่ำ

Mendoza *et al.* (1995) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์แมนนานเนสจาก *B. subtilis* NM-39 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่า เอนไซม์แมนนานเนสที่ได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 4.8 มีอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส โดยองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนานเนสที่พบตามลำดับ คือ Gly > Glx > Ser และ Asx > Ala

Hossain *et al.* (1996) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนานเนสจาก *Bacillus* sp. KK01 ที่คัดแยกได้จากดิน และนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า มีเอนไซม์เบต้า-แมนนานเนสอยู่ 4 ไอโซเมอร์ ได้แก่ F1, F2, F3 และ F4 โดยทุกไอโซเมอร์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 7.1 โดย F1 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่า F2, F3 และ F4 อยู่ 5-10 องศาเซลเซียส เอนไซม์ F1, F2, F3 และ F4 เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนนจากกากมะพร้าว ในสัดส่วน 23-31 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น mannobiose, mannotriose และ mannotetraose และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย locust bean gum ในสัดส่วน 19-22 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลิตภัณฑ์เช่นเดียวกับการย่อยสลายแมนแนนจากกากมะพร้าว

Zakaria *et al.* (1998) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนานเนสจาก *B. subtilis* KU-1 ที่คัดแยกมาจากแบคทีเรีย 117 สายพันธุ์ พบว่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 4.5 มีอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 50-55 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระหว่างพีเอช 4.5-9.0 และมีความคงตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส และยังพบว่าอนุมูลของโลหะกลุ่ม Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Cr^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนานเนสที่พบตามลำดับ คือ Asx > Glx > Leu > Tyr > Ser

Ma *et al.* (2004) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนานเนสจาก *Bacillus* sp. N16-5 ที่คัดแยกได้จากตะกอนของทะเลสาบ Wudunur Soda ใน Inner Mongolia ประเทศจีน พบว่า เอนไซม์มีอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และ 9.5 ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน และเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีค่า pI เท่ากับ 4.3 เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกาแลคโตแมนแนน และกลูโคแมนแนน ทำให้ได้ผลผลิตเป็น โอลิโกแซคคาไรด์ และโมโนแซคคาไรด์

Phothichitto (2006) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินในจังหวัดนครปฐม พบแบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนส โดยแบคทีเรีย *B. circulans* NT6.7 มีกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุด เท่ากับ 0.306 หน่วยต่อไมโครลิตร มีอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ 45 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกิจกรรมการย่อยสลายแมนแนนด้วยเอนไซม์แมนนาเนส ยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารพรีไบโอติก ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย

นฤมล (2549) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาสจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ที่ Phothichitto (2006) คัดแยกได้จากดินในจังหวัดนครปฐม พบว่า อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดที่พีเอช 8.0 โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ เท่ากับ 59.51 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอช 6.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือ เท่ากับ 25.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ เป็นประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าทางด้านการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อใช้เป็นสารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

4. ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (Glycoside hydrolases)

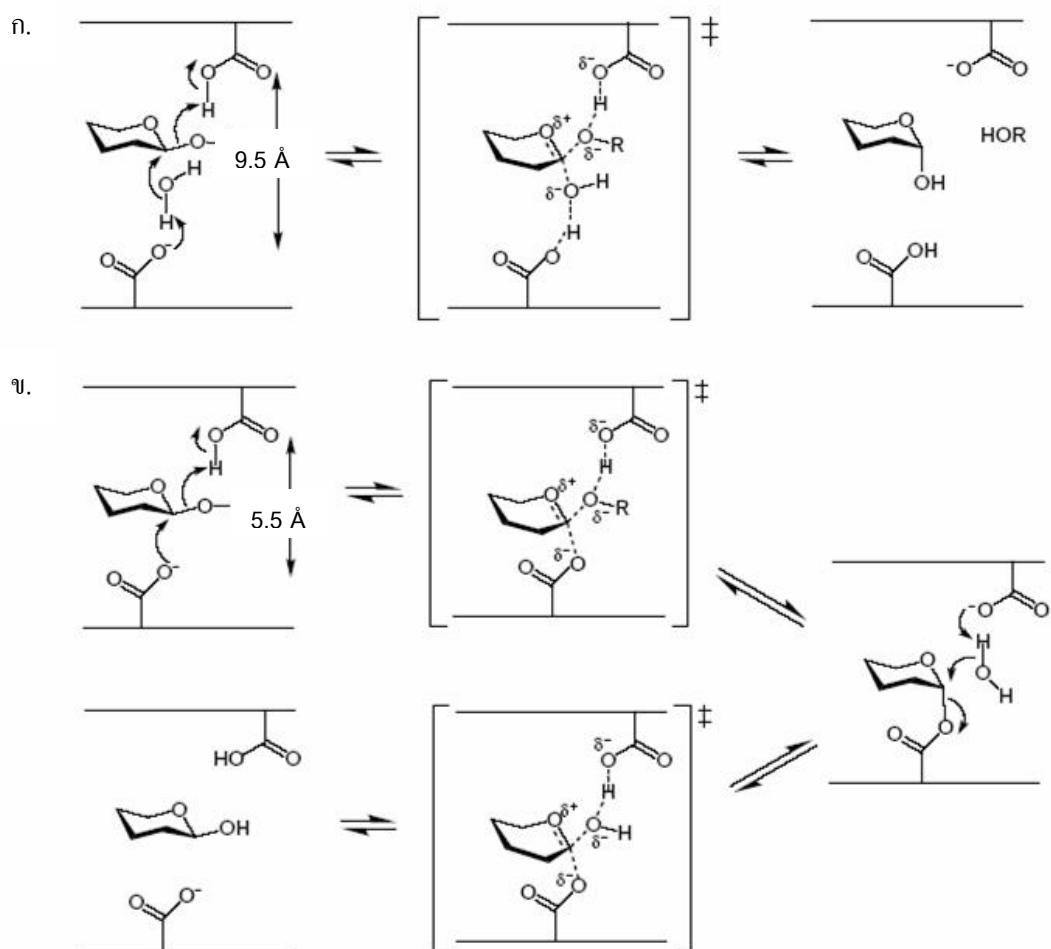
ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์กลุ่มที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตสองโมเลกุลหรือมากกว่า หรือ ระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์เบต้า-แมนนาส ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโครงสร้างของแมนแนน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ ทำให้เกิดผลผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีประโยชน์ในการใช้เป็นสารพรีไบโอติก เป็นต้น บทบาทหน้าที่ในการย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส มีความสำคัญเป็นอย่างมากในทางชีววิทยา ดังนั้น การศึกษาถึงกลไกในการเร่งปฏิกิริยา การจัดแบ่งหมวดหมู่ และลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จึงมีความสำคัญที่จะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์สามารถใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.1 ลักษณะทั่วไปในการเร่งปฏิกิริยา

เอนไซม์ในกลุ่ม *O*-glycosyl hydrolases ประกอบด้วยเอนไซม์ซึ่งมีส่วนร่วมในกระบวนการย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ในพืช ความหลากหลายของโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตนั้นทำให้เอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสเกิดความจำเพาะกับสารตั้งต้นอย่างกว้างขวาง โครงสร้าง

และหน้าที่ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสถูกนำมาศึกษาอย่างแพร่หลาย เอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสชนิดแรกที่ถูกนำมาหาโครงสร้างด้วยวิธี X-ray crystallography ในปี ค.ศ.1965 เมื่อคำนึงถึงข้อมูลทางด้านจลนพลศาสตร์และความรู้ทางด้านโครงสร้างที่มี ทำให้ทราบถึงกลไกโดยทั่ว ๆ ไป ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส กลไกหลักของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เมื่อพิจารณาจากการเรียงตัวของอะตอมในโมเลกุลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 (anomeric carbon) ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ inversion และ retention (ภาพที่ 2)

การเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวเป็น acid และ base catalysts อยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันประมาณ 9.5 Å ซึ่งยอมให้โมเลกุลของสับสเตรท และน้ำ มาจับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลได้พร้อมกัน โดยหมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น acid catalyst จะให้โปรตอนกับ glycosidic oxygen พร้อมกับหมู่คาร์บอกซิลที่ทำหน้าที่เป็น base catalyst จะรับโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำ ซึ่งเข้ามาเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon เกิดการสลายพันธะไกลโคซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์ คือ น้ำตาล ที่มี anomeric configuration เปลี่ยนแปลงไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ single-displacement และ transition state จะมีลักษณะเป็นออกโซคาร์บอนเนียมไอออน (oxocarbenium ion) (ภาพที่ 2ก) ส่วนการเร่งปฏิกิริยาแบบ retention จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัวเป็น acid/base catalysts และ nucleophile ซึ่งวางอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันประมาณ 5.5 Å ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ double-displacement ซึ่งจะเกิดโควาเลนต์ไกลโคซิล-เอนไซม์อินเตอร์มีเดียท (covalent glycosyl-enzyme intermediate) (ภาพที่ 2ข) ในขั้นตอนแรกหมู่คาร์บอกซิลตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid catalyst ซึ่งจะให้โปรตอนแก่ glycosidic oxygen พร้อมกับสลายพันธะไกลโคซิดิก และหมู่คาร์บอกซิลอีกตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งจะเกิด nucleophilic attack กับ anomeric carbon สร้างเป็นโควาเลนต์ไกลโคซิล-เอนไซม์อินเตอร์มีเดียท ในขั้นตอนที่สอง หมู่คาร์บอกซิลที่สูญเสียโปรตอนจะทำหน้าที่เป็น base catalyst โดยจะดึงโปรตอนจากโมเลกุลของน้ำที่เข้ามาโจมตี anomeric center ทำให้ได้น้ำตาลหลุดออกมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมี anomeric configuration เหมือนเดิม โดยทั้ง 2 ขั้นตอนจะเกิดขึ้นผ่าน transition state ที่มีลักษณะเป็นออกโซคาร์บอนเนียมไอออน (ชมพูนุท, 2549)



ภาพที่ 2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแบบ inversion (ก) และ retention (ข)

ที่มา: Carl and Stephen (2000)

4.2 การจัดแบ่งหมวดหมู่ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

Henrissat *et al.* (1995) ได้เสนอวิธีการจัดแบ่งหมวดหมู่ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส โดยอ้างอิงจากความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน และการวิเคราะห์กลุ่มของ hydrophobic (hydrophobic cluster analysis) โดยฐานข้อมูลของการจัดกลุ่มเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส สามารถอ้างอิงได้ที่เว็บไซต์ <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>

เอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสถูกจัดแบ่งออกเป็น 110 สกุล (families) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) การจัดแบ่งหมวดหมู่นี้ได้รับการสนับสนุนจากข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้นในไม่กี่ปีที่ผ่านมา จากข้อมูลความเหมือนทางโครงสร้างของเอนไซม์จึงทำให้สกุลต่าง ๆ ถูกรวบรวมขึ้นเป็นตระกูล (clan) หนึ่งในตระกูลหลักที่มีความสำคัญ คือ ตระกูล GH-A (clan GH-A) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 16 สกุล รวมทั้งเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 และ GH26 ด้วย เอนไซม์ในตระกูล GH-A นี้ มีลักษณะโครงสร้างที่มีการม้วนพับของโปรตีนเป็นแบบ (β/α)₈-barrel หรือเรียกว่า TIM-barrel ซึ่งลักษณะการม้วนพับนี้เป็นหนึ่งในการม้วนพับของโปรตีนแบบที่พบมากที่สุด (Todd, 1999) นอกจากนี้ตำแหน่งที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ในตระกูล GH-A ได้แก่ ตำแหน่งของบริเวณกรด/เบสที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และตำแหน่งของนิวคลีโอไฟล์นั้นจะอยู่ที่ปลายคาร์บอน (C-termini) ของโครงสร้าง β -sheet ที่ 4 และ 7 ตามลำดับ (Henrissat, 1997) จากการจัดแบ่งหมวดหมู่ของเอนไซม์เป็นตระกูล GH-A นี้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสในแง่ของการมีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยเอนไซม์ที่อยู่ในตระกูล GH-A จะมีลักษณะของบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกัน

4.3 ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

เอนไซม์ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกิจกรรมหลักในปฏิกิริยาการย่อยสลาย กลุ่มที่ 1 คือ เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายจากปลายสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ และกลุ่มที่ 2 คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกจากภายในสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าตำแหน่งที่สำคัญต่อการย่อยสลายพันธะนั้น มีผลมาจากโครงสร้างที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (ภาพที่ 3) (Henrissat, 1995)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะภายในสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ เช่น เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเบต้า-แมนนาเนส โดยมากจะมีรูปร่างพื้นผิวของบริเวณเร่งปฏิกิริยาแบบรอยบุ๋ม (cleft) ในทางกลับกัน โครงสร้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่มีรูปร่างเป็นหลุม (pocket) นั้น โดยมากจะพบในเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะจากปลายสายโซ่ ซึ่งจะปลดปล่อยโมโนแซคคาไรด์จากปลายที่ไม่ใช่รีดิวซิง (non-reducing end) ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส และกลูโคอะมัยเลส พื้นผิวของบริเวณเร่งปฏิกิริยาแบบโพรง (tunnel) นั้น พบในเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส ซึ่งจะปลดปล่อยเซลโลไบโอสจากปลายรีดิวซิง และปลายที่ไม่ใช่รีดิวซิงของเซลลูโลส อย่างไรก็ตาม ลักษณะรูปร่างของบริเวณเร่งไม่ได้มีผลกระทบต่อหน้าที่ในการย่อยสลายของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส เนื่องจากเอนไซม์บางชนิดมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายจากภายในสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ แต่ก็สามารถแสดงกิจกรรมของการย่อยสลายจากปลายสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ได้เช่นเดียวกัน แต่ลักษณะรูปร่างของบริเวณเร่งจะส่งผลต่อการเข้าจับกับสารตั้งต้น คือ บริเวณส่วนที่จับกับไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากจะทำให้เกิดรูปแบบของการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้น พื้นผิวบริเวณที่จับกับสารตั้งต้นจึงถูกแบ่งออกเป็นหลาย ๆ หน่วยย่อย ตามคำแนะนำของระบบการตั้งชื่อคำเฉพาะที่ใช้ทางชีววิทยา ซึ่งจะใช้หมายเลข +4, +3, +2, +1, -1, -2 ฯลฯ จากปลายที่ไม่ใช่รีดิวซิงไปจนถึงปลายรีดิวซิง ซึ่งพันธะ *O*-glycosidic ที่ถูกตัดจะอยู่ที่ตำแหน่งระหว่างหน่วยย่อย ที่ +1 และ -1 (ภาพที่ 4)

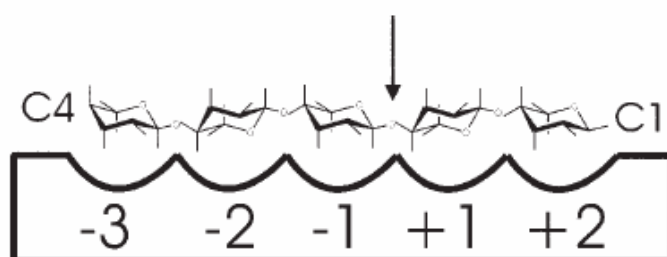
4.4 การจัดแบ่งหมวดหมู่ และลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ถูกโคลนทั้งหมดนั้น จัดอยู่ใน GH5 หรือ GH26 ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส เอนไซม์ใน GH5 และ GH26 นี้มีลักษณะโครงสร้างอยู่ในตระกูล GH-A และมีกลไกเป็นแบบ retention เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากแบคทีเรีย และยูคาริโอตนั้นถูกจัดอยู่ใน GH5 ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์เอนโด- และเอกโซกลูคาเนส ไชลานเนส และเอนโดไกลโคเซรามิเดส ตัวอย่างการจัดลำดับความเหมือน (alignment) ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 บางชนิดจากแหล่งที่เป็นยูคาริโอตแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 เหมือนกัน สำหรับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 นั้น มีแหล่งที่มาหลักจากแบคทีเรีย และเชื้อราที่ไม่ต้องการอากาศบางชนิด และนอกจากเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสแล้ว ยังพบเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเบต้า-1,3-ไชลานเนสอยู่ใน GH26 อีกด้วย ในบางกรณีเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่มาจากจีนัสเดียวกันก็ถูกจัดหมวดหมู่อยู่ในสกุลที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* และเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* ที่ต่างสายพันธุ์กัน ก็ถูกจัดอยู่ทั้งใน GH5 และ GH26



ภาพที่ 3 โครงสร้างของส่วนที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส
แบบ pocket (ก) cleft (ข) และ tunnel (ค)

ที่มา: Hagglund (2002)



ภาพที่ 4 การเรียกชื่อหน่วยย่อยที่จับกับน้ำตาลตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (ลูกศร คือ บริเวณพันธะ *O*-glycosidic ที่ถูกตัด)

ที่มา: Hagglund (2002)

ในปี 2002 Hagglund ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่จัดอยู่ใน GH5 จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* และ *T. fusca* จากการทำ X-ray crystallography พบว่าเอนไซม์จากเชื้อทั้งสองชนิดมีการม้วนพับแบบ $(\beta/\alpha)_8$ -barrel ซึ่งเป็นการม้วนพับแบบอนุรักษที่พบในตระกูล GH-A นอกจากนี้ยังพบบริเวณ β -sheet จากเอนไซม์ทั้งสอง ซึ่งไม่ใช่บริเวณอนุรักษที่พบในเอนไซม์ที่มีการม้วนพับแบบ $(\beta/\alpha)_8$ -barrel อื่น ๆ และมีบริเวณของการเกิด glycosylation อยู่ตรงตำแหน่งของ N-acetylglucosamine ทั้ง 4 ตำแหน่ง ส่วนบริเวณเร่งในโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส Hagglund พบว่า มีลักษณะเป็นรอยบุ๋มตื้น ๆ ที่สัมผัสกับตัวทำละลาย ภายในบริเวณเร่งนี้ มีกรดอะมิโนอย่างน้อย 7 ชนิด ที่เป็นบริเวณอนุรักษสำหรับเอนไซม์ใน GH5 ได้แก่ Arg54, Asn168, Glu169, His241, Tyr243, Glu276 และ Trp306 (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ Hagglund ยังได้ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 ที่ผลิตจากยีน *manA* จากเชื้อ *Pseudomonas cellulosa* ทำให้พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *P. cellulosa* นั้นมีการม้วนพับเป็นแบบ $(\beta/\alpha)_8$ -barrel และมีตำแหน่งอนุรักษ และบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่จัดอยู่ในตระกูล GH-A เช่นเดียวกับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อรา *T. reesei* และ *T. fusca*

5. เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

5.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ *In vitro* enzymatic gene amplification ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ในหลอดทดลอง ประกอบด้วย ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) thermostable DNA polymerase deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) 4 ชนิด (dATPs, dCTPs, dGTPs และ dTTPs) oligonucleotide primer และ บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1 Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2 Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม คือเป็นลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์สายเดิม

```

Trichoderma M-MMLSKSLLSAAT--AASALAAVLQPV-----PRASSFVTISGTFQNDIGK
Aspergillus --MKLSHMLLSLASLGVATALPRTPNHN-----AATTAFFPSTSGLHFTIDGK
Agaricus -----AM-----N-----QAF--S----DI-AN
Geobacillus MNKKWSYTFIALLVSIICAVVPIFFSQNNVHAKTKREPATPTKDNFVYRGRDKLMIGNK
Orpinomyces --MHFNK--VSALLTLATSVAGQFR-----EGFVQTDGNTFVVDGC
Lycopersicon --MSYARRSCICGLFLLFLALVCEAN-----SGFIGVKDSHFELNGS
Mytilus -----MLLTALAVLFASTGC-----QARLSVSGTNLNYNGH
consensus

Trichoderma VGYFAGTNCYWCSEF---TNHA----DVOSTFSHSSSGLKVVFWG-FNDVNTQPSF
Aspergillus TGYFAGTNSYWIGFL---TNND----DVOLVMSQLAASDLKILFWG-FNDVNTKPTD
Agaricus AG---GT-----T-----VETWG-FNEV-TSPN-
Geobacillus EFRFVGNTNNYLLHYK---SNQ-----MIDDVIESAKKMGIKVIFLWGGFDGNTSENQA
Orpinomyces KRYFSGSNTYYL-MV---SNHE----RVOLALETYARHNLNVFAMA-PCDECEDEAT-
Lycopersicon PFLFNGFNSYWLHVAAADPTERY----KVTEVLKSDASVAGLSVCHWA-FSDGGDRA--
Mytilus HIFLSGANQAWVNYARDFGHNQYSKSKSTFESTLSDIQSHGGNSVFWL-HIEGESTPE-
consensus

Trichoderma GQIWFQK----LSATG--STINTGAD--GLQTLDYVVQSAEQHNKLIIPFVNNWSVDYGG
Aspergillus GTVWYQ----LHANGT-STINTGAD--GLQRLDYVVTSAEKYGVKLIINPVNEWTDYGG
Agaricus GN--YYSQ---WSGAR--PTINTGAS--GLLNFDNVIAAAKANGIRLIVALTNNWADYGG
Geobacillus HNTYMQYEMGKYMGEPIKKELEGAQN-GFERLDYTIYKAKQEGIRLVIVLTNNWNWPFGG
Orpinomyces -R-LVD-----FSGPE--VTLN-GEN--MEKVDDYLAQAQRNIRVVLTLNNWTDYGG
Lycopersicon ----LQ-----ISPG----IYDERV--FQGLDFVIAEAKK-----YG-
Mytilus ----FD-----NNG----YVTGIDNTLISDMRAYLHAAQRNLIIFFTL---WN--GA
consensus

Trichoderma INAYVNAF-G-GNATT-WYINTAAQTOYRKVYQAVVSR-----YANSTAFIWEELGN
Aspergillus MQAYVTAY-G-AAAQTDIFYINTAICAAKYNIKAVVSR-----YSSSAIFAWELAN
Agaricus MDVYVNMVGVNGQPHDLFYINTAIDAFKSYGRAVSR-----YANEPTVMAWELAN
Geobacillus MMQYVNWII-G-ETNHDLFYTDERTIKAYKNVYHLYLNKRNQYTGIIYKNEPTIMAWELAN
Orpinomyces MDVWVKQF-G-GKYHDEFYTNKDIIRKYKQYIKAMINRVNTYTGQLYKDDPTIFSQQLAN
Lycopersicon --AQI-----SNDDEFYTHPMLKKYLNKHEIKVVTRLNSITKVAYKDDPTIMAWELAN
Mytilus VKQSTH-Y----RLNGLMVDTRKLSQSYIDHALKPMANA-----LKNEKALGGWDIMN
consensus

Trichoderma EPRC--NG-----CSTDVIVQ---WA-----TSVSQYV-----KSLSDSNHLV
Aspergillus EPRC--QG-----CDTSVLYN---WI-----SDTSKYI-----KSLSDSKHLV
Agaricus EPRC--KGSTGTTSGTCTTTITVTN---WA-----KEMSAFI-----KTIDSNHLV
Geobacillus EPRN--DSD-----PTGDTLVR---WA-----DEMSTYI-----KSIDPHHLV
Orpinomyces EARN--NGPHGLPVKNCNTDTITK---WM-----DEIATFI-----HQEDPNHLV
Lycopersicon EPRD--QAD-----YSGKTVNG---WV-----QEMASFV-----KSLSDNHLL
Mytilus EPEGEIKPGESS-SEPCFDTRHLSGSGAGWAGHLYSAQEIGRFVNWQAAAIKEVDPGAMV
consensus

Trichoderma TLGDEGLGLST----GDGAYPYTYGNGTDFARN-VQIKSLDFGTFFLNPDSW--GTNYT
Aspergillus TIGDEGFGLDLD---SDGSYPYTYGEGNFTKN-LGISTIDFGTLELNPDSW--GTSYD
Agaricus AIGDEGF-YNQP---GAPTYPYQSGEGVDFEAN-LAISSVDFAFTHNPDSW--GGQAD
Geobacillus AVGDEGFFRRSSGGFNGEGSYMYTGYNGVDWDL-IALKNIDYGTFFLNPDSW--GISPE
Orpinomyces SSGIEGIGLTPPAG-VDKNTYVYTYTEGTDYEAI-SALDSIDYNTVWNPVGVW--GLKDY
Lycopersicon EVGMGEFGYGSIP---ERKSVNPGYQVGTDFISN-HLINEIDFATHTPTDQWVSGQSDS
Mytilus TVGSWNMRADT----DAMGFHNLYSMDCLVKAGGKQSGTSLSFYQVFTN---DW----QNH
consensus

Trichoderma ----WGNWGIOTH-AAACLAAGKPCVFEEYGAQ-----QNF----CTNEAFWQTTSI
Aspergillus ----WGNWITAH-AAACKAVGKPCLEEFYGVV-----SNH----CAVESFWQQTAG
Agaricus AKA-WGTQWITDH-AAAMKRVNKPVILEEFGVT-----TNQ----PDYAEWFN-EI
Geobacillus NVEKWGEQYILDH-LAAGKKARKPVVLEEFYGISATGV---QNR----EMIYDTWNRME
Orpinomyces AKD--GVTWIKAH-ADVKKFNKPTVVEEWGLSTADNVPIQR---DPIYTQWMNEVL
Lycopersicon AQLVWMEKWITSHWEDARNILKKPLVLAEFGKSSRGQ---GSRDIFMSSVYRNVLAK
Mytilus ----FGNESPFKH-SFSNFRLLKPMVIGEFNQEHGAG---MSS----ESMF-EWAY---
consensus

Trichoderma TTRGMGGDMFQW-G-----DTFANGAQSNSDPYTVWY-NSSNWQCIVKNHVDIAINGG-
Aspergillus NATGISGDLYQY-G-----TTFSWG-QSPNDGNTFY-NTSDETCLVTDHVAAINAQ
Agaricus ESSGLTGDLIQA-G-----SHLSTG-DTPNDGYAVYP-DGFVYP-LVKSHASAMKNRA
Geobacillus EHGG-TGAMFNLTLGIDNPESADENGYPDYDGRIVN-DHSSVTNLLKYAKLFGDR
Orpinomyces ANDNIGMNMFWVCG-----EDYYG---TDGY-----LLEE--DEI---
Lycopersicon EGGTMAGSLVWQL-----MAHGMENYDDGYCIVLQGTFTTQIISQAHVMTALA
Mytilus -TKGYSGAWTHER-----TDVSWN--NQLRGIQHLK-----SRTDHGQVQFGL-
consensus

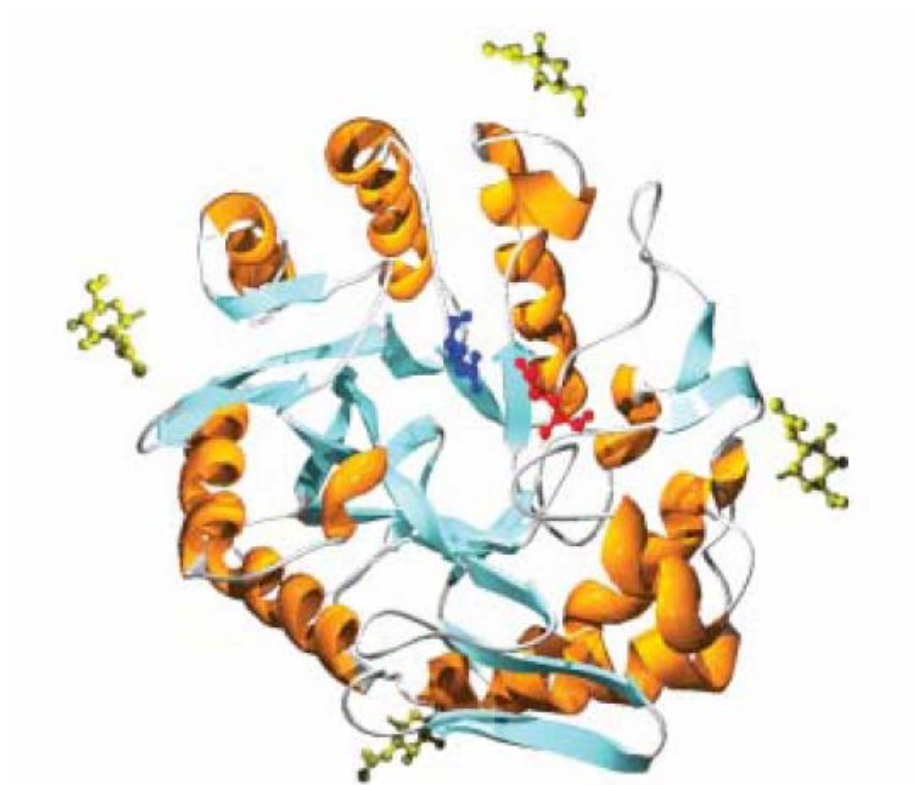
```

ภาพที่ 5 การจัดลำดับความเหมือน (alignment) ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5 บางชนิดจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต
กำหนดให้ ตัวอักษรในช่องสี่เหลี่ยม แทนกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH5

* แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

ที่มา: Hagglund (2002)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่จัดอยู่ใน GH5 จากเชื้อรา *T. reesei*
 บริเวณสีทอง คือโครงสร้าง α -helix สีฟ้า คือ โครงสร้าง β -sheet
 บริเวณสีแดง และสีน้ำเงิน คือ บริเวณที่คาดว่าเป็น acid/base catalysts และ nucleophile
 ตามลำดับ
 บริเวณสีเหลือง คือ N-acetylglucosamine
 ที่มา: Hagglund (2002)

ขั้นที่ 3 Primer extension (synthesis) เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยต้องอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกัน เป็นจำนวน 30-40 รอบ ทำให้ได้ amplified product หรือที่เรียกว่า amplicon เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นล้าน ๆ เท่า (2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) แสดงดังภาพที่ 7

