รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2562

ชื่อแผนงานวิจัย วิจัยพัฒนาระบบการผลิตพืชเพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

ชื่อโครงการวิจัย ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ผลิตเอ็นไซม์ Cellulase และ Chitinase ที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย

(ภาษาอังกฤษ) The potential study of cellulase and chitinase-producing microorganisms isolated from the areas affected by climate change around the Pai River.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวภรณี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคติเนส จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย บนอาหารสูตรคัดเลือกที่มีเซลลูโลส และไคตินเป็นองค์ประกอบ ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ การเกิดวงใสรอบโคโลนี และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท 2CMC-1.1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี นำมาทำการโคลนยีน cellulase สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน cellulase ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน endoglucanase gene ของเชื้อ *Bacillus velezensis* (Accession no. KY427020.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ ทำการแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน cellulase family glycosylhydrolase (*Bacillus*) (Accession No. WP_025851060.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ cellulase ที่ได้มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน การโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* ไอโซเลท 1Ch 2.4 ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,103 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน chitinase type II gene ของเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* (Accession no. MN597082.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ สามารถแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน

chitinase (*Paenibacillus* sp.) (Accession No. WP_095290735.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ได้มีขนาดประมาณ 74 กิโลดาลตัน

คำสำคัญ เซลลูเลส ไคติเนส รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ จุลินทรีย์

รหัสการทดลอง **03-26-60-01-02-00-03-60**
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Patumthani, 12110, Thailand

Abstract

Cellulase and Chitinase-producing microorganisms isolated around the Pai river on the selection media containing cellulose and chitin compounds were identified. Enzyme activity detection, clear zone formation around the colony and reducing sugar content analysis were detected produced by the *Bacillus velezensis* 2CMC-1.1 isolate. The isolate was identified as the best cellulase-producing isolate. The 1,500 bp full-length gene of *B. velezensis* isolate 2CMC-1.1 cellulase gene was obtained by PCR. The cellulase gene sequence comparison with the nucleotide database in GanBank showed sequence similarity to *B. velezensis* endoglcanase gene (GenBank accession number KY427020.1) at 99% identity. The amino acid sequence showed similarity to *B. velezensis* cellulase family glycosylhydrolase (*Bacillus*) (GenBank accession number WP_025851060.1) at 99% identity. For the expression analysis at the protein level, a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) system for the analysis of recombinant cellulase molecular weight is approximately 55 kDa. The 2,103 bp full-length chitinase gene of *Paenibacillus xylanilyticus* isolate 1Ch 2.4 was obtained by gene cloning. The chitinase gene sequence comparison with the nucleotide database in GanBank showed sequence similarity to *P. xylanilyticus* chitinase type II gene (GenBank accession number Accession no. MN597082.1) at 98% identity. The amino acid sequence showed similarity to *B. velezensis* chitinase (*Paenibacillus* sp.) (GenBank accession number WP_095290735.1) at 98% identity. For the expression analysis by SDS-PAGE system for the analysis of recombinant chitinase molecular weight is approximately 74 kDa.

Key word: cellulose, chitinase, recombinant enzyme, microorganisms

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (Climate change) สาเหตุหลักเกิดมาจากสภาวะโลกร้อน (Global warming) ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม เกิดภัยธรรมชาติที่รุนแรงมากขึ้น และส่งผลกระทบโดยตรงต่อภาคการเกษตร ทำให้ศักยภาพในการผลิตลดลง เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการทางสรีระวิทยาของพืช รวมถึงการระบาดของโรคและแมลงศัตรู สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปยังส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของแหล่งที่อยู่อาศัย ชนิด และประชากรของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตร จุลินทรีย์บางชนิด/สายพันธุ์ อาจมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ นอกจากนี้การทำเขตกรรม และการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังส่งผลทำให้จุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ cellulase (เซลลูเลส) และ chitinase (ไคติเนส) บริเวณลุ่มน้ำปาย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคติเนส ซึ่งเป็นชนิด/สายพันธุ์ที่ผ่านการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มศักยภาพการผลิตพืช และยังเป็นแนวทางในการใช้เอนไซม์เซลลูเลส และ ไคติเนส (Ridout *et al.,* 1988 ; Millati *et al*., 2005) ในการย่อยสลายและเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้จำพวกเซลลูโลส (เปลือกหรือแกนสับปะรด ทลายปาล์ม น้ำกากส่าจากโรงงานสุรา เศษไม้ขี้เลื่อยจากโรงงานทำไม้ ของเสียจากโรงงานทำกระดาษ ของเหลือใช้หลังจากการเก็บเกี่ยว เช่น กากถั่วเหลือง ฟางข้าว รำข้าว ชานอ้อย ขี้เลื่อย ซังและเปลือกข้าวโพด) และของเหลือทิ้งไคติน (เปลือกกุ้ง และกระดองปูที่มีจำนวนมากจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ) ให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆต่อไป โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส อาทิเช่น *Geobacillus pallidus* *G. debilis* (Lynd *et al*., 2002) *Bacillus subtilis* (Koide *et al*., 1986) เอนไซม์ไคติเนส พบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. และ *Bacillus sterothermophilus* (Ueda and Arai, 1992) เป็นต้น ซึ่งนับเป็นการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสารประกอบเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ให้สามารถกลับมาใช้ประโยชน์ได้คุ้มค่ามากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส ในสภาพพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย และการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคติเนส จากจุลินทรีย์ในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
10. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit ® (RBC Bioscience)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α, BL21(DE)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific)
19. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
20. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
    - ไพรเมอร์ 16S rDNA : 27F (forward), 1492R (reverse)
    - ไพรเมอร์ยีน Cel_eglS_F 5’ ATGAAACGGTCAATTTCTATTTTTATTACGTGTTTATTG 3’
      Cel_eglS_R 5’ CTAATTGGGTTCTGTTCCCCAAATCAGTTTTCCTTGATG 3’
      Chi2_F 5’ ATGTCATATAAAGCCAAACCCATGGATTTCAA 3’
      Chi2_R 5’ TTACGGTTGAAGCTGCCACAATGCAGCCACATTG 3’
    - ไพรเมอร์ T&A Cloninng vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
    - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse
21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

- โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
- โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment *จาก* http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
- โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
- โปรแกรม CromasPro version 1.33 จาก http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
- โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/

22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้แก่ YA medium, Nutrient agar (NA), Luria-Bertani (LB), LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

วิธีการ

1. การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ Cellulase และ Chitinase จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย

เก็บตัวอย่างดินจากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย จำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ พื้นที่ป่าปลายน้ำ พื้นที่เกษตรปลายน้ำ พื้นที่เกษตรต้นน้ำ และ พื้นที่ป่าธรรมชาติต้นน้ำบ้านแม่นะ ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ Cellulase บนอาหาร Cellulose Congo red Agar เอนไซม์ Chitinase บนอาหาร Chitin Selective Agar (Gomez *et al*., 2004) โดยใช้เทคนิค dilution spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ Cellulase

- การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ Cellulase โดยวิธี bioassay plate technique

ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย จำนวนทั้ง 4 แหล่ง นำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ Cellulase โดยการเลี้ยงกระตุ้นในอาหารเหลว enrichment medium ที่มีเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารแข็ง Screening medium ซึ่งมี CMC-Na เป็นองค์ประกอบ เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมด้วยสีย้อม congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1M NaCl ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บันทึกผลการเกิดปฏิกิริยาโดยการสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี

- การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS method)

เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยนำเชื้อที่ใช้ศึกษามาเลี้ยงในอาหาร NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ มาวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วจึงปรับค่า $O.D._{600}$ = 1 เพื่อเตรียมเป็นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันทุกไอโซเลท และเติมเชื้อตั้งต้น 300 ไมโครลิตร ($O.D._{600}$ = 1) ลงในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบ/นาที นาน 72 ชั่วโมง ดูดน้ำใสส่วนบน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่

ลงในหลอดทดลอง ตรวจเช็คปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS reagent (DNS 10 กรัม, โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร, โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต 300 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร) ทดสอบปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS reagent 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5-8 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นจึงนำไปวัดหาค่าน้ำตาลรีดิวซิงค์ เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

1.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ Chitinase

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ Chitinase ด้วยวิธี bioassay plate technique โดยการเตรียมเชื้อตั้งต้น โดยนำเชื้อที่ใช้ศึกษามาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายเชื้อมาวัดการเจริญเติบโตด้วย เครื่อง spectrophotometer แล้วจึงปรับค่า $O.D._{600}$ = 1 เพื่อเตรียมเป็นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันทุกไอโซเลท ดูดสารละลายเชื้อ (cell suspension) ตั้งต้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (∅) 5 มิลลิเมตร ที่วางบนอาหาร Chitin Selective Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง บันทึกผลประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ Chitinase โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) แต่ละไอโซเลท

