

การโคลนและการหาลำดับของยีนเดซซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14



นางสาว พิมพ์รัตน์ เต็มจิตต์ภักดี

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND SEQUENCING OF DEXTRANASE GENE FROM

*Penicillium* sp. SMCU 3-14



Miss Pimonrut Temjitpukdee

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University



พิมพ์รัตน์ เต็มจิตต์ภักดี : การโคลนและการหาลำดับของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14. (CLONING AND SEQUENCING OF DEXTRANASE GENE FROM *Penicillium* sp. SMCU 3-14) อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา; 152 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้โคลนและหาลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของรานี้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วเชื่อมเข้ากับอะแดปเตอร์ จากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ (Dex6R กับ AP2 และ Dex4F กับ AP2) แล้วโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 2.5 กิโลเบส และ 2.4 กิโลเบส เข้าในเวกเตอร์ ระเบิดรีคอมบิแนนท์พลาสมิทที่ได้เป็น pPT-4 และ pPT-5 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PT-4 และ PT-5 พบว่ามีความเหมือน 92% และ 96% ตามลำดับ กับปลายด้าน 5' (ก่อนโปรโมเตอร์) และปลายด้าน 3' (หลังกรอบอ่านรหัสเปิด) ของเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* HI-4 ดังนั้นเพื่อให้ได้ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (*SMCU-dex*) ที่สมบูรณ์อยู่ภายในชิ้นเดียวกันได้ใช้ข้อมูลที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณปลายด้าน 5' ของ PT-4 และปลายด้าน 3' ของ PT-5 ออกแบบ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ เพิ่มขึ้นส่วนของ *SMCU-dex* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าในเวกเตอร์ ระเบิดรีคอมบิแนนท์พลาสมิทที่ได้เป็น pPT-6 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่โคลนได้ พบตำแหน่งของโปรโมเตอร์ซึ่งประกอบด้วย CAAT Box และ TATA Box ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCAAT และ TATAA ตามลำดับ และพบ Poly A signal ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AATAAG กรอบอ่านรหัสเปิดของ *SMCU-dex* มีขนาด 1,824 คู่เบส ที่ไม่มีอินทรอน และประมวลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 608 หมู่ ขนาดประมาณ 66 กิโลดาลตัน ที่บริเวณปลาย N-terminal พบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 20 หมู่ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX พบว่ามีความเหมือน 99% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* HI-4 ผลการทดลองจากเซาเทิร์นไฮบริไดเซชัน แสดงว่ามี *SMCU-dex* เพียงหนึ่งชุดในโครโมโซมของรานี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ระบุว่า ราสายพันธุ์นี้มีความเหมือน 100% กับ *Penicillium pinophilum* งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่เสนอข้อมูลจากยีนเดกซ์แทรนเนสของราสายพันธุ์นี้

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต..... พัทธไธน์ เต็มจิตต์ภักดี  
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา...2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



# # 4772405123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: dextranase / *Penicillium* sp. / nucleotide sequences

PIMONRUT TEMJITPUKDEE : CLONING AND SEQUENCING OF DEXTRANASE GENE FROM *Penicillium* sp. SMCU 3-14. THESIS ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., 152 pp.

The DNA fragment encoding dextranase was cloned and amplified from the genomic DNA of *Penicillium* sp. SMCU 3-14 by using BD GenomeWalker™ Universal Kit. The genomic DNA was digested with restriction enzymes and ligated to adaptors. The libraries obtained were used as template to amplified fragments of the dextranase gene using two pairs of primers; Dex6R+AP2 and Dex4F+AP2. The 2.5 kb and 2.4 kb PCR products were cloned into plasmid vector, the recombinant plasmids were designated as pPT-4 and pPT-5. Sequences of PT-4 and PT-5 revealed 92% and 96% sequence identity to 5' and 3' non-coding sequences of dextranase from *Penicillium minioluteum* HI-4, respectively. To obtain complete genomic DNA encoding dextranase gene (*SMCU-dex*) in a single fragment, forward and reverse primers specific to 5' and 3' non-coding sequences were designed and used to perform PCR using genomic DNA of *Penicillium* sp. SMCU 3-14 as template. The PCR product was cloned into plasmid vector and the recombinant plasmid was designated as pPT-6. The complete dextranase gene contained promoter with CAAT Box-like sequence; CCAAT, and TATA Box-like sequence; TATAA, as well as a polyadenylation signal; AATAAG. The open reading frame composed of 1,824 bp which encoded a protein of 608 amino acids with predicted molecular mass of 66 kDa, including 20 N-terminal amino acid residues corresponded to a signal peptide. Amino acid sequence of the protein SMCU-DEX revealed 99% identity to dextranase of *Penicillium minioluteum* HI-4. Southern hybridization revealed only one copy of dextranase gene in the chromosome. The ITS1-5.8S-ITS2 region of this fungus is 100% identical to that of *Penicillium pinophilum*. Hence, this is the first report of dextranase gene sequence in *Penicillium pinophilum*.

Department.....Microbiology..... Student's signature..... *Pimrut Temjitrukdee*.....  
Field of study.....Industrial microbiology... Advisor's signature..... *Phan Samran*.....  
Academic year...2006..... Co-advisor's signature..... *Supat Chareonpornwattana*.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนิยวัน ที่กรุณาได้รับเป็น ประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลา การศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาได้รับ เป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณาให้ความ อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และ น้องๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณน้า และครอบครัวโลประวัตติ และ ขอขอบใจน้องชาย ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนความรัก ความห่วงใย และ กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฑ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรัชญาวรรณกรรม.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	27
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	29
3.3.1 รา.....	29
3.3.2 แบคทีเรีย.....	29
3.4 พลาสติดและโพลิโกนิวคลีไธดไทรโพรเมอร์.....	29
3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
3.5.1 การเก็บรักษาราด.....	32
3.5.1.1 การเก็บรักษาราดในระยะสั้น.....	32
3.5.1.2 การเก็บรักษาราดในระยะยาว.....	32
3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	32
3.6 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากรา <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	32
3.6.1 การเลี้ยงรา <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ.....	32
3.6.2 การเก็บไมซีเลียมและการไลโอไฟไลซ์ (lyophilization).....	33
3.6.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากรา <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	33

3.6.4 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้.....	34
3.7 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยใช้ชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Bioscience, USA).....	34
3.7.1 การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์.....	34
3.7.2 การทำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วให้บริสุทธิ์.....	35
3.7.3 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับอะแดปเตอร์ (adaptor).....	35
3.7.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	36
3.7.4.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	36
3.7.4.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1.....	37
3.7.4.2.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex5R และ AP1.....	37
3.7.4.2.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex3F และ AP1.....	39
3.7.4.2.3 ชุดควบคุมผลบวก (positive control).....	40
3.7.4.2.4 ชุดควบคุมผลลบ (negative control).....	40
3.7.4.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2.....	40
3.7.4.3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex6R และ AP2.....	40
3.7.4.3.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex4F และ AP2.....	42
3.8 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2.....	43
3.8.1 การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน	43
3.8.2 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	43
3.8.3 การทรานสฟอร์มมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ <i>Escherichia coli</i> DH5α และการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่ต้องการ.....	44
3.8.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell).....	44
3.8.3.2 การทรานสฟอร์มมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	45



3.8.3.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ.....	45
3.9 การคัดเลือกโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสส์ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	47
3.9.1 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany).....	47
3.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้.....	48
3.9.3 การยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	48
3.9.4 การทดสอบทิศทางการเข้าของซันดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	49
3.9.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสส์ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	50
3.10 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสส์ของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	50
3.10.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	50
3.10.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	50
3.11 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสส์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	52
3.11.1 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.1 ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน.....	52
3.11.2 การไลเกต (ligation) ซันดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	52
3.11.2.1 การทำให้ปลายของผลิตภัณฑ์ PCR เป็น blunt end....	52
3.11.2.2 การไลเกต (ligation) ซันดีเอ็นเอที่ปลายทู่ (blunt end) แล้วเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	53
3.11.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....	53
3.11.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสส์.....	53
3.11.5 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany).....	54

3.11.6	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).	
3.12	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีนเดกซ์แทรนเนส.....	54
3.13	การตรวจสอบยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้ว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization).....	55
3.13.1	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)	55
3.13.2	การติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP โดยวิธี Random Labeling.....	55
3.13.3	การเตรียมในลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 สำหรับการไฮบริดเซชัน.....	56
3.13.3.1	การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ.....	58
3.13.3.2	การย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังในลอนเมมเบรน (Southern blot).....	58
3.13.3.3	พรีไฮบริดเซชันและไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม..	60
3.14	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	62
3.14.1	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)	62
3.14.2	การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	63
3.14.3	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	63
4.	ผลการทดลอง.....	64
4.1	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	64
4.1.1	การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	64
4.1.2	การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1.....	66
4.1.2.1	โดยใช้ไพรเมอร์ Dex5R และ AP1.....	67
4.1.2.2	โดยใช้ไพรเมอร์ Dex3F และ AP1.....	67

4.1.2.3 ชุดควบคุมผลบวก.....	67
4.1.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2.....	69
4.1.3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex6R และ AP2.....	69
4.1.3.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex4F และ AP2.....	69
4.2 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 เข้าใน pDrive Cloning Vector.....	70
4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ตามลำดับ.....	75
4.4 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	77
4.5 การโคลนผลิตภัณฑ์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	78
4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจากพลาสมิด pPT-6 และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้.....	81
4.7 การตรวจสอบยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส PT-6 ที่โคลนได้ว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization).....	97
4.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม.....	97
4.7.2 การไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอติดตามที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	98
4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	99
4.8.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	99
4.8.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	100
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	102

รายการอ้างอิง.....	107
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	117
ภาคผนวก ข.....	119
ภาคผนวก ค.....	131
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	152