5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

5.2.1 การคัดเลือก และการออกแบบไพรเมอร์

(1) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurines, polypyrimidines หรือการเรียงตัวของลำดับเบสที่ไม่ปกติ และควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์

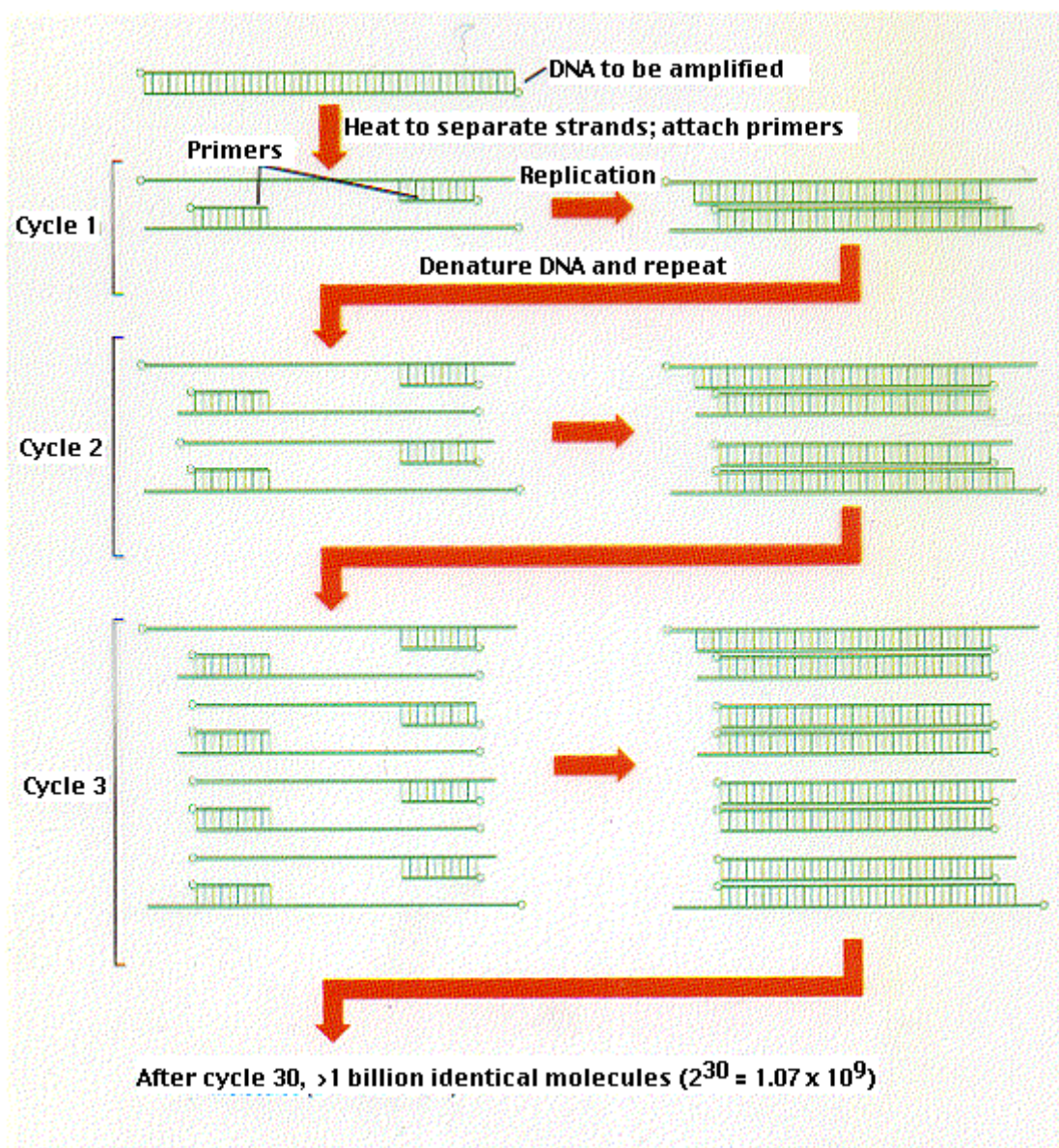
(2) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3' (3'-end) ของไพรเมอร์

(3) ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ ไม่ให้มีเบสเป็นคู่สมกัน (complementarity) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3' – overlaps ในคู่ไพรเมอร์ ซึ่งจะช่วยให้ลดอัตราการเกิด primer dimer

(4) ไพรเมอร์ควรประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 18-35 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์

(5) มี T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส

(6) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมคราร์ ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด และมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้น และอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer dimer ทำให้ผลผลิตที่ต้องการลดลง



ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ที่มา: Mullis (1990)

5.2.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เมื่อเริ่มใช้ต้องทดสอบหาความเข้มข้นที่พอเหมาะของเอนไซม์ ซึ่งความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5-5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร และตรวจผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไป มีผลทำให้เกิดการสะสมผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย เกณฑ์มาตรฐานกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ประมาณ 1-2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ถ้าดีเอ็นเอแม่พิมพ์มีความซับซ้อนมาก เช่น genomic DNA ควรใช้เอนไซม์ 1-4 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร

5.2.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน

Taq DNA polymerase ต้องการ Mg^{2+} เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย Mg^{2+} จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น Mg^{2+} ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของไพรเมอร์ด้วย ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไป ความเข้มข้นที่พอเหมาะของ Mg^{2+} คือ ต้องเหลือแมกนีเซียมในรูปอิสระ ประมาณ 0.5-1.0 มิลลิโมล มักใช้แมกนีเซียมความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 มิลลิโมล ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า Mg^{2+} ก็ช่วยให้ไพรเมอร์มีการ anneal ที่มีความจำเพาะขึ้น เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

5.2.4 ความเข้มข้นของ deoxynucleotide triphosphates

deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ปกติมีความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมล โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่ pH 7.0 ควรเตรียมเป็น primary stock solution มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล แล้วเจือจางเป็น working stock solution มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมล แบ่งเป็น aliquots เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในปฏิกิริยามาตรฐาน ปกติมีความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTP ทั้ง 4 ชนิด 0.8 มิลลิโมล

5.2.5 ความสำคัญขององค์ประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับปฏิกิริยา PCR คือ 10-15 มิลลิโมลของ Tris-HCl pH 8.3-8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส การเติม dimethylsulfoxide (DMSO) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาทำให้ลด secondary structure ของดีเอ็นเอ และนิยมใช้ในเอนไซม์ Klenow *E. coli* DNA polymerase แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ *Taq* DNA polymerase เพราะยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ผลผลิต PCR น้อยลง

Gelatin หรือ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถช่วยคงสภาพ (stabilize) ของเอนไซม์ แต่ BSA มีข้อเสียที่ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง และอาจตกตะกอนกับ *Taq* DNA polymerase

5.2.6 สภาพที่เหมาะสมของขั้นตอน denaturation

ข้อผิดพลาดส่วนมากของ PCR เกิดจากการ denaturation ได้ไม่สมบูรณ์ สภาพที่กำหนดสำหรับการ denaturation คือที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที หรือ 97 องศาเซลเซียส 15 วินาที อย่างไรก็ตามอาจกำหนดอุณหภูมิสูงขึ้นกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มี G+C ปริมาณสูง การเกิด denaturation ที่ไม่สมบูรณ์ เป็นผลทำให้สายดีเอ็นเอเกิด snapback ทำให้ผลผลิตน้อยลง ในทางตรงกันข้าม ถ้าขั้นตอน denaturation กำหนดอุณหภูมิสูงเกินไป และ/หรือระยะเวลาเกินไปจะนำไปสู่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ อายุครึ่งชีวิตของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มากกว่า 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส 40 นาที ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส และ 5 นาทีที่อุณหภูมิ 97.5 องศาเซลเซียส

5.2.7 สภาพที่เหมาะสมของขั้นตอน primer annealing

อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ต้องการสำหรับ primer annealing ขึ้นกับความยาวของลำดับเบส และความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิสำหรับ annealing ควรใช้อุณหภูมิต่ำกว่า T_m ของไพรเมอร์ประมาณ 5 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงานได้ที่ช่วงอุณหภูมิกว้าง ประมาณ 20-85 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ให้ผลดีที่สุดคือ 55-73 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ช่วยไม่ให้เกิดการจับคู่ที่ผิดพลาด และลดการเกิด misextension ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ดังนั้นการใช้อุณหภูมิใน

ขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรอบแรก ๆ ของปฏิกิริยา จะช่วยเพิ่มความจำเพาะของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และควรเติมเอนไซม์ในปฏิกิริยา ภายหลังขั้นตอน denaturation ของรอบแรก ซึ่งอยู่ในขั้นตอน extension ความเข้มข้นสูงของ dNTP จะช่วยส่งเสริมให้เกิด misextension ของไพรเมอร์ และเกิดการเรียงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ผิดพลาด

5.2.8 สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน primer extension

เวลาในการเกิด extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิที่ควรใช้ คือ 72 องศาเซลเซียส อัตราการต่อลำดับเบสที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ซึ่งขึ้นอยู่กับ pH ของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเกลือ และธรรมชาติของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เวลาในการเกิด extension 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ผลผลิตที่มีความยาวถึง 2 กิโลเบส อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่ยาวขึ้นในการเกิด extension ในรอบแรก จะมีประโยชน์ถ้ามีความเข้มข้นของ substrate ต่ำ และในรอบหลังของ PCR เมื่อความเข้มข้นของผลผลิตสูงเกินความเข้มข้นของเอนไซม์

5.2.9 จำนวนรอบ (cycle number)

จำนวนรอบที่พอเหมาะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อปรับองค์ประกอบอื่น ๆ ของ PCR ให้เหมาะสมแล้ว ความผิดพลาดที่พบบ่อยคือ ทำจำนวนรอบมากเกินไป ทำให้ผลผลิตที่ได้เป็น nonspecific background แต่ถ้าจำนวนรอบน้อยเกินไปจะสังเคราะห์ผลผลิตได้น้อย ข้อเสนอแนะสำหรับจำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย เริ่มต้นมีดังนี้ จำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 3×10^5 , 1.5×10^4 , 1×10^3 และ 50 ใช้จำนวนรอบที่ 25-30, 30-35, 35-40 และ 40-45 รอบ ตามลำดับ

5.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

5.3.1 วิธี gel electrophoresis

วิธี gel electrophoresis คือ การดูผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากผ่านขบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ที่ทราบขนาดแน่นอน ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสเพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิด ที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้อย่างชัดเจน หากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่ถ้าหากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 เบส นิยมใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือใช้ acrylamide gel 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับเป็นเจลตรวจหา

6. PCR walking

Chromosome walking เป็นการวิเคราะห์หาลำดับเบสของส่วนดีเอ็นเอที่ต่อเนื่องจากส่วนของดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสแล้ว โดยอาศัยเทคนิคการโคลน แต่เทคนิคดังกล่าวจะไม่ประสบผลสำเร็จถ้าจีโนมที่ทำการศึกษามีลำดับเบสซ้ำกระจายอยู่ทั่วจีโนม (Interspersed repeated sequence) จึงมีการนำเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) มาใช้ในการทำ chromosome walking เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR walking

PCR walking เป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่อยู่ถัดจากตำแหน่งที่ทราบลำดับเบส ไพเรเมอร์ที่ใช้มี 2 แบบ คือ specific primer เป็นไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนที่ทราบลำดับเบส และ walking primer เป็นไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนที่ไม่ทราบลำดับเบส (ภาพที่ 8) ซึ่งมีหลายวิธี อาทิ Inverse PCR (IPCR) เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ โดยการออกแบบไพเรเมอร์ 2 ชุดในทิศทางตรงข้ามกันจากตำแหน่งที่ทราบลำดับเบสแล้ว และดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) อยู่ในรูปวงแหวน (Ochman *et al.*, 1988) (ภาพที่ 9) Ligation-mediated PCR (LMPCR) (ภาพที่ 10) Biotin-capture PCR, adapter/cassette/linker ligation PCR เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนที่ทราบลำดับเบส และไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วน adapter/ cassette/ linker เชื่อมกับปลายด้านหนึ่งของดีเอ็นเอ (Rosenthal *et al.*, 1990) T-linker ligation PCR เป็นการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพของการทำ ligation PCR โดย Yan *et al.* (2002) อาศัยคุณสมบัติการเติมเบสอะดีนีน (A) ที่ปลาย 3' ของผลิตภัณฑ์ถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนที่ทราบลำดับเบส และไพเรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วน T-linker วิธีนี้ช่วยลดการเกิด non-specific จากการเชื่อมด้วย adapter, cassette และ linker อื่น นอกจากนี้ยังมีเทคนิค Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มของ nested sequence-specific primer โดยค่า T_m ควรมีค่าสูง (58-63 องศาเซลเซียส) และ shorter arbitrary degenerate (AD) primer โดยค่า T_m ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 47-48 องศาเซลเซียส ส่วน annealing temperature แบ่งเป็น 3 ช่วง คือ annealing temperature ช่วง high-stringency cycle (thermal asymmetric) อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ทำ PCR 5 รอบ การใช้อุณหภูมิสูงเพื่อช่วยให้ไพเรเมอร์จับกับดีเอ็นเอ

เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง ช่วง low-stringency cycle อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำ PCR 1 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์ให้ได้จำนวนมาก ส่วนช่วง Reduced-stringency cycle (thermal asymmetric) อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นการเพิ่มผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์ (Liu *et al.*, 1995)

เทคนิค PCR walking นิยมใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับถัดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้ว ดังผลการศึกษาของ Lin *et al.* (1995) ใช้เทคนิค PCR walking ศึกษาส่วนของ upstream และ downstream ของยีน *kerA* ใน *B. licheniformis* PWD-1 (ATCC 53757) ที่ผลิตเอนไซม์ keratinase โดยส่วน upstream ใช้ไพรเมอร์ R10 5' CTTTGTCCGC 3' เป็นไพรเมอร์จากส่วนที่ทราบลำดับเบส ไพรเมอร์ P15 5' CTCCCTGCCAA 3' เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม ส่วน downstream ใช้ไพรเมอร์ N10 5' GCGCAAACCG 3' ที่ออกแบบจากส่วนที่ทราบลำดับเบส ไพรเมอร์ P14 5' CCCGTACAT 3' เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และใช้ไพรเมอร์ N25 5' CAAACCGTTCCTTACGGCATTCCTCC 3' เป็นดีเอ็นเอติดตามในการทำ hybridization เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์ นำไปหาลำดับเบส โดยการโคลนเข้าไปใน pCR II พบว่าส่วนของ upstream มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 575 คู่เบส และ downstream มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 683 คู่เบส Lin และ Li (1995) ใช้เทคนิค PCR walking ในการศึกษา ยีน *hsl V* และ *hsl U* บนจีโนมของ *Leptospira borgpetersenii* พบว่า *hsl V* มี open reading frame (ORF) 543 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 180 เรซิดิว ขนาด 19.476 กิโลดาลตัน มีความเหมือน (identity) กับโปรตีน Hsl V ร้อยละ 49-62 ส่วน downstream ของยีน *hsl V* พบยีน *hsl U* ที่อยู่ถัดจากตำแหน่ง stop codon ของยีน *hsl V* 43 คู่เบส ยีน *hsl U* มี open reading frame (ORF) 1,401 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 467 เรซิดิว ขนาด 53.139 กิโลดาลตัน มีความเหมือน (identity) กับโปรตีน Hsl V ร้อยละ 49-96 มีส่วน ribosome binding site (RBS) และโปรโมเตอร์อยู่ในช่วง upstream ของทั้ง 2 ยีน

ในปี 1998 Kim *et al.* ได้ศึกษาโคลนและลำดับเบสของยีน *arfI* และ *arfII* ที่ผลิต α -L-Arabinofuranosidase (ARAF) ของโปรตีน Arf I และ Arf II (ตามลำดับ) ใน *Cytophaga xylanolytica* ยีน *arfI* ใช้ primer 5 คู่ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR walking จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบส พบว่ายีนมี open reading frame (ORF) 1,533 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 509 เรซิดิว ขนาด 57.7 กิโลดาลตัน ยีน *arfII* ทำการโคลนด้วยวิธี Shotgun ใน *E.coli* DH5 α พบว่ายีนนี้มี open reading frame (ORF) 1,605 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 534 เรซิดิว ขนาด 59.2 กิโลดาลตัน

Tip *et al.* (2000) ศึกษา bacteriocin Salivaricin B (SalB) จาก *Bacillus silivarius* M7 ในระดับโมเลกุล โดยกล่าวถึงรายงานก่อนหน้านี้ว่า *B. silivarius* M7 มีการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา ลำดับกรดอะมิโน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *salB* เรียบร้อยแล้ว Tip *et al.* (2000) จึงศึกษาส่วนของลำดับเบสที่อยู่ต่อเนื่องจากลำดับเบสของยีน *salB* โดยใช้เทคนิค inverse PCR ผลการทำ inverse PCR ได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์เรสขนาด 500 คู่เบส เมื่อนำไปหาลำดับเบสและวิเคราะห์ผล พบ open reading frame (ORF) 171 คู่เบส เป็นส่วนยีนโครงสร้าง 114 คู่เบส (กรดอะมิโน 38 เรซิดิว) และส่วน long leader 57 คู่เบส (กรดอะมิโน 19 เรซิดิว) มีส่วน ribosome binding site (RBS) (GAGG) อยู่ในตำแหน่งที่ห่างจากจุดเริ่มต้นในการแปลรหัส (start codon) ไปทาง upstream 8 คู่เบส

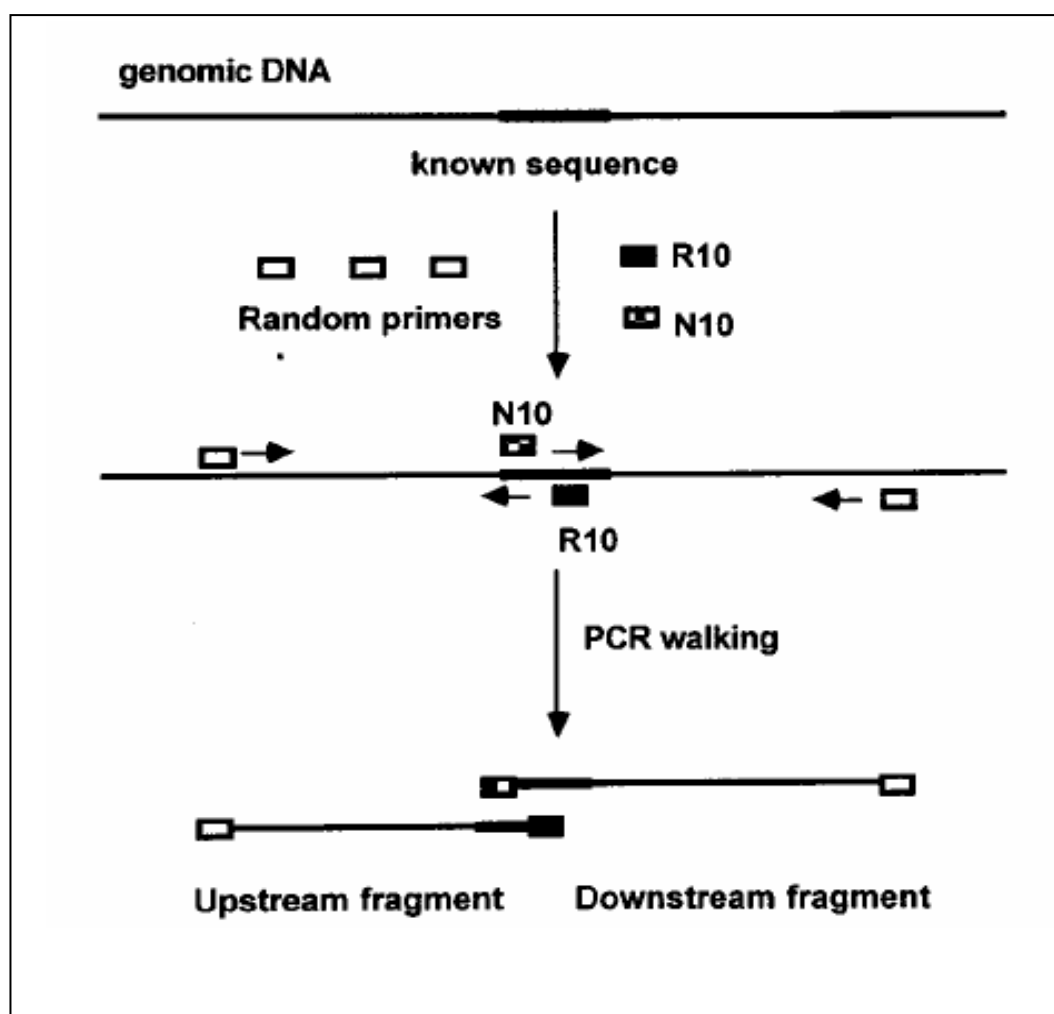
จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าเทคนิค PCR walking เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์หาลำดับเบสในตำแหน่งที่ต่อจากลำดับเบสที่ทราบแล้ว แบ่งเป็นหลายวิธี อาทิเช่น IPCR, LMPCR, TAIL PCR เป็นต้น เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะทำการทดลองได้ง่ายและให้ประสิทธิภาพสูง

7. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์

7.1 ความหมายและความสำคัญของชีวสารสนเทศศาสตร์

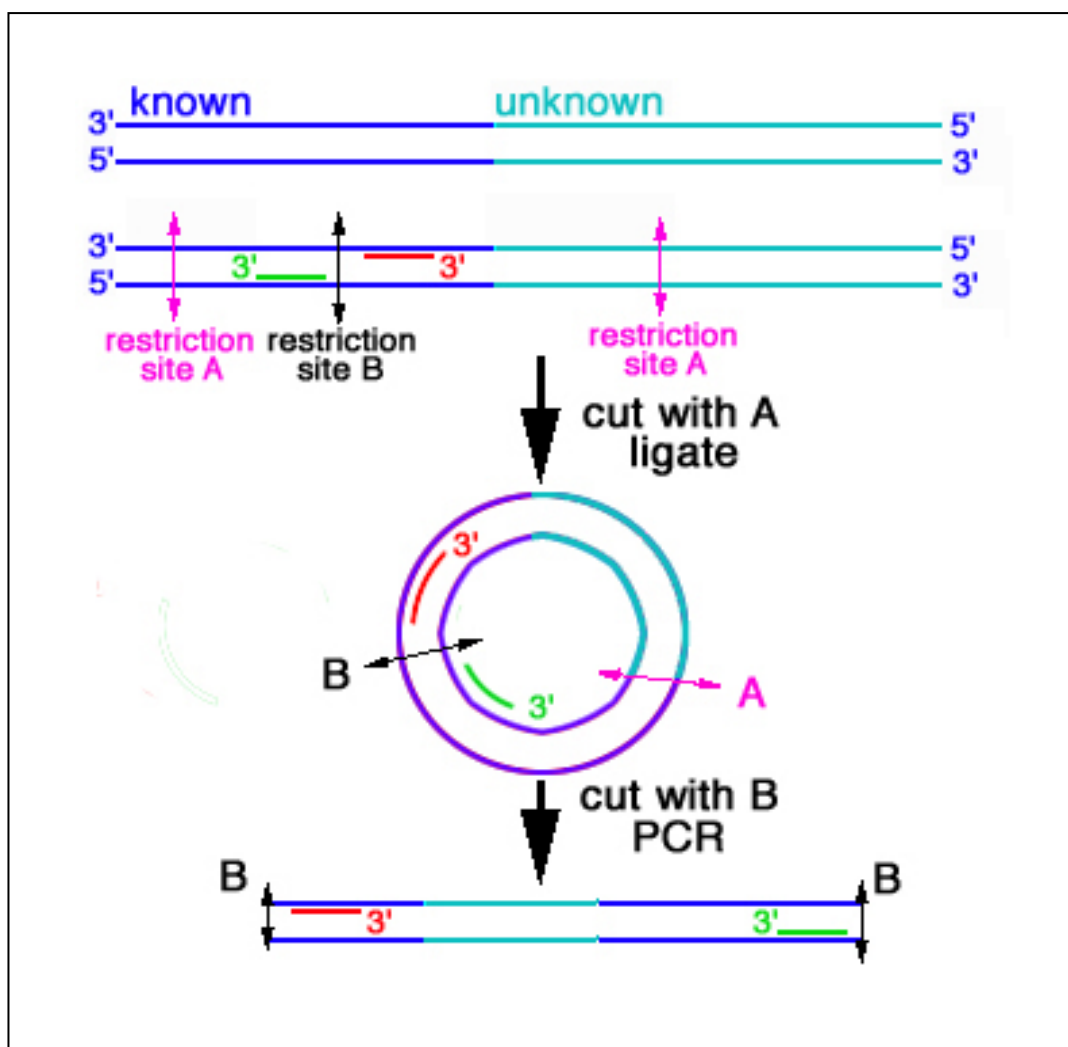
ชีวสารสนเทศศาสตร์ หรือ Bioinformatics เป็นวิทยาศาสตร์แขนงใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและวิจัยเพื่อผลิตข้อมูล จัดระบบเรียบเรียงข้อมูล เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยา (Kitano, 2002 และ Slonim, 2003) ตัวอย่างของข้อมูลเหล่านี้ ได้แก่ ข้อมูลระดับโมเลกุล ประเภทลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม ลำดับกรดอะมิโนในสายโปรตีน ไปจนถึงข้อมูลระดับการแสดงออกของยีน หน้าที่ของยีน การตอบสนองของยีน และยังรวมถึงข้อมูลทางสถิติและบทความทางวิทยาศาสตร์อีกด้วย

เป้าหมายของชีวสารสนเทศศาสตร์ ได้แก่ การจัดรูปแบบข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายแก่การค้นหา วิเคราะห์ และนำไปใช้ สามารถเพิ่มเติมข้อมูลลงในฐานข้อมูลได้สะดวกรวดเร็ว นอกจากนี้ ยังมีการกลั่นกรองวิเคราะห์ข้อมูลดิบในระดับหนึ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความหมายเข้าใจง่าย ตัวอย่างเช่น การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน แสดงตำแหน่งที่น่าจะเป็นยีน แสดงตำแหน่งที่น่าจะเป็น signal peptide และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน หรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่ตีพิมพ์ข้อมูลนี้ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การวิจัยพัฒนาทางด้านซอฟต์แวร์ และฮาร์ดแวร์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลเป็นไปได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากขึ้น ก็มีความสำคัญมากเช่นกัน และเนื่องจากข้อมูลจากการศึกษา



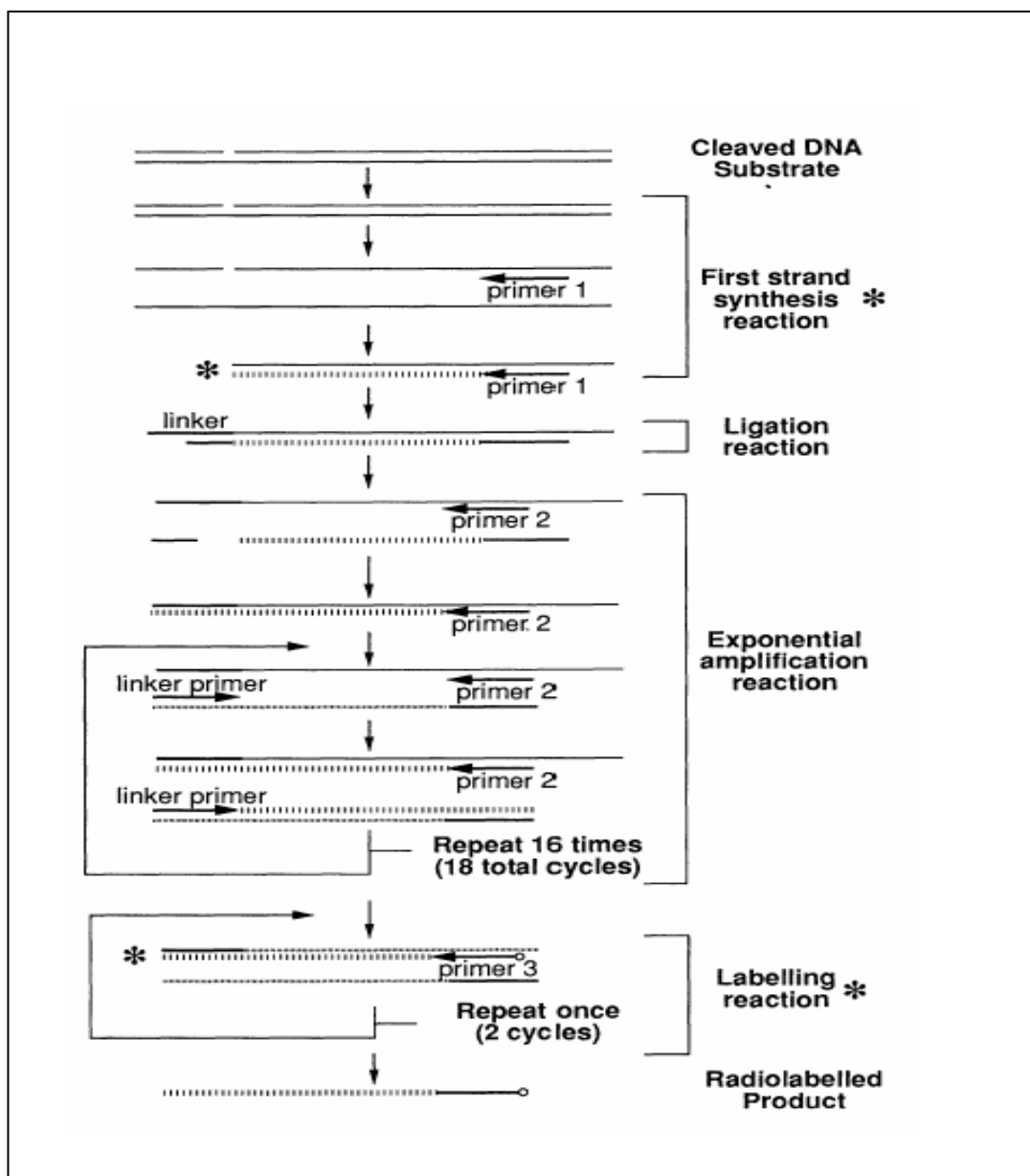
ภาพที่ 8 แผนภูมิเทคนิค PCR walking (R10 และ N10 แทน primer ที่ออกแบบจากส่วนที่ทราบลำดับเบส)