1.3 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

1.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในข้อ 1 โดยการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH_2O) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว160 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE Buffer 2 ครั้ง เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก 15 นาที เติม 2 เท่า CTAB (บ่ม 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่ม 65 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ผสมทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ปั่นหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 700 ไมโครลิตร) เติม 0.6 เท่า ของ isoproponol และ 0.1 volume ของ 3 M NaOAC ผสมเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ระเหยแอลกอฮอล์ที่ตกค้างในหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เติม TE + RNase 15 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ $OD_{260/280}$ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์

Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แช่แผ่นเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

1.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16s rDNA โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

โดยใช้ universal primer (Lane, 1991; Alm *et al*., 1996)

Forward 27F 5’ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3’

Reverse 1492R 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 1492R (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร,Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

1.3.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 3.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol

ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

1.3.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ 16s rDNA

1.3.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

1.3.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 3.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

1.3.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

1.3.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1.3.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI ต่อไป

2. การโคลนยีน และการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน

2.1 การโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ Cellulase (endoglucanase gene)

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที นาน 2-4 วัน นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ มาวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่า $O.D._{600}$ เท่ากับ 1 ดูดเชื้อไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวที่มี CMC-Na เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยใช้เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ อาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที นาน 3-5 วัน สังเกตจนอาหารมีลักษณะใสขึ้นและนำอาหารเหลวไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ นำเชื้อที่เลี้ยงใน Flask ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนที่ได้เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1

2.1.2 การเพิ่มปริมาณ endoglucanase gene จาก genomic DNA โดยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ endoglucanase gene ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์

Cel_eglS_F (forward) 5’ ATGAAACGGTCAATTTCTATTTTTATTACGTGTTTATTG 3’

Cel_eglS_R (reverse) 5’ CTAATTGGGTTCTGTTCCCCAAATCAGTTTTCCTTGATG 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (forward) (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (reverse) (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 40 รอบ
62 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (∞)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

2.1.3 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลนยีน

ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือจาก 2.1.2 มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 1,500 คู่เบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดถ่ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,245 คู่เบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Cloning vector

นำชิ้นยีนซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 4.1.3 มาทำการเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector โดยใช้ชุด T&A Cloning Kit (RBC Bioscience)

Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product	2	ไมโครลิตร
ddH_2O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ทันที นำ ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.5 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

เตรียมอาหารแข็ง LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal โดยเตรียมอาหาร LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) ที่มีสารปฏิชีวนะ amplicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB- Amplicilin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน14-16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีน cellulase ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม amplicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

2.1.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เก็บตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงไว้ จากข้อ 2.1.5 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.7 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของ endoglucanase gene เข้ากับ Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

2.1.8 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) เข้าไปเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6) เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

2.1.9 การตรวจสอบการปรากฏของยีนใน aLICator LIC Cloning and Expression system

การตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’

LIC Reverse 5’ GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ

58 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 3 นาที

72 องศาเซลเซียส 5 นาที

4 องศาเซลเซียส infinity (α)

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.10 การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน

กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 3 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน บันทึกผลการการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

2.2 การโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ Chitinase (chitinase gene)

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีน chitinase โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin เป็นองค์ประกอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 180 รอบ/นาที m นาน 3-5 วัน นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนที่ได้แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน chitinase จาก genomic DNA โดยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน chitinase ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์

Chi2_F 5’ ATGTCATATAAAGCCAAACCCATGGATTTCAA 3’

Chi2_R 5’ TTACGGTTGAAGCTGCCACAATGCAGCCACATTG 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (forward) (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (reverse) (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 40 รอบ
62 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (∞)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

2.2.3 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลนยีน

ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit นำผลผลิต PCR ที่เหลือจาก 2.2.2 มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis เตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,245 คู่เบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน chitinase เข้ากับ PCR Cloning vector

นำดีเอ็นเอของยีน chitinase ซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 4.2.3 มาเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector (RBC Bioscience)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product (จากข้อ 2.2.3)	2	ไมโครลิตร
ddH_2O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์ *E. coli* ทันที นำปฏิกริยา ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.5 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

เตรียมอาหารแข็ง LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal เช่นเดียวกับข้อ 2.1.5 จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ competent cell ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB-Ampicillin /IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 14-16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

2.2.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

2.2.7 การตรวจสอบการปรากฏของยีน chitinase ใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.2.6 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13-R 5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-F (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-R (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร

ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ และเก็บผลผลิต PCR ที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.8 การเชื่อมต่อชิ้นยีน chitinase เข้ากับ Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน chitinase (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

2.2.9 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) เข้าไปเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2.5) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2.6) เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

2.2.10 การตรวจสอบการปรากฏของยีนใน aLICator LIC Cloning and Expression system

การตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’

LIC Reverse 5’ GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.11 การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน chitinase มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร

10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร 3 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ตรวจดูปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

3. การทดสอบกิจกรรมของ Recombinant enzymes โดยวิธี Bioassay technique

เตรียมอาหารที่มีเซลลูโลส และไคติน เป็นองค์ประกอบ (100 มิลลิลิตร : เซลลูโลส/ไคติน 0.5 กรัม, agar 2 กรัม และน้ำกลั่น) เทลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร เจาะรูบนอาหารโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เก็บอาหารไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมใช้ทดสอบต่อไป ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNA ในอาหาร LB-Ampicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ลิตร ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG นาน 6 ชั่วโมง (ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1) เก็บตะกอนเซลล์โดยนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (หลังจากนี้วางบนน้ำแข็งทุกขั้นตอน) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Lysis buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง sonicator แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใส (crude enzyme) มาทำการทดสอบโดยดูด crude enzyme ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วหยดลงในอาหารอาหารวุ้นที่มีเซลลูโลส/ไคตินเป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อย ไคตินของเอนไซม์ chitinase โดยสังเกตจากการเกิดวงใส (clear zone) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารที่มีเซลลูโลส ตรวจสอบโดยการเททับด้วยสารละลาย congo red วางทิ้งไว้ 15 นาที ล้างสีส่วนเกิน สังเกตดูการเกิดวงใส (clear zone)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2562 **รวม 3 ปี**

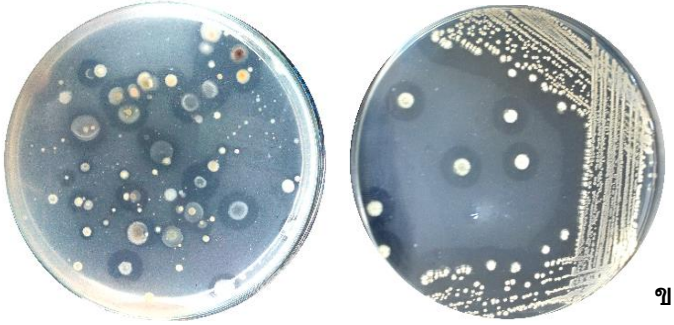
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ Cellulase และ Chitinase จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย

จากการดำเนินการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสจากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย จำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ พื้นที่ป่าปลายน้ำ พื้นที่เกษตรปลายน้ำ พื้นที่เกษตรต้นน้ำ และ พื้นที่ป่าธรรมชาติต้นน้ำ บ้านแม่นะ ในช่วงฤดูกาลต่างๆ พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส บนอาหาร selective medium ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส และไคติน ดังภาพที่ 1 โดยสามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 296 ไอโซเลท แบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 198 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 98 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1

ก



ข

ภาพที่ 1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสของเชื้อจุลินทรีย์ โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ ก.) อาหารสังเคราะห์ที่มี cellulose เป็นองค์ประกอบ ข.) อาหารสังเคราะห์ที่มี chitin เป็นองค์ประกอบ

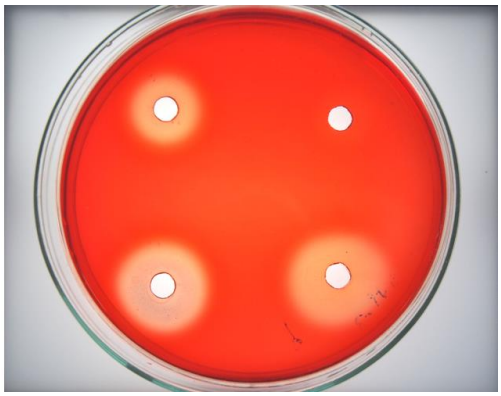
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย จำนวน 4 แหล่ง

สถานที่เก็บ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	
	Chitin medium	CMC medium
ป่าปลายน้ำ	20	43
พื้นที่เกษตรปลายน้ำ	23	43
พื้นที่เกษตรต้นน้ำ	29	56
ป่าธรรมชาติต้นน้ำ	26	56