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์บางชนิดที่สร้างเดกซ์แทรนเนส	15
3.1 แบคทีเรีย.....	29
3.2 พลาสมีด.....	30
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์.....	31
3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลาก .....	57
4.1 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ที่ได้จากการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน <i>SMCU-dex</i> กับเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX .....	90

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรนโดยกลูโคซิลทรานสเฟอเลส (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2542) .....	4
2.2 แสดงส่วนประกอบของสารต่างๆในน้ำอ้อย (อัศวิทย์ ปัทมเวณู, 2539).....	9
2.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการด้วยชุด BD Genome Walker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) .....	22
2.4 โครงสร้างของ BD GenomeWalker™ Adaptor และ adaptor primers รวมทั้ง แสดงตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์บนอะแดปเตอร์.....	23
2.5 แผนที่แสดงบริเวณ ITS และแสดงตำแหน่งของ universal ITS ไพรมเมอร์ (ITS1 และ ITS4) (Gutzmer และคณะ, 2004).....	25
3.1 แผนที่แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์ที่ถูกรอกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณปลาย 5' และบริเวณปลาย 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ทราบแล้ว.....	37
3.2 แผนภาพแสดงการจัดวางชิ้นต่างๆในการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยัง ไมลอนเมมเบรน โดยวิธี Capillary transfer.....	60
4.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรสโดยใช้คู่ไพรมเมอร์ Dex1F กับ Dex1R และคู่ไพรมเมอร์ Dex2F กับ Dex2R.....	64
4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสใน <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	66
4.3 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรสครั้งที่ 1 .....	68
4.4 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรสครั้งที่ 2 .....	70
4.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำโคลนนิ่ง PCR ของโคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยคู่ไพรมเมอร์ Dex6R กับ AP2.....	72
4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำโคลนนิ่ง PCR ของโคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยคู่ไพรมเมอร์ Dex4F กับ AP2.....	73
4.7 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรสของพลาสมิด pPT-4 และ pPT-5.....	73

4.8 ภาพอะกาโรสเจลิเล็กโทรโฟเรซิสของ pPT-4 และ pPT-5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ SalI.....	74
4.9 ก) แผนที่แสดงทิศทางการเข้าของซันดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-4 ข) แผนที่แสดงทิศทางการเข้าของซันดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-5....	75
4.10 ก) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของซันดีเอ็นเอ PT-4 ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pPT-4 ข) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของซันดีเอ็นเอ PT-5 ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pPT-5..	76
4.11 ภาพอะกาโรสเจลิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส.....	78
4.12 ภาพอะกาโรสเจลิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากโคลนต่างๆ โดยเทคนิคการทำโคลน PCR .....	79
4.13 ภาพอะกาโรสเจลิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เมื่อใช้ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R .....	80
4.14 แผนที่แสดงซันดีเอ็นเอ PT-6, PT-4 และ PT-5 ที่โคลนได้ทั้งหมดซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อเนื่องกัน และแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างๆที่ใช้เพื่อหาลำดับของซันดีเอ็นเอ.....	82
4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากรหัสเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG, codon) ของซันดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPT-4, pPT-5 และ pPT-6 .....	85
4.16 แผนที่แสดงยีน <i>SMCU-dex</i> ขนาด 4,023 bp ที่เกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของซันดีเอ็นเอ PT-6 เชื่อมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ PT-4 และ PT-5 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>SMCU-dex</i> ต่อเนื่องกัน รวมทั้งแสดงตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ .....	88
4.17 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน <i>SMCU-dex</i> ของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 กับเดคซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX เวอร์ชัน 1.83 .....	91
4.18 Phylogenetic tree ของ SMCU-DEX จากการจัดเรียงเทียบ (alignment) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสเดคซ์แทรนเนส 6 ชนิดโดย Bootstrap analysis 100 replicons.....	93

## ภาพประกอบ

## หน้า

4.19 ผลการหาบริเวณอนุรักษ์ของเด็กซ์แทรนเนสด้วยโปรแกรม Clustal X.....	94
4.20 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม .....	97
4.21 ก) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่มีดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ	
ข) สัญญาณจากเซาเทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม PT6-probe.....	98
4.22) ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4.....	99
4.23) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ใน <i>Penicillium</i> sp. SMCU 3-14.....	100
4.24) Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 จากการจัดเรียงเทียบ (alignment) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Penicillium</i> 3 ชนิด โดย Bootstrap analysis 100 replicons.....	101

# บทที่ 1

## บทนำ

เดกซ์แทรนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันเป็นสายพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดฮอมอพอลิเมอร์ด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก และมีสายที่แตกแขนงออกจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3-ไกลโคซิดิก เดกซ์แทรนเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ละลายน้ำได้ยาก และมีลักษณะเหนียวหนืด เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลซูโครส โดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextranase) หรือกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) ในปัจจุบันได้มีการนำเดกซ์แทรนมาใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เติมในไอศกรีม เบเกอรี่ หรือลูกอม เพื่อช่วยให้ความนุ่มของเนื้อสัมผัส และในทางการแพทย์ได้มีการนำเดกซ์แทรนมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การนำเดกซ์แทรนมาใช้เป็น blood plasma expander เพื่อเพิ่มปริมาตรของโลหิตในผู้ป่วยที่มีอาการช็อกเนื่องจากการสูญเสียเลือด โดยไม่รบกวนระบบของแอนติเจน-แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของเลือด (Lee และ Fox, 1985; Das และ Dutta, 1996) รวมทั้งมีการนำเดกซ์แทรนมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพื่อเป็นตัวควบคุมการปล่อยยาในกลุ่มฮอร์โมน เช่น อินซูลิน นอกจากนี้ยังมีการนำเดกซ์แทรนมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการเป็นตัวพานำยาไปยังเซลล์เป้าหมายที่ต้องการการรักษา เช่น เซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังมีการนำเดกซ์แทรนมาใช้เป็นพรีไบโอติก เพื่อส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ด้วย (Khalikova และคณะ, 2005)

อย่างไรก็ตาม เดกซ์แทรนจัดเป็นปัญหาสำคัญในด้านทันตสาธารณสุขและในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล สำหรับด้านทันตสาธารณสุขนั้น เดกซ์แทรนเป็นสาเหตุหลักของการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวฟัน เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากจะใช้น้ำตาลแล้วสร้างเดกซ์แทรนลักษณะเหนียวหนืดออกมา สามารถจับเกาะกับผิวฟัน ไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารในช่องปาก เกิดเป็นคราบฟัน อันเป็นผลให้จุลินทรีย์ต่างๆเกาะผิวฟันได้ดีขึ้น และนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ (Pleszczynska และคณะ, 1997) สำหรับด้านอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล เดกซ์แทรนซึ่งถูกสร้างขึ้นจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ จะก่อให้เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย นอกจากนั้นเดกซ์แทรนยังเข้าไปรบกวนกระบวนการผลิต และก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนต่างๆของกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล และคุณภาพของน้ำตาลที่ได้ลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลอย่างมากในแต่ละปี และเกิดการสูญเสีย

รายได้มูลค่าหลายพันล้านบาท อันเป็นผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างมากอีกด้วย (Finnegan และคณะ, 2004)

การแก้ปัญหาโรคพืชน้ำอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรน อาจทำได้โดย การแปรงพืชน้ำให้ถูกต้อง การใช้สารฟลูออไรด์ การใช้ยาปฏิชีวนะ และสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ในคราบพืชน้ำ ในขณะที่การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาล อาจทำได้โดย การใช้กรดร่วมกับความร้อนในการสลายเดกซ์แทรน หรือการใช้สารเคมี หรือสารชีวฆาต (biocides) ในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดเดกซ์แทรนก่อนเข้ากระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้สามารถแก้ปัญหาได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ทั้งนี้วิธีที่สามารถลดปัญหาเดกซ์แทรนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ การใช้เดกซ์แทรนเนสย่อยสลายเดกซ์แทรน เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายเดกซ์แทรน ทำให้สมบัติความเหนียวเหนืดของเดกซ์แทรนลดลง สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น ซึ่งในด้านทันตสาธารณสุขจะช่วยลดการสะสมของคราบพืชน้ำ รวมทั้งลดการยึดเกาะของจุลินทรีย์บนผิวพืชน้ำที่จะนำไปสู่การเกิดโรคพืชน้ำ และในด้านอุตสาหกรรมน้ำตาลจะช่วยแก้ปัญหาการอุดตันของท่อส่งน้ำอ้อย ตลอดจนปัญหาอื่นๆที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ ได้แก่ รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส แต่ราส่วนมากมักจะมีส่วนของผนังเซลล์ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ และราบางชนิดยังสร้างอะฟลาทอกซินออกมาในภาวะเดียวกันกับภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ (Leach, 1969) ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสที่นำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันพืชน้ำจึงนิยมใช้เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ พบว่า ราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากราสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากราจะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีสมบัติเหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้โดยเฉพาะกับในอุตสาหกรรมน้ำตาลมากกว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย แต่เนื่องจากราบางชนิดสามารถผลิตทอกซินและยาปฏิชีวนะได้ ดังนั้นการนำไปโปรตีนจากราไปใช้ในอุตสาหกรรมโดยตรงก็อาจไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภค (Kang, 2005) ปัญหานี้ อาจแก้ไขได้โดยการนำยีนจากราไปแสดงออกในยีสต์หรือแบคทีเรีย ซึ่งการปฏิบัติเช่นนี้จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุศาสตร์ของราสายพันธุ์นั้น เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอและ cDNA ซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจากราสายพันธุ์นั้นก่อน งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่สุวรรณภวนพพรพันธุ์ (2538) ได้กลายพันธุ์ไว้นั้น ให้ผลผลิตเดกซ์แทรนเนสสูง



ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสของราสายพันธุ์นี้กับเดกซ์แทรนเนสของราอื่นๆที่มีรายงานมาแล้ว (Garcia และคณะ, 1996; Kang และคณะ, 2005; Li และคณะ, 2006) งานวิจัยนี้จึงโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลทางพันธุศาสตร์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ และข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้าง cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยการแสดงออกเกินในยีสต์หรือแบคทีเรียต่อไปในอนาคต และนอกจากนี้ยังพิสูจน์เอกลักษณ์ของราสายพันธุ์นี้ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อโคลนและหาลำดับของจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และพิสูจน์เอกลักษณ์ของราสายพันธุ์นี้

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานไว้แล้ว และเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ของราสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยการแสดงออกเกินต่อไปในอนาคต และทราบชนิดของราสายพันธุ์นี้

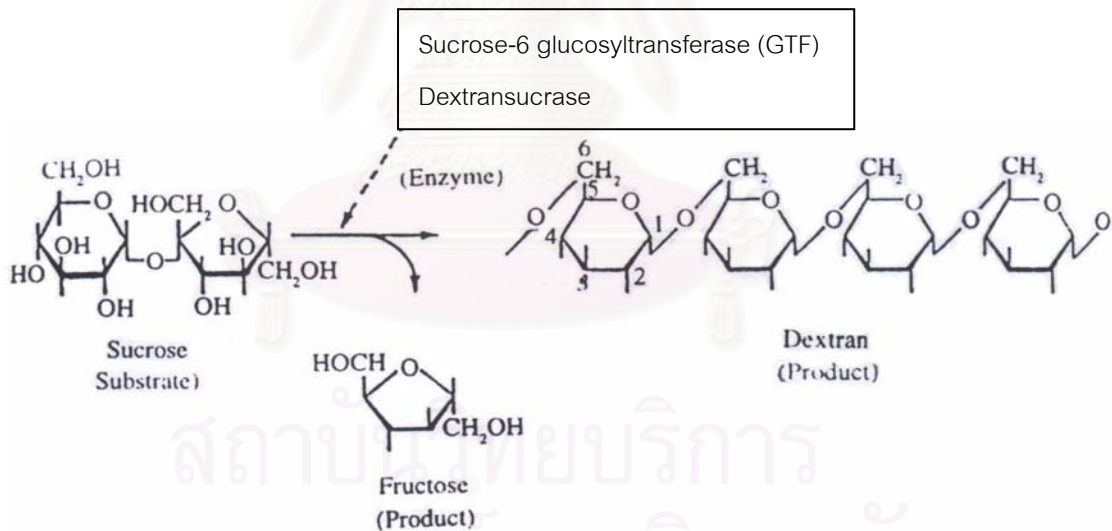
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ปรีทรรสน์วรรณกรรม

#### เดกซ์แทรน (dextran)

เดกซ์แทรนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ชนิดฮอมอพอลิเมอร์ ด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก เป็นแกนหลักประมาณ 50-95% และอาจมีการแตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3 หรืออาจพบเป็นพันธะแอลฟา-1,2 หรือแอลฟา-1,4 เดกซ์แทรนจะมีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหนืด ละลายน้ำได้ยาก เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลซูโครส โดยอาศัยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextranase) หรือกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลฟรุกโทสและน้ำตาลกลูโคส จากนั้นหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจะมาเรียงต่อกันเป็นสายยาวของเดกซ์แทรน (Bigelis, 1991; Abdel-Naby และคณะ, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรนโดยกลูโคซิลทรานสเฟอเรส

(ที่มา : จินตกร คู่วัฒนสุชาติ, 2542)

ในปัจจุบันมีการผลิตเดกซ์แทรนในทางการค้ามากมาย โดยมีให้เลือกตามขนาดของโมเลกุลและการใช้งาน เช่น เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เติมน้ำไอศกรีม เบเกอรี่ หรือลูกอม เพื่อช่วยให้เกิดความนุ่มของเนื้อสัมผัส เดกซ์แทรน

ที่ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็น blood plasma expander เพื่อเพิ่มปริมาตรของโลหิตในผู้ป่วยที่มีอาการช็อกเนื่องจากการสูญเสียเลือด โดยไม่รบกวนระบบของแอนติเจน-แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของเลือด (Lee และ Fox, 1985; Das และ Dutta, 1996), ใช้ร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในการควบคุมการปล่อยของยาในกลุ่มฮอร์โมน เช่น อินซูลิน ซึ่งจะอยู่ในรูปของเดกซ์แทรนไฮโดรเจลที่ภายในบรรจุอินซูลิน เพื่อควบคุมอินซูลินให้ปล่อยออกมาสู่ร่างกายอย่างช้าๆ ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ยา และใช้ร่วมกับเดกซ์แทรนเนสเพื่อเป็นตัวนำพาเข้าไปยังเซลล์เป้าหมายที่ต้องการการรักษา เช่น กรณีของเซลล์มะเร็งนั้น แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นมาให้มีลักษณะจำเพาะคู่ (bispecific antibody) คือ มีความจำเพาะต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่มีความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์แทรน จะถูกฉีดเข้าไปในกระแสเลือดของผู้ป่วย แอนติบอดีที่ถูกฉีดเข้าไปนั้นจะจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง จากนั้นฉีดเดกซ์แทรนเนสตามเข้าไป ซึ่งเดกซ์แทรนเนสจะจับจำเพาะกับแอนติบอดีที่จับอยู่กับเซลล์มะเร็ง สุดท้ายจึงฉีดยารักษามะเร็งที่คอนจูเกตติดอยู่กับเดกซ์แทรน เดกซ์แทรนจะถูกย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสที่จับอยู่ที่เซลล์มะเร็ง ทำให้ยาถูกปล่อยในบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งเท่านั้น ซึ่งเป็นการรักษาตรงตำแหน่งเป้าหมายของยา นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังถูกนำมาใช้เป็นพรีไบโอติก เพื่อส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ด้วย โดยเดกซ์แทรนจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับพรีไบโอติกแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ซึ่งเดกซ์แทรนจะส่งเสริมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Khalikova และคณะ, 2005)

อย่างไรก็ตาม ด้วยลักษณะเหนียวหนืด ละลายน้ำได้ยากของเดกซ์แทรน ทำให้เดกซ์แทรนเป็นปัญหาสำคัญในด้านทันตสาธารณสุขและในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล (Sidebotham, 1974) สำหรับด้านทันตสาธารณสุขนั้น เดกซ์แทรนเป็นสาเหตุหลักของการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวฟัน เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในช่องปากของคนและเป็นสาเหตุให้เกิดฟันผุ (Wolinsky, 1988) มีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรนซูเครสได้ดี เมื่อคนบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลเข้าไป จุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลแล้วสร้างเป็นเดกซ์แทรนลักษณะเหนียวหนืด สามารถจับเกาะกับผิวฟันโดยรวมตัวกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารในช่องปาก เกิดเป็นคราบฟัน (plaque) อันเป็นผลให้จุลินทรีย์ต่างๆ เกาะกับผิวฟันได้ดีขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีการเจริญและปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากการเมตาบอลิซึมออกมา กรดเหล่านี้จะทำลายสารเคลือบฟันและเนื้อฟัน ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ (Melville และ Russell, 1981) สำหรับด้านอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล น้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายนั้น จะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรนปนเปื้อนติดมาจากธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยเป็นเดกซ์แทรน ซึ่งมีลักษณะ

เหนียวเหนียวสามารถเกาะกับพื้นผิวต่างๆได้ดี และเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำให้หน้าอ้อยมีความเหนียวเพิ่มขึ้น เป็นผลให้อัตราการกรองน้ำอ้อยช้าลง นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังเข้าไปรบกวนกระบวนการผลิตและก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย เช่น เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย, เครื่องกรอง และอื่นๆ เนื่องจากการรวมตัวกันของเดกซ์แทรนเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ เกิดเป็นตะกอน ทำให้เกิดการอุดตันขึ้น เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลและผลผลิตของน้ำตาลที่ได้ลดต่ำลง ซึ่งอาจจำเป็นต้องมีการพักเครื่องเพื่อทำความสะอาดก่อนที่จะดำเนินการผลิตต่อไป อันเป็นผลให้เกิดการเพิ่มต้นทุนการผลิตและเสียเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นการเสียเปรียบอย่างมากในเชิงเศรษฐศาสตร์

การแก้ปัญหาในด้านทันตสาธารณสุขที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนนั้น อาจทำได้โดยการเคลือบร่องฟัน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปอาศัยในร่องฟัน การใช้สารประกอบฟลูออไรด์ เพื่อป้องกันฟันผุ การใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซัคเคอไรต์ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสในการให้ความหวาน การใชยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านจุลินทรีย์ เช่น เพนิซิลลิน เทตราไซคลิน การใช้วัคซีนในการป้องกันฟันผุ และการใช้สารยับยั้งการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอเรส เช่น น้ำตาลฟรักโตส และสารพวกเลคติน (Hamada และ Slade, 1980; Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988) ในขณะที่การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาล อาจทำได้โดย การใช้กรดร่วมกับความร้อนในการสลายเดกซ์แทรน การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน (sterilization) หรือการเติมสารเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดเดกซ์แทรนก่อนเข้ากระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้สามารถแก้ปัญหาได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งวิธีที่สามารถลดปัญหาเดกซ์แทรนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดและมีความเหมาะสมซึ่งนิยมใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้เดกซ์แทรนเนส เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายเดกซ์แทรน ทำให้เดกซ์แทรนมีขนาดโมเลกุลสั้นลง สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น เป็นผลให้สมบัติความเหนียวเหนียวของเดกซ์แทรนลดลง ซึ่งในด้านทันตสาธารณสุขจะช่วยลดการสะสมของคราบฟัน ซึ่งจะทำให้พื้นผิวภายในช่องปากไม่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์อันเป็นผลให้ลดการยึดเกาะของจุลินทรีย์บนผิวฟันที่จะนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ และในทางด้านอุตสาหกรรมน้ำตาล นอกจากจะช่วยแก้ปัญหาการอุดตันของท่อส่งน้ำอ้อย แล้วยังช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนด้วย เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลและผลผลิตของน้ำตาลที่ได้เพิ่มสูงขึ้น

เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้ง รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีต โดยพบว่าราสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณที่สูงมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Sun และ

คณะ, 1988) แต่บางส่วนมากมักจะมีส่วนของผนังเซลล์ เช่น กลูแคน ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ และบางชนิดยังสร้างอะฟลาทอกซินออกมาในภาวะเดียวกันกับภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ (Leach, 1969) ดังนั้นจึงนิยมนำเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันฟั่มมากที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสจากราจะนำมาใช้ในการแก้ปัญหาเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาล และในงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำเดกซ์แทรนเนสจากรามาใช้เพื่อแก้ปัญหาเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาล

## เศรษฐกิจจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายจัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศอย่างมาก โดยเป็นกิจกรรมการผลิตของประเทศที่มีมูลค่าสูง ทั้งนี้มีประชากรที่มีอาชีพเป็นชาวไร่อ้อย หรือแรงงานรับจ้างในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลประมาณ 1 ล้านครัวเรือน หรือไม่น้อยกว่า 5 ล้านคน ในส่วนของอุตสาหกรรมน้ำตาลพบว่าในแต่ละปีอุตสาหกรรมน้ำตาลได้สร้างงาน และมูลค่าการผลิตหลายหมื่นล้านบาทที่หมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจ ในขณะที่ทางด้านการส่งออก น้ำตาลทรายจัดเป็นสินค้าทางการเกษตรที่ทำรายได้จากการส่งออกให้กับประเทศไทยในลำดับที่สูงเช่นเดียวกัน ในปีการผลิต 2548 ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำตาลได้ทั้งสิ้น 7.10 ล้านตัน จากโรงงานน้ำตาลทรายทั้งหมด 46 โรง ที่กระจายอยู่ทั่วประเทศ ซึ่งประเทศไทยสามารถผลิตน้ำตาลทรายได้เป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากบราซิล อินเดีย และสหภาพยุโรป (Lichats, 2006) แต่ในด้านการส่งออก ประเทศไทยส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากบราซิล โดยมีปริมาณการส่งออกในปี 2547 ถึง 4.65 ล้านตัน (บริษัทอ้อยและน้ำตาลไทย, 2547) ทำให้ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกน้ำตาลเป็นมูลค่าถึง 33,128 ล้านบาท จึงกล่าวได้ว่า ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำตาลรายใหญ่ของโลก อันเป็นผลทำให้เกิดการนำเข้ารายได้ที่เป็นเงินตราต่างประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท ซึ่งมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยอย่างมาก

อุตสาหกรรมน้ำตาลนอกจากผลิตน้ำตาลแล้ว ยังมีผลพลอยได้ที่สามารถสร้างมูลค่าในอุตสาหกรรมอื่นๆได้อีก เช่น กากน้ำตาล สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆภายในประเทศ ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผลิตผงชูรส อุตสาหกรรมผลิตชอล์กหัวเหลือง อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมผลิตกรดซิตริก ส่วนกากอ้อยก็สามารถนำไปใช้ผลิตกระดาษ ไม้อัด ใช้ทำปุ๋ยปรับปรุงดิน และโรงงานน้ำตาลส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นเชื้อเพลิงในโรงงานด้วย



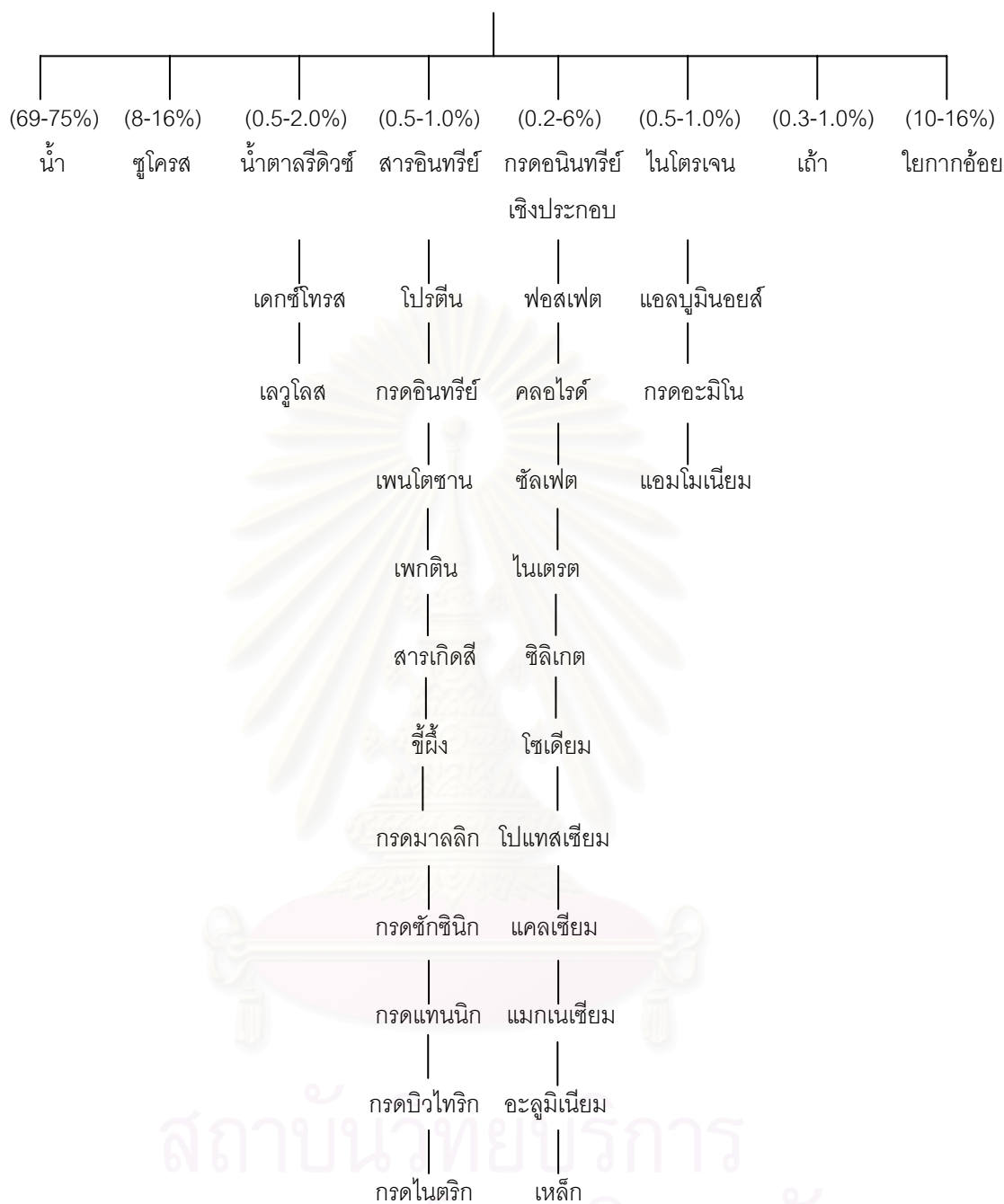
วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลทราย ได้แก่ อ้อย บีท และเมเปิล แต่สำหรับประเทศไทยแล้วอ้อยจัดเป็นวัตถุดิบที่สำคัญเพียงอย่างเดียวในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่เหมาะสมกับการปลูกอ้อยอยู่มากทุกภาคของประเทศทั้งภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ยกเว้นภาคใต้ ซึ่งมีฝนตกชุกเกินไป วิธีการตัดอ้อยเพื่อป้อนให้โรงงานมีอยู่ 2 วิธี คือ การตัดด้วยแรงคน หรือการตัดด้วยเครื่องจักร แต่เนื่องจากการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมน้ำตาลภายในประเทศ ทำให้พื้นที่ในการเพาะปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ผลที่ตามมาคือการจัดการด้านวัตถุดิบต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยวอ้อย ปัจจุบันเกษตรกรจึงนิยมเผาต้นอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเผาอ้อยนั้นนอกจากจะเป็นการทำลายระบบนิเวศแล้ว ยังเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ในดินที่ติดมากับบาดแผลของอ้อยที่ถูกเผาไฟด้วย ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายที่ตามมาอันเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตและผลผลิตน้ำตาลทรายลดลงอย่างมาก

### จุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในน้ำอ้อยและปัญหาจากเดกซ์แทรน

น้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายนั้น จะประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ และธาตุอาหารอื่นๆอีกเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาเจริญเติบโตได้ดี

หลังจากการเผาอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์ในดินจะถูกทำลายหมด ยกเว้นจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลในกลุ่ม *Leuconostoc spp.* ซึ่งสามารถสร้างสปอร์และทนความร้อน ได้แก่ *Leuconostoc dextranicum* และ *Leuconostoc mesenteroides* จุลินทรีย์กลุ่มนี้พบปนเปื้อนมากในอุตสาหกรรมน้ำตาล และการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะก่อให้เกิดปัญหาหลายประการต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย (Lee และ Fox, 1985; Rauh และคณะ, 1999) จุลินทรีย์กลุ่มนี้พบได้ทั่วไป และจะปนเปื้อนกับอ้อยในระหว่างการเก็บเกี่ยวจากไร่และขนส่งเข้าสู่โรงงาน โดยเฉพาะอ้อยที่ผ่านการเผาไฟจะทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ติดมากับบาดแผลอ้อยที่ถูกเผาไฟ รวมทั้งอ้อยที่ถูกแช่เย็นไว้ในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดความเสียหายและง่ายต่อการติดเชื้อนี้ (Eggleston และ Monge, 2005)