ที่มา: Lin *et al.* (1995)



ภาพที่ 9 แผนภูมิเทคนิค inverse PCR

ที่มา: Ochman *et al.* (1988)



ภาพที่ 10 แผนภูมิเทคนิค ligation-mediated PCR (LMPCR)

ที่มา: Paul *et al.* (1997)

ระบบชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตมีปริมาณ และความซับซ้อนมากเสียจนบางครั้งอาจไม่สามารถหาความสัมพันธ์กันระหว่างชุดข้อมูลได้ ดังนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ชีวสารสนเทศศาสตร์มาเก็บข้อมูลดิบ และจัดข้อมูลเป็นหมวดหมู่ก่อน เพื่อลดความซับซ้อนของข้อมูล แล้วจึงจัดการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณทางคณิตศาสตร์และสถิติ ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้นี้ อาจะบ่งบอกถึงการค้นพบองค์ความรู้ใหม่ ๆ ทางวิทยาศาสตร์ หรืออาจกำหนดทิศทางของการทำงานในอนาคตว่าต้องตั้งสมมติฐานอย่างไร และทดสอบสมมติฐานโดยใช้ข้อมูลชนิดใด ต้องการเทคโนโลยีใดบ้างเพื่อตอบคำถาม

7.2 ฐานข้อมูล

ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบัน งานวิจัยทางชีววิทยาและชีววิทยาโมเลกุลมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ขณะเดียวกันก็ได้ผลิตข้อมูลปริมาณมาก ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นแบบ exponential ข้อมูลบางส่วนได้ถูกนำเสนอ หรือตีพิมพ์เผยแพร่ แต่ข้อมูลปริมาณมหาศาลที่ไม่เปิดเผยยังคงถูกเก็บรักษาไว้ ข้อมูลหลักทางชีววิทยาแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับกรดอะมิโน โครงร่างสามมิติของชีวโมเลกุล และข้อมูลจากการทดลองหาหน้าที่ของยีน (functional genomics) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลทางชีววิทยาประเภทอื่น เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างวิถีเมแทบอลิซึม ภาพแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ บทความวิทยาศาสตร์ ข้อมูลทางสถิติอื่น ๆ ก็ยังคงมีความสำคัญ

ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างฐานข้อมูลต่าง ๆ ที่สามารถติดต่อสืบค้นได้บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ไม่ว่าจะเป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน โครงร่างสามมิติของโปรตีน จีโนมของหนอน *Caenorhabditis elegans* และจีโนมของมนุษย์ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานจึงได้มีการพัฒนาภาษาคอมพิวเตอร์ชนิดพิเศษขึ้นมา เพื่อค้นหาและเข้าถึงข้อมูลทางชีววิทยาที่มีความเกี่ยวเนื่องสัมพันธ์กัน แต่ถูกจัดเก็บกระจัดกระจายอยู่ตามฐานข้อมูลต่าง ๆ ภาษานี้เรียกว่า Sequence Retrieval System (SRS) ฐานข้อมูลที่เชื่อมต่อกับฐานข้อมูลอื่น ๆ โดยใช้ภาษาพิเศษ และมีซอฟต์แวร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นนี้มีชื่อว่า ฐานข้อมูลแบบบูรณาการ (Integrated database) ยกตัวอย่างเช่น ฐานข้อมูล GenBank ที่บรรจุข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน หน้าที่ของโปรตีน และรายละเอียดของข้อมูล ซึ่งเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลบทความทางวิทยาศาสตร์ (PubMed และ MEDLINE) ฐานข้อมูลโครงการจีโนมมนุษย์ มาลาเรีย หนู และรีโทรไวรัส นอกจากนี้ ผู้ดูแลฐานข้อมูลนี้ยังได้พัฒนาซอฟต์แวร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้ไว้ อาทิเช่น ORF finder, BLAST, VecScreen เป็นต้น

ตารางที่ 4 ตัวอย่างฐานข้อมูลทางชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

ฐานข้อมูล	เว็บไซต์
ฐานข้อมูลลำดับเบส	
GENBANK	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
EMBL	http://www.ebi.ac.uk/
DDBJ	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
ฐานข้อมูลลำดับกรดอะมิโน	
SWISS-PROT	http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html
PIR	http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/
ฐานข้อมูลโปรตีน	
PDB	http://www.rcsb.org
PRINTS	http://umbr.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/
PRODOM	http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html
PROSITE	http://ca.expasy.org/prosite/
PFAM	http://pfam.wustl.edu/
ฐานข้อมูลดีเอ็นเอพลาสมิด	
ESF-PLASMID	http://esplasmid.ulb.ac.be/
VECTORDB	http://seq.yeastgenome.org/vectordb/
VECTOR	http://www.bioscience.org/urllists.vector.html
ฐานข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิต	
ACEDB	http://www.acedb.org/
GDB	http://www.gdb.org/
TAIR	http://www.arabidopsis.org/
MOsDB	http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/index.jsp
ฐานข้อมูลบทความวิทยาศาสตร์	
MEDLINE	http://medline.cos.com/
PUBMED	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

7.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยาโดยใช้ซอฟต์แวร์บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

ปัญหาของงานวิจัยทางชีววิทยา คือ การเพิ่มจำนวนของข้อมูลอย่างรวดเร็วไม่ว่าจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน โครงร่างสามมิติของโปรตีน หรือแผนที่โปรตีนจาก 2D-PAGE และ 2D-LC (Proteomics) ทั้ง ๆ ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดแล้ว แต่ยังคงไม่ทราบว่าบริเวณใดบนจีโนมที่เป็นยีน แต่ละยีนมีหน้าที่อะไร ปัจจัยใดบังคับการแสดงออกของยีน โปรตีนซึ่งเป็นผลลัพธ์ของการแสดงออกยีนมีหน้าที่ และรูปร่างอย่างไร เพื่อตอบคำถามเหล่านี้จึงมีความจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ตามขั้นตอนอย่างเป็นระบบ เช่น การเชื่อมต่อสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ shotgun sequencing ให้เป็นสายเดียวกัน การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ควบคุมการถอดรหัสและแปลรหัส การทำนายส่วนที่เป็น open reading frame (ORF) บนนิวคลีโอไทด์ การทำนายส่วนที่เป็น exon และ intron เป็นต้น สำหรับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนอาจนำไปวิเคราะห์เพื่อทำนายหน้าที่ของโปรตีนโดยอาศัยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนอื่นที่รู้หน้าที่อยู่แล้ว นอกจากนี้ยังสามารถทำนายตำแหน่งที่เกิด glycosylation และ phosphorylation บนสายโปรตีน

ขั้นตอนการวิเคราะห์และทำนายด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์นั้นประกอบด้วยซอฟต์แวร์หลายประเภท ควรเลือกใช้อย่างเป็นระบบเป็นขั้นตอน จึงจะได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้อง ซอฟต์แวร์ด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ หรือ webtool นั้น มีแพร่หลายให้เรียกใช้ได้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต และยังมีการปรับปรุงให้มีความสามารถในการทำงานวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นตลอดเวลา

7.3.1 การตัดแต่งสายดีเอ็นเอหรือสายโปรตีนเพื่อให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้

ก. สายดีเอ็นเอ สายอาร์เอ็นเอ หรือสายโปรตีนในฐานะข้อมูล ควรคัดลอกเฉพาะข้อมูลรูปแบบ FASTA แล้วเก็บไว้ในรูปของ text file

ข. กรณีที่ได้สายดีเอ็นเอจากการทำ DNA sequencing ควรนำมาเชื่อมต่อกันด้วยซอฟต์แวร์ประเภท sequence assembly แล้วตัดแต่งให้อยู่ในทิศทางเดียวกันซึ่งมักนิยมให้เริ่ม

จากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' สุดท้ายแปลงให้อยู่ในระบบ FASTA ก่อนเก็บไว้ในรูปแบบของ text file ด้วยโปรแกรม Microsoft word หรือ Notepad

7.3.2 การเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ระหว่างสายดีเอ็นเอ หรือสายโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล (Homology or Similarity search)

เมื่อทราบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่กำลังศึกษา หรือลำดับกรดอะมิโนบนสายโปรตีนแล้ว สิ่งต่อไปที่ควรวิเคราะห์ คือ วิเคราะห์หาว่าสายดีเอ็นเอที่ได้มีส่วนของยีนหรือไม่ ถ้าใช่เป็นยีนอะไร แสดงออกเป็นโปรตีนอะไร และโปรตีนมีหน้าที่อะไร สายโปรตีนที่กำลังศึกษามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูลบ้าง สิ่งมีชีวิตอื่นมีโปรตีนชนิดนี้หรือไม่ เพื่อจะได้ทำนายว่ายีนนั้น ๆ จะแสดงออกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะทางกายภาพ-ชีวภาพอย่างไร จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนชนิดใด น่าจะมีหน้าที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตหรือไม่ เพื่อการตัดสินใจว่าควรจะศึกษายีนหรือโปรตีนชนิดนี้อย่างไร ควรศึกษาต่อไปในแนวลึกหรือไม่

ซอฟต์แวร์ที่ใช้สำหรับบริการชนิดนี้มีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตกันมาก คือ BLAST, FASTA และ SSEARCH ทั้ง 3 โปรแกรมใช้ฐานข้อมูลเดียวกัน (คือ GenBank, EMBL และ DDBJ) แต่วิธีการคำนวณ (algorithm) ต่างกันไป ได้แก่ วิธีการคำนวณแบบ BLAST, FASTA และ Smith-Waterman algorithm ตามลำดับ เพราะฉะนั้นถึงแม้จะใช้สายดีเอ็นเอตัวอย่างเดียวกัน แต่ผลลัพธ์จากแต่ละโปรแกรมอาจต่างกัน ความเร็วและความไวในการคำนวณก็ต่างกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเว็บไซต์ที่ให้บริการเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล

ฐานข้อมูล	เว็บไซต์
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
FASTA	http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-e.html
SSEARCH	http://www.ddbj.hig.ac.jp/search/ssearch-e.html

ในกรณีของ BLAST ข้อมูลเบื้องต้นที่ควรทราบเกี่ยวกับการใช้โปรแกรมประเภทนี้ คือ ต้องเลือกใช้โปรแกรมให้เหมาะสมกับข้อมูล กล่าวคือต้องระบุว่าข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน BLASTN จะใช้หาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ BLASTP ใช้หาความเหมือนของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลโปรตีน BLASTX ใช้ในกรณีที่หาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สำเร็จ โปรแกรมจะถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนก่อนนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน

7.3.3 การวิเคราะห์หาส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจเป็นยีนและสร้างสายโปรตีนได้

(Computational Gene Identification)

ก. กรณีที่ศึกษาในสิ่งมีชีวิตประเภท prokaryote ซอฟต์แวร์สามารถทำนายส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจเป็นยีน (open reading frame หรือ coding region) ได้ กล่าวคือ ทำนายว่า ถ้าสายดีเอ็นเอนี้มีการถอดรหัสเป็นสาย mRNA และเกิดการแปลรหัสเป็นสายโปรตีนแล้วควรได้สายโปรตีนที่มีกรดอะมิโนอะไรบ้าง มีขนาดเท่าไร เหตุการณ์นี้สามารถคาดการณ์ได้โดยการค้นหาจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (ATG) และจุดสิ้นสุดของการแปลรหัส (TAG TGA TAA) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอนั้น ๆ เริ่มจากการถอดรหัสดีเอ็นเอเป็นลำดับกรดอะมิโนทั้ง 6 เฟรม โดยใช้รหัสพันธุกรรมสากล (universal codon usage) โดยซอฟต์แวร์จะแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นกรดอะมิโนทีละ 3 เบสจากเบสลำดับที่ 1 จนครบทั้งสายดีเอ็นเอ สำหรับดีเอ็นเอสายบน จะมีการเลื่อนเฟรมการแปลงลำดับเบสเป็นกรดอะมิโนทีละ 1 เฟรม (เริ่มจากเบสลำดับที่ 2 และ 3 ตามลำดับ) สุดท้ายจะได้สายอะมิโนจากดีเอ็นเอสายบนเป็น 3 สาย และจากดีเอ็นเอสายล่างอีก 3 สาย รวมแล้วซอฟต์แวร์จะแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นกรดอะมิโนที่เป็นไปได้รวม 6 สาย (possible six-frame reading) แล้วแสดงผลเป็นรูปภาพ (ที่ประกอบด้วย start codon และ stop codon) และ/หรือลำดับกรดอะมิโนที่อาจเป็นไปได้ (deduced amino acid) ซอฟต์แวร์ประเภทนี้ประยุกต์ใช้กับดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตประเภท prokaryote หรือลำดับเบสบนสาย mRNA เท่านั้น

ข. ถ้าสายดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ได้มาจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตประเภท eukaryote จะไม่สามารถถอดรหัส และแปลรหัสดีเอ็นเอโดยตรง เนื่องจากมีส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่แสดงออก (intron) ซึ่งจะถูกกำจัดออกกระหว่างขั้นตอนการถอดรหัสดีเอ็นเอ จำเป็นต้องใช้ซอฟต์แวร์อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งสามารถจดจำตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอ แล้วจำแนกได้ว่าช่วงลำดับเบสใดที่ไม่ใช่ส่วนจำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน และช่วงลำดับเบสใดจำเป็น นำส่วนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีนมาต่อเชื่อมกันแล้วถอดรหัสเป็นสายโปรตีน นักวิทยาศาสตร์อาจนำซอฟต์แวร์ประเภท

นี้มาประยุกต์ใช้ค้นหา splice site, poly-A region, transcription regulator region, translation start site อันจำเป็นต่อการศึกษาลำดับเบสในจีโนม (genome project) ได้อีกด้วย (สิทธิรักษ์, 2549)

8. การทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน (Homology modeling)

ปัจจุบันนี้มีฐานข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด และบางฐานข้อมูลก็มีข้อมูลลำดับเบสของจีโนมครบถ้วนสมบูรณ์แล้ว และด้วยการพัฒนาเทคนิคทางด้านชีวฟิสิกส์ เทคนิคทางด้านเอนไซม์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ทำให้พอจะทราบช่วงตำแหน่งเบสสำคัญบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตบางชนิดซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนที่สำคัญต่อการดำรงชีพ ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของโปรตีน จะทำให้การศึกษาน้ำที่ของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เป็นไปได้ง่ายขึ้น

เทคนิค X-ray crystallography และ multidimensional nuclear magnetic resonance (NMR) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนโดยเฉพาะ แต่ทั้งสองเทคนิคก็มีข้อจำกัดทั้งความยุ่งยากซับซ้อนของเทคนิค และความยุ่งยากในการเตรียมโปรตีนเพื่อวิเคราะห์ ทำให้มีข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีนต่าง ๆ น้อยมาก จึงได้มีความพยายามที่จะทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีนต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่ละซอฟต์แวร์ก็มีวิธีการคำนวณหลายวิธีแตกต่างกันไป เช่น คำนวณพลังงานที่เหมาะสมต่อโครงสร้างสามมิติของโปรตีน (Energetic method) หรือทำนายจากความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทราบโครงสร้างสามมิติแล้วในฐานข้อมูล ถ้าเหมือนกันควรมีโครงสร้างสามมิติลักษณะ (Homology modeling) หรือทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีนตัวอย่างจากการรวมโครงสร้างทุติยภูมิเข้าไว้ด้วยกัน (Substructure condensation) เป็นต้น (วสันต์ และ วีระพงศ์, 2544)

Homology modeling เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Comparative protein modeling หรือ Knowledge-based modeling คือกระบวนการที่โครงสร้างสามมิติของ target sequence ถูกสร้างขึ้นโดยอ้างอิงการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนโดยใช้ homologue experimental (ได้แก่ เทคนิค X-ray crystallography และ NMR)

โปรแกรม Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) เป็นซอฟต์แวร์ที่ถูกพัฒนาโดย GlaxoWellcome Experimental Research ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ใช้ทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีนตัวอย่างโดยวิธีการคำนวณแบบ Homology modeling ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใน

การใช้ (วสันต์ และ วีระพงศ์, 2544) คำสั่งของการสร้างโมเดลจากการทำงานของ Swiss-Model ประกอบไปด้วยชุดคำสั่งดังต่อไปนี้

(1) First approach mode: ในส่วนนี้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ต้องการสร้างโมเดลจะถูกนำมาใส่ใน Swiss-Model server ในรูปของ fasta format ซึ่งโปรแกรมจะสร้างโมเดลขึ้นมาโดยอัตโนมัติ เริ่มจากการ alignment ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนที่เป็น template และ target ไปจนกระทั่งได้เป็นโมเดลที่สมบูรณ์

(2) Optimise (project mode): ในส่วนนี้ผู้ใช้สามารถควบคุมกระบวนการสร้างโมเดลด้วยตนเองได้ทั้งหมด ซึ่งทำให้ผู้ใช้สามารถปรับปรุงผลการ alignment ที่ไม่สมบูรณ์ได้

(3) Oligomer modeling: ใช้ในการสร้างโมเดลของโปรตีนที่เป็น multimeric ซึ่งจะต้องใช้ไฟล์ข้อมูลจากโปรแกรม DeepView

(4) GPCR mode: ใช้ในการสร้างโมเดลของ 7 transmembrane helical จากส่วนของ G-protein coupled receptors (GPCR)

การดูโครงสร้างสามมิติของโปรตีนจากฐานข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank หรือ PDB) ดูได้จากเว็บไซต์ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/> ข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีนจากฐานข้อมูลโปรตีนจะมีลักษณะเป็นตัวอักษร ต้องใช้ซอฟต์แวร์ที่เหมาะสม (เช่น Rasmol, CHIME หรือ Swiss-PdbViewer) ปรับเปลี่ยนตัวอักษร (*.pdb) ให้เป็นรูปภาพ และยังสามารถพิเศษ เช่น ภาพสามมิติของโปรตีนนี้จะหมุนรอบทิศทางอย่างอิสระ แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างสามมิติในรูปแบบที่เข้าใจง่าย แสดงการเรียงตัวและม้วนตัวของกรดอะมิโนได้ชัดเจน (วสันต์ และ วีระพงศ์, 2544)

โปรแกรม DeepView – Swiss-PdbViewer หรือ SPDBV เป็นโปรแกรมที่มีขนาดเล็กที่สามารถดาวน์โหลดได้จากแหล่งดาวน์โหลดโปรแกรมทั่วไปในอินเทอร์เน็ต โปรแกรม SPDBV ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนซึ่งสามารถเลือกที่จะดูเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาได้ เช่น backbone sidechain หรือเลือกดูโครงสร้างของโปรตีนในรูปแบบที่ต้องการได้ เช่น โครงสร้างพื้นฐานของโปรตีน โครงสร้าง 2 มิติ และ 3 มิติ และสามารถเปลี่ยนแปลงรายละเอียดของโครงสร้างโปรตีนที่ต้องการศึกษาได้ โดยสามารถนำข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน

มาจากฐานข้อมูล PDB (เกียรติทวี, 2550) โปรแกรม SPDBV จะใช้ดูโมเดลที่ได้จากการสร้างโดย Swiss-Model ซึ่งจะปรับเปลี่ยนตัวอักษร (*.pdb) ให้เป็นรูปภาพ

นอกจากโปรแกรม SPDBV แล้วยังมีโปรแกรมอีกมากมายที่ใช้ในการดูโครงสร้างสามมิติ ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง หนึ่งในโปรแกรมที่น่าสนใจ คือ โปรแกรม DSViewerPro ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท Accelrys ประเทศอเมริกา ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติจากโมเดลของโปรตีน ที่สามารถแสดงรูปร่างของโมเลกุลแบบเป็นเส้นสาย แบบแท่ง แบบรูปกลมและแท่ง หรือโมเดลที่ถูกทำให้เกิดช่องว่างระหว่างอะตอมขึ้นได้ โดยโมเดลที่ถูกสร้างขึ้นนั้นสามารถหมุน เคลื่อนย้าย หรือ ลดและเพิ่มขนาดได้ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมระยะห่าง มุม การบิด และการเรียงตัวในลักษณะสามมิติของอะตอมในโมเลกุลได้โดยง่าย ซึ่งตัวแปรเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนแปลงค่าทางเรขาคณิตอย่างรวดเร็วเมื่อใดก็ตามที่โมเลกุลถูกดัดแปลงแก้ไข ในโปรแกรม DSViewerPro นี้สามารถที่จะใส่สีหรือตัวอักษร เพื่เน้นให้เห็นถึงอะตอมที่แตกต่างกันในโมเลกุลของโปรตีนได้ จากคุณสมบัติมากมายดังที่ได้กล่าวมา จึงทำให้โปรแกรม DSViewerPro เป็นอีกโปรแกรมหนึ่งที่น่าสนใจ และเหมาะที่จะนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Accelrys, 2002)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่นำมาศึกษาได้จากการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินในจังหวัดนครปฐม โดย Mr. Khampheng Phothichitto นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเก็บรักษาเชื้อในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในอาหาร nutrient broth (NB) ผสม glycerol 15% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีน

2. ไพรมเมอร์ (primer)

ไพรมเมอร์สำหรับการตรวจสอบชนิด และสังเคราะห์ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส และไพรมเมอร์สำหรับการทำ PCR walking เพื่อหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน แสดงในตารางที่ 6

3. ดีเอ็นเอพลาสมิด

ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เข้าไปใน *E. coli* DH5 α คือพลาสมิด pGEM-T Easy Vector (บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งมียีนต้านทานแอมพิซิลลิน (amp^r) เป็นยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (lacZ) เป็นยีนรายงานผล (reporter gene)

ตารางที่ 6 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบชนิด และสังเคราะห์ยีน ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส และไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR walking

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<u>ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบชนิด และสังเคราะห์ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส</u>	
BMF	5' CCN GTN AAY CCN AAY GCN CAR 3'
BMR	5' YTC NGC RAA NGC RAA NGG YTT 3'
MF	5' GAR GTN CAY GAY GCN CAN GGN 3'
MR	5' NCC NGC RTA YTC RTA CAT RTG 3'
<u>ไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR walking</u>	
FP1	5' THH HHR VAW DGA GGA G 3'
R1NT6.3	5' CTT CAA CTG TGG AAG G 3'
R1NT6.7	5' CCC TGA CTG AAA AGC 3'
<u>ไพรเมอร์แบบสุ่มสำหรับการทำ PCR walking</u>	
RAPD analysis primer 1	5' GGT GCG GGA A 3'
RAPD analysis primer 2	5' GTT TCG CTC C 3'
RAPD analysis primer 3	5' GTA GAC CCG T 3'
RAPD analysis primer 4	5' AAG AGC CCG T 3'
RAPD analysis primer 5	5' AAC GCG CAA C 3'
RAPD analysis primer 6	5' CCC GTC AGC A 3'

หมายเหตุ N คือ A หรือ G หรือ C หรือ T

D คือ A หรือ G หรือ T

H คือ A หรือ C หรือ T

V คือ A หรือ C หรือ G

Y คือ C หรือ T

R คือ A หรือ G

W คือ A หรือ T

4. โปรแกรมที่ใช้สร้างโมเดล และวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนาเนส

โปรแกรมที่ใช้ทำ homology modeling เพื่อสร้างโมเดลของเอนไซม์แมนนาเนส ได้แก่ โปรแกรม Swiss-Model จากเว็บไซต์ <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> ส่วนโปรแกรมที่ใช้ในการดูและวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโมเดล ได้แก่ โปรแกรม DSViewerPro เวอร์ชัน 5.0 ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ <http://www.accelrys.com> และโปรแกรม SPDBV เวอร์ชัน 3.7 ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ <http://www.expasy.org/spdbv/>

วิธีการ

1. การตรวจสอบชนิดของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

1.1 การสกัดแยกโครโมโซมดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Harwood and Cutting, 1990)

เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที นาน 12-18 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 มิลลิลิตร เหยี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเหยี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนสั้ทิ้ง แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติมผง lysozyme จำนวน 0.002 กรัม ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม 20% sarkosyl ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหยี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูสารละลายสั้ส่วนบนในสั้หลอด microtube หลอดใหม่ แล้วเติม phenol:chloroform (24:1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหยี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ดูสารละลายสั้ส่วนบนในสั้หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และ absolute ethanol 2.5 เท่าของปริมาตร พลิกหลอดกลับไปมาช้า ๆ แช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที (ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง) เหยี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย

บัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร เติม RNase ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติม phenol จนละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Birnboim and Doly, 1979)

เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เจย้าที่ 200 รอบต่อนาที นาน 12-18 ชั่วโมง นำเซลล์ 2 มิลลิลิตรเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TSE ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม solution A ที่มี egg white lysozyme (เตรียมเมื่อจะใช้) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนเซลล์แตก (นานประมาณ 30 นาทีหรือสารละลายขุ่น) แล้ววางบนน้ำแข็ง เติม solution B (เตรียมเมื่อจะใช้) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform 1:1 จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute alcohol ผสมให้เข้ากันและเก็บในน้ำแข็ง 20 นาที (ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง) นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF/BMR และ MF/MR (ตารางที่ 6) เอนไซม์ DNA polymerase และเครื่อง Thermal cycle (บริษัท Biometra, ประเทศเยอรมัน) โดยเติมบัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (10X buffer)

ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร ในหลอด microtube ขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม dNTPs mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.50 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ แต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบจากโครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.50 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2 หน่วยต่อไมโครลิตร สุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารเคมีต่าง ๆ โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลง จากนั้นทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycle โดยสถานะในการทำปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส คือ ขั้นที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 53.2 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ชนิด 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4 การหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่พบใน

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

นำผลิตภัณฑ์ถูกใช้โพลีเมอเรสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสในข้อ 1.3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ pure PCR NucleoSpin kit (บริษัท Macherey Nagel, ประเทศเยอรมัน) แล้วโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy Vector (บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α จากนั้นนำ *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอไปเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin, X-gal และ IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีแล้ว นำโคโลนีมาตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส (ภาคผนวก ข)

ส่งโคโลนีที่ตรวจสอบพบชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากการคัดเลือกเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ

1.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่พบใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์

นำลำดับเบสที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ด้วยชุดโปรแกรม BLAST ซึ่งประกอบด้วยโปรแกรม blastn blastx และ blastp ซึ่งเป็นการสืบค้นในฐานข้อมูลว่าลำดับเบสที่ได้จากการโคลน รวมถึงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลโดยโปรแกรม Baylor College of Medicine (BCM) Search Launcher จากเว็บไซต์ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu> ของหน่วยงาน Human Genome Sequencing Center ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนใด และกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิดใดในฐานข้อมูล และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้กับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ในฐานข้อมูล เพื่อจำแนกสกุล (family) ของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลด้วยโปรแกรม BCM โดยทำ multiple alignment กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกันโดยโปรแกรม ClustalW จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw> ของ European Bioinformatics Institute (EBI) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยการทำ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม EMBOSS ของ EBI ที่เว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align>

2. การหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน (full sequence) โดยเทคนิค PCR walking

2.1 การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' (5'-walking)

นำลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่พบใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการวิเคราะห์จากหน่วยบริการชีวภาพในข้อ 1.3 มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม primer3 ที่เว็บไซต์ <http://frodo.wi.mit.edu/> เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) R1NT6.3 และ R1NT6.7 โดยจะใช้เป็น reverse primer คู่กับ forward primer FP1 และไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) จำนวน 6 ชุด โดยไพรเมอร์ FP1 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสในฐานข้อมูล NCBI โดยตัดเฉพาะส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ แล้วนำมาทำ multiple alignment

ด้วยโปรแกรม clustalW เพื่อให้ได้ consensus sequence ซึ่งใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ FP1 ส่วนไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 6 ชุดนั้น เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสชุดละ 10 นิวคลีโอไทด์ จาก Ready-To-Go RAPD Analysis kit (บริษัท Amersham Biosciences, ประเทศอังกฤษ) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 1.3 แต่จะมีความแตกต่างตรงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน โดยอุณหภูมิของขั้นตอน annealing จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ annealing ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนดังแสดงในภาคผนวก ข

2.2 การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' (3'-walking)

การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' จะใช้ primer BMF เป็น forward primer และไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 6 ชุด เป็น reverse primer ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตามวิธีการในข้อ 1.3 วิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้ และเมื่อได้ลำดับเบสแบบครบทั้งยีนแล้ว นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์โดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์ ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 1.5 เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาโครงสร้างสามมิติในขั้นตอนต่อไป

3. การทำ Homology modeling เพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนาเนส

3.1 การสร้างโมเดลด้วยโปรแกรม Swiss-Model

การสร้างโมเดลโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนาเนสด้วยโปรแกรม Swiss-Model เริ่มจากการแปลลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และหาส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส (Open Reading Frame, ORF) โดยใช้โปรแกรม BCM Search Launcher เพื่อให้ได้ frame ที่เกิดการแปลรหัสจากกรดอะมิโนเป็นเอนไซม์แมนนาเนสที่ถูกต้อง จากนั้นเริ่มสร้างโมเดลด้วยโปรแกรม Swiss-Model ที่เว็บไซต์ <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> โดยใช้ชุดคำสั่ง First Approach Mode โดยชุดคำสั่งนี้จะสร้างโมเดลให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นใส่ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ในรูปแบบของ fasta format ซึ่งในชุดคำสั่งนี้ ส่วนของ options จะถูกตั้งค่า BLAST-value limit ไว้ที่ 0.00001 และเลือกใช้ template ที่ดีที่สุด (the best template) สำหรับอ้างอิงในการสร้างโมเดล จากนั้นกด submit เพื่อให้โปรแกรมสร้างโมเดลออกมา หลังจากได้โมเดลแล้ว ทำการดาวน์โหลดและบันทึกโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์