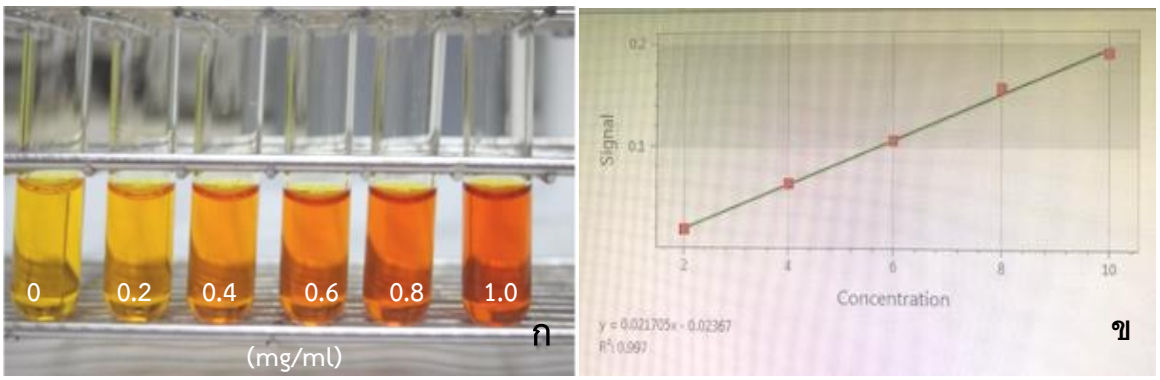
รวมทั้งสิ้น	98	198

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ Cellulase

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหาร selective medium ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ จำนวนทั้งสิ้น 198 ไอโซเลท เมื่อนำมาทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ Cellulase ได้ดี โดยการนำมาทดสอบเลี้ยงกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว enrichment medium แล้วนำส่วนใส (supernatant) มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ Cellulase บนอาหาร Screening medium ที่มี CMC-Na 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง พบว่า สามารถคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี ดังภาพที่ 2 โดยให้ผลของปฏิกิริยาการเกิดวงใสรอบโคโลนี ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง >20 มิลลิเมตร จำนวน 20 ไอโซเลท และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS method) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 3 ก, ข ตารางที่ 2 พบว่า ไอโซเลท 2CMC-1.1 ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง เกิดวงใสรอบโคโลนี และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดีที่สุด เท่ากับ 0.6380 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ ให้ผลของปฏิกิริยาการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มีเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 ก. ปริมาณสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml ตามลำดับ

ข. กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการสกัดสารพันธุกรรมแล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16S ribosomal DNA เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ NCBI พบว่า เชื้อไอโซเลท 2CMC-1.1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus velezensis*

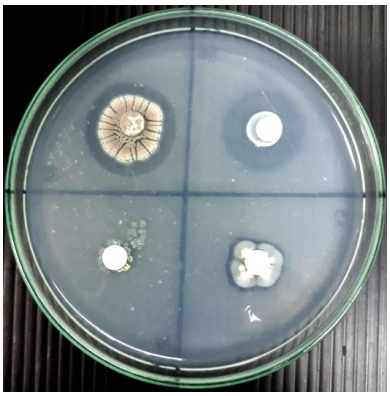
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์จำแนกชนิดโดยเทคนิคชีวโมเลกุล การผลิตเอนไซม์ Cellulase (สร้างวงใส) และค่าการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 20 ไอโซเลท

ไอโซเลท	Genus/ species	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มม.)	Reducing sugar (mg/ml)
1CMC-1.6	*Bacillus cereus*	20	0.5850
2CMC-1.1	*Bacillus velezensis*	23	0.6380
3CMC-2.4	*Bacillus cereus*	20	0.5541
3CMC-2.6	*Lysobacter enzymogenes*	20	0.6191
3CMC-2.7	*Streptomyces*	20	0.5707
3CMC-3.5	*Streptomyces cellostaticus*	20	0.5357
3CMC-4.2	*Bacillus luciferensis*	20	0.5329
4CMC-2.3	*Streptomyces*	20	0.4795
4CMC-2.9	*Duganella nigrescens*	22	0.5361
4CMC-3.5	*Bacillus aryabhattai*	20	0.4970
4CMC-3.7	*Pseudomonas nitroreducens*	20	0.5274
4CMC-3.9	*Pseudomonas fluorescens*	20	0.4325
4CMC-3.13	*Pseudomonas nitroreducens*	23	0.5444
4CMC-3.15	*Bacillus cereus*	20	0.5385
4CMC-3.16	*Streptomyces cinereospinus*	20	0.6061
4CMC-4.3	*Pseudomonas brenneri*	20	0.5265
4CMC-4.14	*Pseudomonas brenneri*	20	0.5458
7CMC-1.2	*Pseudomonas brenneri*	20	0.5140
8CMC-3.4	*Streptomyces griseovariabilis*	20	0.5569
8CMC-3.6	*Streptomyces griseovariabilis*	20	0.5624

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ Chitinase จากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย

การคัดเลือกได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดี จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ จำนวนทั้งสิ้น 98 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี บนอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ > 20 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4 จำนวนทั้งสิ้น 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1Ch 2.4, 3Ch-1.4, 6Ch-2.1, 6Ch-2.2, 6Ch-2.4, 6Ch-3.5 และ 6Ch-4.2 ซึ่ง ไอโซเลท 1Ch 2.4 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ได้ดีที่สุด โดยให้ค่าการสร้างวงใสบนอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบสูงสุด 23 มม. ดังตารางที่ 3

เมื่อนำจุลินทรีย์ไอโซเลท 1Ch 2.4 ไปจำแนกชนิด โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ NCBI พบว่า เชื้อไอโซเลท 1Ch 2.4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus*



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ และให้ผลของปฏิกิริยาการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ หลังจากบ่มให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

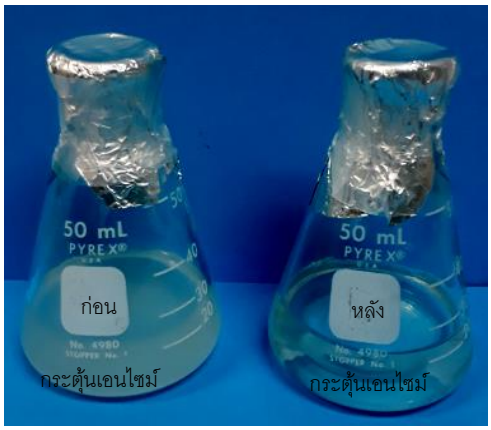
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาการสร้างวงใสบนอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ

ไอโซเลท	Genus/ species	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มม.)
1Ch 2.4	*Paenibacillus xylanilyticus*	23
3Ch-1.4	*Paenibacillus xylanilyticus*	20
6Ch-2.1	*Duganella nigrescens*	22
6Ch-2.2	*Paenibacillus terrigena*	20
6Ch-2.4	*Paenibacillus kobensis*	20
6Ch-3.5	*Streptomyces bambusae*	21
6Ch-4.2	*Cellulosimicrobium cellulans*	20

2. การโคลนยีน และการแสดงออกในระดับโปรตีน

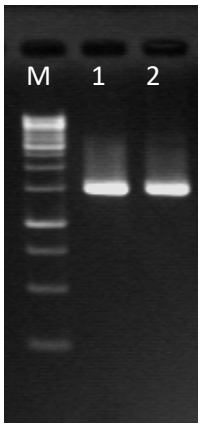
2.1 การโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ Cellulase

การเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวที่มี CMC-Na เพื่อกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ Cellulase เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 180 รอบ/นาที นาน 3-5 วัน จะสามารถสังเกตเห็นอาหารมีลักษณะใสขึ้น เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase ดังภาพที่ 1 เมื่อนำเชื้อที่เลี้ยงใน Flask ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนที่ได้แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 5

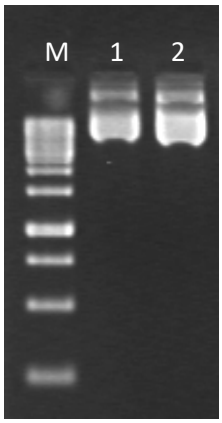


ภาพที่ 5 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase ก่อนและหลังการย่อย Cellulose ของเชื้อจุลินทรีย์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC-Na เป็นองค์ประกอบ นาน 3-5 วัน

การสังเคราะห์ Cellulase gene จาก genomic DNA ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของ Cellulase gene ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp ดังภาพที่ 6 จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีนเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ (T&A cloning vector) และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5α) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีน และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 7 ตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp ดังภาพที่ 8 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ Cellulase gene ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน endoglucanase gene ของเชื้อ *Bacillus velezensis* (Accession no. KY427020.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 9 และเมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน cellulase family glycosylhydrolase [Bacillus] (Accession No. WP_025851060.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 10