## ส่วนประกอบของสารต่างๆในน้ำอ้อย



รูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของสารต่างๆในน้ำอ้อย (อัศวิทธิ์ ปัทมเวณู, 2539)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอ้อย ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 33 ถึง 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำอ้อยเป็นอาหาร เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส หรือ กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งจะย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อย และสร้างสารที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหนืดที่เรียกว่า เดกซ์แทรนออกมา (Tsuchiya และคณะ, 1952; Arora และคณะ, 1991) และเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยไม่มีการแข่งขัน จึงเพิ่มปริมาณได้สูง เป็นผลทำให้เกิดการสร้างเดกซ์แทรนในปริมาณที่มากตามมา

เดกซ์แทรนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยเหล่านี้ มีผลทำให้ผลผลิตน้ำตาลที่ได้น้อยลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลลดลง เพราะปริมาณของน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำอ้อยถูกใช้ไปในการสร้างเดกซ์แทรน (Eggleston และ Monge, 2005; Rauh และคณะ, 1999) นอกจากนี้เดกซ์แทรนจะทำให้ผลผลิตน้ำตาลลดลงแล้ว ด้วยลักษณะที่เป็นเมือกเหนียวหนืดของเดกซ์แทรนนั่น ยังเข้าไปรบกวนกระบวนการผลิต และก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตน้ำตาล เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล และคุณภาพของน้ำตาลที่ได้น้อยลง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลอย่างมากในแต่ละปี และเกิดการสูญเสียรายได้มูลค่าหลายล้านบาท อันเป็นผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างมากอีกด้วย ดังนั้นเดกซ์แทรนจึงจัดเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย

เดกซ์แทรนที่ถูกสร้างขึ้น จะมีความยาว ขนาดน้ำหนักโมเลกุล และจำนวนแขนงย่อยแตกต่างกัน โดยจะมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่หลายพันขึ้นไปจนถึงหลายล้านดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ NRRL B-512 พบว่า มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง ยึดกันด้วยพันธะชนิดแอลฟา-1,6 สูงถึง 95% และมีสายแตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3 ประมาณ 5% นอกจากนี้ยังอาจพบเป็นแอลฟา-1,2 และ แอลฟา-1,4 ได้ด้วย (Santos และคณะ, 2000) ในขณะที่ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ B-1299 จะสร้างเดกซ์แทรนที่มีสายแตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,2 ประมาณ 27% และแอลฟา-1,3 ประมาณ 1% (Dols และคณะ, 1997) การแตกแขนงของพันธะกลูโคสจะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของเดกซ์แทรนลดลง ทำให้เดกซ์แทรนมีลักษณะเหนียวหนืด ประกอบกับเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง  $10^5$ - $10^7$  ดาลตัน (Cuddihy และคณะ, 2001) ยิ่งทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืด และเนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำตาลใน

โรงงานอุตสาหกรรมนั้นไม่ใช่กระบวนการปลอดเชื้อ ดังนั้นในน้ำอ้อยจึงมีการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ดังกล่าว

ประเทศไทยนั้นประสบปัญหาการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนมาเป็นเวลานานแล้ว เดกซ์แทรนที่ถูกผลิตขึ้นนี้มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลและคุณภาพของน้ำตาลที่ได้ลดต่ำลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยถูกนำไปใช้ในการสร้างเดกซ์แทรน ทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลง (Khalikova และคณะ, 2005) เดกซ์แทรนซึ่งมีลักษณะเหนียวเหนียวจะเกาะกับพื้นผิวต่างๆได้ดี ทำให้เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย, ถัง, ตะแกรง, เครื่องกรอง และอื่นๆ อันเป็นผลทำให้อัตราการไหลของน้ำอ้อยต่ำลง (Cuddihy และคณะ, 2001) เดกซ์แทรนยังเพิ่มความหนืดของน้ำอ้อย (Geronimos และ Greenfield, 1978) โดยปริมาณเดกซ์แทรนร้อยละ 1 สามารถเพิ่มความหนืดของน้ำอ้อยได้ 2 เท่า และถ้ามีเดกซ์แทรนร้อยละ 6 จะสามารถเพิ่มความหนืดของสารละลายได้ถึง 37 เท่า (สามชัย ไชยทิพย์อาสน์, 2508) ความหนืดของน้ำอ้อยอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนนี้นี้มีผลทำให้อัตราการกรองน้ำอ้อยช้าลง และยังมีผลทำให้ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้ใสล่าช้า และต้องใช้พลังงานมากกว่าปกติ รวมทั้งยังทำให้เกิดการล่าช้าของการต้มเคี่ยวอันเนื่องมาจากสัมประสิทธิ์การถ่ายเทความร้อนที่ลดลงด้วย (Jame และ Cameron, 1971) นอกจากนี้เดกซ์แทรนจะทำให้อัตราการตกผลึกน้ำตาลช้าลง และจะทำให้เกิดผลึกน้ำตาลรูปเข็ม (needle-shaped crystals) ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ เนื่องจากเป็นอุปสรรคต่อการปั่นแยก ทำให้ตะแกรงอุดตัน และการเกิดผลึกน้ำตาลรูปเข็มนี้ จัดว่าเป็นรูปร่างที่ไม่สวยงามไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Cuddihy และคณะ, 2001; Finnegan และคณะ, 2004)

ความหนืดของเดกซ์แทรนยังทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ปนเปื้อนมาในน้ำอ้อยถูกจับไว้ (บุญส่ง แสงอ่อน, 2525) และแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหาร แล้วปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากกระบวนการเมแทบอลิซึมออกมา เช่น กรดแลคติก, กรดบิวทิริก เป็นต้น กรดอินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ทำให้ความเป็นกรดของสารละลายน้ำตาลสูงขึ้น และทำให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้น้ำตาลฟรักโตสที่เหลืออยู่อาจสลายตัวเป็นกรดอินทรีย์ และสารประกอบที่มีสีขึ้นได้ด้วย (สันดี ฉายตระกุล, 2525)

จากเหตุผลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเป็นอุปสรรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียขึ้นในกระบวนการผลิตน้ำตาล ก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้ของโรงงานน้ำตาลในแต่ละปีเป็นจำนวนมากจากการประมาณการโดยทั่วไป พบว่าการสูญเสียในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายที่มีสาเหตุมา

จากเดกซ์แทรนนั่นสูงถึง 9.2% ของปริมาณการผลิตทั้งหมด (Tilbury และ French, 1974) ซึ่งเมื่อคิดจากปริมาณการส่งออกน้ำตาลในปี 2547 พบว่า มีการส่งออกน้ำตาลทรายประมาณ 4.65 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 33,128 ล้านบาท (ฝ่ายวิชาการและแผนงาน ศูนย์บริหารการผลิต, 2547) ในอัตราข้างต้นจะประมาณได้ว่า เดกซ์แทรนจะก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้ถึง 3,047.77 ล้านบาท ซึ่งนับได้ว่าเป็นผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก

### การแก้ปัญหาเดกซ์แทรนในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย

การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล ทำได้โดยป้องกันการเกิดหรือกำจัดเดกซ์แทรนออกไป สำหรับการป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนนั่น ทำได้โดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนำอ้อยที่ตัดได้เข้ากระบวนการผลิตทันที เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อ การเก็บอ้อยที่อุณหภูมิต่ำ การควบคุมความเป็นกรดเบสของน้ำอ้อย การฆ่าเชื้อโรคโดยการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน และการฉายรังสี หรือวิธีการทางเคมี เช่น การใช้สารเคมี หรือสารชีวฆาต (biocides) ในการฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดเดกซ์แทรนก่อนเข้ากระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามวิธีการทางชีวภาพนั้น สามารถให้ผลดีเฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่เมื่อไปใช้จริงในโรงงานที่มีขนาดใหญ่ก็ทำได้ยาก เนื่องจากปริมาณวัตถุดิบนั้นมีจำนวนมาก และการใช้สารเคมีก็อาจทำให้เกิดการตกค้างไปสู่ผู้บริโภคได้ เมื่อการป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการกำจัดเดกซ์แทรน โดยการกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดร่วมกับการใช้ความร้อน (Monson และ Paul, 1991) แต่วิธีนี้จะเกิดปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่รุนแรง การตัดโมเลกุลของเดกซ์แทรนจะเป็นแบบสุ่ม และอาจทำให้เกิดซูโครสอินเวอร์ชันได้ วิธีต่อมาคือ การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือ คลื่นแสงที่มีความถี่สูงในการกำจัดเดกซ์แทรน (Watson และ Woff, 1955) หรืออาจใช้วิธีการทางชีวภาพ เช่น อัลตราฟิลเทรชัน (ultrafiltration) ในการแยกเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีต้นทุนในการดำเนินงานสูงจึงไม่เป็นที่นิยม

ภายหลังจึงมีการนำเดกซ์แทรนเนสมาใช้กำจัดเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้น (Fulcher และ Inkerman, 1972) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถลดปัญหาเดกซ์แทรนได้ เนื่องจากวิธีนี้เป็นปฏิกิริยาทางเอนไซม์ทำให้มีความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาที่เกิดไม่มีความรุนแรง มีความเป็นพิษต่ำ ไม่ก่อการปนเปื้อนจากสารเคมี และสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยแต่ได้ประสิทธิภาพสูง (Imrie และ Tilbury, 1972) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายเดกซ์แทรน ทำให้เดกซ์แทรนมีขนาดโมเลกุลสั้น