แมนนานเนสที่ได้ในรูปของไฟล์ pdb เพื่อที่จะนำข้อมูลโครงสร้างสามมิตินี้ไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนานเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

3.2.1 การคัดเลือก template

ในการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนานเนสจำเป็นต้องใช้ template จากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน (Protein Data Bank, PDB) ที่เว็บไซต์ <http://rcsb.org/pdb> ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาเพื่อเก็บข้อมูลของโครงสร้างสามมิติของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในการอ้างอิงเพื่อหาบริเวณเร่งของเอนไซม์ โดย template ที่จะเลือกใช้นั้นควรมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนนานเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มากที่สุด

3.2.2 การหาบริเวณเร่ง (Active site)

การหาบริเวณเร่งบนโมเลกุลของเอนไซม์แมนนานเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้นจะต้องอ้างอิงจากบริเวณเร่งของ template ที่มีข้อมูลรายงานไว้ในฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน (PDB) โดยบริเวณเร่งที่หาได้บน template จะนำไปเปรียบเทียบกับบริเวณเร่งของโปรตีนที่สนใจในตำแหน่งเดียวกัน โดยขั้นตอนในการหาบริเวณเร่งนั้นจะใช้โปรแกรม DSViewerPro (บริษัท Accelrys, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ <http://www.accelrys.com> จากนั้นเปิดไฟล์ข้อมูลของ template ในรูปของไฟล์ pdb โดยใช้คำสั่ง New Hierarchy Windows เพื่อที่จะตรวจสอบว่ามีเรซิดิวของกรดอะมิโนใดบ้างที่อยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล จากนั้นเลือกบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแมนแนนเพื่อหาว่ามีกรดอะมิโนใดบ้างที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนน โดยกำหนดให้พันธะรอบ ๆ บริเวณเร่ง มีรัศมีห่างออกออกไปไม่เกิน 6 อังสตรอม (Å) เมื่อทราบเรซิดิวของกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งแล้วก็จะนำกรดอะมิโนเหล่านั้นไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งบนโมเลกุลของเอนไซม์แมนนานเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยการทำการ model fit ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การเปรียบเทียบโครงร่างสามมิติโดยการทำ model fit

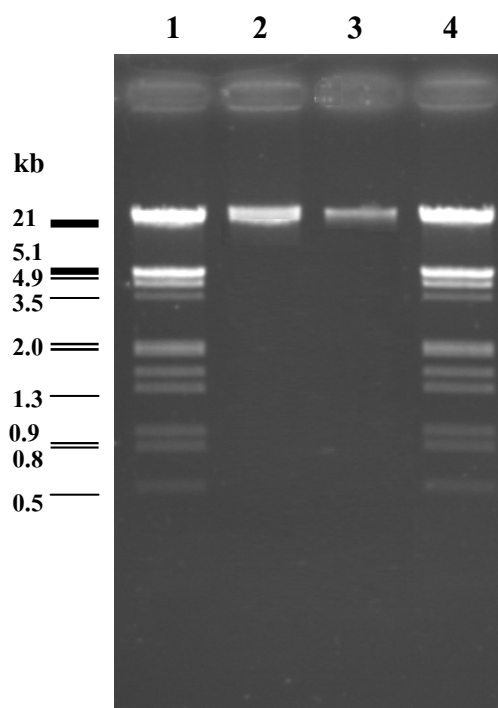
การเปรียบเทียบโครงร่างสามมิติระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กับ *B. circulans* NT6.7 และระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 กับ template โดยการทำ model fit นั้น จะใช้โปรแกรม SPDBV เวอร์ชัน 3.7 ซึ่งดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ <http://www.expasy.org/spdbv/> เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระหว่างโครงร่างสามมิติของเอนไซม์ 2 โมเลกุล ด้วยชุดคำสั่ง Iterative magic fit เพื่อให้โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) บริเวณที่เหมือนกันซ้อนทับกันอย่างเหมาะสมมากที่สุด ส่วนบริเวณที่แตกต่างกันก็จะไม่เกิดการซ้อนทับกันของ โครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้สามารถวิเคราะห์หาความเหมือน และความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิ ที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างสามมิติ รวมทั้งความเหมือน และความแตกต่างของกรดอะมิโนแต่ละตัว ที่อยู่ในบริเวณเร่งระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ในโครงร่างสามมิติที่นำมาเปรียบเทียบกันได้

ผลและวิจารณ์

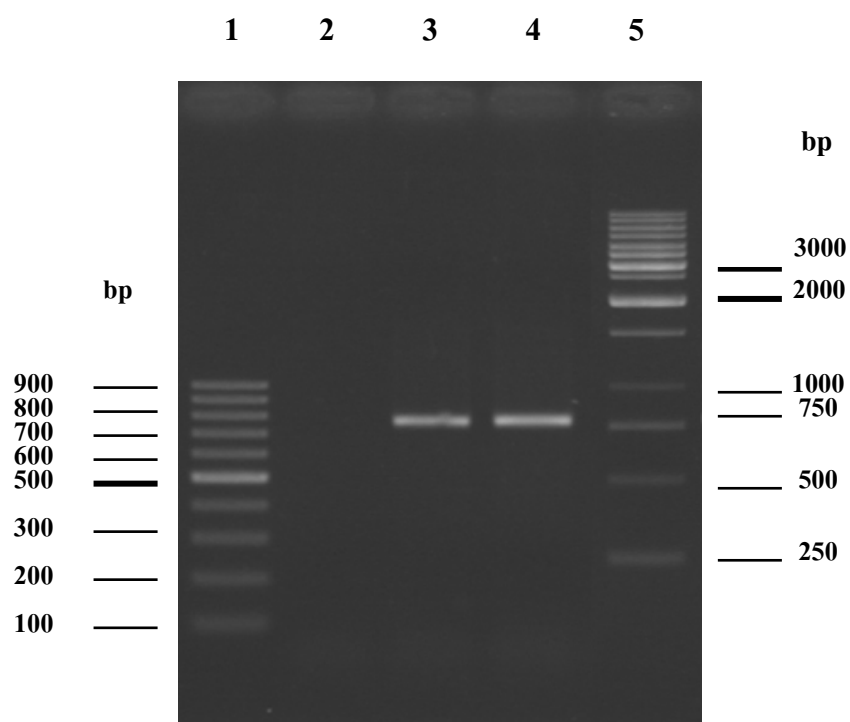
1. การตรวจสอบชนิดของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

ในการวิจัยนี้ ได้เลือกศึกษาแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่ได้จากการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินในจังหวัดนครปฐม (Phothichitto, 2006) โดยมุ่งเน้นศึกษายีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ทำการตรวจสอบชนิดของยีนว่าจัดอยู่ใน GH5 หรือ GH26 ด้วยการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 แล้วสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ และพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Harwood and Cutting (1990) และ Birnboim and Doly (1979) ตามลำดับ ผลการสกัด พบโครโมโซมดีเอ็นเอ แต่ไม่พบพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มีความเข้มข้น 0.270 และ 0.135 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อคำนวณจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบคุณภาพของโครโมโซมดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งเป็นลักษณะของโครโมโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้อย่างสมบูรณ์ ไม่มีการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 11

จากนั้นตรวจสอบชนิดของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MF/MR และ BMF/BMR ซึ่งออกแบบจากบริเวณ consensus sequence จากเชื้อ *Bacillus* ที่มียีนแมนนาเนสใน GH5 และ GH26 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสใน GH26 ทั้งใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 แต่ไม่พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสใน GH5 จากเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker 100 bp และ 1 kb) (บริษัท Fermentus, ประเทศลิทัวเนีย) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 786 คู่เบส (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดไว้จากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ BMF/BMR แสดงให้เห็นว่าใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มียีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสใน GH26 อยู่บนโครโมโซมดีเอ็นเอ



ภาพที่ 11 โครโมโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7
 ช่องที่ 1 และ 4 DNA marker (Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 และ *Eco*RI)
 ช่องที่ 2 โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3
 ช่องที่ 3 โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. circulans* NT6.7



ภาพที่ 12 ผลิตรหัสที่ 12 ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ BMF/BMR

ของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

ช่องที่ 1 DNA marker (100 bp DNA Ladder)

ช่องที่ 2 Negative control

ช่องที่ 3 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก

B. amyloliquefaciens NT6.3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 4 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก

B. circulans NT6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 5 DNA marker (1 kb DNA Ladder)

เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ที่ได้ โคลนในดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy Vector (บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วนำโคลนที่ได้ส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 พบว่า ลำดับเบสที่ได้มีขนาดประมาณ 786 และ 771 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 13 และ 14) ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์และโคลนดังกล่าว สอดคล้องกับขนาดของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ที่ได้จากการใช้ยูไพร์เมอร์ BMF/BMR นำลำดับเบสที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ด้วยโปรแกรม blastn รุ่น BLASTN 2.2.17 [Aug-26-2007] และโปรแกรม blastx รุ่น BLASTX 2.2.17 [Aug-26-2007] จากการวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม BLAST ในวันที่ 19 กันยายน 2550 พบว่าการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn นั้น ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* ต่างสายพันธุ์ในฐานข้อมูล โดยมีความเหมือน (identity) กับยีน *man* จาก *B. subtilis* A33 (DQ269473.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 98 ที่ตำแหน่ง 1-1083 มีค่าความคาดหวัง (E-value) เท่ากับ 0 ค่า bit score เท่ากับ 1356 (ตารางที่ 7) สำหรับลำดับเบสที่ได้จาก *B. circulans* NT6.7 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn พบว่ามีความเหมือนกับยีน *endo-beta-1,4 mannanase* จาก *B. subtilis* G1 (DQ309335.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 98 ที่ตำแหน่ง 1-1092 มีค่าความคาดหวัง เท่ากับ 0 ค่า bit score เท่ากับ 1338 (ตารางที่ 8)

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ด้วยโปรแกรม blastx พบว่าลำดับเบสซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นลำดับกรดอะมิโนนั้น มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 97 ที่ตำแหน่ง 30-348 ใน frame -1 มีค่าความคาดหวัง เท่ากับ $2e^{-146}$ ค่า bit score เท่ากับ 494 (ตารางที่ 9) ส่วนลำดับเบสของ *B. circulans* NT6.7 เมื่อถูกเปลี่ยนไปเป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วพบว่า มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* G1(ABC61374.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 97 ที่ตำแหน่ง 34-352 ใน frame +2 มีค่าความคาดหวังเท่ากับ $2e^{-143}$ ค่า bit score เท่ากับ 511 (ตารางที่ 10) เพื่อเป็นการยืนยันลำดับเบสที่ได้จากการโคลนว่าเป็นชิ้นส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์แมนนาเนส จึงวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ โดยการแปลรหัสของลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโน (เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์อยู่ในรูปของโปรตีนซึ่งประกอบมาจากกรดอะมิโน ไม่ใช่เป็นการทำงานในสภาพที่เป็นนิวคลีโอไทด์) การแปลรหัสของลำดับเบสที่ได้ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยรหัส

```

1  CTCGGTCAAG  GCAAAAGGGCT  TTTTCAGAGA  CAGCATTTC  TCATAGCCTG
51  ATATCGCATA  CGGATCAGTG  AAGTAAAGCGT  CCAGACCGGT  AATATCCACA
101  TAAAGATGAGC  CTGGGTAGAA  GTCTGTTTTA  AAGTCTCTGT  TGGCATCCGG
151  CGAATACACC  CACAAAAAGGT  TATCCAATCC  TCTTGTCTCT  GTCATATAGC
201  GGTATATCTT  CTTGTAAAGC  TCTTTGTACA  GCGAGATTCT  CTCATTGTCT
251  TTTTGGTTGT  AGCCTGTCAG  CCCCCACCAG  AACCACCTGC  CGTTCATTTC
301  ATGCAGCGGT  CTGAACAGAA  CGGTGACGCC  TTGATTTTTC  AGCTGAGTAA
351  GGCCGTCGGC  AATTTTGCTG  AGCAGCGCCT  CAAGCCGTTT  TCCTTCCACA
401  GTTGAAGGGT  CAAGGATGTT  TTTGTACTGG  CTGTTTGAGA  TGGCCGTTTT
451  ATAGTTTCCG  GATGGAAAAG  CCGGATTTGC  GAGATGCAGG  CTGACCTGAG
501  GGAGGCCGCC  GCTTTTCCAG  TATGAGATTA  AGCTGCTGTT  GCAGCTGTAA
551  TCGATAGTAT  CGGTGATCTC  CGCTGTTTCC  AGCCACCCTC  TCCCATAGTC
601  ACAGCCGTAG  ATGGCGGGAG  ACTGTCCCGT  CGTGTTTTTT  AAGCGGTTTT
651  CCTCTGTCAT  TGAAAAAGTG  ACATCGCTGT  ACCCGCCGAA  CGCTCCGGAC
701  ATGACCCTGT  TTTCTGAACG  GTGGGCAGGT  GGGCCAGCCA  GTTCATAATA
751  TCTTTTGTCT  TCTGTTGCGC  GTTCGGATTT  ACAGGA

```

ภาพที่ 13 ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3

บนโครโมโซมดีเอ็นเอ ขนาด 786 คู่เบส

```

1  TGGGCTCAGA  CAACAAAAGC  AGATGATGAA  CTGGCTTGCA  CACCTGCCGA
51  ACCGAACGGA  AAACAGAGTC  CTTTCCGGAG  CGTTCGGAGG  TTACAGTCAT
101  GACACATTTT  CTATGGCTGA  GGCTGATAGA  ATCCGAAAGC  CCACCGGGCA
151  ATCGCCTGCT  ATTTACGGCT  GCGATTATGC  CAGAGGGTGG  CTTGAAACAG
201  CTAAGATTGA  AGATTCAATA  GATGTAAGCT  GCAACGGTGA  TTTAATTTCT
251  TATTGGAAAA  ATGGCGGAAT  TCCGCAAAAT  AGCTTGCAAC  TGGCGAAACC
301  TGCTTTTCAG  TCAGGGCATT  TTAAAAACAC  GATTACAAAC  GATCAGTATA
351  AAAAAATACT  AGATTCTTCA  ACAGCAGAA  GAAAAGCGGT  AAATGCCATG
401  CTCAGCAAAA  TTGCTGACGG  ACTTCAAGAG  CTGGAGAACC  AAGGTGTGCC
451  TGTTCTGTTC  AGGCCGCTGC  ATGAAATGAA  CGGCGAATGG  TTTTGGTGGG
501  GACTCACATC  ATATAACCAA  AGGGATAATG  AAAGAATCTC  TCTATATAAA
551  CAGCTCTACA  AGAAAAATCTA  TCATTATATG  ACCGACACAA  GAGGACTTGA
601  TCATTTGATT  TGGGTTTACT  CTCCCGACGC  CAACCGAGAT  TTTAAACTG
651  ATTTTTACCC  GGGCGCGTCT  TACGTGGATA  TTGTCGGATT  AGATGCGTAT
701  TTTCAAAGATG  CCTACTCGAT  CAATGGATAC  GATCAGCTAA  CAGCGCTTAA
751  TAACCTTTGC  TTTCGCCGAG  A

```

ภาพที่ 14 ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. circulans* NT6.7 บน

โครโมโซมดีเอ็นเอ ขนาด 771 คู่เบส

ตารางที่ 7 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนจากลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนแนนสของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ที่ได้จากการทดลองกับลำดับเบสในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	ยีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)
DQ269473.1	<i>B. subtilis</i> A33	man gene for β -mannanase	1-1083	1356	0	98
AB005755.1	<i>Bacillus</i> sp. W-2	manA gene for endo β -1,4-mannanase	481-1563	1345	0	97
D37964.1	<i>B. subtilis</i> NM-39	β -mannanase gene	493-1575	1339	0	97
CP000560.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	ydhT gene for β -mannanase	3693867-3694949	1306	0	96
DQ167409.1	<i>B. subtilis</i> WL-3	manA gene for β -mannanase	1103-2185	1290	0	96

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

ตารางที่ 8 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนจากลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนแนนสของ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลองกับลำดับเบสในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	ยีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)
DQ309335.1	<i>B. subtilis</i> G1	endo- β -1,4-mannanase gene	1-1092	1338	0	98
AY601725.1	<i>B. subtilis</i> WL-7	manA gene for β -mannanase	257-1345	1304	0	97
AY827489.1	<i>B. subtilis</i> Z-2	β -1,4-mannanase gene	2011-3099	1282	0	97
Z99107.2	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str.168	ydhT gene for β -mannanase	20691-21779	1277	0	97
AF324506.1	<i>B. subtilis</i> HB002	β -mannanase gene	1193-2296	1267	0	96

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

ตารางที่ 9 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	โปรตีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)	Frame
ABB91433.1	<i>B. subtilis</i> A33	β -mannanase	30-348	494	$2e^{-146}$	97	-1
ABS75922.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase (β -mannanase)	30-348	492	$7e^{-146}$	97	-1
BAA07178.1	<i>B. subtilis</i> NM-39	β -mannanase	30-348	492	$9e^{-146}$	97	-1
AAZ95239.1	<i>B. subtilis</i> WL-3	β -mannanase	30-348	491	$1e^{-145}$	97	-1
BAA31711.1	<i>Bacillus</i> sp. 5H	β -mannanase	32-350	410	$2e^{-120}$	78	-1

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

ตารางที่ 10 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสของ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	โปรตีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)	Frame
ABC61374.1	<i>B. subtilis</i> G1	Endo- β -1,4- mannanase	34-352	511	$2e^{-143}$	97	+2
AAT27435.1	<i>B. subtilis</i> WL-7	β -mannanase (precursor)	32-350	508	$1e^{-142}$	96	+2
AAV84100.1	<i>B. subtilis</i> Z-2	β -1,4-mannanase	32-350	506	$7e^{-142}$	96	+2
BAA19712.1	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str.168	Mannan endo-1,4- β -mannosidase (β -mannanase)	32-350	505	$1e^{-141}$	95	+2
BAA31711.1	<i>Bacillus</i> sp. 5H	β -mannanase	32-350	497	$3e^{-139}$	94	+2

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

มาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม BCM Search Launcher ที่เว็บไซต์ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-uti/.html> พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้แปลรหัสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ประกอบด้วย 262 กรดอะมิโน และส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส อยู่ใน frame -1 (ภาพที่ 15) ส่วนกรดอะมิโนที่ได้ทำการแปลรหัสจาก *B. circulans* NT6.7 ประกอบด้วย 256 กรดอะมิโน และส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส อยู่ใน frame +2 (ภาพที่ 16) จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม blastp รุ่น BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007] ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 19 กันยายน 2550 จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 97 ที่ตำแหน่ง 32-350 มีค่าความคาดหวังเท่ากับ $3e^{-134}$ ค่า bit score เท่ากับ 480 (ตารางที่ 11) และจากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *B. circulans* NT6.7 พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 97 ที่ตำแหน่ง 34-352 มีค่าความคาดหวังเท่ากับ $3e^{-142}$ ค่า bit score เท่ากับ 507 (ตารางที่ 12) ผลการวิเคราะห์ พบว่า การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม blastn blastx และ blastp ของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ให้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ ชิ้นส่วนของยีนที่ได้จากการโคลนของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความเหมือนกับยีนเบต้า-แมนนาเนส เนื่องจากเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนแล้วมีค่าร้อยละความเหมือน (identity) สูงสุด ส่วนค่าความคาดหวัง (expect value) ต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Madden (2002) กล่าวคือ ค่าร้อยละความเหมือนสูง ลำดับเบสจะมีความเหมือนกันมากกว่าค่าร้อยละความเหมือนต่ำ ส่วนค่าความคาดหวังเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับค่าความคาดหวัง คือ ค่า bit score ความยาวของลำดับเบส และขนาดของฐานข้อมูล ค่าความคาดหวังควรมีค่าต่ำ (เข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์) ส่วนค่า bit score เป็นการแสดงความคล้ายคลึงกัน (similarity) ระหว่างลำดับเบสที่ศึกษากับลำดับเบสในฐานข้อมูล ค่า bit score ควรมีค่าสูง จะทำให้มีความคล้ายคลึงกันสูงด้วย นอกจากนี้จากผลของการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้กับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ในฐานข้อมูล NCBI จากโปรแกรม BLAST 2.2.17 [Jun-24-2007] ที่ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 19 กันยายน 2550 พบว่า บริเวณอนุรักษ์จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ในกลุ่มของ GH26 โดยมีค่าความคาดหวังเท่ากับ $1e^{-84}$ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=FA47FR4_Z01&mode=all) และ $8e^{-88}$ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=FA4CG_N58012&mode=all) ตามลำดับ จากนั้นทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW เวอร์ชัน 1.83 เพื่อเปรียบเทียบ

```

1  SCKSERATDD KRYVELAGPP AHRSENRVMS GAFGGYSDVT FSMTEENRLK
51 NTTGQSPAIIY GCDYGRGWLE TAEITDTIDY SCNSSLISYW KSGGLPQVSL
101 HLANPAFPSG NYKTAISNSQ YKNILDPSTV EGKRLEALLS KIADGLTQLK
151 NQGVTVLFRP LHEMNGEWFV WGLTGYNQKD NERISLYKEL YKKIYRYMTE
201 TRGLDNLLWV YSPDANRDFK TDFYPGSSYV DITGLDAYFT DPYAISGYDE
251 MLSLKKPFAL TE

```

ภาพที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนแนนสใน frame -1 ที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens*
NT6.3 ประกอบด้วย 262 กรดอะมิโน

```

1  ALRQQKQMMN WLAHLNPNRTE NRVLSGAFGG YSHDTFSMAE ADRIRSATGQ
51 SPAIYGCDYA RGWLETAKIE DSIDVSCNGD LISYWKNGGI PQISLHLANP
101 AFQSGHFKTP ITNDQYKKIL DSSTAEGKRL NAMLSKIADG LQELNQGVV
151 VLFRLHEMN GEWFVWGLTS YNQDNERIS LYKQLYKKIY HYMTDTRGLD
201 HLIWVYSPDA NRDFKTDFYP GASVVDIVGL DAYFQDAYSI NGYDQLTALN
251 NLCFRR

```

ภาพที่ 16 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แมนแนนสใน frame +2 ที่ได้จาก *B. circulans* NT6.7
ประกอบด้วย 256 กรดอะมิโน

ตารางที่ 11 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล โดยโปรแกรม BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	โปรตีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)
ABB91433.1	<i>B. subtilis</i> A33	β -mannanase	32-350	480	$3e^{-134}$	97
ABS75922.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	Mannan endo-1,4- β -mannosidase (β mannanase)	30-348	479	$8e^{-134}$	97
BAA07178.1	<i>B. subtilis</i> Z-2	β -mannanase	30-348	479	$9e^{-134}$	97
AAZ95239.1	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str.168	β -mannanase	30-348	477	$2e^{-133}$	97
BAA31711.1	<i>Bacillus</i> sp. 5H	β -mannanase	32-350	403	$4e^{-111}$	78

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

ตารางที่ 12 ตัวอย่างผลจากการสืบค้นความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]

Accession No.	สายพันธุ์	โปรตีน	ตำแหน่ง	Bit score	E-value	Identity (%)
ABC61374.1	<i>B. subtilis</i> G1	Endo- β -1,4- mannanase	34-352	507	3e ⁻¹⁴²	97
AAT27435.1	<i>B. subtilis</i> WL-7	β -mannanase (ManA)	32-350	504	2e ⁻¹⁴¹	96
AAV84100.1	<i>B. subtilis</i> Z-2	β -1,4-mannanase	32-350	502	8e ⁻¹⁴¹	96
BAA19712.1	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str.168	β -mannanase	32-350	501	1e ⁻¹⁴⁰	95
AAK16706.1	<i>B. subtilis</i> HB002	β -mannanase	37-355	494	2e ⁻¹³⁸	94

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2550

ความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจำนวน 10 ตัวอย่างที่สืบค้นจากข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ในวันที่ 19 กันยายน 2550 ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส ที่มีบริเวณอนุรักษ์ซึ่งจัดอยู่ใน GH26 จากเชื้อ *Bacillus* อย่างสมบูรณ์ (complete coding sequence) ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* NM-39 (BAA07178.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* WL-3 (AAZ95239.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *Bacillus* sp. 5H (BAA31711.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* FZB42 (ABS75922.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* subsp. *subtilis* str.168 (BAA19712.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* Z-2 (AAV84100.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. subtilis* WL-7 (AAT27435.1) ลำดับกรดอะมิโนของ *B. licheniformis* DSM13 ATCC 14580 (YP_090363.1) ผลที่ได้จากการทำ multiple alignment แสดงดังภาพที่ 17

เอนไซม์ที่จัดอยู่ใน GH26 จะมีบริเวณอนุรักษ์ (highly conserved regions) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นรูปร่างแหวน (aromatic amino acid-rich region) จำนวน 5 เรซิดิว คือ WFWWG (Tryptophan, Phenylalanine, Tryptophan, Tryptophan, Glycine) (Zhang *et al.*, 2005) ซึ่งเมื่อพิจารณาผลของการทำ multiple alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง กับลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล ในภาพที่ 17 พบบริเวณอนุรักษ์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน WFWWG ในลำดับกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 รวมทั้งลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล และจากการจัดหมวดหมู่ของ Henrissat (1991) พบว่า เอนไซม์ที่มีบริเวณอนุรักษ์อยู่ใน GH26 จะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (EC3.2.1.78) และเอนไซม์ไซลานเนส (EC3.2.1.32) แต่จากผลของการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลดังที่ได้กล่าวมา รวมทั้งการศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 พบว่า มีความเหมือนกับเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสเท่านั้น ไม่พบว่ามีเหมือนกับเอนไซม์ไซลานเนสเลย จึงเป็นการยืนยันในขั้นต้นว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลน เป็นส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่จัดอยู่ใน GH26

เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม EMBOSS ของ EBI

(European Bioinformatics Institute) ที่เว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align> พบว่าการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มีค่าร้อยละของความเหมือน เท่ากับ 45.8 (ภาพที่ 18) ส่วนผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 พบว่ามีค่าร้อยละของความเหมือน เท่ากับ 67.4 (ภาพที่ 19) แสดงให้เห็นว่าลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนบางส่วน (partial sequence) ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ นั้น มีความแตกต่างกันในระดับโครงสร้างปฐมภูมิ และทุติยภูมิ ซึ่งจะต้องหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนเพื่อเป็นการยืนยันความแตกต่างที่เกิดขึ้น เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ ในรูปแบบของโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป

2. การหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน (full sequence) ของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสโดยเทคนิค PCR walking

ลำดับเบสที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 1. นั้น เป็นลำดับเบสเพียงบางส่วน (partial sequence) ของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส โดยลำดับเบสที่ได้นั้น อยู่บริเวณส่วนกลางของยีนซึ่งมีขนาด 786 คู่เบส และ 771 คู่เบส ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ ดังนั้น ในการหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน จึงได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' (5'-walking) และการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' (3'-walking) โดยเทคนิค PCR walking

การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' โดยการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) จากลำดับเบสของยีนบางส่วนที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ได้แก่ ไพรเมอร์ R1NT6.3 (5' CTTCAACTGTGGAAGG 3') และ R1NT6.7 (5' CCCTGACTGAAAA GC 3') ตามลำดับ โดยใช้ไพรเมอร์ R1NT6.3 และ R1NT6.7 เป็น reverse primer คู่กับ forward primer FP1 (5' THHHHRVAWDGAGGAG 3') ซึ่งออกแบบจากบริเวณ consensus sequence ของส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ จากตัวอย่างเชื้อ *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 โดยขนาดที่คาดหมายจากการใช้คู่ไพรเมอร์ FP1/R1NT6.3 และ FP1/R1NT6.7 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ ประมาณ 517 คู่เบส และประมาณ 426 คู่เบส ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซฟิโกลีเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' ด้วยคู่ไพรเมอร์ FP1/R1NT6.3 และ FP1/R1NT6.7 โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบแสดงดังภาพที่ 20