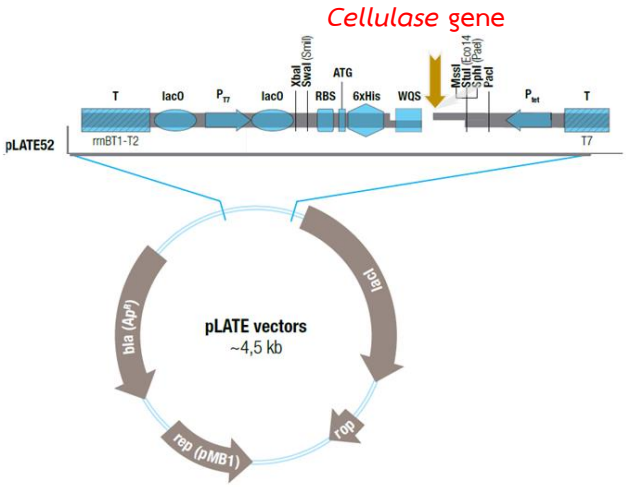
ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR ของยีน Cellulase Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-2; ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp



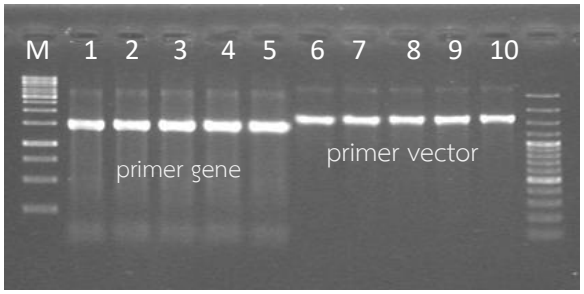
ภาพที่ 7 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ T&A Cloning vector ที่มียีน Cellulase M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-2; พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีน Cellulase ซึ่งได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

การเชื่อมต่อชิ้นยีน cellulase เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน cellulase เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน cellulase ดังภาพที่ 8 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของปลาย 5’ ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน cellulase เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส และสามารถตรวจพบการปรากฏของยีน cellulase ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค PCR ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 8 แผนที่ตำแหน่งของยีน cellulase ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)



ภาพที่ 9 การตรวจสอบการปรากฏของยีน Cellulase ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน Cellulase, Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)

```
Bacillus velezensis strain RS1 endoglucanase (eglS) gene, complete cds
Sequence ID: KY427020.1Length: 1500Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 1499GenBankGraphics Next Match Previous Match
            Alignment statistics for match #1
     Score      Expect   Identities      Gaps      Strand
2675 bits(1448) 0.0    1482/1499(99%) 0/1499(0%) Plus/Plus
Query  1     ATGAAACGGTCAATTTCTATTTTTATTACGTGTTTATTGATTACGGTATTGACAATGGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  1     ATGAAACGGTCAATTTCTATTTTTATTACGTGTTTATTGATTACGGTATTGACAATGGGC  60

Query  61    GGCTTGCAGGCTTCGCCGGCATCTGCAGCAGGGACAAAAACGCCAGCAGCCAAGAATGGA  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  61    GGCTTGCAGGCTTCGCCGGCATCTGCAGCAGGGACAAAAACGCCAGTAGCCAAGAATGGG  120

Query  121   CAGCTTAGCATAAAAGGAACACAGCTCGTAAACCGGGACGGCAAAGCGGTACAATTGAAA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   CAGCTTAGCATAAAAGGAACACAGCTCGTAAACCGGGACGGCAAAGCGGTACAATTGAAA  180

Query  181   GGGATCAGTTCTCATGGATTGCAATGGTATGGCGATTTTGTCAATAAAGACAGCTTAAAA  240
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   GGGATCAGTTCACATGGATTGCAATGGTATGGCGATTTTGTCAATAAAGACAGCTTAAAA  240

Query  241   TGGCTGAGAGACGATTGGGGCATAACCGTTTTCCGCGCGGCGATGTATACCGCAGATGGC  300
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||
Sbjct  241   TGGCTGAGAGACGATTGGGGCATAACCGTTTTCCGCGCGGCGATGTATACGGCAGACGGC  300

Query  301   GGTTATATTGACAACCCTTCCGTGAAAAATAAAGTAAAAGAAGCGGTTGAAGCGGCAAAA  360
             |||||||||||  ||  || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   GGTTATATTGATAATCCGTCCGTGAAAAATAAAGTAAAAGAAGCGGTTGAAGCGGCAAAA  360

Query  361   GAACTTGGGATATATGTCATCATTGACTGGCATATCTTAAATGACGGCAACCCAAACCAA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   GAACTTGGGATATATGTCATCATTGACTGGCATATCTTAAATGACGGCAACCCAAACCAA  420

Query  421   AACAAAGAGAAGGCAAAAGAATTTTTTAAGGAAATGTCAAGTCTTTACGGAAACACGCCA  480
             || ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   AATAAAGAGAAGGCAAAAGATTTTTTTAAGGAAATGTCAAGTCTTTACGGAAACACGCCA  480

Query  481   AACGTCATTTATGAAATTGCAAACGAACCAAACGGTGATGTGAACTGGAAGCGGGATATT  540
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  481   AACGTCATTTATGAAATTGCAAACGAACCAAACGGTGATGTGAACTGGAAGCGTGATATT  540

Query  541   AAACCGTATGCGGAAGAAGTGATTTCCGTTATCCGCAAAAATGATCCAGACAACATCATC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   AAACCGTATGCGGAAGAAGTGATTTCCGTTATCCGCAAAAATGATCCAGACAACATCATC  600

Query  601   ATTGTCGGAACCGGTACATGGAGCCAAGATGTGAATGATGCAGCCGATGATCAGCTAAAA  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   ATTGTCGGAACCGGTACATGGAGCCAAGATGTGAATGATGCAGCCGATGATCAGCTAAAA  660

Query  661   GATGCAAACGTCATGTACGCGCTTCATTTTTATGCCGGCACACACAGCCAATCTTTACGG  720
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  661   GATGCAAACGTCATGTACGCGCTTCATTTTTATGCCGGCACACACGGCCAATCTTTACGG  720

Query  721   GATAAAGCAAACTATGCACTCAGTAAAGGAGCGCCTATTTTCGTGACGGAATGGGGAACA  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   GATAAAGCAAACTATGCACTCAGTAAAGGAGCGCCTATTTTCGTGACGGAATGGGGAACA  780

Query  781   AGCGACGCGTCTGGAAATGGCGGTGTATTCCTTGACCAGTCGCGGGAATGGCTGAATTAT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   AGCGACGCGTCTGGAAATGGCGGTGTATTCCTTGACCAGTCGCGGGAATGGCTGAATTAT  840

Query  841   CTCGACAGCAAGAACATCAGCTGGGTGAACTGGAATCTTTCTGATAAGCAGGAATCATCC  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   CTCGACAGCAAGAACATCAGCTGGGTGAACTGGAATCTTTCTGATAAGCAGGAATCATCC  900
```

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน endoglucanase (eglS) gene ของเชื้อ *Bacillus velezensis* (Accession no. KY427020.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

```
Query  901   TCAGCGTTAAAGCCGGGAGCATCTAAAACAGGCGGCTGGCCGCTTACAGATTTAACTGCT  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  901   TCAGCGTTAAAGCCGGGAGCATCTAAAACAGGCGGCTGGCCGCTTACAAATTTAACTGCT  960

Query  961   TCAGGAACATTCGTAAGAGAAAACATTCTCGGCAACAAAGATTCAACGAAAGAACGCCCT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   TCAGGAACATTCGTAAGAGAAAACATTCTCGGCAACAAAGATTCAACGAAAGAACGCCCT  1020

Query  1021  GAAACGCCAGCACAAGATAACCCCGCACAGGAAAACGGCATTTCTGTACAATACAAAGCA  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GAAACGCCAGCACAAGATAACCCCGCACAGGAAAACGGCATTTCTGTACAATACAAAGCA  1080

Query  1081  GGGGATGGGGGTGTGAACAGCAACCAAATCCGCCCGCAGCTTCACGTAAAAAATAACGGC  1140
             |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  1081  GGGGATGGGGGTGTGAATAGCAACCAAATCCGCCCGCAGCTTCACATAAAAAATAACGGC  1140

Query  1141  AATGCGACGGTTGATTTAAAAGATGTCACTGCCCGTTACTGGTATAACGCGAAAAACAAG  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1141  AATGCGACGGTTGATTTAAAAGATGTCACTGCCCGTTACTGGTATAACGCGAAAAACAAA  1200

Query  1201  GGCCAAAACTTTGACTGTGACTACGCGCAGATTGGATGCGGCAATCTGACCCACAAATTT  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1201  GGCCAAAACTTTGACTGTGACTACGCGCAGATTGGATGCGGCAATCTGACCCACAAATTT  1260

Query  1261  GTGACGCTGCATAAACCTAAGCAAGGTGCAGATACCTATCTGGAACTGGGTTTTAAAACA  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1261  GTGACGCTGCATAAACCTAAGCAAGGTGCAGATACCTATCTGGAACTGGGTTTTAAAACA  1320

Query  1321  GGAACGCTGTCACCGGGAGCAAGCACAGGGAATATTCAGCTTCGTCTTCACAATGATGAC  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1321  GGAACGCTGTCACCGGGAGCAAGCACAGGGAATATTCAGCTTCGTCTTCACAATGATGAC  1380

Query  1381  TGGAGTAGTTATGCACAAAGCGGTGATTATTCCTTTTTTCAATCAAATACGTTTAAAACA  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1381  TGGAGTAGTTATGCACAAAGCGGTGATTATTCCTTTTTTCAATCAAATACGTTTAAAACA  1440

Query  1441  ACGaaaaaaaTTACATTATATCATCAAGGAAAACTGATTTGGGGAACAGAACCCAATTA  1499
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1441  ACGAAAAAAATTACATTATATCATCAAGGAAAACTGATTTGGGGAACAGAACCCAATTA  1499
```