ลง และทำให้สมบัติความเหนียวหนืดลดลง สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น (Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) ทำให้ช่วยแก้ปัญหาการอุดตันของท่อส่งน้ำอ้อย ตลอดจนปัญหาอื่นๆอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนดั่งที่กล่าวมาแล้วข้างต้นได้ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆตามมาในขั้นตอนของการผลิตน้ำตาล ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลและผลผลิตของน้ำตาลที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย

### เดกซ์แทรนเนส (dextranase)

เดกซ์แทรนเนส เป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบการเรียกเอนไซม์ว่า  $\alpha$ -1,6-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.11 มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะ  $\alpha$ -1,6 ซึ่งเป็นพันธะหลักที่เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของกลูโคสภายในสายเดกซ์แทรน เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยสารชักนำ (inducible enzyme) ซึ่งก็คือ เดกซ์แทรน (Das และ Dutta, 1996) ผลของการย่อยสลายเดกซ์แทรนนอกจากจะทำให้เดกซ์แทรนมีขนาดโมเลกุลสั้นลงแล้ว ยังมีผลทำให้สมบัติความเหนียวหนืดลดลง สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น โดยหากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 8 หน่วย แล้วเดกซ์แทรนจะสูญเสียสมบัติความเหนียวหนืดทั้งหมด (Koenig และ Day, 1989) โดยการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการสลายพันธะของเดกซ์แทรนสามารถทำได้ 2 แบบ (Walker, 1978) คือ

#### 1. เอกโซเดกซ์แทรนเนส (exo-dextranase)

เอกโซเดกซ์แทรนเนส ทำงานโดยการย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายของสายเดกซ์แทรนด้านใดด้านหนึ่ง เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคสจากปลายสาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกลูโคส เอกโซเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานในปัจจุบันมี 3 ชนิด โดยแบ่งตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายเดกซ์แทรน ได้แก่

1.1 กลูโคเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.70) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ได้แก่ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ I-42 (Mizuno และคณะ, 2004), *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999), *Streptococcus mitis* (Walker และ Pulkownik, 1973), *Thermomyces lanuginosus* (Jensen และ Olsen, 1996)

1.2 ไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.94) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโทส จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ ได้แก่ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-6 (Hatada และคณะ, 2004), *Achromobacter* sp. (Madhu และ Prabhu, 1983)

1.3 ไอโซมอลโทไทรโอเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.95) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโทไทรโอส จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ ได้แก่ *Brevibacterium fascum* var. *dextranolyticum* (Sugiura และคณะ, 1974), *Brevibacterium fascum* var. *dextranolyticum* สายพันธุ์ 0407 (Mizuno และคณะ, 1999)

## 2. เอนโดเดกซ์แทรนเนส (endo-dextranase)

เอนโดเดกซ์แทรนเนส ทำงานโดยการย่อยสลายพันธะที่จุดใดจุดหนึ่งภายในของสายเดกซ์แทรน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นพอลิเมอร์ขนาดต่างๆ อาจเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer), ไดเมอร์ (dimer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ของน้ำตาลกลูโคส ขึ้นอยู่กับความห่างระหว่างจุดที่ตัด จุลินทรีย์ที่สร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991), *Streptococcus salivarius* สายพันธุ์ PC-1 (Lawman และ Bleiweis, 1991), *Streptococcus salivarius* สายพันธุ์ M-33 (Ohnishi และคณะ, 1995), *Penicillium luteum* สายพันธุ์ ATCC-9644 (Fukumoto และคณะ, 1971), *Penicillium funiculosum* (Sugiura และคณะ, 1973), *Penicillium lilacinum* (Das และ Dutta, 1996), *Penicillium notatum* (Pleszczynska และคณะ, 1997), *Penicillium acualeatum* (Madhu และ Prabhu, 1984), *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996), *Aspergillus carneus* (Hiraoka และคณะ, 1972), *Chatomium gracile* (Hattori และคณะ, 1981), *Fusarium* sp. (Shimizu และคณะ, 1998), *Sporothrix schenckii* (Arnold และคณะ, 1998)

การทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการย่อยสลายพันธะของเดกซ์แทรนจะเป็นรูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ทั้ง 2 แบบ คือ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) ซึ่งสามารถสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular endodextranase) และสร้างเอกโซเดกซ์แทรนเนสสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ (intracellular exodextranase)

มีการค้นพบแบคทีเรียทรานเนสจากแหล่งต่างๆ ทั้งในจุลินทรีย์และเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด แต่โดยส่วนมากแล้วแบคทีเรียทรานเนสที่มีรายงานการค้นพบจะเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ทั้งในรา, ยีสต์, แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีต (Preobrazhenskaya และคณะ, 1974; Beldarrian และคณะ, 2003) ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์บางชนิดที่สร้างแบคทีเรียทรานเนส

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
<i>Acetobacter capsulatus</i>	Yamamoto และคณะ, 1992
<i>Achromobacter</i> sp.	Sawai และคณะ, 1974
<i>Arthrobacter</i> sp.	Hatada และคณะ, 2004
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Iwai และคณะ, 1996
<i>Bacillus</i> sp.	Zevenhuizen, 1968; Khalikova และคณะ, 2003
<i>Bacillus circulans</i>	Okami และคณะ, 1980
<i>Bacteroides</i> sp.	Staat และคณะ, 1973
<i>Bacteroides ochraceus</i>	Schachtele และคณะ, 1975
<i>Bacteroides oralis</i>	Takahashi, 1982
<i>Brevibacterium</i> sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1973
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Igarashi และคณะ, 1998
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	Igarashi และคณะ, 1998
<i>Cellovibrio mixtus</i>	Wynter, 1996
<i>Cytophaga johnsonii</i>	Foxgarty และคณะ, 1984
<i>Flavobacterium</i> sp.	Kobayashi และคณะ, 1983
<i>Lactobacillus</i> sp.	Staat และคณะ, 1973
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Khalikova และ Usanov, 2002
<i>Pseudomonas</i> sp.	Covacevich และ Richards, 1978
<i>Streptococcus downei</i>	Igarashi และคณะ, 2001
<i>Streptococcus mitis</i>	Staat และ Schachtele, 1974
<i>Streptococcus mutans</i>	Igarashi และคณะ, 2001
<i>Streptococcus salivarius</i>	Ohnishi และคณะ, 1995

<i>Streptococcus sobrinus</i>	Igarashi และคณะ, 2001
<i>Streptococcus suis</i>	Serhir และคณะ, 1997
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	Wynter และคณะ, 1997
แอกติโนมัยซีส	
<i>Actinomyces israelii</i>	Staat และ Schachtele, 1974
<i>Streptomycea cinamonensis</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
ยีสต์	
<i>Lipomyces stakeyi</i>	Webb และ Spencer-Martins, 1983
รา	
<i>Aspergillus carneus</i>	Hirsoka และคณะ, 1972
<i>Aspergillus luchvasis</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
<i>Chaetomium gracile</i>	Mizuno และคณะ, 1999
<i>Fusarium</i> sp.	Shimizu และคณะ, 1998
<i>Fusarium moniliforme</i>	Simonson และคณะ, 1975
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
<i>Hemicola grisea</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
<i>Penicillium acualeatum</i>	Madhu และ Prabhu, 1984
<i>Penicillium funiculosum</i>	Chaiet และคณะ, 1970; Kosaric และคณะ, 1973
<i>Penicillium lilacinum</i>	Walker และ Dewar, 1975
<i>Penicillium luteum</i>	Fukumoto และคณะ, 1971
<i>Penicillium minioluteum</i>	Roca และคณะ, 1996
<i>Penicillium notatum</i>	Pleszczynska และคณะ, 1997
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Minakova และ Preobrazhenskaia, 1997
<i>Penicillium roquefortii</i>	Hattori และ Ishibashi, 1952
<i>Penicillium verrucosum</i>	Wheatly และ Moo-Young, 1977
<i>Penicillium</i> sp. Strain 61	เอก แสงวิเชียร, 2531
<i>Penicillium</i> sp. SMCU 3-14	สุวรรณนา นพพรพันธุ์, 2538
<i>Sporothrix schencki</i>	Arnold และคณะ, 1998
<i>Verticillium</i> sp.	Tsuchiya และคณะ, 1952

เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย ส่วนมากจะมีปฏิกิริยาการย่อยสลายเดกซ์แทรนแบบเอกโซเดกซ์แทรนเนส สายเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยจะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกลูโคส (Forgaty และ Kelly, 1984) ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากราจะมีการย่อยสลายเดกซ์แทรนแบบเอนโดเดกซ์แทรนเนส (Khalikova และคณะ, 2005) สายเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยจะให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์, ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งส่วนมากจะอยู่ในรูปของน้ำตาลไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทไทรออส (Tsuru และคณะ, 1971)

เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ สามารถจัดจำแนกอยู่ในสองกลุ่ม คือ Glycosyl hydrolase family 49 และ Glycosyl hydrolase family 66 ซึ่ง Glycosyl hydrolase family เป็นการจัดกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตกับคาร์โบไฮเดรต หรือระหว่างคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลชนิดอื่น โดยใช้หลักการความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ซึ่ง Glycosyl hydrolase family 66 จะเป็นเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* spp. ในขณะที่ Glycosyl hydrolase family 49 จะเป็นเดกซ์แทรนเนสจากรา เช่น *Penicillium* spp. และเดกซ์แทรนเนสจากยีสต์ *Lipomyces starkeyi* รวมทั้งเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น *Arthrobacter* spp. และ *Brevibacterium* spp. โดย Glycosyl hydrolase family 49 และ 66 เป็นกลุ่มของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก ที่เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสภายในสายเดกซ์แทรน (Li และคณะ, 2006)

จากการจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโนโดย Aoki และ Sakano (1997) พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มของเดกซ์แทรนเนสมีความเหมือนกับไอโซพุลูลูแลนเนสในระดับหนึ่ง โดยการวิเคราะห์ลำดับแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม PileUp ในชุดซอฟต์แวร์สำเร็จ GCG Aoki และ Sakano พบบริเวณอนุรักษ์ทั้งสิ้น 7 บริเวณ (บริเวณ I-VII) ซึ่งคาดว่าบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวน่าจะมี ความสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้