NT6.3	1	CTCGGTCAGGCAAGCGGCTTTTTCAGAGACAGCATTTTCATCATAG	46
NT6.7	1	TGCGCTCAGACAA--CAAA-AGCAGATGATGA-CTGGCTTGCA-CA---	42
NT6.3	47	CCTGATATCGCATACGG--ATCAGTGAAGT-----AAGCGTCCAGA----	85
NT6.7	43	CCTGCCGAACCGAACGGAAACAGAGTCCTTTCCGGAGCGTTCCGAGGTT	92
NT6.3	86	CCGGTAATATCCACATAAGATGAGCCTCGGTAGAACTCTGTTTAAAGTC	135
NT6.7	93	ACAGTCATG-ACACATT TTCTATGGCTG-----AGGCTGAT----AGAA	131
NT6.3	136	TCTGTTG-GCATCCGGCGAATACACCCACAA--AAGGTTATCCAAT---	178
NT6.7	132	TCCGAAGCGCCACCGG-GCAATCGCCTGCTATTTACGGCTG--CGATTAT	178
NT6.3	179	-CCT-----CTTGTCTCTG-TCATATAGCGGTATATCTTCTGTAAA	218
NT6.7	179	GCCAGAGGCTGGCTTGAAACAGCTAAGATTGAAGATTCAATAGATGT-AA	227
NT6.3	219	GCT-CTTTGTACAGCGAGATTCTCTC--ATTGTCCTTTTGGTTGTA----	261
NT6.7	228	GCTGC----AAGGCTGATTTAATTTCGTATTGGAATAATGCCGCAATTCC	273
NT6.3	262	GCCTGTGAGCCGCCACC--AGAACCCTCGCCGTTCA-----TT	298
NT6.7	274	GCAAATCAGCTTGACCTGGCGAACCC-CT-GCTTTTCAGTCAGCGCATTT	321
NT6.3	299	TCATGCAGCGGTCTGAACAGAACGGT-----GACGCCCTTGATTTTTCAG	342
NT6.7	322	TAAACACCCGATTACAAACGATCAGTATAAAAAAATACTAGATTCTTCAA	371
NT6.3	343	CTGACTAAGGCCGTCCGCAATTTTCTGAGCAGCGCCTCA-AGCCGTTTT	391
NT6.7	372	CAGCAGAAAGCAAGCGGCTA-AATGCCATGCTCAGCAAAATTGCTGACGG	420
NT6.3	392	CCTTCCACAGTTGAAGGCTCAAGGATGTTTTGTACTG-----GCTG	433
NT6.7	421	ACTTCAAGAGCTGGAGAACCAGG-TGTGCCTGTCTGTTCAAGCCGCTG	469
NT6.3	434	TTTGAGATGCCGTTTTATAGTTTCCGGATGGAAGGCCGGATTGCGGAG	483
NT6.7	470	CATCAAAATGAACGCCGAATGCTTT-----TGGTGGGAC----TCACATC	510
NT6.3	484	ATGCAGGCTGACCTGAGGGAGGCGG-CGCGTTTTC-CAGTATGAGATTAA	531
NT6.7	511	AT-----ATAACCAAGCGGATAATGAAAGAATCTCTCTATATAA-----	549
NT6.3	532	GCTGCTGTTGCAGCTGTAATCGATAGTATCGGTGATCTCCGCTGTTTCCA	581
NT6.7	550	-----ACAGCTCTA--CAAGAAAATC-----TATCATTATATGACC	583
NT6.3	582	GCCACCCCTCTCCCATAGTCACAGCCGTAGATGGCGGAGACTGTCCCGT-	630
NT6.7	584	GACACAAGAGGACTTGATCAT-----TTGATTGGGTTTACTCTCCCGAC	628
NT6.3	631	-----CGTGTTTTCAAGCGGTTTT--CC-----TCTGTCAATTGA	663
NT6.7	629	GCCAACCGAGATT TTAACCTGATTTTACCCGGCGCGTCTTACGTGGA	678
NT6.3	664	AAAAGT-GACATCGCTGTACCCGCCGAACGCTCCGGACATGACCTGTTT	712
NT6.7	679	TATTGTCGGATTAGATG-----CGTATTTCAAG--ATGCC-----T	713
NT6.3	713	TCT-GAACGGTGGCGAGGTGGGCCAGC--CAGTTCAATAATCTTTTGT	758
NT6.7	714	ACTCGATCAATGGATA--CGATCAGCTAACAGCGCTTAATAACCTTT--	758
NT6.3	759	CGTCTGTGCGCGTTCCGATTACAGGA	786
NT6.7	759	-----GCTTTTCG-----CCGAGA	771

ภาพที่ 18 ผลการทำ pairwise alignment ของลำดับเบสระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

กำหนดให้ | แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution

NT6.3		1 SCKSERATDDKRYELAGPPAHRSENRVMSGAFGGYSVDVTFSMTEENRLK	50
		 : : : : : . . . : :	
NT6.7		1 ALRQKKQMNNWLAHLPMRTENRVLSGAFGGYSHDTFMSMAEADRIR	45
NT6.3		51 NTTGQSIPAIFYGCDYGRGWLETAETIDTIDYSCNSSLISYWKSGLPQVSL	100
		: . : . : . . . : : :	
NT6.7		46 SATGQSIPAIFYGCDYARGWLETAKIEDSIDVSCNGDLISYWKNKGIPQISL	95
NT6.3		101 HLANPAFPSPGNKYKTAISNSQYKNILDPTVEGKRLEALLSKIADGLTLQLK	150
		. : . : . . . : . : :	
NT6.7		96 HLANPAFAQSGHFKTPIITNDQYKKILDSSTAEGKRLNAMLSKIADGLQELE	145
NT6.3		151 NQGVTVLFRPLHEMNGEWFWWGLTGYNQKDNERISLYKELYKKIYRYMTE	200
		. : : : :	
NT6.7		146 NQGVPSVLFRPLHEMNGEWFWWGLTSYNQRDNERISLYKQLYKKIHYHMTD	195
NT6.3		201 TRGLDNLLWVYSPDANRDFKTD FYPGSSYVDITGLDAYFTDPYAISGYDE	250
		: : : . . . : : :	
NT6.7		196 TRGLDHLIWVYSPDANRDFKTD FYPGASYVDIVGLDAYFQDAYSINGYDQ	245
NT6.3		251 MSL-----KKPFALTE	262
		: : : :	
NT6.7		246 LTALNNLCFRR	256

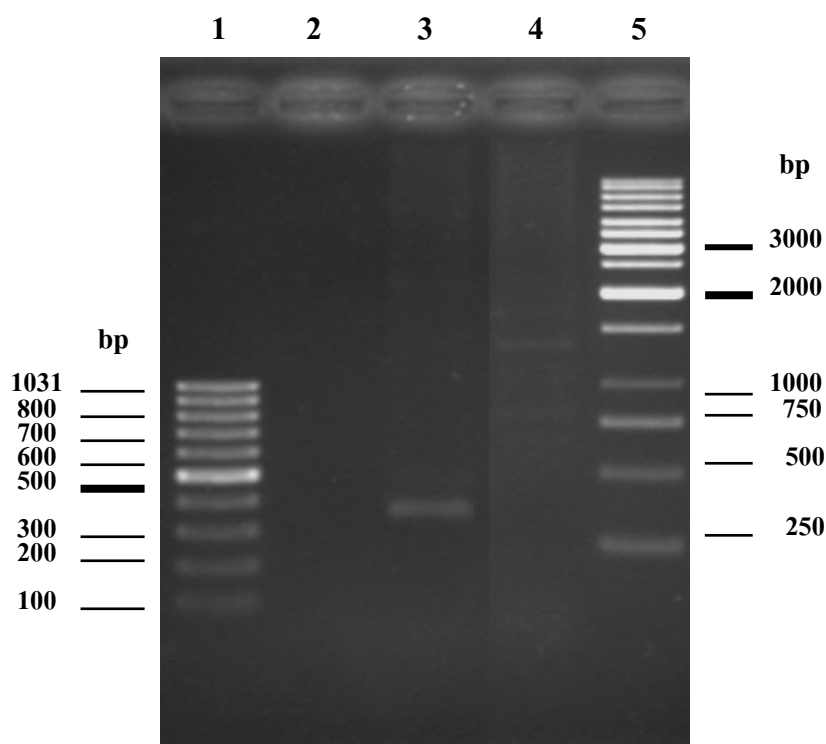
ภาพที่ 19 ผลการทำ pairwise alignment ของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง *B. amyloliquefaciens*

NT6.3 and *B. circulans* NT6.7

กำหนดให้ | แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution



ภาพที่ 20 ผลิตรหัสที่ 1 ได้จากการทำ PCR walking ทางด้านปลาย 5' (5'-walking)

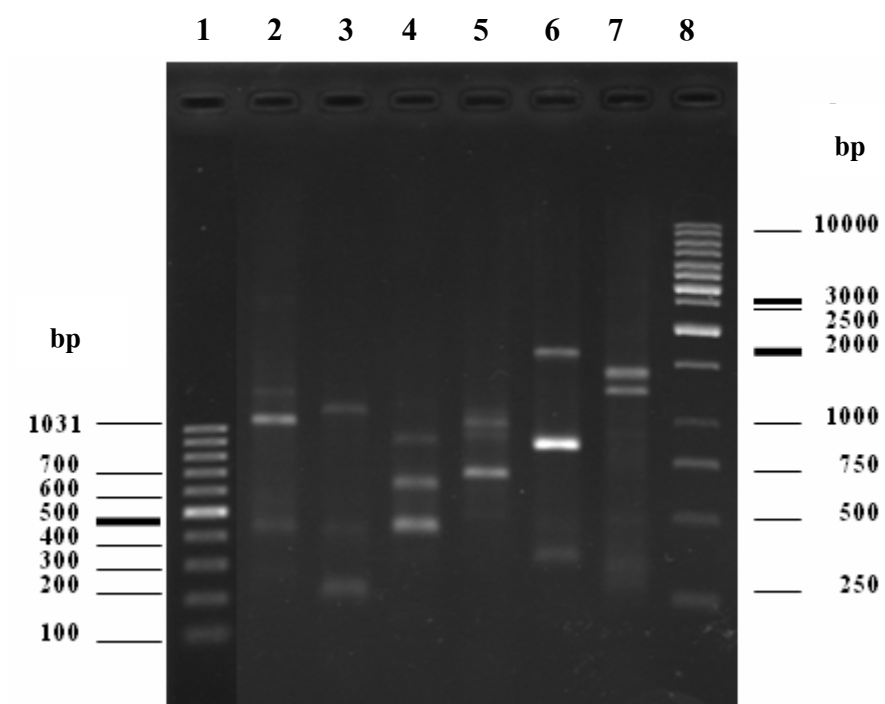
- ช่องที่ 1 DNA marker (100 bp DNA Ladder)
- ช่องที่ 2 Negative control
- ช่องที่ 3 ผลิตรหัสที่ 1 ปฏิกริยาถูกใช้เพื่อลิเมอร์จากการใช้คู่ไพรเมอร์
FP1/R1NT6.3 เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3
เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- ช่องที่ 4 ผลิตรหัสที่ 2 ปฏิกริยาถูกใช้เพื่อลิเมอร์จากการใช้คู่ไพรเมอร์
FP1/R1NT6.7 เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. circulans* NT6.7
เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- ช่องที่ 5 DNA marker (1 kb DNA Ladder)

จากภาพที่ 20 พบว่า ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์จากคู่ไพรเมอร์ FP1/R1NT6.3 นั้นมีขนาดประมาณ 390 คู่เบส ซึ่งไม่ใช่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหมายไว้ ส่วนผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์จากคู่ไพรเมอร์ FP1/R1NT6.7 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1300 และ 800 คู่เบส ซึ่งไม่ใช่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหมายเช่นเดียวกัน แสดงว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' ด้วยคู่ไพรเมอร์ FP1/R1NT6.3 และ FP1/R1NT6.7 ได้ อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ FP1 ที่ออกแบบจากบริเวณโปรโมเตอร์ของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ใน GH26 นั้น ไม่สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ได้ ความเป็นไปได้ว่าบริเวณโปรโมเตอร์ของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้นแตกต่างกับบริเวณโปรโมเตอร์ของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ใน GH26 จึงได้ทดลองเปลี่ยนคู่ไพรเมอร์โดยจะใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) จำนวน 6 ชุด (ตารางที่ 6) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสชุดละ 10 นิวคลีโอไทด์ จาก Ready-To-Go RAPD Analysis kit (บริษัท Amersham Bioscience, ประเทศอังกฤษ) ได้แก่ RAPD analysis primer 1 (5'GGTGC GGGA3') RAPD analysis primer 2 (5'GTTTCGCTCC3') RAPD analysis primer 3 (5'GTAGACCCGT3') RAPD analysis primer 4 (5' AAGAGCCCGT 3') RAPD analysis primer 5 (5'AACGCGCAAC3') RAPD analysis primer 6 (5'CCCGTCAGCA3') เป็น forward primer คู่กับไพรเมอร์ BMR (5' YTCNGCRAANGCRAANGGYTT 3') ซึ่งเป็น reverse primer โดยจะคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 786 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ได้จากการทดลอง โดยการตรวจสอบยีนจะใช้คู่ไพรเมอร์ BMF/ BMR ถ้าพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 786 คู่เบส ปรากฏอยู่ ก็จะนำชิ้นดีเอ็นเอนั้นไปโคลน โดยเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy Vector (บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วนำโคโลนีที่ตรวจสอบพบชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการไปหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ต่อไป

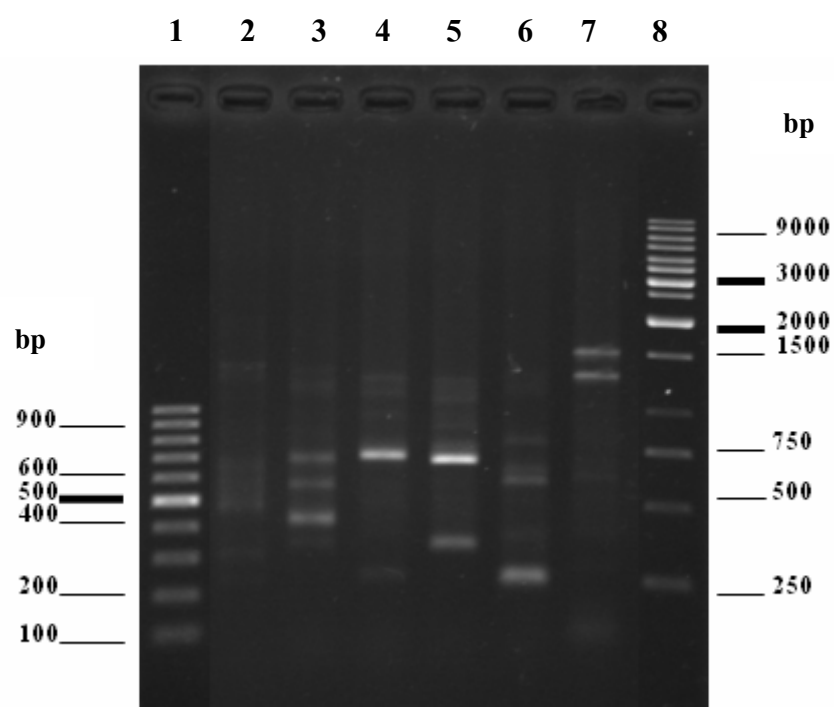
ผลจากการใช้คู่ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 6 ชุด และไพรเมอร์ BMR ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แสดงดังภาพที่ 21 โดยพบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 786 คู่เบส แต่ไม่พบยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 786 คู่เบสจากการตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ BMF/BMR จึงไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ได้

ภาพที่ 21 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำPCR walking ทางด้านปลาย 5' โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 (ก) และ *B. circulans* NT6.7 (ข) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

- ช่องที่ 1 DNA marker (100 bp DNA Ladder)
- ช่องที่ 2 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 1 และ BMR
- ช่องที่ 3 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 2 และ BMR
- ช่องที่ 4 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 3 และ BMR
- ช่องที่ 5 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 4 และ BMR
- ช่องที่ 6 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 5 และ BMR
- ช่องที่ 7 ผลิตรหัสปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 6 และ BMR
- ช่องที่ 8 DNA marker (1 kb DNA Ladder)



ဂ.



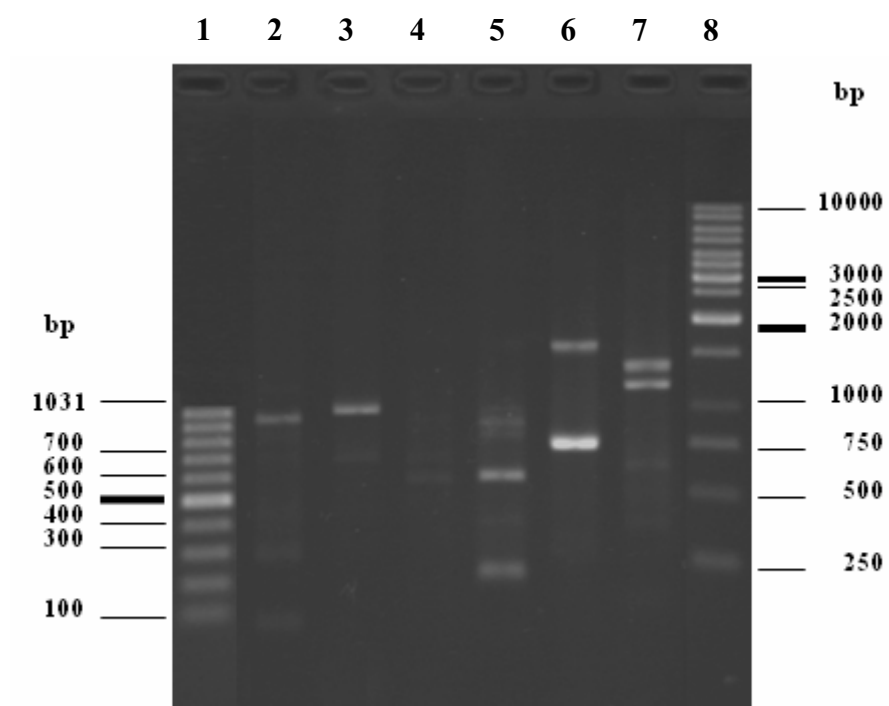
ဃ.

การหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' โดยใช้ไพรเมอร์ BMF เป็น forward primer คู่กับไพรเมอร์แบบสุ่ม 6 ชุด (RAPD analysis primer 1-RAPD analysis primer 6) ที่จะใช้เป็น reverse primer ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และจะคัดเลือกชิ้น DNA ที่มีขนาดมากกว่า 786 คู่เบส โดยจะใช้คู่ไพรเมอร์ BMF/BMR ในการตรวจสอบยืนยัน เช่นเดียวกับการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ผลจากการใช้คู่ไพรเมอร์คู่ไพรเมอร์ BMF และไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 6 ชุดในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แสดงดังภาพที่ 22 โดยพบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 786 คู่เบส แต่ไม่พบชิ้นที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 786 คู่เบส จากการตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ BMF/BMR จึงไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสทางด้านปลาย 3' ได้

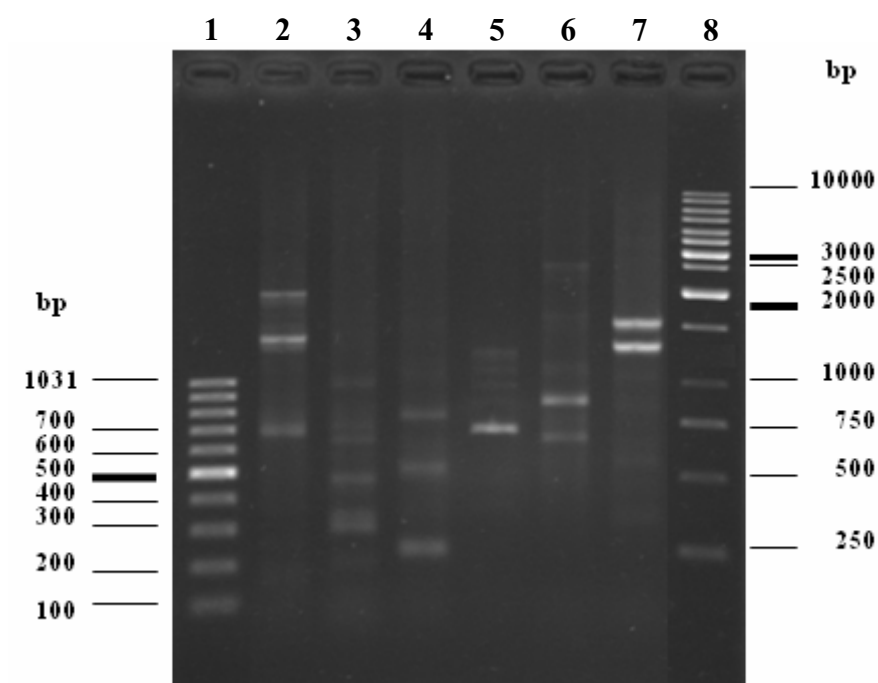
จากผลการหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส โดยเทคนิค PCR walking ดังกล่าวนั้น ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสทางด้านปลาย 5' และ 3' จึงไม่สามารถหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนได้ แต่เนื่องจากลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสแบบครบทั้งยีนใน GH26 จากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล NCBI มีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 1080 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งมีขนาด 786 และ 771 ตามลำดับ พบว่าขนาดของลำดับเบสที่หาได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 คิดเป็นร้อยละ 73 และร้อยละ 71 ของขนาดลำดับเบสแบบครบทั้งยีนโดยเฉลี่ยจากฐานข้อมูล ตามลำดับ และลำดับเบสบางส่วนที่ได้นั้น มีบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ใน GH26 อยู่ ดังนั้นจึงนำลำดับเบสบางส่วน (partial sequence) จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง ไปวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติ เพื่อหาบริเวณเร่งบนโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสต่อไป

ภาพที่ 22 ผลิตรหัสบาร์โค้ดที่ได้จากการทำPCR walking ทางด้านปลาย 3' โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 (ก) และ *B. circulans* NT6.7 (ข) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

- ช่องที่ 1 DNA marker (100 bp DNA Ladder)
- ช่องที่ 2 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 1
- ช่องที่ 3 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 2
- ช่องที่ 4 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 3
- ช่องที่ 5 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 4
- ช่องที่ 6 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 5
- ช่องที่ 7 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 6
- ช่องที่ 8 DNA marker (1 kb DNA Ladder)



п.



у.

3. การทำ Homology modeling เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

การทำนายโครงสร้างสามมิติด้วยวิธี homology modeling อาศัยหลักการที่เอนไซม์ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน จะมีลักษณะโครงสร้างสามมิติเหมือนกัน ซึ่งวิธีนี้มีขั้นตอนในการดำเนินการไม่ยุ่งยาก เพียงแค่ทราบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่ต้องการทำนายโครงสร้างเพื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทราบโครงสร้างแล้วในฐานข้อมูล ด้วยซอฟต์แวร์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน ซึ่งการทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ในการทดลองนี้ จะใช้โปรแกรม Swiss-Model ในการสร้างโมเดล จากนั้นวิเคราะห์หาบริเวณเร่งด้วยโปรแกรม DSViewerPro และเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติโดยการทำ model fit ด้วยโปรแกรม SPDBV

3.1 การสร้างโมเดลด้วยโปรแกรม Swiss-Model

โปรแกรม Swiss-Model เป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้ทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ตัวอย่าง โดยใช้วิธีคำนวณแบบ homology modeling โดยการนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน จากนั้นโปรแกรมจะคัดเลือกโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอย่างมากที่สุด เพื่อใช้เป็น template เนื่องจาก template ที่ใช้เป็นแม่แบบในการสร้างโมเดล เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วยวิธี homology modeling ถ้า template มีค่าร้อยละความเหมือนสูง จะทำให้ได้โครงสร้างสามมิติที่มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือ สำหรับการสร้างโมเดลด้วยโปรแกรม Swiss-Model นั้น โปรแกรมจะค่อย ๆ เลียนแบบพิคคของอะตอมต่าง ๆ ในโครงสร้างของ template ไปเป็นโครงสร้างสามมิติของโปรตีนตัวอย่างโดยการจำลองส่วนของ backbone ส่วนของ loop และส่วนของ sidechain โดยโปรแกรมจะคำนวณค่าพลังงานที่เหมาะสมต่อโครงสร้างสามมิติของโปรตีน เพื่อให้ได้โมเดลที่มีความสมบูรณ์

การสร้างโมเดลโครงสร้างสามมิติจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส โดยนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับเบสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ใน frame ที่เกิดการแปลรหัสจากกรดอะมิโนเป็นเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ถูกต้อง (open reading frame) มาสร้างโมเดลด้วยโปรแกรม Swiss-Model ผลที่ได้จากการหา open reading frame จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 พบว่าอยู่ใน frame -1 และ +2 ตามลำดับ จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไป submit ในส่วน

ของ First Approach Mode โปรแกรมจะนำลำดับกรดอะมิโนที่ submit เปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีนด้วยโปรแกรม blastp รุ่น BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007] เพื่อคัดเลือก template สำหรับสร้างเป็นโมเดล โดยพิจารณาจากค่าร้อยละความเหมือนที่ได้จากผลของการ blastp ลำดับของกรดอะมิโนที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงที่สุด จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็น template โดยผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนจาก

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน แสดงดังตารางที่ 13 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก

Cellulomonas fimi (PDB code: 2bvyA) และ *Cellvibrio japonicus* (PDB code: 1odzA) มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 28 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าร้อยละความเหมือนที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ โดยทั่วไป การคัดเลือก template ที่มีค่าร้อยละความเหมือนมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้โมเดลที่ได้มีความน่าเชื่อถือในระดับที่ยอมรับได้ตามกฎของ Doolittle (Doolittle's rule of thumb) (Balaji, 2006) เนื่องจากโปรตีนจะมี homology กัน ดังนั้น โปรแกรมจึงคัดเลือก template 2bvyA และ template 1odzA เป็น โมเดลต้นแบบในการจำลองโครงสร้างสามมิติ ทำให้ได้โมเดลโครงสร้างสามมิติจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ดังแสดงในภาพที่ 23 เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลอง เป็นลำดับกรดอะมิโนบางส่วน ดังนั้น เพื่อเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่ได้ กับลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จึงนำลำดับกรดอะมิโนจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนที่มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโน

บางส่วนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มากที่สุด มาสร้างโมเดลโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Swiss-Model ผลจากการคัดเลือก template เพื่อใช้เป็นโมเดลต้นแบบในการจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) แสดงดังตารางที่ 14 โดยพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Cellvibrio japonicus* (PDB code: 1odzA) และ *Cellvibrio japonicus* (PDB code: 1r7oA) มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 27 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าร้อยละความเหมือนที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) ตามลำดับ ดังนั้น โปรแกรมจึงคัดเลือก template 1odzA และ template 1r7oA เป็นโมเดลต้นแบบในการจำลองโครงสร้างสามมิติ ทำให้ได้โมเดลโครงสร้างสามมิติ ดังแสดงในภาพที่ 23

ตารางที่ 13 ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) จากโปรแกรม Swiss-Model

Model	Template (PDB code)/ Source	E-value	%Identity	Modelled residue range
<i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3	2bvyA / <i>Cellulomonas fimi</i>	$3.18e^{-14}$	28	33 – 238
<i>B. circulans</i> NT6.7	1odzA / <i>Cellvibrio japonicus</i>	$2.89e^{-16}$	30	30 – 233

ตารางที่ 14 ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลของโปรตีน (PDB) จากโปรแกรม Swiss-Model

Model	Template (PDB code)/ Source	E-value	%Identity	Modelled residue range
<i>B. subtilis</i> A33 (ABB91433.1)	1odzA / <i>Cellvibrio japonicus</i>	$3.63e^{-14}$	27	26 – 266
<i>B. subtilis</i> G1 (ABC61374.1)	1r7oA / <i>Cellvibrio japonicus</i>	$2.84e^{-16}$	29	30 – 270

หมายเหตุ ตารางที่ 13 และ 14 ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 20 กันยายน 2550



ภาพที่ 23 โมเดลที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เปปตา-แมนนาเนสจากเชื้อ

B. amyloliquefaciens NT6.3 (ก) *B. circulans* NT6.7 (ข) *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) (ค)

และ *B. subtilis* G1(ABC61374.1) (ง) โดยโปรแกรม Swiss-Model

บริเวณสีแดง คือ โครงสร้างทุติยภูมิแบบ α - helix

บริเวณสีเหลือง คือ โครงสร้างทุติยภูมิแบบ β - strand

บริเวณสีเทา คือ บริเวณที่เป็น loop

จากผลของโมเดลโครงร่างสามมิติที่ได้ในภาพที่ 23 ซึ่งเป็นโมเดลจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 และ โมเดลจากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) พบว่า โมเดลโครงร่างสามมิติที่ได้ ประกอบด้วยโครงสร้างทุติยภูมิแบบ α -helix และ β -strand ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยบริเวณที่เป็น loop มีการม้วนพับของโครงร่างสามมิติแบบ $(\beta/\alpha)_8$ -barrel หรือเรียกว่า TIM-barrel ซึ่งเป็นลักษณะการม้วนพับแบบที่อนุรักษ์ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสสกุลที่ 26

3.2 การวิเคราะห์โครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เพื่อหาบริเวณเร่ง

รูปแบบการม้วนพับของโปรตีนที่ปรากฏในธรรมชาตินั้น ก่อนข้างมีปริมาณจำกัด โครงร่างสามมิติของโปรตีนจึงมีการอนุรักษ์มากกว่าลำดับเบส ทำให้เกิดการวิเคราะห์ความเหมือนของโครงร่างสามมิติของโปรตีนที่สนใจกับ template ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทราบโครงสร้างแล้ว ในการวิเคราะห์เพื่อหาบริเวณเร่งจากโครงร่างสามมิติของโปรตีนที่สนใจนั้น ต้องใช้การอ้างอิงจาก template ในฐานะข้อมูลของโปรตีน ในการคัดเลือก template นอกจากจะพิจารณาจากค่าร้อยละความเหมือนที่สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์แล้ว ยังต้องคำนึงถึงค่า resolution ควบคู่ไปด้วย เนื่องจากค่า resolution จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความละเอียดของโครงสร้าง ซึ่งจะวัดเป็นระยะอังสตรอม (Å) หากค่า resolution ต่ำ หมายถึง resolution ที่ดี ทำให้ทราบรายละเอียดในโครงสร้างอย่างถูกต้องมากกว่าค่า resolution สูง ผลการคัดเลือก template เพื่อใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์โครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เพื่อหาบริเวณเร่งโดยการสืบค้นข้อมูลในฐานะข้อมูลของโปรตีนวันที่ 25 กันยายน 2550 แสดงดังตารางที่ 15

จากตารางที่ 15 พบข้อมูลโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จำนวน 6 โครงสร้าง โดยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Cellvibrio japonicus* (PDB code: 1odz) มีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 สูงที่สุด เท่ากับ 27 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า resolution ต่ำที่สุดเท่ากับ 1.4 Å ดังนั้น จึงคัดเลือก template 1odz ในการอ้างอิงเพื่อวิเคราะห์หาบริเวณเร่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