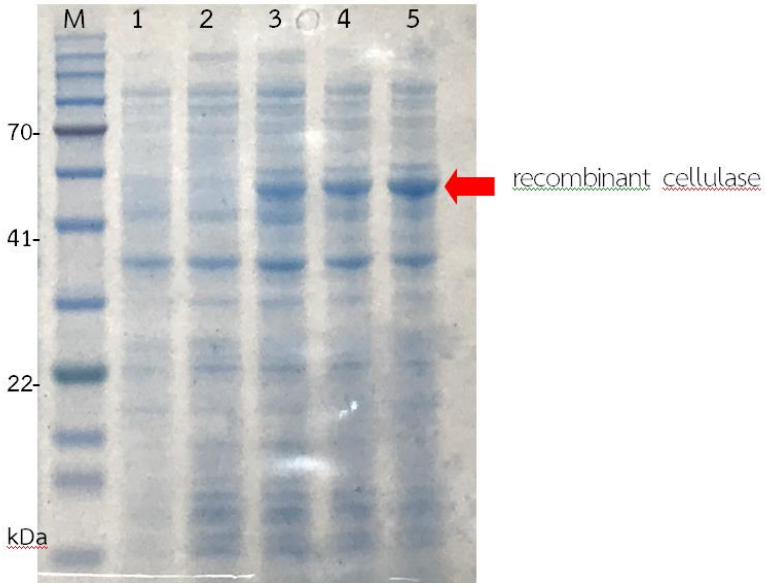
ภาพที่ 10 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน endoglucanase (eglS) gene ของเชื้อ *Bacillus velezensis* (Accession no. KY427020.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

```
MULTISPECIES: cellulase family glycosylhydrolase [Bacillus]
Sequence ID: WP_025851060.1Length: 499Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 499GenPeptGraphics Next Match Previous Match
           Alignment statistics for match #1
     Score      Expect  Identities   Positives     Gaps
992 bits(2565) 0.0    494/499(99%) 496/499(99%) 0/499(0%)
Query  1    MKRSISIFITCLLITVLTMGGLQASPASAAGTKTPAAKNGQLSIKGTQLVNRDGKAVQLK  60
            MKRSISIFITCLLITVLTMGGLQASPASAAGTKTP AKNGQLSIKGTQLVNRDGKAVQLK
Sbjct  1    MKRSISIFITCLLITVLTMGGLQASPASAAGTKTPVAKNGQLSIKGTQLVNRDGKAVQLK  60

Query  61   GISSHGLQWYGDFVNKDSLKWLRDDWGITVFRAAMYTADGGYIDNPSvknkvkeaveaak  120
            GISSHGLQWYGDFVNKDSLKWLRDDWGITVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAK
Sbjct  61   GISSHGLQWYGDFVNKDSLKWLRDDWGITVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAK  120

Query  121  eLGIYVIIDWHILNDGNPNQNKEKAKEFFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDI  180
            ELGIYVIIDWHILNDGNPNQNKEKAK+FFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDI
Sbjct  121  ELGIYVIIDWHILNDGNPNQNKEKAKDFFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDI  180

Query  181  KPYAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYVGTHGQSLR  240
            KPYAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFY GTHGQSLR
Sbjct  181  KPYAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQSLR  240

Query  241  DKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSREWLNYLDSKNISWVNWNLSDKQESS  300
            DKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSREWLNYLDSKNISWVNWNLSDKQESS
Sbjct  241  DKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSREWLNYLDSKNISWVNWNLSDKQESS  300

Query  301  SALKPGASKTGGWPLTDLTASGTFVRENILGNKDSTKERPETPAQDNPAQENGISVQYKA  360
            SALKPGASKTGGWPLT+LTASGTFVRENILGNKDSTKERPETPAQDNPAQENGISVQYKA
Sbjct  301  SALKPGASKTGGWPLTNLTASGTFVRENILGNKDSTKERPETPAQDNPAQENGISVQYKA  360

Query  361  GDGGVNSNQIRPQLHIKNNGNATVDLKDVTARYWYNAKNKGQNFDCDYAQIGCGNLTHKF  420
            GDGGVNSNQIRPQLHIKNNGNATVDLKDVTARYWYNAKNKGQNFDCDYAQIGCGNLTHKF
Sbjct  361  GDGGVNSNQIRPQLHIKNNGNATVDLKDVTARYWYNAKNKGQNFDCDYAQIGCGNLTHKF  420

Query  421  VTLHKPKQGVDTYLELGFKTGTLSPGASTGNIQLRLHNDDWSSYAQSGDYSFFQSNTFKT  480
            VTLHKPKQG DTYLELGFKTGTLSPGASTGNIQLRLHNDDWSSYAQSGDYSFFQSNTFKT
Sbjct  421  VTLHKPKQGADTYLELGFKTGTLSPGASTGNIQLRLHNDDWSSYAQSGDYSFFQSNTFKT  480

Query  481  TKKITLYHQGKLIWGTEPN  499
            TKKITLYHQGKLIWGTEPN
Sbjct  481  TKKITLYHQGKLIWGTEPN  499
```

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน cellulase ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน cellulase family glycosylhydrolase [Bacillus] (Accession No. WP_025851060.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ recombinant enzyme cellulase

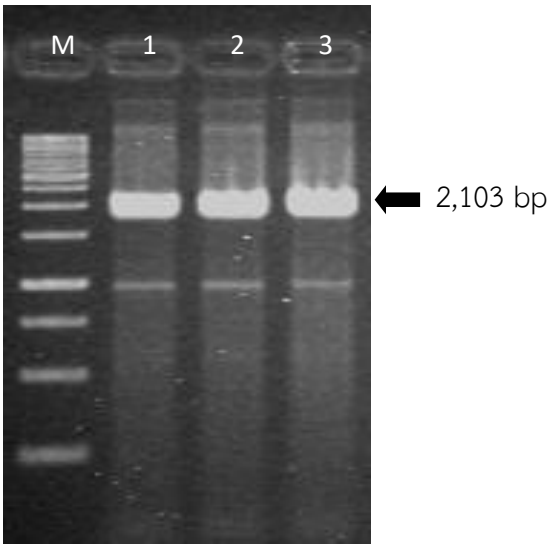
การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน cellulase เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ cellulase ที่ได้มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีน cellulase โดย 3mM IPTG Lane M; protein marker Lane 1; *E. coli* BL21 (DE3) Lane 2-5; *E. coli* BL21 (DE3) ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน cellulase ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

2.2 การโคลนยีน Chitinase

การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณยีน chitinase จากเชื้อไอโซเลท 1Ch 2.4 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ chitinase ได้ดี ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน chitinase มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของยีน chitinase ที่มีขนาดประมาณ 2,103 bp ดังภาพที่ 13 จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีน chitinase เข้าสู่เวคเตอร์พาหะ (T&A cloning vector)) และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5α) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน chitinase สอดแทรกอยู่ (โคโลนีลักษณะสีขาว) ดังภาพที่ 14