ตารางที่ 15 ผลการคัดเลือก template ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสสกุลที่ 26 (GH26) จากฐานข้อมูลโปรตีน

PDB code	Source	Resolution (Å)	ค่าร้อยละความเหมือน (%identity) เมื่อ เปรียบเทียบกับ <i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3	ค่าร้อยละความเหมือน (%identity) เมื่อ เปรียบเทียบกับ <i>B. circulans</i> NT6.7
1odz	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1.40	27	30
1gvy	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1.70	27	29
1gw1	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1.65	27	29
1j9y	<i>Cellvibrio japonicus</i>	1.85	27	30
2bvt	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	2.90	27	26
2bvy	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	2.25	27	26

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 25 กันยายน 2550

การหาบริเวณเร่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยอ้างอิงจากบริเวณเร่งของ template 1odz ใช้โปรแกรม DSViewerPro เวอร์ชัน 5.0 ในการวิเคราะห์ โดยการเปิดไฟล์ข้อมูลของ template 1odz (นามสกุล .pdb) เพื่อเรียกดูเรซิดิวที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส ได้แก่ เรซิดิว MAN1425 และ BMA1426 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแมนแนนที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากการวิเคราะห์เรซิดิวดังกล่าว พบกรดอะมิโนซึ่งเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนน ประกอบด้วย Glu121, His143, Glu212, Tyr285, Glu320, Ala325, Trp360, Arg361 และ His377

เนื่องจากโมเดลโครงสร้างสามมิติของ template 1odz นั้น มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ถูกสร้างเป็นโมเดลในช่วงตั้งแต่เรซิดิวของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 5 ถึง 385 ซึ่งเป็นโมเดลที่ถูกสร้างอย่างสมบูรณ์จากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งชิ้น ส่วนโมเดลโครงสร้างสามมิติของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้น เป็นโมเดลที่ถูกสร้างจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วน ดังนั้น โมเดลที่ถูกสร้างจึงเป็นโมเดลบางส่วน โดยบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 อยู่ในช่วงของลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่เรซิดิวที่ 33 ถึง 238 ส่วน *B. circulans* NT6.7 อยู่ในช่วงของลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่เรซิดิวที่ 30 ถึง 233 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจาก template 1odz โดยการทำให้ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW ในการจัดตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ความเหมือนกันให้มาอยู่ใกล้กันเพื่อเปรียบเทียบบริเวณเร่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 24 และ 25 ตามลำดับ และผลจากการทำให้ multiple alignment เพื่อเปรียบเทียบบริเวณเร่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งชิ้นจาก *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) กับ template 1odz แสดงดังภาพที่ 26 และ 27 ตามลำดับ

```

10DZ      MRADV K P V T V K L V D S Q A T M E T R S L F A F M Q E Q R R H S I M F G H Q H E T T Q G L T I T R T D G T Q S D T 60
NT6.3     -----SCKSERATDDKRYYE LAGPPAHRSENRVMS GA FGGYSDVT F S M T E E N R L K N T T G Q 55
           . : : . * . : * . * . * * : . * : * . . : .

10DZ      F N A V G D F A A V Y G W D T L S I V A P K A E S D I V A Q V K K A Y A R G G I I T V S S H F D N P K T D T Q K G V W P 120
NT6.3     S P A I Y G C D Y G R G W L E T A E I T D T I D Y S C N S S L I S Y W K S G G L P Q V S L H L A N P -- A F P S G N Y K 113
           * : .      * * : : : . : . : : : * * : * * : * * . * :

10DZ      V G T S W D Q T P A V V D S L P G G A Y N P V L N G Y L D Q V A E W A N N L K D E Q G R L I P V I F R L Y H E N T G S W 180
NT6.3     T A I S N S Q Y K N I L D -- P S T V E G K R L E A L L S K I A D G L T Q L K N Q G -- V T V L F R P L H E M N G E W 168
           . . * . * : : * . . . * : . * : : * : . : * : * * . * . *

10DZ      F W W G D K ----- Q S T P E Q Y K Q L F R Y S V E Y L R D V K G V R N F L Y A Y S P N N F W D V T E A N Y L E R Y 234
NT6.3     F W W G L T G Y N Q K D N E R I S L Y K E L Y K K I Y R Y M T E T R G L D N L L W V Y S P ----- D A N R D F K T D F Y 224
           * * * * .      : .      * * : : : . * : : : : * : : * * * * * . . . : *

10DZ      P G D E W V D V L G F D T Y P V A D N A D W F R N V V A N A A L V A R M A E A R G K I P V I S G I G I R A P D I E A G 294
NT6.3     P G S S Y V D I T G L D A Y ----- 238
           * . . : * * : * : *

10DZ      L Y D N Q W Y R K L I S G L K A D P D A R E I A F L L V W R N A P Q G V P G P N G T Q V P H Y W V P A N R P E N I N N G 354
NT6.3     -----

10DZ      T L E D F Q A F Y A D E F T A F M R D I E Q V Y Q R P T L I W K 386
NT6.3     -----F T D P Y A I S G Y D E M L S L K K P F A L T E 262
           : : * : : . *      : : * : :

```

ภาพที่ 24 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 เปรียบเทียบกับ

template 10dz

กำหนดให้ ตัวอักษรสีน้ำเงิน แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ template 10dz

ตัวอักษรสีแดง แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ *B. amyloliquefaciens*

NT6.3

บริเวณสีเหลือง แทนตำแหน่งของบริเวณเร่ง (active site)

* แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution

```

10DZ      MRADV KPTVTKLVDS QATME TRSLFAFMQE QRRHS IMFQHQHETTQGLTITRTDGTQSDT 60
NT6.7     -----ALRQQKQMMNWLHL PNRTE NRVLS GAFGGYSHDTFSMAEADRIRSATGQ 50
           * : : * : : * : * * * : : : : :
10DZ      FNAVGDFAAVYGWD T L S I V A P K A E G D I V A Q V K K A Y A R G G I I T V S S H F D N P K T D T Q K G V W P 120
NT6.7     S P A I Y G C D Y A R G U L E T A K I E D S I D V S C N G D L I S Y K N G G I P Q I S L H L A N P -- A F Q S G H F K 108
           * : . . * * : : . . : : : : : * * * : * : * * * : * :
10DZ      V G T S W D Q T P A V V D S L P G G A Y N P V L N G Y L D Q V A E W A N N L K D E Q G R L I P V I F R L Y H E I T G S W 180
NT6.7     T P I T N D Q Y K K I L D S S T A E G K R -- L N A M L S K I A D G L Q E L E N Q G --- V P V L F R P L H E I N G E W 163
           . : * * : : * * . . . . * * * : : : : : : : : : * * * * * : * . *
10DZ      F W W G D K Q S T P ----- E Q Y K Q L F R Y S V E Y L R D V K G V R N F L Y A Y S P N M F W D V T E A N Y L E R Y 234
NT6.7     F W W G L T S Y N Q R D M E R I S L Y K Q L Y K K I Y H Y M T D T R G L D H L I W V Y S P ---- D A M R D F K T D F Y 219
           * * * * . . . . * * * : : . * : * : * : : : : * * * * * . . . : *
10DZ      P G D E W V D V L G F D T Y G P V A D N A D W F R N V V A N A A L V A R M A E A R G K I P V I S G I G I R A P D I E A G 294
NT6.7     P G A S Y V D I V G L D A Y F Q D A Y S I N G Y D Q L T A L M N L C F R R ----- 256
           * * . : * * : * : * : * * . : : : : * * * *
10DZ      L Y D N Q W Y R K L I S G L K A D P D A R E I A F L L V W R N A P Q G V P G P N G T Q V P H Y W V P A N R P E N I N N G 354
NT6.7     -----
10DZ      T L E D F Q A F Y A D E F T A F N R D I E Q V Y Q R P T L I V K 386
NT6.7     -----

```

ภาพที่ 25 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ *B. circulans* NT6.7 เปรียบเทียบกับ

template lodz

กำหนดให้ ตัวอักษรสีน้ำเงิน แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ template lodz

ตัวอักษรสีแดง แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ *B. circulans* NT6.7

บริเวณสี่เหลี่ยม แทนตำแหน่งของบริเวณเร่ง (active site)

* แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution

```

10DZ      -----MRADV KPVTVKLVDSQATMETRSLFAFMQ-----EQRHHSIM 37
ABB91433.1 MLKKLAVCLSIVLLLLGAASPISAHTVYPVNPNAQQTTKD IMNWL A HLPNRS ENRVMSG A 60
           :  . .  * *  * : : *  * : : : :  :  * : *  *

10DZ      FGHQHETTQGLTITRTDGTQSDTFNAVGDFAAVYGWDTLSIVAPKAEEDIVAQVKKAYAR 97
ABB91433.1 FGGYSDVTFSTMTEENRLKNATGQSPAIIYGC DYGRGWLETADITDTIDYSCNSSLISYWK S 120
           **  : . *  . : *  .  .  .  .  * : .  **  : : : .  .  .  : : .  .  :

10DZ      GGIITVSSHFDMPKTD TQKGVNPGVTSWDQTPAVVDSLPGGAYNPVLNGYLDQVAEWANN 157
ABB91433.1 GGLPQVSLH L ANP--AFPSGNYKTAISNSQYKNILD--PSTVEGKRLEALLSKIADGLTQ 176
           ** :  **  *  **  . * : . . * . *  : : *  *  . .  * : . * : : * : . :

10DZ      LKDEQGR LIPVIFRLYHE NTGSWFWWGDK-----QSTPEQYKQLFRYSVEYL RDVKGV R 211
ABB91433.1 LKNQG---VTVLFRPLHETMNGEWFWWGLTGYNQKDNERISLYKELYKKIYRYMTETRG LD 233
           ** : :  . : * : **  *  * . * . * : : .  .  .  * : : * : :  . * : : : * :

10DZ      NFLYAYSPNNFWDVTEANYLERYPGDEWVDVLGFDTYGPVADNADWFRNVVANAALVARM 271
ABB91433.1 NLLWVYSP---DANRDFKTD FYPGSSYVDITGLDAYFTD PYAISGYDEMLS----- 281
           * : * : . ***  * . . .  :  * : : . : * : * : * : * : .  .  .  : : : :

10DZ      AEARGKIPVISGIGIRAPDIEAGLYDNQWYRK LISGLKADPDAREIAFLLVWRNAPQGV P 331
ABB91433.1 -----LKKPFAFAETGPGSGNIGSFD---YAAFINAIRQK--YPQTAYFLTWDEQLSPAA 330
           :  . . .  . * . :  * : *  *  : * : : :  .  :  * : * : *  .  . .

10DZ      GPNGTQVPHYWVPANRPENINNGTLED FQA FYADEFTAFNRDIEQVYQRPTLIVK 386
ABB91433.1 NQGAQSLYQMSWTLNKGEIWNNGSLTPIAE----- 360
           .  . .  . : :  .  * :  *  * . * : *  :

```

ภาพที่ 26 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) เปรียบเทียบกับ

template 10dz

กำหนดให้ ตัวอักษรสีน้ำเงิน แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ template 10dz

ตัวอักษรสีแดง แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ *B. subtilis* A33

(ABB91433.1)

บริเวณสีเหลือง แทนตำแหน่งของบริเวณเร่ง (active site)

* แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution

```

10DZ      -----MRADVKPVTVKLVDSQATMETRSLFAFMQ-----EQRR 33
ABC61374.1 MGSCI VKNIRSLAHYILLRL LFSKTNEAHTVSPVNPNAQQTTKAVMNWLAHLPNRTENRV 60
           :   :. **. *:.* *::: :.   :*:
           :   :. **. *:.* *::: :.   :*:

10DZ      HSI MF GHQHE TTQGLTITRTDGTQSDTFNAVGDFAAVYGWDTLSIVAPKAE GDI VAQVKK 93
ABC61374.1 LSGAFGGYSHDTFSMAEADRIRSATGQSPA IYGCDYARGWLETAKIEDSIDVSCNGDLIS 120
           *  ** . * .: : : : :. * : . . ** : : . : . : : .

10DZ      AYARGGIITVSSHFDNPKTD TQKGVWPVGT SWDQTPAVVD SLPGGAYNPVLNGYLDQVAE 153
ABC61374.1 YWKNGGIPQISLHLANP--AFQSGHFKTPT TNDQYKKILD SSTAE GKR--LNAML SKIAD 176
           : . *** : * : ** * . * : . : ** : : ** . . . . ** . * : : :

10DZ      WANNLKDEQGR LIPVIFRLYHEITG SWFWWGDQSTP-----EQYKQLFRYSVEYLRDV 207
ABC61374.1 GLQEL ENQG---VPV LFRPLHEMNGEWFWWGLTSYNQKDNERISLYKQLYKKIYHYMTDT 233
           : : * : : : : : : : ** . * . * : : . . . . * : : : : : : : .

10DZ      KGV RNFLYAYSPNNFWDVTE ANYLERYPGDEWVDVLGFDTYGPVADNADWFRNVVANAAL 267
ABC61374.1 RGLDHLIWVYSP---DANRDFKTD FYPGASYVDI VGLDAYFQDAYSINGYDQLTALNKP 289
           : * : : : : . *** * . . : *** . : : : : * : * . : : : . *

10DZ      VARMAEARGKIPVISGIGIRAPDIEAGLYDNQWYRK LISGLKADPDAREIAFLLVWRNAP 327
ABC61374.1 FAFTEVG-----PQPANGSFD---YSLFINAIKQK--YPKTIYFLAWN--- 327
           . * . . : * : * * : * . : * . : : : * .

10DZ      QGVPGPNGTQVPHYWVPANRPENINNGTLED FQAFYADEFTAFNRDIEQVYQRPTLIVK 386
ABC61374.1 -----DEWSPA VN-----KGSALYHDSWTLNKG EIWN GDSLTPIVE- 364
           . * ** . : . . * : * * : * : : * : . . : : :

```

ภาพที่ 27 ตำแหน่งบริเวณเร่ง (active site) ของ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) เปรียบเทียบกับ

template 10dz

กำหนดให้ ตัวอักษรสีน้ำเงิน แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็น โมเดลของ template 10dz

ตัวอักษรสีแดง แทนบริเวณที่ถูกสร้างเป็น โมเดลของ *B. subtilis* G1

(ABC61374.1)

บริเวณสีเหลือง แทนตำแหน่งของบริเวณเร่ง (active site)

* แทนด้วย identical sequence

: แทนด้วย conserved substitution

. แทนด้วย semi-conserved substitution

จากภาพที่ 24-27 พบว่า ตำแหน่งของบริเวณเร่งเมื่อเปรียบเทียบกับ template 1odz โดยการทำ multiple alignment ได้แก่ กรดอะมิโน Asp79, His101, Glu163 และ Tyr285 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กรดอะมิโน Asp74, His96, Glu158 และ Tyr333 ใน *B. circulans* NT6.7 กรดอะมิโน Asp107, His129, Glu191 และ Tyr266 ใน *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ กรดอะมิโน Asp111, His133, Glu195 และ Tyr270 ใน *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) ตามลำดับ

ตารางที่ 16 แสดงให้เห็นการเปรียบเทียบบริเวณเร่งบน โมเดล โครงร่างสามมิติของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3, *B. circulans* NT6.7, *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) กับ template 1odz ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ขาดไปบางส่วน ไม่มีผลต่อกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ เนื่องจากพบกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง 4 ตำแหน่ง จากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) เช่นเดียวกับบริเวณเร่งจากลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ดังนั้น จึงได้นำบริเวณเร่งทั้ง 4 ตำแหน่ง มาวิเคราะห์หาความเหมือน และความแตกต่างบนโมเดล โครงร่างสามมิติโดยการทำ model fit ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 16 ตำแหน่งของบริเวณเร่งบน โมเดลของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3, *B. circulans* NT6.7, *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) เปรียบเทียบกับบริเวณเร่งจากเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสของ *Cellvibrio japonicus* (PDB code: 1odz) ที่ใช้เป็น template

Model	บริเวณเร่งจาก template 1ODZ			
	Glu121	His143	Glu212	Tyr285
<i>B. amyloliquefaciens</i> NT6.3	Asp89	His101	Glu163	Tyr238
<i>B. circulans</i> NT6.7	Asp74	His96	Glu158	Tyr233
<i>B. subtilis</i> A33(ABB91433.1)	Asp107	His129	Glu191	Tyr266
<i>B. subtilis</i> G1(ABC61374.1)	Asp111	His133	Glu195	Tyr270

3.3 การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติโดยการทำ model fit

การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติ และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน โดยการทำ model fit เป็นการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติระหว่างโปรตีน 2 โมเลกุล ซึ่งสามารถบอกความสัมพันธ์ในแง่ของวิวัฒนาการระหว่างกลไกการเกิดปฏิกิริยาสำหรับเอนไซม์ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลสได้ ซึ่งในการทดลองส่วนนี้จะใช้โปรแกรม SPDBV เวอร์ชัน 3.7 ในการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติ ระหว่างโมเดลของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนบางส่วน กับ โมเดลที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) โดยจะแบ่งการเปรียบเทียบโมเดลออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ model fit ระหว่างโครงสร้างสามมิติของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กับ *B. circulans* NT6.7, *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กับ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1), *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กับ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1), *B. circulans* NT6.7 กับ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1), *B. circulans* NT6.7 กับ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) กับ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) เพื่อวิเคราะห์หาความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างสามมิติ และตำแหน่งของบริเวณเร่งบนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

การวิเคราะห์ตำแหน่งของบริเวณเร่งบนโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม SPDBV เวอร์ชัน 3.7 โดยการเปิดไฟล์ข้อมูลของโมเดลที่ได้จาก Swiss-Model (นามสกุล .pdb) จากนั้นเลือกตำแหน่งของบริเวณเร่งที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2 เพื่อให้โปรแกรมแสดง side chain บนโครงสร้างสามมิติ ผลจากการศึกษาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลโครงสร้างสามมิติของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3, *B. circulans* NT6.7, *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) และ *B. subtilis* G1 (ABB91433.1) แสดงดังตารางที่ 17-20 และภาพที่ 28-31 ตามลำดับ

จากตารางที่ 17-20 และภาพที่ 28-31 ทำให้ทราบถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลโครงสร้างสามมิติ ว่าอยู่บนโครงสร้างทุติยภูมิ หรือ บริเวณที่เป็น loop เมื่อทราบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลทั้งหมดแล้ว จะนำโมเดลทั้งหมดที่ได้ มาเปรียบเทียบกันทีละคู่ เพื่อเป็นการวิเคราะห์หาความเหมือน และความแตกต่างระหว่างโครงสร้างสามมิติ และกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง โดยการทำให้ model fit ซึ่งจะใช้หลักการ alignment ของโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure alignment) โดยโปรแกรมจะทำ alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงเรซิดิวที่ถูกสร้างเป็น โมเดล ผลจากการทำให้ model fit แสดงดังภาพที่ 32-37 และข้อมูลจากการทำ secondary structure alignment แสดงในภาคผนวก ค

ตารางที่ 17 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3

กรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง	ตำแหน่งบน โมเดลนับจากปลาย N-terminal
Asp79	helix ที่ 3
His101	loop ระหว่าง β -strand ที่ 5 กับ helix ที่ 4
Glu163	loop ระหว่าง helix ที่ 5 กับ helix ที่ 6
Tyr238	loop ส่วนปลาย C-terminal

ตารางที่ 18 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. circulans* NT6.7

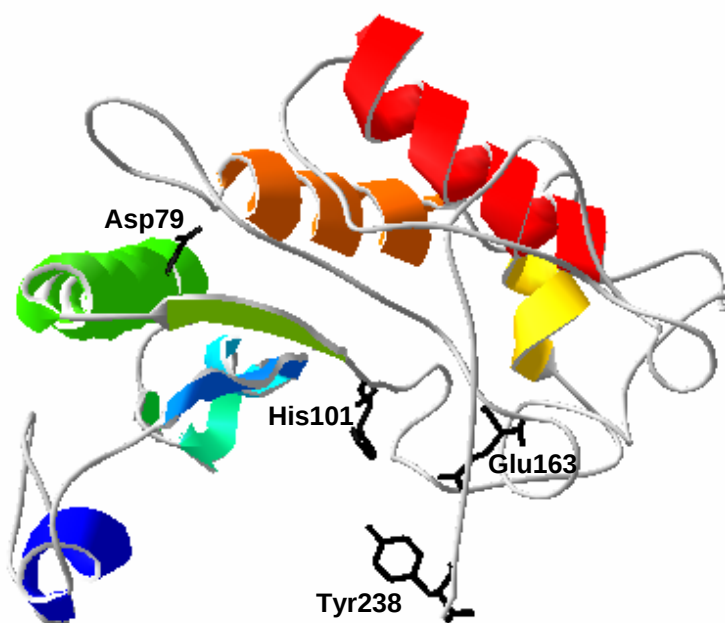
กรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง	ตำแหน่งบน โมเดลนับจากปลาย N-terminal
Asp74	loop ระหว่าง β -strand ที่ 1 กับ helix ที่ 2
His96	loop ระหว่าง β -strand ที่ 2 กับ β -strand ที่ 3
Glu158	loop ระหว่าง β -strand ที่ 5 กับ β -strand ที่ 6
Tyr233	loop ส่วนปลาย C-terminal

ตารางที่ 19 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. subtilis* A33
(ABB91433.1)

กรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง	ตำแหน่งบน โมเดลนับจากปลาย N-terminal
Asp107	loop ระหว่าง β -strand ที่ 1 กับ helix ที่ 3
His129	loop ระหว่าง β -strand ที่ 2 กับ helix ที่ 4
Glu191	loop ระหว่าง β -strand ที่ 5 กับ helix ที่ 5
Tyr266	loop ส่วนปลาย C-terminal

ตารางที่ 20 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. subtilis* G1
(ABC61374.1)

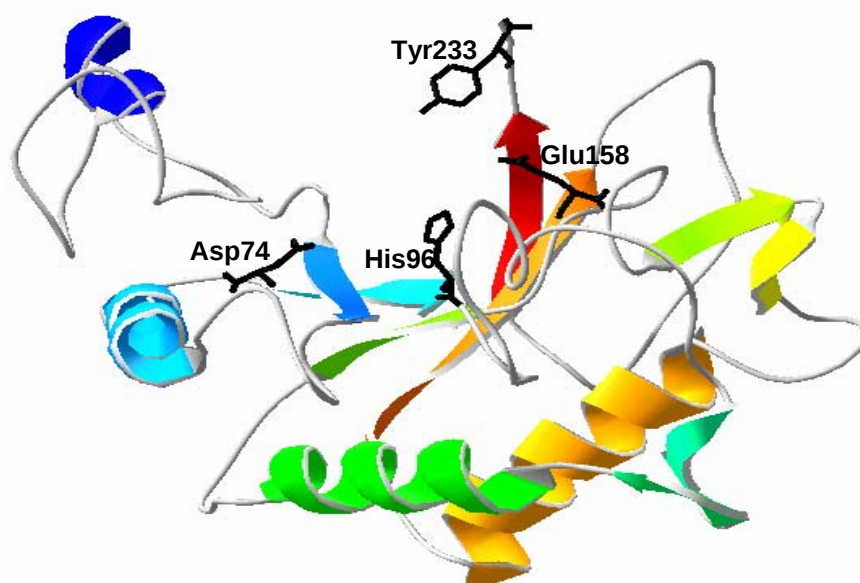
กรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง	ตำแหน่งบน โมเดลนับจากปลาย N-terminal
Asp111	loop ระหว่าง β -strand ที่ 1 กับ helix ที่ 3
His133	loop ระหว่าง β -strand ที่ 2 กับ helix ที่ 4
Glu195	loop ระหว่าง β -strand ที่ 3 กับ β -strand ที่ 4
Tyr270	loop ส่วนปลาย C-terminal



ภาพที่ 28 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3

บริเวณสีม่วง ■ คือ ปลาย N-terminal

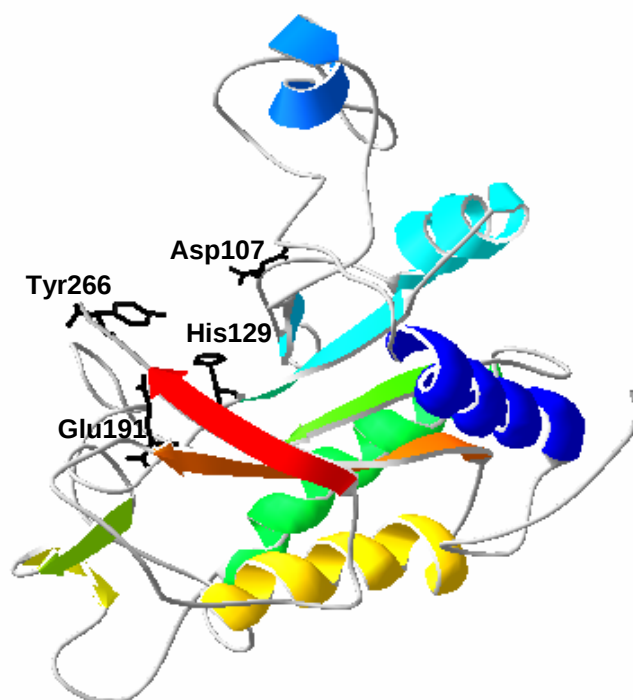
บริเวณแดง ■ คือ ปลาย C-terminal



ภาพที่ 29 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. circulans* NT6.7

บริเวณสีม่วง ■ คือ ปลาย N-terminal

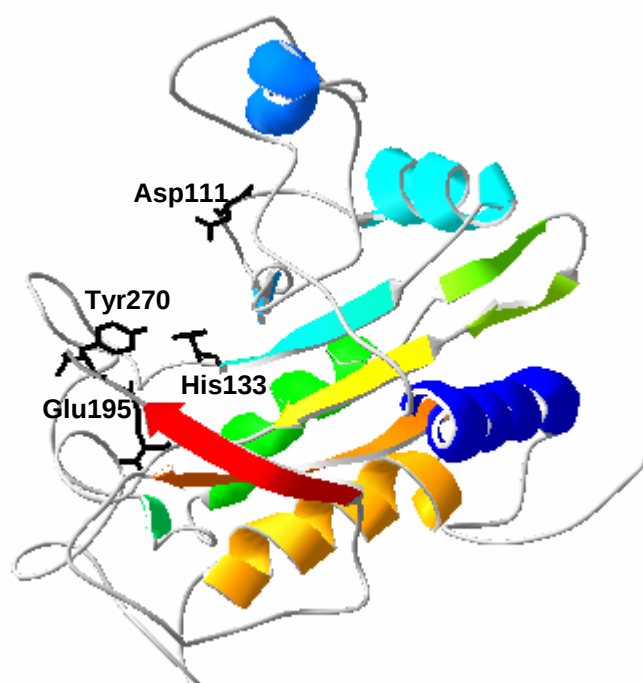
บริเวณแดง ■ คือ ปลาย C-terminal



ภาพที่ 30 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1)

บริเวณสีม่วง ■ คือ ปลาย N-terminal

บริเวณแดง ■ คือ ปลาย C-terminal

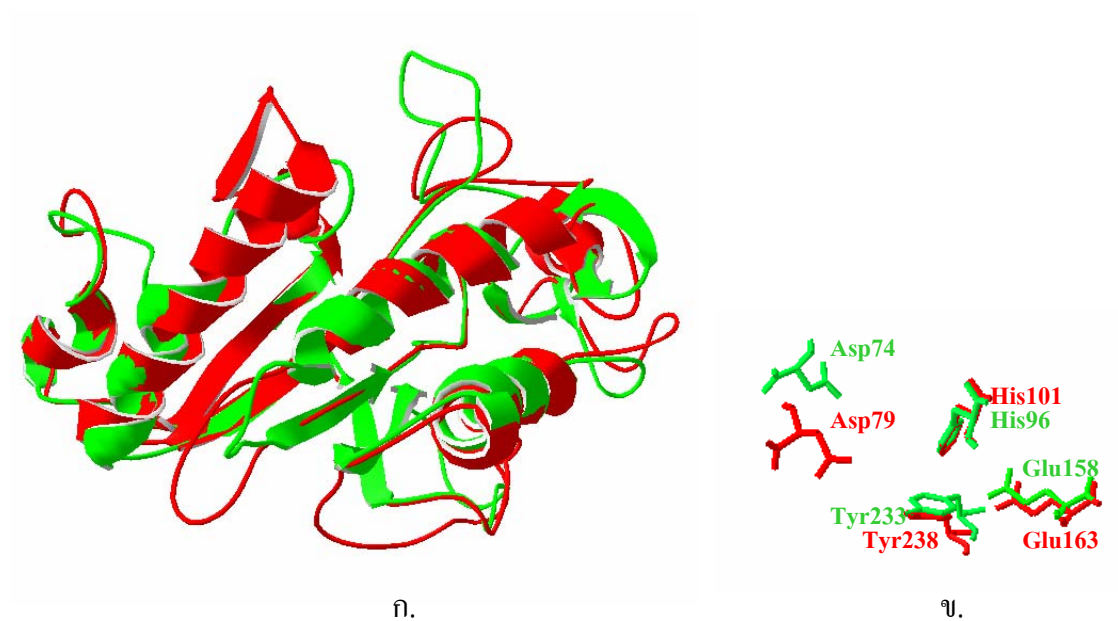


ภาพที่ 31 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งบนโมเดลของ *B. subtilis* G1(ABC61374.1)

บริเวณสีม่วง ■ คือ ปลาย N-terminal

บริเวณแดง ■ คือ ปลาย C-terminal

จากภาพที่ 32ก – 37ก พบว่า บริเวณโครงสร้างที่เป็น α -helix และ β -strand ส่วนใหญ่จะเกิดการซ้อนทับกันอย่างเหมาะสม โดยโครงร่างสามมิติที่มาจากลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมาก จะเกิดการซ้อนทับกันพอดี ส่วนโครงร่างสามมิติที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน จะเกิดการเหลื่อมซ้อนกันของโมเลกุล ตัวอย่างเช่น model fit ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1) ซึ่งมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 มากที่สุด จะเกิดการซ้อนทับกันของโมเลกุลในโครงร่างสามมิติได้พอดี มากกว่า model fit ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 กับ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1) ซึ่งมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับ *B. circulans* NT6.7 มากที่สุด เป็นต้น ส่วนบริเวณที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในการทำ model fit คือ บริเวณที่เป็น loop ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่สามารถทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนได้ จึงทำให้บริเวณที่เป็น loop นั้นมีความผันแปรค่อนข้างมาก และทำให้เกิดความยืดหยุ่นขึ้นในโมเลกุล ในขณะที่โครงสร้างทุติยภูมิ ได้แก่ α -helix และ β -strand นั้น เป็นโครงสร้างที่มีความแน่นอนค่อนข้างสูง ดังนั้น ความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการซ้อนทับกันของบริเวณ loop ที่พบจึงไม่ส่งผลต่อโครงร่างสามมิติโดยรวมของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส นอกจากนี้ พบว่า การนำลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ได้จากการทดลองมาสร้างเป็นโมเดลนั้น ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อโครงร่างสามมิติของเอนไซม์ เนื่องจาก โครงร่างสามมิติของเอนไซม์ ยังคงมี homology กับโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส ที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนแบบสมบูรณ์ในฐานข้อมูล เมื่อพิจารณาถึงการการทำ model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งจากภาพที่ 32ข-37ข พบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโน histidine (His) glutamic acid (Glu) และ tyrosine (Tyr) เกิดการซ้อนทับกันพอดีในโครงร่างสามมิติ ในขณะที่กรดอะมิโน aspartic acid (Asp) จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ไม่สามารถซ้อนทับได้พอดีกับกรดอะมิโน aspartic acid จากโครงร่างสามมิติอื่น ๆ เมื่อพิจารณาข้อมูลจากการทำ secondary structure alignment จึงพบว่า การที่กรดอะมิโน aspartic acid จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 เกิดการเรียงตัวแตกต่างไปจากโครงร่างสามมิติอื่น ๆ เนื่องจาก กรดอะมิโน aspartic acid นั้น อยู่บนโครงสร้างที่เป็น α -helix (ตารางที่ 17) ในขณะที่กรดอะมิโน aspartic acid ในโครงร่างสามมิติอื่น ๆ ที่นำมาเปรียบเทียบนั้น อยู่บน loop ดังนั้น จึงทำให้กรดอะมิโน aspartic acid จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 ไม่สามารถซ้อนทับได้พอดีกับกรดอะมิโน aspartic acid อื่น ๆ ที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้นในบริเวณเร่งดังกล่าว ไม่ได้ส่งผลให้โครงร่างสามมิติจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 เปลี่ยนแปลงไปแต่อย่างใด เนื่องจากผลของ model fit จากโครงร่างสามมิติดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้น ยังคงมี homology ต่อกัน



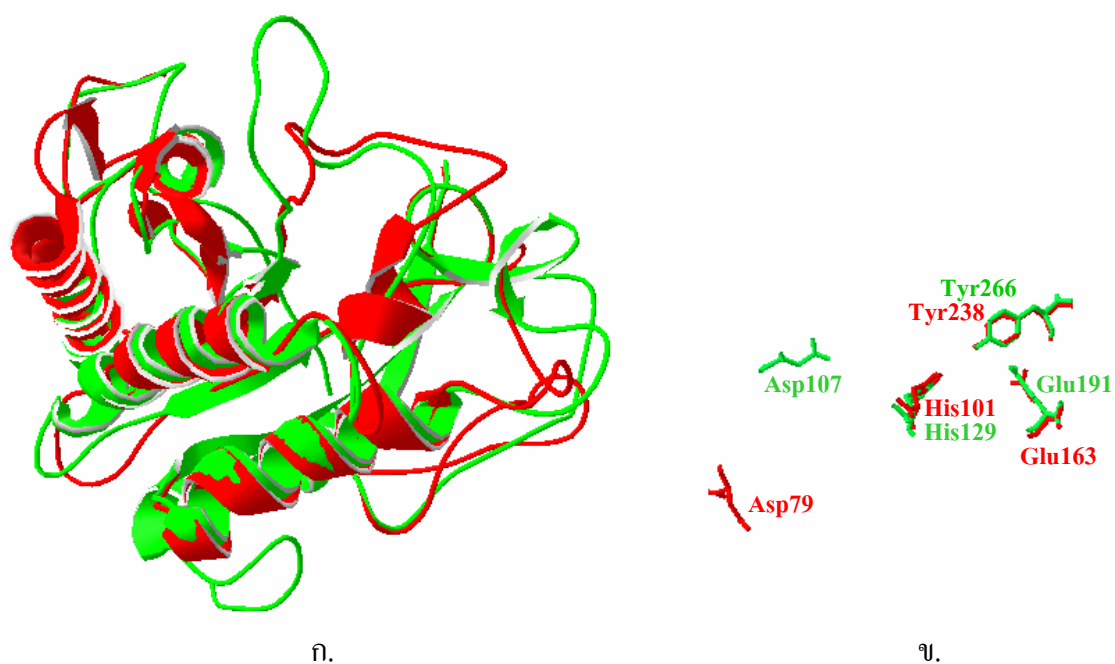
ภาพที่ 32 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

ก. model fit ของโครงสร้างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* NT6.7



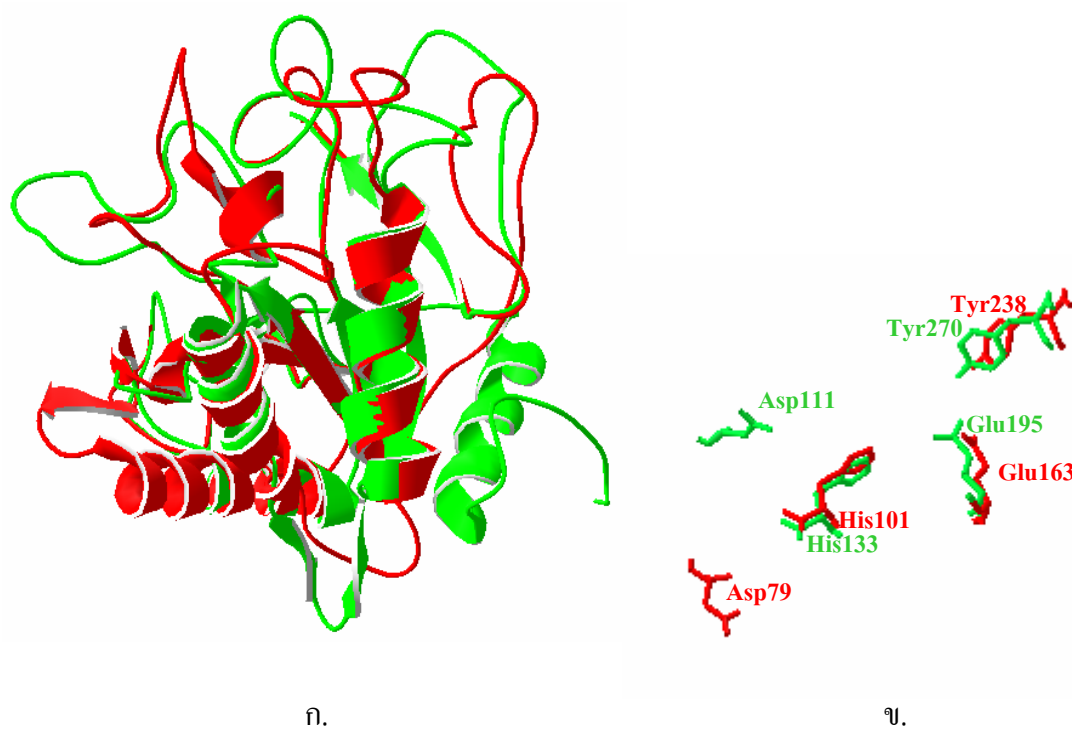
ภาพที่ 33 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1)

ก. model fit ของโครงร่างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. subtilis* A33



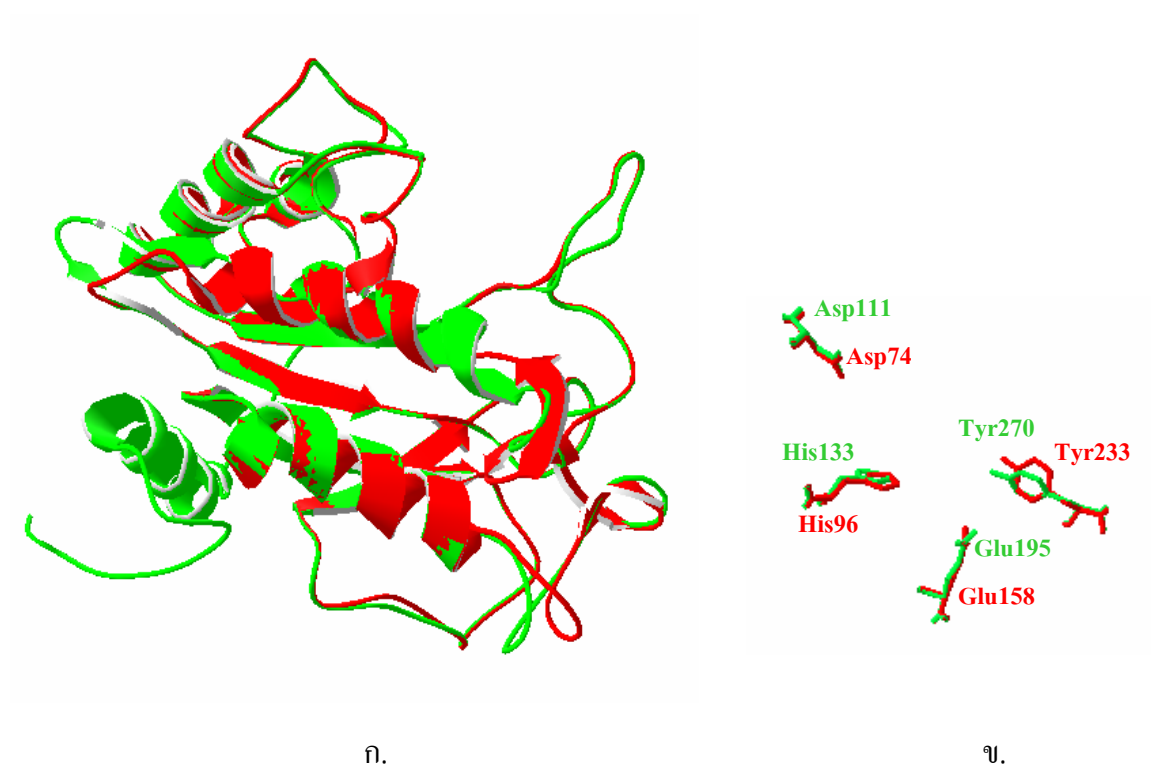
ภาพที่ 34 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* G1 (ABC61374.1)

ก. model fit ของโครงร่างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* G1



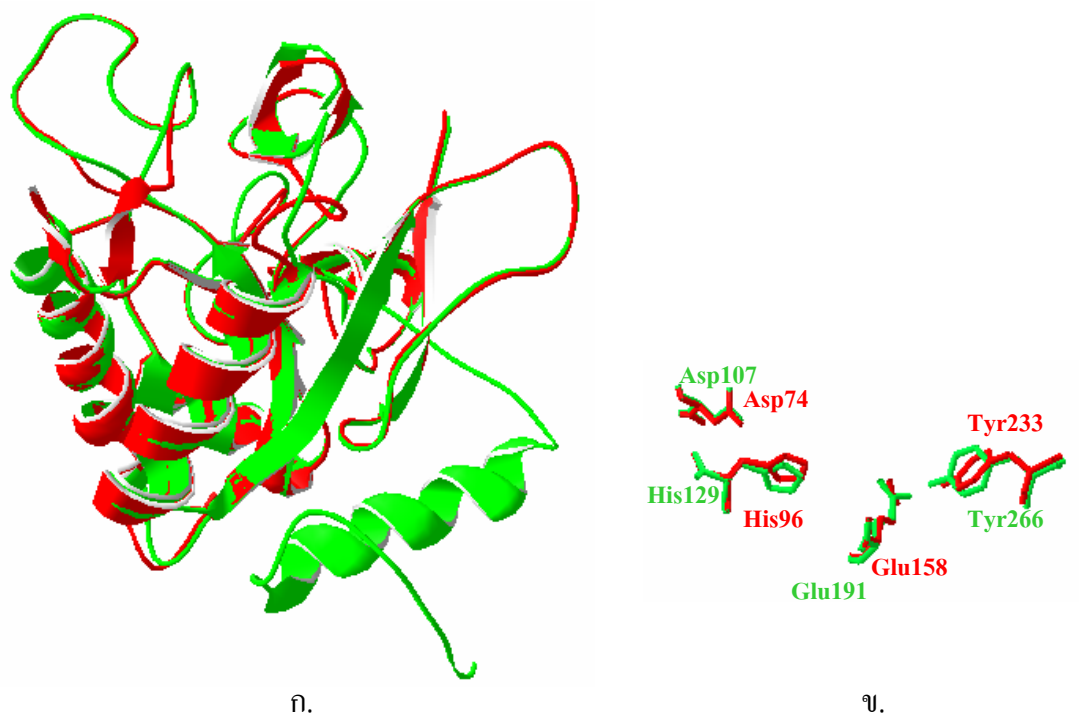
ภาพที่ 35 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. circulans* NT6.7 และ *B. circulans* G1 (ABC61374.1)

ก. model fit ของโครงร่างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* NT6.7

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* G1



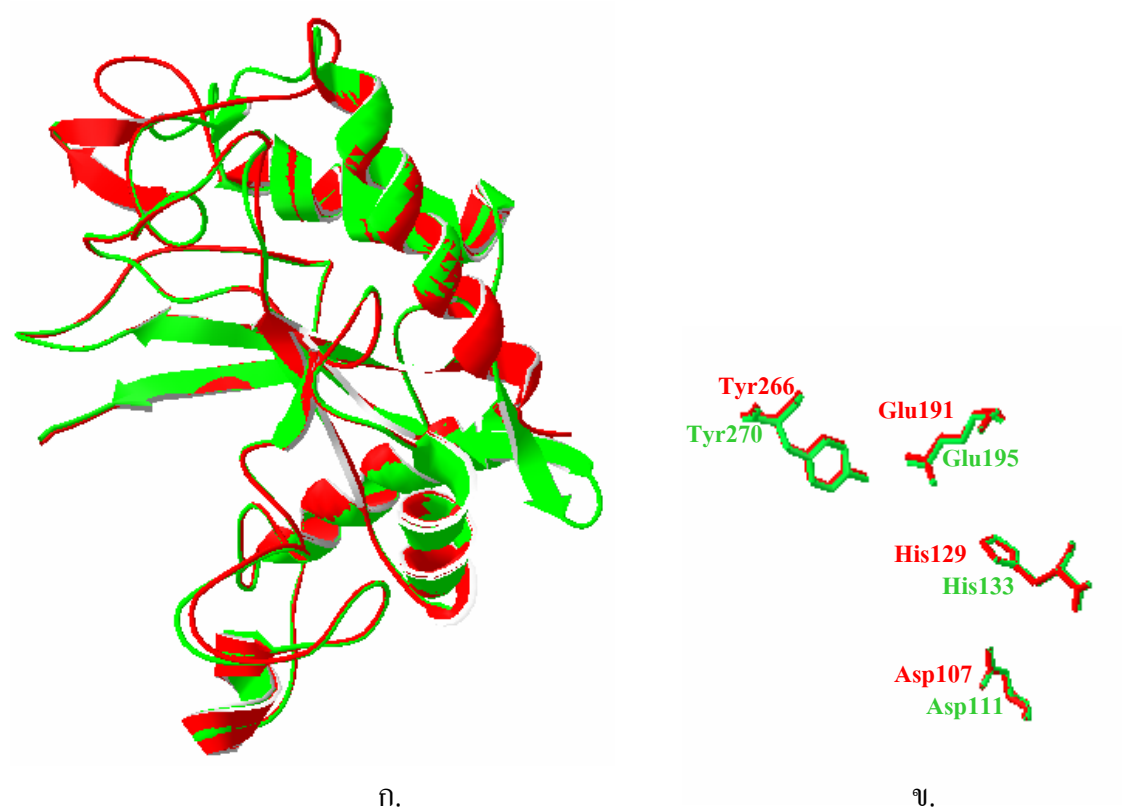
ภาพที่ 36 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. circulans* NT6.7 และ *B. circulans* A33
(ABB91433.1)

ก. model fit ของโครงสร้างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* NT6.7

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* A33



ภาพที่ 37 ผลจากการทำ model fit ระหว่าง *B. circulans* A33 (ABB91433.1) และ *B. circulans* G1 (ABC61374.1)

ก. model fit ของโครงร่างสามมิติ

ข. model fit ของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่ง

กำหนดให้ สีแดง คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* A33

สีเขียว คือ โมเดล และกรดอะมิโนของ *B. circulans* G1

จากการที่เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 อยู่ใน GH26 และตระกูล GH-A นั้น ทำให้ทราบถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ว่าเป็นแบบ retention คือ มีกรดอะมิโนที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัว ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และ nucleophile ในการสลายพันธะไกลโคซิดิก เมื่อพิจารณาถึงกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 พบกรดอะมิโนที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 ตัว ได้แก่ Asp79 และ Glu163 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ Asp74 และ Glu191 ใน *B. circulans* NT6.7 ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ Glu121 และ Glu212 จาก template 1odz ซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Cellvibrio japonicus* ที่ใช้อ้างอิงในการหาบริเวณเร่ง สอดคล้องกับการทดลองของ David *et al.* (1996) ที่ได้ศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (MANA) จาก *Pseudomonas fluorescens* ssp. *cellulosa* โดยการศึกษาบริเวณเร่งด้วยการทำ Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) พบว่ามีเรซิดิวของกรดอะมิโน glutamic acid และ aspartic acid ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับเอนไซม์ใน GH26 ทั้งหมดที่ถูกนำมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ HCA ยังพบว่าเอนไซม์ใน GH26 มีความสัมพันธ์กับตระกูล GH-A ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบ $(\beta/\alpha)_8$ – barrel

กรดอะมิโน Glu212 จาก template 1odz ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิก (Michael *et al.*, 2003) เมื่อพิจารณาคำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีหมู่คาร์บอกซิลในบริเวณเร่งของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ที่ตรงกับตำแหน่งของกรดอะมิโน Glu212 จาก template 1odz พบกรดอะมิโน Glu163 และ Glu158 ตามลำดับ จึงคาดว่า กรดอะมิโน Glu163 และ Glu158 มีความสำคัญโดยทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hogg *et al.* (2001) ที่ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (Man26A) จาก *Pseudomonas cellulosa* (*Cellvibrio japonicus*) โดยการทำ X-ray crystallography มีค่า resolution เท่ากับ 1.85 Å ซึ่งพบว่า Glu212 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst ในการสลายพันธะไกลโคซิดิกเช่นเดียวกัน

กรดอะมิโน Glu320 ที่พบใน template 1odz ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile นั้น ไม่ตรงกับตำแหน่งของกรดอะมิโนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เนื่องจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ถูกสร้างเป็นโมเดลของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้นสั้นกว่าใน template 1odz จึงไม่พบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ตรงกับ Glu320 ของ template 1odz แต่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีหมู่คาร์บอกซิลที่พบภายในบริเวณที่ถูกใช้สร้างโมเดลของ template 1odz ที่ตรงกับตำแหน่งของกรดอะมิโนจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans*

NT6.7 ได้แก่ Glu121 (Asp79 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ Asp74 ใน *B. circulans* NT6.7) ซึ่งพบว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน GH26 ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI รวมถึงเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้น เกิดการ mutate ไปเป็นกรดอะมิโน aspartic acid ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อ *Bacillus* จะเลือกใช้รหัส (codon preference) ของกรดอะมิโน aspartic acid ที่ตำแหน่งนี้ มากกว่ากรดอะมิโน glutamic acid ดังนั้น จึงคาดว่ากรดอะมิโน Asp79 จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ Asp74 จาก *B. circulans* NT6.7 มีความสำคัญโดยทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ (Hogg *et al.*, 2001) ที่พบว่า กรดอะมิโน aspartic acid สามารถทำหน้าที่เป็น nucleophile แทนกรดอะมิโน glutamic acid ได้

สำหรับตำแหน่งของกรดอะมิโน His143 จาก template 1odz ซึ่งตรงกับกรดอะมิโน His101 และ His96 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ พบว่า His143 เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserved) สำหรับเอนไซม์ใน GH26 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจับกับสารตั้งต้นทั้งที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ subsite -2 ผ่านทางพันธะไฮโดรเจนระหว่างวงแหวน imidazole และหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาล (Hogg *et al.*, 2001) ดังนั้น คาดว่ากรดอะมิโน His101 และ His96 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 มีหน้าที่ในการจับกับสารตั้งต้นที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ส่วนตำแหน่งของกรดอะมิโน Tyr285 จาก template 1odz ซึ่งตรงกับกรดอะมิโน Tyr238 และ Tyr233 มีความสำคัญในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Asp79 และ Asp74 ที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ (Hogg *et al.*, 2001) ที่พบว่ากรดอะมิโน Tyr285 มีหน้าที่ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Glu320 ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile ในปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการจับกับสารตั้งต้นที่ตำแหน่ง subsite -1 และยังสามารถทดลองของ Nours *et al.* (2005) ที่พบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโน Tyr248 จากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Cellulomonas fimi* (Tyr285 ใน *Cellvibrio japonicus*) มีหน้าที่ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Glu285 ที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile

จากการทำ homology modeling เพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ทำให้สามารถบอกถึงความแตกต่างในระดับโมเลกุลระหว่างเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ว่ามีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งในตำแหน่งของ nucleophile บนโครงสร้างสามมิติที่ต่างกัน

โดยกรดอะมิโน aspartic acid ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 นั้นอยู่บนโครงสร้างที่เป็น α -helix ในขณะที่กรดอะมิโน aspartic acid จาก *B. circulans* NT6.7 อยู่บนโครงสร้างที่เป็น loop และยังพบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็น nucleophile ของ *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 นั้น มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนที่เป็น nucleophile ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จากแหล่งอื่นๆ โดยเกิดการ mutate ไปเป็นกรดอะมิโน aspartic acid ในขณะที่กรดอะมิโนที่เป็น nucleophile ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จากแหล่งอื่นๆ เป็น glutamic acid ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวเพื่อศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ต่อไป

สรุป

การตรวจสอบชนิด และคุณสมบัติของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 โดยการโคลนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกละออง เมอเรส พบจีนดีเอ็นเอที่มีขนาด 786 และ 771 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าจีนดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลน เป็นลำดับเบสบางส่วน ของยีนเบต้า-แมนนาเนส ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (EC 3.2.1.78) ซึ่งจัดอยู่ใน GH26 ตระกูล GH-A มีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนบางส่วน เท่ากับ 45.8 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการทำ PCR walking เพื่อหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน ทางด้านปลาย 5' และ 3' พบว่า ไม่สามารถหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ได้

การทำ homology modeling เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ด้วยการจำลอง และวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบกรดอะมิโนที่คาดว่าเป็นบริเวณเร่ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ กรดอะมิโน Asp79, His101, Glu163 และ Tyr238 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และกรดอะมิโน Asp74, His96, Glu158 และ Tyr233 ใน *B. circulans* NT6.7 โดยกรดอะมิโน Aspartic acid (Asp79 และ Asp74) ทำหน้าที่เป็น nucleophile ร่วมกับกรดอะมิโน Glutamic acid (Glu163 และ Glu158) ที่ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst โดยมีกรดอะมิโน Histidine (His101 และ His96) ทำหน้าที่จับกับสารตั้งต้นที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ และกรดอะมิโน Tyrosine (Tyr238 และ Tyr233) ทำหน้าที่ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ nucleophile ในปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิก เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนน ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 เพื่อพิสูจน์ว่า โครงสร้างสามมิติที่ได้จากการวิจัย มีความสัมพันธ์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส นำไปสู่การประยุกต์ใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล. 2550. เอกสารประกอบคำบรรยาย **Workshop Advanced Protein Modelling and Protein Drug Design**. ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชมพูนุท พรเจริญพ. 2549. การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์จากพะยูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ทรัพย์มณีคุณ. 2549. ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ. เทคนิควิจัยปริญญาตรี, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เขวาลักษณ์ พุจิตรกานนท์. 2548. คุณลักษณะของยีน *cry1* ที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนจาก *Bacillus thuringiensis* JC 590. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วสันต์ จันทราพิศย์และวีระพงษ์ อุลิตานนท์. 2544. ชีวสารสนเทศศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

สิทธิรักษ์ รอยตระกูล. 2549. เอกสารประกอบคำบรรยาย **Workshop on Protein Bioinformatics**. ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Accelrys. 2002. คู่มือการใช้โปรแกรม **Discovery Studio ViewerPro**. San Diego. Accelrys Inc, San Diego, California.

Ademark, P., A. Varge, J. Medve, V. Harjunpaa, T. Drakenberg, F. Tjerneld and H. Stalbrand. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzyme from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. **J. Biotechnol.** 63: 199-210.

- Ademark, P., R. P. de Vries., P. Hagglund and J. Visser. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding a β -mannosidase involved in galactomannan degradation. **Eur. J. Biochem.** 268: 2982-2990.
- Aduse-Opoku, J., L. Tao., J. Ferretti and R. R. B. Russell. 1991. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* α -galactosidase. **J. Gen. Microbiol.** 137: 757-764.
- Akino, T., N. Nakamura and K. Horikoshi. 1998. Characterization of β -mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Biol. Chem.** 52: 1459-1464.
- Alkhatat. A. H., S. A. Kraemer, J. R. Leipprandt., M. Macek., W. J. Kleijer and K. H. Friderici. 1998. Human β -mannosidase cDNA characterization and first identification of mutation associated with human β -mannosidases. **Hum. Mol. Genet.** 7: 75-83.
- Balaji, S., K. Rangaswamy and E. J. Santhosh. 2006. PIR pairwise alignment-A slip up for signal peptides. **Bioinformatics.** 1(5): 188-193.
- Balasubramaniam, K. 1976. Polysaccharides of the kernel of maturing and mature coconuts. **J. Food Sci.** 41: 1370-1373.
- Behr Winfried. 2003. **Dietetic and pharmaceutical raw materials: Konjac mannan.** Available Source: <http://www.behrobonn.com/literat/konjacmb.html>, December 19, 2006.
- Birnboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7: 1513-1523.
- Bradner, J. R., R. K. Sidhu., M. Gillings and K. M. H. Nevalainen. 1999. Hemicellulose activity of Antarctic microfungi. **J. Appl. Microbiol.** 87: 366-370.

- Cann, I.K.O., S. Kocherginskaya., M.R. King., B.A. White and R.I. Mackie. 1999. Molecular cloning, sequencing and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. **J. Bacteriol.** 181: 1643-1651.
- Chaplin, M. 2005. **Water structural and behavior: locust bean gum**. Available Source: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html>, February 29, 2005.
- Carl, S. R. and W. G. Stephen. 2000. Glycosidase mechanisms. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 4: 573-580.
- Chen, H., J. R. Leieprandt, C. E. Traviss, B. T. Sopher, M. Z. Jones, K. T. Cavanagh and K. H. Friderici. 1995. Molecular cloning and characterization of bovine β -mannosidase. **J. Biol. Chem.** 270: 3841-3848.
- Civas, A., R. Eberhard., P. Le Dizet and F. Petek. 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamari* secreted 2-D-galactosidase and β -D-mannanase. **Biochem. J.** 219: 857-863.
- David, N. B., H. Neil, V. Richard, L. H. Jeremy, H. P. Geoffery, H. Bernard, B. L. Kerynne and G. J. Harry. 1996. Mannanase A from *Pseudomonas fluorescens* spp. *cellulose* is a retaining glycosyl hydrolase in which E212 and E320 are the putative catalytic residues. **Biochemistry.** 35: 16195-16204.
- Deborah, H., P. Gavin., D. Paul., G. Florence., M.M. Susana., A. Sylvie and J.G. Harry. 2003. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. **Biochem. J.** 371: 1027-1043.
- De Vries, R. P., H. C. van den Broeck., E. Decker., P. Manzanares., L. H. de Graaff and J. Visser. 1999. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2453-2460.

- Dey, P. M., S. Patel and M. D. Brouwnleader. 1998. Induction of α -galactosidase in *Pennicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 361-371.
- Ethier, N., G. Talbot and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(11): 4428-4432.
- Ferreira., H. M. and Filho. E.X.F. 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydr Polymers.** 57: 23-29.
- Fridjonsson, O., H. Watlawick., A. Gehweiler., T. Rohrhirsch and R. Matter. 1999. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α -galactosidase from *Thermus Brockianus* ITI360. **App. Environ. Microbiol.** 65: 3955-3963.
- Gibbs, M. D., D. J. Saul., E. Luthi and P. L. Bergquist. 1992. The β -mannanase from "*Caldocellum saccharolyticum*" is part of a multidomain enzyme. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3864-3867.
- Goldstein, A. M., E. N. Alter and J. K. Seaman. 1973. Guar gum. **Ind. Gums.** Academic press: 303-321.
- Golubev, M. M. and K. N. Neustroev. 1993. Crystallization of α -galactosidase from *Trichoderma reesei*. **J. Mol. Biol.** 231: 933-934.
- Gubitz, G. M., M. Hayn., M. Sommerauer and W. Steiner. 1996. Mannan-degradation enzymes from *Scleertium rolfii* : characterization and synergism of two endo- β -mannanase and a β -mannosidase. **Bioresour. Technol.** 58: 127-135.
- Hagglund, P. 2002. **Mannan-hydrolysis by hemicellulases enzyme-polysaccharide interaction of a modular β -mannanase.** Doctoral thesis, Lund University Sweden.