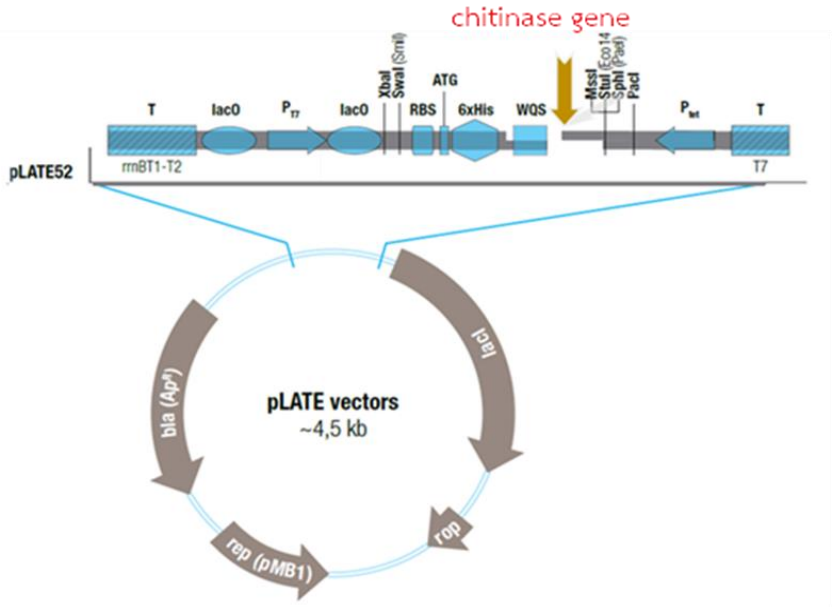


ภาพที่ 13 ผลผลิต PCR ของยีน chitinase Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-3; ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 2,103 bp

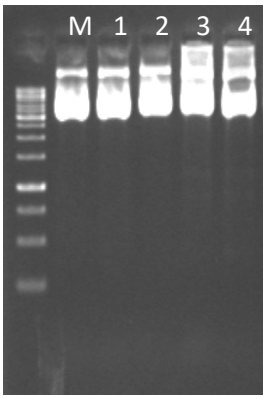
ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* (DH5α) (สีขาว) ที่มีการถ่ายฝากของยีน chitinase เข้าสู่เวคเตอร์พาหะ T&A cloning vector

การเชื่อมต่อชิ้นยีน chitinase เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

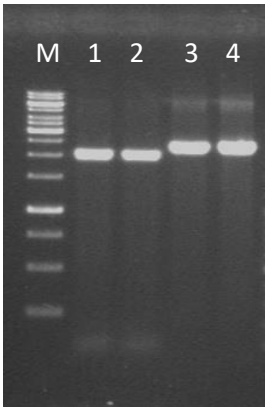
ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน chitinase เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน chitinase ดังภาพที่ 15 แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 6.6 กิโลเบส และสามารถตรวจพบการปรากฏของยีน chitinase ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค PCR และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 16 และตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 2,103 bp ดังภาพที่ 17 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน chitinase ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน chitinase type II gene ของเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* (Accession no. MN597082.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 18 และเมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน chitinase (*Paenibacillus* sp.) (Accession No. WP_095290735.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 15 แผนที่ตำแหน่งของยีน chitinase ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression vector



ภาพที่ 16 พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase ที่แทรกอยู่ใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase ที่แทรกอยู่ใน Expression Vector



ภาพที่ 17 การตรวจสอบการปรากฏของยีน chitinase ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-2; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน chitinase, Lane 3-4; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)

```
Paenibacillus xylanilyticus strain W4 chitinase type II gene, complete cds
Sequence ID: MN597082.1Length: 2103Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 2103GenBankGraphics Next Match Previous Match
           Alignment statistics for match #1
     Score      Expect   Identities      Gaps      Strand
3685 bits(1995) 0.0    2067/2103(98%) 0/2103(0%) Plus/Plus
Query  1     ATGTCATATAAAGCCAAACCCATGGATTTCAAAAAAGTCGGTAAGGTTCTCCTCGGTGTG  60
             |||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ATGTCATATAAAGCCAAACACATGGGTTTCAAAAAAGTCGGTAAGGTTCTCCTCGGTGTG  60

Query  61    GTCCTGCTCTTATCAGTCATCATCCCTTCATTTACACTTCAATCTCGAACGGCCGAAGCA  120
             |||||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GTCCTGCTCTTATCTGTCATCATCCCTTCATTTACCCTTCAATCTCGAACGGCCGAAGCA  120

Query  121   GCAGATGCCTATAAAATTGTTGGTTACTATCCTGCCTGGGCGGCATACGGACGAAACTAC  180
             ||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   GCAGAAGCCTATAAAATTGTCGGTTACTATCCTGCCTGGGCGGCATACGGACGAAACTAC  180

Query  181   AATGTGACGGATATTGATCCCACCAAGGTGACGCATATCAACTATGCCTTTGCTGATATT  240
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  181   AATGTGACGGATATTGATCCCACCAAGGTGACGCATATCAACTATGCCTTTGCCGATATT  240

Query  241   TGTTGGAACGGCATTCATGGGAATCCAGACCCTTCGGGCCCCAATCCGGTGACTTGGAGC  300
             |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   TGTTGGAACGGCATTCATGGAAATCCAGACCCTTCGGGCCCCAATCCGGTGACTTGGAGC  300

Query  301   TGCCAGAATGAGAAGAGCCAGACAATCAATGTACCGAATGGAACGATTGTTCTCGGAGAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   TGCCAGAATGAGAAGAGCCAGACAATCAATGTACCGAATGGAACGATTGTTCTCGGAGAC  360

Query  361   CCCTGGATCGACACAGGCAAACAATTTGCCGGGGACACATGGGATCAGCCCTATGCAGGG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   CCCTGGATCGACACAGGCAAACAATTTGCCGGGGACACATGGGATCAGCCCTATGCAGGG  420

Query  421   AATATCAATCAGCTCAACAAGCTGAAGCAGGTCAATCCGAATCTGAAAACAATCATCTCC  480
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   AATATTAATCAGCTCAACAAGCTGAAGCAGGTCAATCCGAATCTGAAAACAATCATCTCC  480

Query  481   GTTGGAGGATGGACGTGGTCCAACCGTTTCTCTGATGTAGCCGCAACTTCAGCTACCCGT  540
              |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  481   ATTGGAGGATGGACGTGGTCCAACCGTTTCTCCGATGTAGCCGCAACATCAGCTACCCGT  540

Query  541   GAGGTCTTTGCCAACTCTGCCGTCGATTTCCTGCGGAAATACAACTTTGACGGAGTGGAT  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   GAGGTCTTTGCCAACTCTGCCGTCGATTTCCTGCGGAAATACAACTTTGACGGAGTGGAT  600

Query  601   CTCGACTGGGAATACCCGGTATCAGGCGGGCTGGATGGTAACAGCAAGCGTCCAGAAGAT  660
             || |||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   CTTGACTGGGAATATCCGGTATCAGGCGGGCTGGATGGCAACAGCAAGCGTCCAGAAGAT  660

Query  661   AAGCAAAATTATACCCTTCTCCTAAGCAAAATCCGCGAGAAGCTGGATGCGGCAGAAGCC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   AAGCAAAATTATACCCTTCTCCTAAGCAAAATCCGCGAGAAGCTGGATGCGGCAGAAGCC  720

Query  721   GTTGACGGCAAAGAGTACCTGCTTACGATTGCAAGCGGAGCATCTCCAACCTATGCTGCC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   GTTGACGGCAAAGAGTACCTGCTTACGATTGCAAGCGGAGCATCTCCAACCTATGCTGCC  780

Query  781   AATACGGAGCTTGCGAACATCGCTTCCATCGTTGACTGGATTAACATCATGACCTACGAT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   AATACGGAGCTTGCGAACATCGCTTCCATCGTTGACTGGATTAACATCATGACCTACGAT  840

Query  841   TTTAACGGAGCCTGGCAGAAAATCAGTGCACACAATGCACCGCTGAATGCGGATCCTGCC  900
             ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   TTTAACGGAGCCTGGCAGAAAATCAGCGCACACAATGCACCGCTGAATGCGGATCCTGCC  900

Query  901   GCTGCAAGTGCAGGGGTACCAGATAGCAATACTTTTAATGTGGCTGCCGGAGCCCAAGGG  960
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  901   GCTGCAAGTGCAGGGGTACCAGATAGCAATACTTTTAATGTGGCTGCCGGAGCACAAGGA  960

Query  961   CATCTGAATGCAGGAGTACCGGCTGCCAAGCTGGTGCTGGGTGTTCCATTTTACGGTCGA  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   CATCTGAATGCAGGAGTACCGGCTGCCAAGCTGGTGCTGGGTGTTCCATTTTACGGTCGA  1020
```