- Halstead, J. R., M. P. fransen., R. Y. Eberhart., A. J. Park., H. J. Gibert and G. P. Hazlewood.
2000. α -galactosidase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. Cellulose. Cloning high level expression and its role on galactomannan hydrolysis. **FEMS Microbiol. Lett.** 192: 197-203.
- Hardy, B. 2003. **Maintenance of intestinal health is key to performance and profit.**
Available Source: <http://www.nutrivisioninc.com/intesthealth>, December 3, 2006.
- Hart, D. O., S. He., C. J. Chany., S. G. Wither., P. F. G. Sims., M. L. Sinnott and H. Brumer.
2000. Identification of Asp-130 as the catalytic nucleophile in the main α -galactosidase from *Phanerocheate chrysosporium* a family 27 glycosyl hydrolase. **Biochemistry.** 39: 9826-9836.
- Harwood., C. R. and S. M. Cutting. 1990. **Molecular Biological Methods for *Bacillus*.** Acorn Bookwork, Salisbury, Wiltshire, Great Britain.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280: 309-316.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 293: 781-788.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.** 316: 695-696.
- Henrissat, B., I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn, J. P. Mornon and G. Davies. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.** 92: 7090-7094.
- Henrissat, B. and G. Davies. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 7(5): 637-644.

- Hilge, M., S. M. Gloor., W. Ryphiewski., O. Sauer., T.D. Heightman., W. Zimmermann., K. Winterhalter and K. Piontek. 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable β -mannanase from *Thermomonospora fusca* – substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. **Structure**. 6: 1433-1444.
- Hogg, D. E. J. Woo., D. N. Bolam., V. A. McKie., H. J. Gibert and R. W. Pickersgill. 2001. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding. **J. Biol. Chem.** 276: 31186-31192.
- Hossain, M. Z., J. Abe. And S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. **Enzyme. Microbial. Technol.** 18: 95-98.
- Jorgensen, H., T. Eriksson., J. Borjesson., F. Tjerneld and L. Olsson. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 851-861.
- Juhasz, T., Z. Szengyel., K. Rezey., M. Siika-Aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulose and hemicellulase produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process. Biochem.** Available Source: <http://www.elsevier.com/locate/procbio>, March 3, 2005.
- Kim, K. S., T. G. Lilburn, M. J. Renner and J. A. Breznak. 1998. *arfI* and *arfII*, Two genes encoding α -L-arabinofuranosidases in *Cytophaga xylanolytica*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1919-1923.
- Kitano, H. 2002. Computational systems biology. **Nature**. 420: 206-210.
- Lin., T. C. and C. Chen. 2004. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. **Process. Biochem.** 32: 1103-1109.

- Lin, M. and Y. Li. 1995. **PCR genome walking identifies a genetic locus comprising two heat shock genes (*hsIV* and *hsIU*) from *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjobovis.**
Available Source: <http://www.Springerling.com/app/home/contribution.asp>, March 31, 2005.
- Lin, X., D. W. Kelemen, E. S. Miller and J. C. H. Shih. 1995. Nucleotide Sequence and Expression of *KerA*, the Gene Encoding a Keratinolytic Protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1469-1474.
- Liu, Y. G., N. Mitsukawa, T. Oosumi and R.F. Whittier. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **Plant J.** 8: 457-463.
- Luonteri, E., E. Alatalo., M. Siika-aho., M. Penttila and M. Tenkanen. 1998. α -galactosidase of *Penicillium simplicissimum* : production, purification and characterization of the gene encoding AGL1. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 28: 179-188.
- Ma, Y., Y. Xue., Y. Dou., Z. Xu., W. Tao and P. Zhou. 2004. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. **Extremophiles.** 8: 447-454.
- Madden, T. L. 2002. **The BLAST sequence analysis tool.** Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15215342>, May 19, 2004.
- Manzanres, P., L. H. de Graaff and J. Visser. 1998. Characterization of galactosidase from *Aspergillus niger* : purification of novel α -galactosidase activity. **Enzyme Microb. Technol.** 22: 383-390.
- Margolles. Clark, E., M. Tenkanen., E. Luonteri and M. Penttila. 1996. Three α -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. **Eur. J. Biochem.** 240: 104-111.

- McCutchen, C. M., G. D. Duffaud, P. Leduc, A. R. H. Peterson, A. Tayal., S. A. Khan and R. M. Kelly. 1996. Characterization of extremely thermostable enzymatic breaker (α -1,6-galactosidase and β -1,4-mannanase) from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. **Biotechnol. Bioeng.** 52: 332-339.
- Mendoza, N. S., N. Arai, K. Sugimoto, M. Ueda, T. kawaguchi and L. M. Josen. 1995. Cloning and sequencing of β -mannanase from *Bacillus subtilis* NM-39. **Biochem. Biophys. Acta.** 1243: 552-554.
- Meier, H. and Reid, J. S. G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. **Encyclopaedia of Plant Physiology**, New Series. 13A: 418-471.
- Michael, J., S. Dominik, R. Antony and J. Warren. 2003. Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides. **Chem. Commun.** 1327-1329.
- Mullis, K. B. 1990. **The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction.** Available Source: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/PCR.html>, January 31, 2005
- Nours, L. J., A. Lars, S. Dominik, S. Henrik and L. L. Leila. 2005. **Biochemistry.** 44: 12700-12708.
- NRC (National Research Council). 1998. **Nutrient Requirements of Poultry**, 9 th. National Academy press, Washington, USA. 155P.
- Ochman, H., A. S. Gerber and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. **Genetics.** 120: 621-623.

- Oda, Y., T. Komaki and Tonomura. 1993. Purification and properties of extracellular β -mannanase produced by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed konjak. **J. Ferment. Bioeng.** 76: 14-18.
- Ooi, T. and D. Kikuchi. 1995. Purification and some properties of β -mannanase from *Bacillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 310-314.
- Park, G. G., I. Knaskabe., Y. Komatsu., H. Kobayashi., T. Yasui and K. Murakami. 1987. Purification and some properties of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum*. **Agric. Biol. Chem.** 51: 2709-2716.
- Paul, K. C. and J.I. Rood. 1997. The resolvase/invertase domain of the site-specific recombinase TnpX Is functional and recognizes a target sequence that resembles the junction of the circular form of the *Clostridium perfringens* transposon Tn4451. **J. Bacteriol.** 16: 5148-5156.
- Phothichitto, K. 2006. **Isolation and Characterization of mannanase producing microorganism.** Master degree thesis, Kasetsart University.
- Puchart, V. P. Katapodis., P. Biely., L. kremnický., P. Christakopoulos., M. Vrsanska., D. Kekos., B. J. Macris and M. K. Bhat. 1999. Production of xylanases, mannanases and pectinase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 355-361.
- Rol, F. 1973. Locust bean gum. **Industrial gums.** Academic Press: 323-327.
- Rosenthal, A., R. M. Mackinnon and D. S. Jones. 1991. PCR walking from microdissection clone M54 identifies three exons from the human gene for the neural cell division molecule L1 (CAM-L1). **Nucleic Acids Res.** 19: 5395-5401.

- Sachslehner, A., B. Nidetzky, K. D. Kulbe and D. Haltrich. 1998. Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 594-600.
- Sachslehner, A., G. Foidl, G. Gubitz and D. Haltrich. 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanase of *Sclerotium rolfsii*. **J. Biotechnol.** 80: 127-134.
- Sachslehner, A. and D. Haltrich. 1999. Purification and some properties of a thermostable acidic endo- β -1,4-D mannanase from *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. **FEMS. Microbiol. Lett.** 117: 47-55.
- Sambrook, J and D. Russel. 1989. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Setati, M. E., P. Ademark., W. H. Van Zyl., B. Hann. Hagerdal and H. Stabrand. 2001. Expression of the *Aspergillus auleatus* endo β -1,4-mannanase encoding gene (man.1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. **Prot. Exp. Purif.** 21: 105-114.
- Shibuya, H., H. Nagasaki., S. kaneko., S. Yoshida., G. G. Park., I. Kusakabe and H. Kobayashi. 1998. Cloning and high-level expression of α -galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4489-4494.
- Singh, S. B. Pillay. V. Dilsook and B. A. Prior. 2000. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. **J. Appl. Microbiol.** 88: 975-982.
- Slonim, DK. 2003. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. **Nat. Genet.** 32: 502-508.

- Stalbrand, H., M. Siika-aho., M. Tenkanen and L. Viikari. 1993. Purification and characterization of two β -mannanase from *Trichoderma reesei*. **J. Biotechnol.** 29: 229-242.
- Stoll, D., H. Stalbrand and R. A. J. Warran. 1999. Mannan degrading enzyme from *Cellulomonas fimi*. **App. Environ. Microbiol.** 65: 2598-2605.
- Sundu, B., A. Kumer and J. Dingle. 2006. Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes. **Int. J. Poultry. Sci.** 5(1): 13-18.
- Surzycki, S. 1999. **Basic Techniques in Molecular Biology.** Springer, New York. 166p.
- Takada, G., T. Kawaguchi., T. Kaga., J. Sumitani and M. Arai. 1999. Cloning and sequencing of β -mannosidase gene from *Aspergillus aculeatus* no. F-50. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63: 206-209.
- Takahashi, R., I. Kusakabe., H. Kobayashi., K. Murakami., A. Maekawa and T. Suzuki. 1984. Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp. **Agric. Biol. Chem.** 48: 2189-2195.
- Talbot, G., and J. Sygusch. 1999. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56(11): 3505-3510.
- Tip, A., A. Moroz and J. M. Combes. 2000. Band structure of absorptive photonic crystals. **J. Phys. A: Math. Gen.** 33: 6223-6252.
- Van den Broek, L. A. M. J. Ton., JC. Verdoes., K. M. J. Van Laere., A. G. J. Voragen and G. Beldman. 1999. Synthesis of α -galacto-oligosaccharides by a cloned α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. **Biotechnol. Lett.** 21: 441-445.

- Xu., B. P. Hagglund., H. Stalbrand and J. C. Janson. 2002. Endo- β -1,4-mannanase from blue mussel, *Mytilus edulis* : purification, characterization and mode of action. **J. biotechnol.** 92: 267-277.
- Yamaura, I., T. Matsumoto., M. Funatu and Y. Funatu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4- β -D mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. **Agri. Biol. Chem.** 54: 2454-2427.
- Yanhe, M., X. Yanfen., D. Yuetan., X. Zhenghing., T. Wenyi and Z. Peijin. 2004. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. **Extremophiles.** 8: 447-454.
- Zakaria, M. M., S. Yamamoto and T. Yagi. 1998. Purification and characterization of an endo-1,4- β -D mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. **FEMS. Microbiol. Lett.** 158: 25-31.
- Zeilinger, S., D. Kristufek., I. Arisan-Atac., R. Kodits and C. P. Kubicek. 1993. Condition of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1347-1353.
- Zhang, Q., X. Yan and W. Tang. 2005. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. **Molecular Biology.** 40: 368-374.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Bacto-yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 7.5 โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (ในกรณีที่เป็นการเลี้ยงเชื้อแข็งให้เติมวุ้น 1.5% ของปริมาณอาหาร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ SOB

Bacto-tryptone	20.0	กรัม
Bacto-yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	0.50	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC คืออาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยเติมสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อ

สารเคมี

1. สารเคมีในการสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ

Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 M NaCl

2. สารเคมีในการสกัดพลาสมิด

2.1 TSE buffer: 1mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl และ 10mM EDTA

2.2 TE buffer: 10mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1mM EDTA

2.3 Solution A: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA และ 50mM NaCl, 20% (w/v) sucrose

2.4 Solution B: 0.2mM NaOH และ 1% (w/v) SDS

2.5 Solution C: 5M potassium acetate และ glacial acetic acid

ภาคผนวก ข

เทคนิคทางชีวโมเลกุล

1. การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต โดยทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อปริมาตรรวม 300 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrometer (Bio Aqariust) แล้วคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ตามสูตร

$$\text{ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{ค่าความเจือจาง}$$

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ loading dye ความเข้มข้น 6 เท่า แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอ ด้วย 0.8% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์คงที่ 50 โวลต์ หรือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที และ 40 นาที ตามลำดับ ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่ง จะเห็นแถบเรืองแสงเมื่ออยู่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากเครื่อง UV-transilluminator (Vilber Lourmat) แล้วบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพ

2. การโคลนยีน

2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ pure PCR NucleoSpin kit (Macherey Nagel)

ขั้นแรกปรับปริมาตรดีเอ็นเอให้มากกว่า 50 ไมโครลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ TE pH 7.5 จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ NT2 ปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงไปในหลอด Nucleospin แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้ง นำ Nucleospin ส่วนบน วางบนหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Elution buffer NE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy Vector (บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้สารเคมีและปริมาณสารเคมีในปฏิกิริยาการเชื่อมต่องานแสดงในตารางผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 สารเคมีและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (pGEM-T Easy Vector)

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5.0
pGEM-T Easy Vector	1.0
PCR product (purified)	3.0
Control insert DNA	-
T4 DNA ligase (3 weiss units/ μ l)	1.0
Sterilized deionized water	-
ปริมาณรวม	10.0

นำปฏิกิริยาที่ทำการผสมแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ

2.3 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell)

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride method) โดยทำการเชื้อ *Escherichia coli* DH5 α จำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าข้ามคืน (12-15 ชั่วโมง) สภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นดูดสารละลายเชื้อ *E. coli* DH5 α ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนเซลล์เจริญถึงช่วง log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ 0.3-0.4 จึงถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4272 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเท

ส่วนใส่ทิ้ง เติมน้ำละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ที่เย็นจำนวน 1/2 ปริมาตรหรือ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเซลล์คอมพิเทนท์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4272 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง เติมน้ำละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ 1/10 ปริมาตร หรือ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกันทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแบ่งเซลล์คอมพิเทนท์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 210 ไมโครลิตร ในกรณีที่ต้องการเก็บไว้ให้เติมน้ำกลีเซอรอล (glycerol) ให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเซลล์คอมพิเทนท์ จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

2.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยเติมดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในเซลล์คอมพิเทนท์ปริมาตร 50 ไมโคร ลิตร ผสมเบา ๆ วางบนน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำไปปรับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45-50 วินาที (ในสภาพนิ่ง) หลังจากนั้น นำมาวางบนน้ำแข็ง 2 นาที เติมน้ำละลาย SOC ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมน้ำละลาย SOC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) และสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalactoside (X-GAL) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

2.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ทำการสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดอย่างรวดเร็วทำโดยเก็บโคโลนีสีขาวหรือโคโลนีสีฟ้าอ่อน โดยชุดเซลล์ใส่ในหลอด microtube ที่มีน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ไมโคร ลิตร พันพาราฟิล์ม แล้วต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที (จนกว่าจะใช้) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือไพรเมอร์ Sp6: 5'-ATTAGG

TGACACTATAGAATAC-3' และไพรเมอร์ T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG CG-3'

สำหรับสารเคมีและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แสดงดังตารางผนวกที่ ข2

ตารางผนวกที่ ข2 สารเคมี และปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อการ
ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10x Mg ²⁺ free buffer	2.5
10 mM dNTPs	0.5
50kM MgCl ₂	0.5
5 pmol/μl primer Sp6	3.0
5 pmol/μl primer T7	3.0
Sterilized deionized H ₂ O	10.0
pGEM-T Easy Vector + PCR product	5.0
2U/μl DyNazyme TM II DNA Polymerase	0.5
ปริมาตรรวม	25.0

ทำการผสมสารเคมีต่าง ๆ โดยปิเปต จากนั้นทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycle (T-gradient, Biometra) โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมื่อดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล

3. สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR walking

3.1 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' (5'-walking)

3.1.1 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ด้วยคู่ไพรเมอร์ FP1 และ R1NT6.3 ได้แก่ ขั้นที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 39.7 องศาเซลเซียส เวลา

1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 34 รอบ และขั้นที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ชนิด 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, Lithuania)

3.1.2 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ด้วยคู่ไพรเมอร์ FP1 และ R1NT6.7 ได้แก่ ขั้นที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 47.3 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 34 รอบ และขั้นที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ชนิด 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, Lithuania)

3.1.3 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ด้วยคู่ไพรเมอร์ RAPD analysis primer 1 - RAPD analysis primer 6 และ R1NT6.3/R1NT6.7 ได้แก่ ขั้นที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 44 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ชนิด 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, Lithuania)

3.2 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' (3'-walking)

3.2.1 สภาวะที่ใช้ในการหาลำดับเบสทางด้านปลาย 3' ด้วยคู่ไพรเมอร์ BMF และ RAPD analysis primer 1 - RAPD analysis primer 6 ได้แก่ ขั้นที่ 1 denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 44 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้ด้วยอะกาโรสเจล

อิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)

ชนิด 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, Lithuania)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลจากการทดลอง


```

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      --MMLIWMQGWKSILVAI LACVSWGGGLP----SPRAATGFYVNGTKLY 43
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      MGVFLVILRFWLI AFVAFLLMFSWTCQLTN---KAHAASGFYVSCTKLL 46
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      ---MIYLMNGFRKIFSITLSLLLSSILFVSGTSTANANS GFYVSGTTL 47
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      ---MDQMKRRLQLFGTLVVLVLFVYSGC----SAYAQNGFHVSGTELL 42
      :           :           :           :           :
      :           :           :           :           :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      DSTGKAFVMRGVNHPTWYKNDLNAAIPALAQTGANTVRVVL SNGSQWTK 93
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      DATGQP FVMRGVNHHTWYKDQLSTAIPALARTGANTIRIVLANCHRWTL 96
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      DANGNP FVMRGVNHCHAWYKDQATTAIRGIANTDANTI RIVLSDCGQWTK 97
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      DRNGDPYVFMRGVNHCHSWFRQDLERAIPALARTGANTVRMVLSNGCQWTK 92
      * . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      DDLSNVNSIISLVSQHQMIAVL EVDHATGCD EYASLEAAVDYWISIKCAL 143
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      DDVNTVMNLTLC EQNKLIAVL EVDHATGCD SLSDLDNAWNYWIGIKSAL 146
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      DDIQTVRNLI SLAEENNLVAVL EVDHATGCD SIASLNRAVDYWIEMPSAL 147
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      DDASELARVLAAT ETYCLTTVL EVDHATGCD PADLEKAVDYWIEMADVL 142
      ** . . : : : . : : : : : : : : : : : : : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      ICKEDRVIINIANEWYCNWNSSGWADCYKQAI PKLRNAGIKNTLIVDAAG 193
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      ICKEDRVIINIANEWYCTWDCVAMANGYKQAI PKLRNAGLTHLIVDSAG 196
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      ICKEDTVIINIANEWYCSWEGAAWADCYKQAI PLRLNAGLNHTLMVDAAG 197
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      KCTEDRVIINIANEWYCSWRSDVWAEAYAQAI PLRSAGLSHTLMVDAAG 192
      * . ** * : : : : : * . . : : : * : : : : : * : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      WCQYYPQSIWDEGA AVFASDQLKNTVFSI HMYEYAGDAATVKTNMDDVLN 243
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      WCQYYPDSVKNYCTEVLNADPLKNTVFSI HMYEYAGDASTVKSNMIDGVLN 246
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      WCQFPQSIHDFGREVFNADPQRNTMFSI HMYEYAGDNASQVRTNIDRVLN 247
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      WCQYPASIERGADVFA SDPLKNTMFSI HMYEYAGADRATLAYNIDRVLA 242
      *** : * : : * : : : : : : : : : : : : : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      KGLPLIIGEFQGYHQGADVDEIAIMKYGQKQEVGWLAWSWYGNSP EIMDL 293
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      KMLALIIGEFQGHITNCDVDEATIMSYSQERGVGWLAWSWKENSDDLAYL 296
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      QDLALVIGIEFGHPTNCDVDEATIMSYSQERGVGWLAWSWKENGCP EWEYL 297
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      ENLAVGIGIEFGHSHHD CDVDEDAILAYTAERGVGWLAWSWYGNSSGGEYL 292
      : . : : : : * . . : : : : : : : : : : : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      DLAACPSCGN-LTGWGNTV VHCIDGIQQT SRKAGIY----- 327
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      DMTNDWAGNSLTSFCNTV VNGSNGIRATSVLSCIFGCVTPTSSPTSTPTS 346
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      DLSNDWAGNNLTAWGNTI VNGFPYGLRET SRLSTVFTGCGSDG----- 339
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      DLAEGPSCGP-LTSWCKRIVYGENGLKSD----- 319
      * : : . : * . : : : : : * : : : : : : : : : :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      -----
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      TPTSTPTPTSPSPGNNGTILYDFETGTQGWSGNNISGCPWVTNEWKA 396
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      -----CTSPTTLYDFEESTQGWTCSSLSGCPWALT EWSS 373
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      -----
      . . . : . . . : . . . : . . . : . . . :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      -----
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      TGAQTLKADVSLQSNS THSLYITSNQNL SGRKSLKATVRHANWGNIGNGI 446
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      KGNHSLKADIQLSNS QHYLHVIENTSLQSSRIQATVRHANWGNVGNM 423
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      -----
      . . : . : . : : : . . . : . : : : : : . : . . .

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      -----
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      YAKLYVKTCSGWTWYDSCENLIQSNDCITLTL SLSGISNLSVKEIGWRF 496
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      TARLYVKTGHGYTWYSGSFVP INCGSCTLSLDLSNVQNL SQVREMGVQF 473
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      -----
      : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . :

gi|62549367|gb|AAK87002.1|      -----
gi|3090434|dbj|BAA25878.1|      RASSNSSGQSAIYVDSVSLQ 516
gi|44888804|gb|AAS48170.1|      QSSNSSGQTSIFYDNVIVE 493
gi|47933806|gb|AAT39478.1|      -----
      : : : : : : : . . .

```

ภาพผนวกที่ ๒ ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ MR และ MR จากบริเวณ consensus sequence ของการ

ทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW (1.83)

กำหนดให้ บริเวณสีเหลือง คือ ไพรเมอร์ MF

บริเวณสีเขียว คือ ไพรเมอร์ MR

```

NT6.3      33      FGG YSDVTFSMTE ENRLKNTTGQ S--PAIYGCD --YGRGWLET
NT6.7      30      GYSHDTFSMA EA.RIR.A.G QSPAITYGCDY ARGWLETAKI EDSIDV----
               .  . *  *  *  .  .  .  .  .

NT6.3      33      hhh hh      sss s  ssshhh      sss sss
NT6.7      30      ... ..h      ...

NT6.3      72      AEITDTIDYS CNSSLISYWK SGGLPQVSLH LANPA----- -FPSGNYKTA
NT6.7      76      ----- . .GD..... N..I..I... ..FQSGH FKTPITNDQY
               *  **  *****  .**_.**_.***  *****

NT6.3      72      hhhhhhh hhhhhhhhhh h  sssss
NT6.7      76      ..... .  .....s

NT6.3      116     ISNSQYKNIL DPSTVEGKRL EALLSKIADG LTQLKNQCVT VLFRLPLHEMN
NT6.7      117     ---KKILDSS TA-EGKR-- N.M..... .QE.E....P .....
               .  .  *  .**_.***  *  . *  ****  *****

NT6.3      116     hhhhh      hhh hhhhhhhhhh
NT6.7      117     sss      sss .....h hh      ssss

NT6.3      166     GEWFWWGLTG --YNQKDNER ISLYKELYKK IYRYMTETRG LDNLLWVYS-
NT6.7      161     .....S YNQRDNE-- . . . . . Q . . . . . H . . . D . . . H . I . . . P
               ***** .  . . .  *  *****  .***_.***  .**_.**_.***

NT6.3      166     hhhhhh hhhhhhhh
NT6.7      161     sss      sss ..... ..... ssssssss

NT6.3      213     ----PDANRD FKTDFFPGSS YVDITGLDAY
NT6.7      209     DANRDFKTDf -----...A. ....V..... -
               ***. *  ****  *****

NT6.3      213     sssss -
NT6.7      209

```

ภาพผนวกที่ ค3 การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7

กำหนดให้ h คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ α -helix

s คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ β -strand

```

NT6.3      33      FGGYSD
ABB91433   26      TVYPVNPNAQ QTTKDIMNWL AHLPNRSENR VMSCAFGCYS DVTFSMTEEN
.

NT6.3
ABB91433      hhhhhhhh hhhhhhhh

NT6.3      39      VTFSMTEENR LKNTTGQ--S PAIYGCD--Y GRGWLETAEI TDTIDYSCNS
ABB91433   76      RLKNA.GQSP AIYGCDYGRG WLETADITDT IDYS----- ***
. * .. . .

NT6.3      hhhhh      sss s sssshhh s ss sss hhhhhhhhhh
ABB91433   .....h      ...      ..

NT6.3      85      SLISYWKSGG LPQVSLHLAN PAF-----P SCGYRTAISN SQYKNILDPS
ABB91433   113     ..... PSCGYKT AISNSQY--- KNI--LDPS-
***** ***** *** . .

NT6.3      hhhhhhhh sssss hhhhh
ABB91433   ..... s

NT6.3      129     TVEGKRLEAL LSKIADGL-T QLRNQGVTVL FRPLHEMNCE WFWWGLT--G
ABB91433   157     .....TQ LKNQ-..... GYN
***** ***** . *****

NT6.3      hhhhhh hhhhhh
ABB91433   h..... ..... hhhh      ss ss      sss s

NT6.3      176     YNQKDNERIS LYKELYKIIY RYMTETRGLD NLLWVYSPDA NRDFKTDYFP
ABB91433   206     QKDNER--.. *****
..... ** *****

NT6.3      hhhhhhhh hhhhhh
ABB91433   ss      ..... ssssssss

NT6.3      226     GSSYVDITGL DAY
ABB91433   254     ..... -
***** ***

NT6.3
ABB91433      ssss s -

```

ภาพผนวกที่ ๑๔ การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. subtilis* A33 (ABB91433.1)

กำหนดให้ h คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ α -helix

s คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ β -strand

```

NT6.3      33      FGGYSD
ABC61374   30      TVSPVNPNAQ QTTKAVMNWL AHLPNRTENR VLSCAFGCYS HDTFSMAEA.
                                     . . *

NT6.3
ABC61374      hhhhhhh hhhhhhh

NT6.3      39      VTFSMTEENR LKNITTCQ--S PAIYGCD--Y GRCWLETAEI TDTIDYSCNS
ABC61374   80      RIR.A.GQSP AIYGC DYARG WLETAKIEDS IDVS----- .G
                  * * . . . . . **

NT6.3      hhhh      sss s ssshhh s ss sss hhhhhhhhhh
ABC61374   .hhh      . . . . .

NT6.3      85      SLISYWKSCG LPQVSLHLAN PAF-----P SCNYKTAISM SQYKNILDPS
ABC61374   117     D.....N.. I..I..... . . . . . QSGHFKT PITNDQYK-- -KILDSS--
                  ***** ** . ** . ***** *** .

NT6.3      hhhhhhhh sssss hhhhh
ABC61374   . . . . . . . . . . s

NT6.3      129     TVECKRLEAL LSKIA DGLTQ LKN--QGVTV LFRPLHEMNG EWFWWGLT--
ABC61374   161     .A.....N.M . . . . . --L QELEN...P. . . . . . . . . . SY
                  * ***** * . ***** * * *****

NT6.3      hhhhhh hhhhhh
ABC61374   h. . . . . . . . . . s ss sss s sss

NT6.3      175     GYNQKDNERI SLYKELYKRI YRYMTETRGL DNLLWVY--- --SPDANRDF
ABC61374   209     NQKDNE--.. . . . . Q. . . . . .H...D... .H.I...SPD ANRDFKTDYF
                  . . . . . ** ***** * . ** . ***** * . ** .

NT6.3      hhhhhhhh hhhhhhhh
ABC61374   . . . . . . . . . . sssssssss

NT6.3      220     KTDFYPGSSY V DITGLDAY
ABC61374   257     -----..A.. . . . . V. . . . . -
                  ** ** *** *****

NT6.3
ABC61374      sssss -

```

ภาพผนวกที่ ๕ การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ

B. amyloliquefaciens NT6.3 และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1)

กำหนดให้ h คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ α -helix

s คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ β -strand

```

NT6.7      30
ABC61374   30      TVSPVNPNAQ QTTKAVMNWL AHLPMRTENR VLSGAF.GYS HDTF.....
                                     *          *****

NT6.7
ABC61374      hhhhhhh hhhhhhh

NT6.7      43      RIRSATGQSP AIYGCDYARG WLETAKIEDS IDVSCNGDLI SYWKNGGIPQ
ABC61374   80      .....
                  *****

NT6.7      hhhhhh      sss      hhhhh hhhhh      ss
ABC61374   .....      ...      .....

NT6.7      93      ISLHLANPAF QSGHFKTPIT NDQYKKILDS STAECK--RL NAMLSKIADG
ABC61374   130     .....
                  *****

NT6.7      sss      ss s sss      hhhhhhhhhh
ABC61374   ...      h      hhhh .....

NT6.7      141     LQELNQGVF VLFRLHEMN GEWFVWGLTS YNQPDNERIS LYKQLYKKIY
ABC61374   178     .....
                  *****

NT6.7      hh      ssss      sss      sss      hhhhhhhh
ABC61374   sss      sss      ....

NT6.7      191     HYMTDTRGLD HLIWVYSPDA NRDFKTDFFP GASVVDIVGL DAY
ABC61374   228     .....
                  *****

NT6.7      hhhhhh      sssssssss      ssss s
ABC61374   .....      .....

```

ภาพผนวกที่ ๑๖ การทำ secondary structure alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ *B. circulans*

NT6.7 และ *B. subtilis* G1 (ABC61374.1)

กำหนดให้ h คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ α -helix

s คือโครงสร้างระดับที่ 2 ของโปรตีน แบบ β -strand

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุภา สกุดศิริรัตน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 17 กันยายน 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ ในวารสารระดับชาติ และนานาชาติ (พ.ศ. 2549)