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน chitinase type II gene ของเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* (Accession no. MN597082.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์

```
Query  1021  GGCTGGGATGGATGTGCACAGGCGAATAACGGCCAGTATCAAACGTGTTCGGGTGGTTCT  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GGCTGGGATGGATGTGCACAGGCGAATAACGGCCAGTATCAAACGTGTTCGGGTGGTTCT  1080

Query  1081  TCTGTAGGAACTTGGGAGGCAGGCTCCTTTGATTTTTACGATCTGGAAGCGAACTACATT  1140
             ||| |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1081  TCTATAGGAACTTGGGAGGCAGGCTCCTTTGACTTTTACGATCTGGAAGCGAACTATATT  1140

Query  1141  AATAAGAATGGATACACACGCTATTGGAACGACACAGCCAAAGTGCCGTTTCTCTATAAC  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1141  AATAAGAATGGATACACACGCTATTGGAACGACACAGCCAAAGTGCCGTTTCTCTATAAC  1200

Query  1201  GCCTCCAACAAGCGCTTCATCAGCTATGACGATGCGGAGTCCATTGGACACAAAACCGCA  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1201  GCCTCCAACAAGCGCTTCATCAGCTATGACGATGCGGAGTCCATTGGACACAAAACCGCA  1260

Query  1261  TATATCAAGAGCAAAGGGCTTGGCGGAGCGATGTTCTGGGAGCTCAGTGGGGACCGCAAC  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1261  TATATCAAGAGCAAAGGGCTTGGCGGAGCGATGTTCTGGGAGCTCAGTGGGGACCGCAAC  1320

Query  1321  AAGACACTCCAAAACAAGTTGAAATCGGATCTGTTAACCGGGGGTACAGTGCCTCCTGCG  1380
             |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1321  AAGACACTCCAAAACAAGTTGAAATCGGATCTGTCAACCGGGGGTACAGTGCCTCCTGCG  1380

Query  1381  GATACGACGGCACCGAGTGTACCGGGTAATGCCCGTTCGACAGGAGTAACGGCAAGCTCC  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1381  GATACGACGGCACCGAGTGTACCGGGTAATGCCCGTTCGACAGGAGTAACGGCAAGCTCC  1440

Query  1441  GTAACCTTGGCCTGGAATGCTTCGACGGATAACGTTGGCGTTACCGGTTATAACGTCTAC  1500
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  1441  GTAACCTTGGCCTGGAATGCTTCGACGGATAACGTTGGCGTTACCGGCTATAACGTCTAC  1500

Query  1501  AATGGCACTAGTCTCGTGACTTTCGTTACTGGAACAACTGCAACAATTAGCGGGCTTGCA  1560
             |||||||||||  ||  |||||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||
Sbjct  1501  AATGGCACTAGCCTAGTGACTTCCGTTACTGGAACAACCGCAACAATTAGCGGGCTTGCA  1560

Query  1561  TCAGGTACTTCCTATACCTTCACGGTAAAAGCAAAGGATGCCGCAGGCAATCTATCCGCA  1620
              ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1561  CCAGGTACTTCCTATACCTTTACGGTAAAAGCAAAGGATGCCGCAGGCAATCTATCCGCA  1620

Query  1621  GCTAGTAATAGCGTTACAGTAAGCACTACGGTTCAGCCGGGGGGGAGATACCCAAGCACCA  1680
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1621  GCTAGTAATAGCGTTACAGTAAGCACTACGGTTCAGCCGGGGGGGAGATACCCAAGCACCA  1680

Query  1681  ACCGTGCCGACCAACCTCACATCAACTGCCAAAACCTCATCTACGATTACCCTTAGCTGG  1740
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  1681  ACCGTGCCGACCAACCTCACATCAACTGCCAAAACCTCATCTACGATCACCCTTAGCTGG  1740

Query  1741  GCGGCCTCCGAGGACAACGTTGGTGTAACCGGGTATGAGGTATACAACGGAACTGCTTTG  1800
             || |||||||  |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1741  GCAGCCTCCACGGACAACGTTGGTGTAACCGGATATGAGGTATACAACGGAACTGCTTTG  1800

Query  1801  GTGACAACCGTTAGTGGAACATCGGCAACTGTTACGGGCCTAACGGCAGACACCTCTTAT  1860
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  1801  GTGACAACCGTTAGTGGAACATCGGCAACTGTTACGGGTCTAACGGCAGACACCTCTTAT  1860

Query  1861  ACGTTTACAGTAAAAGCGAAGGATGCGGCAGGCAACCTGTCTGCTGCGAGCAGTGCCTTG  1920
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1861  ACGTTTACAGTAAAAGCGAAGGATGCGGCAGGTAACCTGTCTGCTGCGAGCAGTGCCTTG  1920

Query  1921  ACGGTGAAAACCGAAGTGGGTACGACGAATCCCGGCGTCTCCGCTTGGCAGGCAAATACG  1980
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1921  ACGGTGAAAACCGAAGTGGGTACGACGAATCCCGGCGTCTCCGCTTGGCAGGCAAATACG  1980

Query  1981  GCTTATGTCGTAGGGCAGCTGGTTACGTATAATGGAAAAACGTATAAATGCCTGCAATCC  2040
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1981  GCTTATGTCGTAGGGCAGCTGGTTACGTATAATGGAAAAACGTATAAATGCCTGCAATCC  2040

Query  2041  CATACCTCCTTAACGGGGTGGGAGCCTTCCAATGTGGCTGCATTGTGGCAGCTTCAACCG  2100
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2041  CATACCTCCTTAACGGGGTGGGAGCCTTCCAATGTGGCTGCATTGTGGCAGCTTCAACCG  2100

Query  2101  TAA  2103
             |||
Sbjct  2101  TAA  2103
```

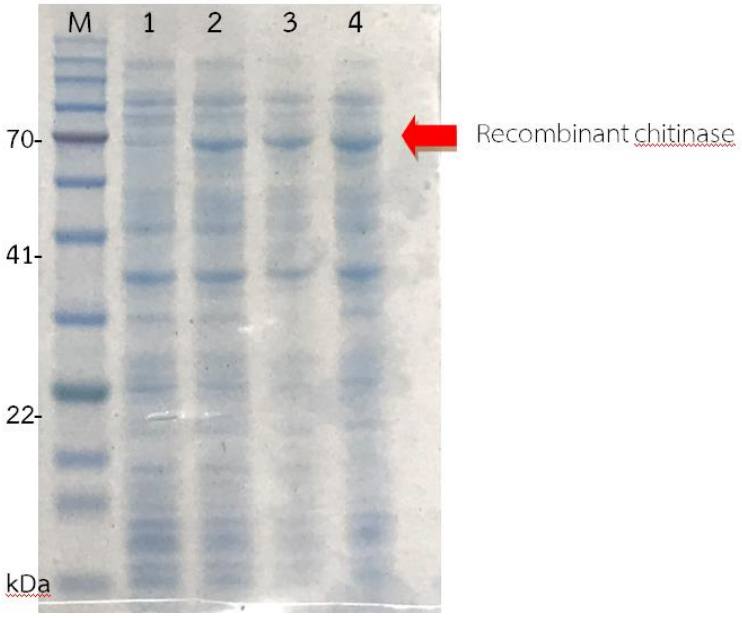
ภาพที่ 18 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน chitinase type II gene ของเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* (Accession no. MN597082.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์

```
chitinase [Paenibacillus sp. 7516]
Sequence ID: WP_095290735.1Length: 700Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 700GenPeptGraphics Next Match Previous Match
           Alignment statistics for match #1
     Score      Expect  Identities    Positives     Gaps
1258 bits(3256) 0.0    685/700(98%) 694/700(99%) 0/700(0%)
Query  1    MSYKAKPMDFkkvgkvllgvvlllsvIIPSFTLQSRTAEAADAYKIVGYYPAWAAYGRNY  60
            MSYKAK MDFKKVGKVLLG+VLLLSVIIP+FT QSRTAEAADAYKIVGYYPAWAAYGRNY
Sbjct  1    MSYKAKHMDFKKVGKVLLGLVLLLSVIIPTFTFQSRTAEAADAYKIVGYYPAWAAYGRNY  60

Query  61   NVTDIDPTKVTHINYAFADICWNGIHGNPDPSGPNPVTWSCQNEKSQTINVPNGTIVLGD  120
            NVTDIDPTKVTHINYAFADICWNGIHGNPDPSGPNPVTWSCQNEKSQTINVPNGTIVLGD
Sbjct  61   NVTDIDPTKVTHINYAFADICWNGIHGNPDPSGPNPVTWSCQNEKSQTINVPNGTIVLGD  120

Query  121  PWIDTGKQFAGDTWDQPYAGNINQLNKLKQVNPNLKTIISVGGWTWSNRFSDVAATSATR  180
            PWIDTGKQFAGDTWDQPYAGNINQLNKLKQVNPNLKTIIS+GGWTWSNRFSDVAATSATR
Sbjct  121  PWIDTGKQFAGDTWDQPYAGNINQLNKLKQVNPNLKTIISIGGWTWSNRFSDVAATSATR  180

Query  181  EVFANSAVDFLRKYNFDGVDLDWEYPVSGGLDGNSKRPEDKQNYTLLLSKIREKLDAAEA  240
            EVFANSAVDFLRKYNFDGVDLDWEYPVSGGLDGNSKRPEDKQNYTLLLSKIREKLDAAEA
Sbjct  181  EVFANSAVDFLRKYNFDGVDLDWEYPVSGGLDGNSKRPEDKQNYTLLLSKIREKLDAAEA  240

Query  241  VDGKEYLLTIASGASPTYAANTELANIASIVDWININMTYDFNGAWQKISahnaplnadpa  300
             DGKEYLLTIASGASPTYAANTELANIASIVDWININMTYDFNGAWQKISAHNAPLNADPA
Sbjct  241  ADGKEYLLTIASGASPTYAANTELANIASIVDWININMTYDFNGAWQKISAHNAPLNADPA  300

Query  301  aasaGVPDSNTFNVAAGAQGHLNAGVPAAKLVLGVPFYGRGWDGCAQANNGQYQTCSGGS  360
            AASAGVPD+NTFNVAAGAQGHLNAGVPAAKLVLGVPFYGRGWDGCAQANNGQYQTCSGGS
Sbjct  301  AASAGVPDTNTFNVAAGAQGHLNAGVPAAKLVLGVPFYGRGWDGCAQANNGQYQTCSGGS  360

Query  361  SVGTWEAGSFDFYDLEANYINKNGYTRYWNDTAKVPFLYNASNKRFISYDDAESIGHKTA  420
            S+GTWEAGSFDFYDLEANYINKNGYTRYWNDTAKVPFLYNASNKRFISYDDAESIGHKTA
Sbjct  361  SIGTWEAGSFDFYDLEANYINKNGYTRYWNDTAKVPFLYNASNKRFISYDDAESIGHKTA  420

Query  421  YIKSKGLGGAMFWELSGDRNKTLQNKLKSDLLTGGTVPPADTTAPSVPGNARSTGVTASS  480
            YIKSKGLGGAMFWELSGDRNKTLQNKLKSDL TGGTVPPADTTAPSVPGNARSTGVTASS
Sbjct  421  YIKSKGLGGAMFWELSGDRNKTLQNKLKSDLSTGGTVPPADTTAPSVPGNARSTGVTASS  480

Query  481  VTLAWNASTDNVGVTGYNVYNGTSLVTFVTGTTATISGLASGTSYTFTVKAKDAAGNLSA  540
            VTLAWNASTDNVGVTGYNVYNGTSLVT VTGTTATISGLASGTSYTFTVK+KDAAGNLSA
Sbjct  481  VTLAWNASTDNVGVTGYNVYNGTSLVTSVTGTTATISGLASGTSYTFTVKSKDAAGNLSA  540

Query  541  Asnsvtvsttv QPGGDTQAPTVPTNLTSTAKTSSTITLSWAASEDNVGVTGYEVYNgtal  600
            ASNS+TVSTTVQPGGDTQAPTVPT+LTSTAKTSSTITLSWAAS DNVGVTGYEVYNGTAL
Sbjct  541  ASNSITVSTTVQPGGDTQAPTVPTSLTSTAKTSSTITLSWAASTDNVGVTGYEVYNGTAL  600

Query  601  vttvsgtsatvtgltaDTSYTFTVKAKDAAGNLsaassaLTVKTEVGTTNPGVSAWQANT  660
            VTTVSGT+ATVTGLTADTSYTFTVKAKDAAGNLSAASSALTVKTEVGTTNPGVSAWQANT
Sbjct  601  VTTVSGTTATVTGLTADTSYTFTVKAKDAAGNLSAASSALTVKTEVGTTNPGVSAWQANT  660

Query  661  AYVVGQLVTYNGKTYKCLQSHTSLTGWEPSNVAALWQLQP  700
            AYVVGQLVTYNGKTYKCLQSHTSLTGWEPSNVAALWQLQP
Sbjct  661  AYVVGQLVTYNGKTYKCLQSHTSLTGWEPSNVAALWQLQP  700
```

ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน chitinase ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน chitinase [Paenibacillus sp.] (Accession No. WP_095290735.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ recombinant enzyme chitinase

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ได้มีขนาดประมาณ 74 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 20 การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย 3mM IPTG Lane M; protein marker Lane 1 - 4; *E. coli* BL21 (DE3) ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

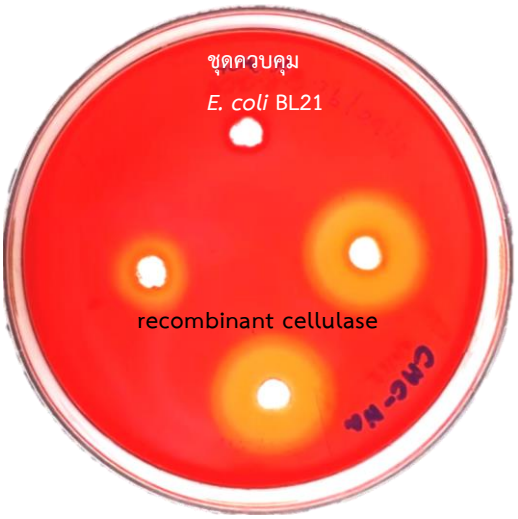
3. การทดสอบกิจกรรมของ crude protein โดยวิธี Bioassay technique

การทดสอบกิจกรรมของ recombinant chitinase โดยวิธี Bioassay plate technique โดยใช้ crude protein หรือ crude enzyme ที่ได้จากการนำ recombinant *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีน มากระตุ้นการทำงานของยีนด้วย 3mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบในอาหารที่มี ไคตินเป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในปริมาตร 20 ไมโครลิตรเท่ากัน เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม *E. coli* BL21 (DE3) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งไม่พบกิจกรรมการย่อยบนอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ดังภาพที่ 21

ส่วนการทดสอบกิจกรรมของ recombinant cellulase สามารถทดสอบในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ นำ recombinant *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีน มาทำการกระตุ้นการทำงานของยีนด้วย 3mM IPTG

นาน 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในปริมาตร 20 ไมโครลิตรเท่ากัน เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยสี congo red พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม *E. coli* BL21 (DE3) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งไม่พบกิจกรรมการย่อยบนอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ดังภาพที่ 22

ภาพที่ 21 เปรียบเทียบกิจกรรมของ recombinant chitinase (crude enzyme) ที่ได้จากการทำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase โดยวิธี Bioassay technique ในอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบกิจกรรมของ recombinant cellulase (crude enzyme) ที่ได้จากการทำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน cellulase โดยวิธี Bioassay technique ในอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสจากดินบริเวณลุ่มน้ำปาย จำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ พื้นที่ป่าปลายน้ำ พื้นที่เกษตรปลายน้ำ พื้นที่เกษตรต้นน้ำ และ พื้นที่ป่าธรรมชาติต้นน้ำบ้านแม่นะ ในช่วงฤดูกาลต่างๆ พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส บนอาหาร selective medium ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส และไคติน สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 296 ไอโซเลท แบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 198 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 98 ไอโซเลท

การโคลนยีน chitinase สามารถเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน ที่มีขนาดประมาณ 2,103 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน chitinase type II gene ของเชื้อ *Paenibacillus xylanilyticus* (Accession no. MN597082.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน chitinase (*Paenibacillus* sp.) (Accession No. WP_095290735.1) ที่ identity 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ chitinase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ได้มีขนาดประมาณ 74 กิโลดาลตัน

การโคลนยีน cellulase สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน cellulase ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน endoglucanase gene ของเชื้อ *Bacillus velezensis* (Accession no. KY427020.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน cellulase family glycosylhydrolase [Bacillus] (Accession No. WP_025851060.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ cellulase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ cellulase ที่ได้มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ cellulase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้ จึงเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท 2CMC-1.1 และ *Paenibacillus xylanilyticus* ไอโซเลท 1Ch 2.4 เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย cellulose และ chitin สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์ cellulase และ chitinase ได้ดี

2. รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ของยีน cellulase และ chitinase สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการพัฒนากรรมวิธีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ cellulase และ chitinase ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการทดแทนสารชีวภาพ ในการประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตร พลังงาน และอุตสาหกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Koide, Y. Koide, A. Nakamura, T. and Uozumi, T. 1986. BeppuMolecular cloning of a cellulase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli* Agric Biol Chem, 50 (1) pp. 233-237

Lynd, L. R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. 2002. Pretorius Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, pp. 506-577.

Millati, R., Millati, L. Edebo, M.J. Taherzadeh**.** 2005. Performance **of** *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates Enzyme Microb. Technol., 36 (2–3), pp. 294-300

Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R. and Lynch, J.M. 1988. Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10: 180-187.

Ueda, M. and Arai, M. 1992. Purification and some propertiesof chitinase fromAeromonassp. No. 10S-24.BiosciBiotechnol Biochem56, 460–464.