ดังกล่าวแล้วว่าราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์ (Sidebotham, 1974; Beldarrain และคณะ, 2003) เนื่องจากราสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Sun และคณะ, 1988) นอกจากนี้เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากราจะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีสมบัติเหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลมากกว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย (Garcia และคณะ, 1996) โดยที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเดกซ์แทรนเนสและการปรับปรุง



ผลผลิตจากเด็กซ์แทรนเนสจากมากมาย (Fukumoto และ คณะ, 1971; Tsuru และคณะ, 1971; Shukla และคณะ, 1989; El Masry, 1991; Pleszczynska และคณะ, 1997; Abdel-Naby และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยในระดับโมเลกุลของยีนเด็กซ์แทรนเนสจากรายยังมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับยีนเด็กซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษายีนเด็กซ์แทรนเนสในระดับโมเลกุลสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมได้ต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ได้ สำหรับงานวิจัยที่ศึกษาและโคลนยีนประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ในกลุ่มราและยีสต์มีดังนี้

Garcia และคณะ (1996) โคลน cDNA ที่ประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) แล้ววิเคราะห์การแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* พบว่า cDNA ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 2,109 คู่เบส (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank เลขที่ L41562) ถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 608 หมู่ ที่มีขนาด 67 กิโลดาลตัน และที่บริเวณ N-terminal พบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 20 หมู่

Roca และคณะ (1996) ได้ใช้ cDNA จากงานวิจัยของ Garcia และคณะ เป็นโพรบ สำหรับค้นหาชิ้นส่วนของยีนประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสบนโครโมโซมของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน และพบว่า โคลนที่ได้มีขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,629 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสไม่มีอินทรอน พบโปรโมเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย CAAT Box ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCAAT และ TATA Box ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TATAAA กรอบอ่านรหัสเปิดของยีนประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสมีขนาด 1,824 คู่เบส ในกรอบอ่านรหัสเปิดมีโคดอนเริ่มต้น (start codon) ที่เป็นไปได้ 4 ตำแหน่ง ซึ่งแต่ละตำแหน่งประมวลรหัสให้โปรตีนเดียวกัน แต่ต่างกันที่ความยาวของปลายด้านอะมิโนเท่านั้น เมื่อถอดรหัสจากโคดอนเริ่มต้น ATG ตำแหน่งที่ 1 จะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 608 หมู่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน โดยที่บริเวณ N-terminal พบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 20 หมู่ และพบ PolyA signal ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AATAAG

Kang และคณะ (2005) ได้โคลน cDNA ที่ประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* (*Isd1*) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* โดยใช้ pGEM-T easy plasmid เป็นดีเอ็นเอพาหะ และพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ประมวลรหัสเด็กซ์แทรนเนสประกอบด้วย



ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 2,052 คู่เบส (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank เลขที่ AY520537) ที่ไม่มีอินทรอน โดยพบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,824 คู่เบส ที่มี PolyA tail 27 คู่เบส ถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 608 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67.6 กิโลดาลตัน บริเวณ N-terminal พบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 32 หมู่ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* กับลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996) โดยใช้โปรแกรม Clustal W พบว่ามีความเหมือนกัน 77%

Li และคณะ (2006) ได้โคลนจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (*Dex1*) โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการหาบริเวณอนุรักษ์ของยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และจากนั้นได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส พบว่ากรอบอ่านรหัสเปิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,818 คู่เบส (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank เลขที่ DQ394070) ถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 606 หมู่ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 จากงานวิจัยของ Garcia และคณะ (1996) พบว่า ยีนเดกซ์แทรนเนสมี 2 โคดอนคือ His34 และ Met35 ถูกขจัดออกไป (delete) นอกจากนั้นยังพบว่ามีกรดอะมิโน 72 หมู่ ที่มีการเปลี่ยนแปลงต่างจากเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปไม่ได้อยู่ในบริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนส

นอกจากนี้ยังมียีนเดกซ์แทรนเนสของราที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank จากงานวิจัยที่ไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (*DexA*) ซึ่งมีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,851 คู่เบส (หมายเลขเข้าถึงของ EMBL เลขที่ AJ272066) ถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 616 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* กับลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996) โดยใช้โปรแกรม Clustal W พบว่ามีความเหมือนกัน 97%

ยีนเดคซ์แทรนเนสไอโซพอร์มของ *Penicillium minioluteum* (Dex2) ซึ่งมีกรอบอ่านรหัส เปิดขนาด 1,815 คู่เบส (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank เลขที่ AF020619) ถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 604 หมู่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* กับลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996) โดยใช้โปรแกรม Clustal W พบว่ามีความเหมือนกัน 89%

สำหรับการศึกษาวิจัยเดคซ์แทรนเนสในประเทศไทยนั้น ได้มีการศึกษาที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย เอก แสงวิเชียร (2531) ได้เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย เพื่อคัดเลือกหาที่สามารถสร้างเดคซ์แทรนเนสได้จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่า รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 สามารถผลิตเดคซ์แทรนเนสได้ 42 หน่วยต่อมิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ Fukumoto ที่ผ่านการปรับปรุง ภายใต้การบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน จากนั้นมีการพัฒนาต่อมาเพื่อให้เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น จากรายงานของสุวรรณ นพพรพันธุ์ (2538) ซึ่งได้กลายพันธุ์นี้ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และกลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมีเอ็นเมทิลเอ็นไนโตรโซกวานิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine หรือ NTG) ทำให้ได้รา *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเดคซ์แทรนเนสได้สูงถึง 330.17 หน่วยต่อมิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็น 3.81 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น ต่อมาได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารที่มีการเติมกากน้ำตาลลงไป ทำให้สามารถสร้างเดคซ์แทรนเนสได้สูงถึงประมาณ 600 หน่วยต่อมิลลิเมตร (ศิริจัน ศรีสุวกรณ, 2547) และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55<sup>o</sup>ซ ความเป็นกรดเบส 4.5-5.0 ความเข้มข้นของบัพเฟอร์ 0.0225-0.0675 โมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40-50<sup>o</sup>ซ ความเป็นกรดเบส 3.5-8.0 ความเข้มข้นของบัพเฟอร์ 0.0095-0.475 โมลาร์ จากสมบัติเหล่านี้พบว่า เดคซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มีความเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาเดคซ์แทรนในโรงงานน้ำตาลซึ่งมีอุณหภูมิสูง การทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงที่เป็นกรดก็เหมาะสมกับการนำไปใช้ในน้ำอ้อยที่มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย ซึ่งจะมีการเจริญและปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากกระบวนการเมแทบอลิซึมออกมา

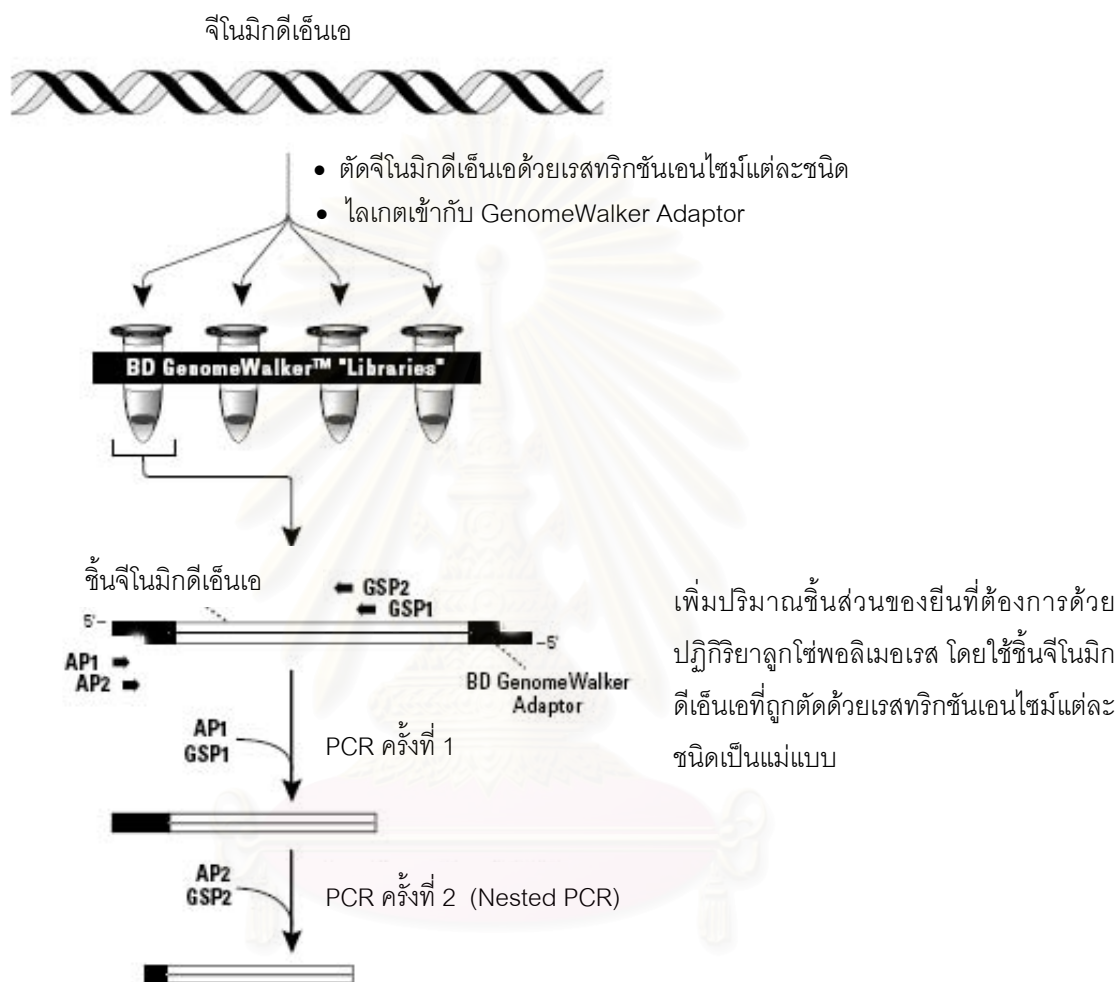
อย่างไรก็ตาม การนำโปรตีนจากราไปใช้ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารโดยตรงอาจไม่เป็นที่ยอมรับ เนื่องจากบางชนิดสามารถผลิตสารมัธยันตร์ที่เป็นพิษและราบางชนิดก็ผลิตยาปฏิชีวนะได้ จึงอาจไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภค (Kang, 2005) ดังนั้นจึงอาจแก้ปัญหาโดยการนำยีนจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ไปแสดงออกในยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่ง

จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุศาสตร์ของสายพันธุ์ดังกล่าว เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิก ดีเอ็นเอและ cDNA ซึ่งประมวลรหัสเดคซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ก่อน

### การค้นหายีนที่ต้องการโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA)

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสำหรับใช้ค้นหายีนที่ต้องการมีหลายวิธี เช่น เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization), ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และการโคลนแบบ shot-gun อย่างไรก็ตาม ได้มีการพัฒนานำชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) มาประยุกต์ใช้ ซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่ออำนวยความสะดวกและรวดเร็วในการค้นหายีนที่ต้องการ โดยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ใช้หลักการของ DNA walking ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งที่อยู่ถัดขึ้นไป (upstream) และถัดลงมา (downstream) จากบริเวณที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วของยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการศึกษาบริเวณที่ทราบแล้วนี้ ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบ Nested PCR โดยออกแบบ outer gene-specific primer1 (GSP1) และ nested gene-specific primer2 (GSP2) ซึ่งจะนำมาใช้ร่วมกับ outer adaptor primer1 (AP1) และ nested adaptor primer2 (AP2) จากชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) โดยมีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งเริ่มจากการนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ซึ่งจะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ (blunt end) จากนั้นไลแกตขึ้นดีเอ็นเอเข้ากับ BD GenomeWalker Adaptor โดยโครงสร้างของอะแดปเตอร์แสดงในรูปที่ 2.4 จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ที่อยู่ด้านนอก ซึ่งได้แก่ outer adaptor primer1 (AP1) ร่วมกับ outer gene-specific primer1 (GSP1) หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 1 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 ให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบ Nested PCR ด้วยไพรเมอร์ที่อยู่ด้านใน ซึ่งได้แก่ nested adaptor primer2 (AP2) ร่วมกับ nested gene-specific primer2 (GSP2) โดยทั้ง AP1 และ AP2 เป็นลำดับที่อยู่บนอะแดปเตอร์ที่ต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสครั้งที่ 2 แล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งอยู่ทั้งด้าน

upstream และ downstream ของบริเวณที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วดังกล่าว ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนนี้สามารถนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ต่อไป

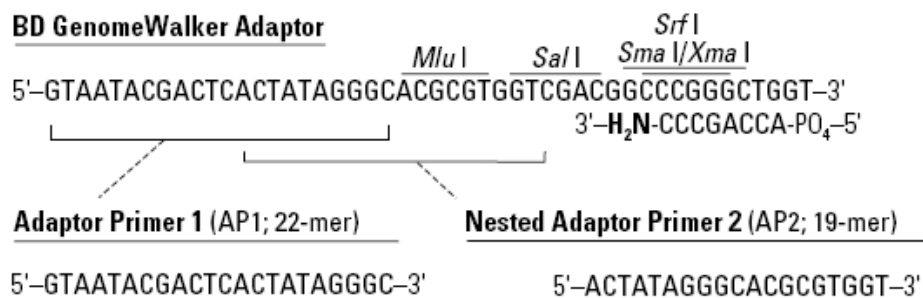


ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้สามารถนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ต่อไป

**รูปที่ 2.3** ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA)

AP1 และ AP2 คือ outer adaptor primer1 และ nested adaptor primer2 ตามลำดับ

GSP1 และ GSP2 คือ outer gene-specific primer1 และ nested gene-specific primer1 ตามลำดับ (ปรับปรุงจากคู่มือประกอบของชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ BD GenomeWalker™ Adaptor และ adaptor primers (AP1 และ AP2) รวมทั้งตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์บนอะแดปเตอร์ อะแดปเตอร์จะถูกไลเกตเข้าไปที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดไว้แล้ว หมู่เอมีน (H<sub>2</sub>N) ที่อยู่บนเส้นล่างของอะแดปเตอร์จะป้องกันการสร้างต่อที่ปลาย 3' ของอะแดปเตอร์ เพื่อป้องกันการเกิด AP1 binding site ที่ปลาย 3' ของอะแดปเตอร์บนชิ้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (จากคู่มือประกอบของชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit)

งานวิจัยมากมายได้นำชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) มาใช้เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ เช่น การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน malate synthase ของ *Streptomyces clavuligerus* สายพันธุ์ NRRL 3585 (Chan และ Sim, 1998), การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ของยีนถั่ว (Chawla และ DeMason, 2003) และการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน orotidine-5'-monophosphate decarboxylase (OMPD) ของ *Myrothecium gramineum* (Maeseneire และคณะ, 2006)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จะโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัส เด็กซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยใช้ชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะเป็นข้อมูลทางพันธุศาสตร์ของสายพันธุ์ดังกล่าว เพื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างกับเด็กซ์แทรนเนสยีนที่มีรายงานแล้ว ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้าง cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต เด็กซ์แทรนเนสโดยการแสดงออกเกินในยีสต์และแบคทีเรียต่อไปในอนาคต



## การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

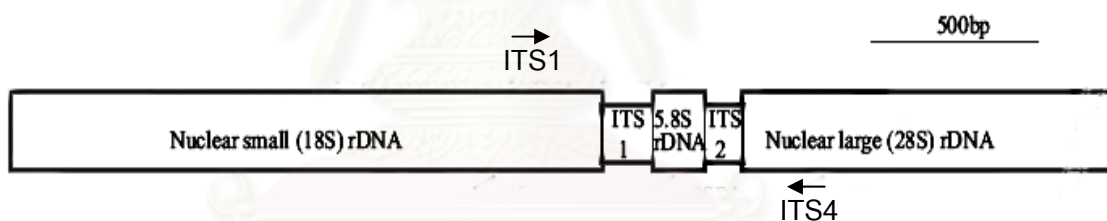
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรามีหลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางสรีรวิทยาของรา (morphological and physiological identification) และการใช้เทคนิคทางโมเลกุล (molecular identification) อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราโดยการศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางสรีรวิทยานั้น เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และราอาจมีลักษณะทางกายภาพและทางสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป ปัจจุบันจึงนิยมใช้เทคนิคทางโมเลกุล (molecular technique) ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ผลการทดลองไม่ขึ้นอยู่กับการจัดเก็บตัวอย่างนอก เป็นวิธีที่มีความไวสูง และให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ถึงระดับสกุล (genus) และชนิด (species) ของราด้วย (Guerche และคณะ, 2004; Gutzmer และคณะ, 2004)

เทคนิคทางโมเลกุลที่นิยมใช้ในปัจจุบันเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรานั้น คือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR) เนื่องจากบริเวณ ITS จะประกอบด้วย บริเวณที่ไม่ประมวลรหัส (non-coding regions) 2 บริเวณ ได้แก่ ITS1 และ ITS2 ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีความแปรผันระหว่างราต่างชนิดกัน (interspecific variation) สูงมาก ในขณะที่มีความแปรผันภายในราชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) น้อยมาก ด้วยลักษณะนี้เอง บริเวณ ITS จึงสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของราในระดับชนิดได้ บริเวณ ITS ที่นิยมใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา คือ บริเวณของ ITS1-5.8S-ITS2 ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โดยบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอเหล่านี้เป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์ โดยเฉพาะบริเวณ 5.8S rDNA นั้นจะมีความอนุรักษ์สูงในราแต่ละสกุล บริเวณนี้จึงสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของราในระดับสกุลได้ และพบว่าในปัจจุบันได้มีรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank แล้วเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้บริเวณ ITS ในจีโนมิกดีเอ็นเอของรา มักจะมีขนาดระหว่าง 600-800 คู่เบส ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวได้ง่าย โดยการใช้อยู่ primers เช่น ไพรมเมอร์ ITS1 และ ITS4 ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยตำแหน่งจับเกาะของไพรมเมอร์แสดงในรูปที่ 2.5 และยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ นั้น จะมีจำนวนชุดของยีนสูง (high copy number) เป็นผลให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เนื่องจากสามารถใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างในปริมาณน้อยหรือเจือจางได้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Gardes และ Bruns,

1993; Jasalavich และคณะ, 2000; Horton และ Bruns, 2001; Iwen และคณะ, 2002; Martin และ Rygliewicz, 2005; Stenstrom และ Ihrmark, 2005; Petti, 2007)

งานวิจัยมากมายได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของรา *Penicillium* ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยการทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Penicillium* ชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (Pedersen และคณะ, 1997) และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Penicillium* ชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากผลองุ่น โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (Guerche และคณะ, 2004) เป็นต้น

ดังนั้นเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 งานวิจัยนี้จึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของรานี้ เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล



รูปที่ 2.5 แผนที่แสดงการเรียงตัวของบริเวณ ITS และแสดงตำแหน่งของ universal ITS ไพรมเมอร์ (ITS1 และ ITS4) (Gutzmer และคณะ, 2004)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany
4. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  ของบริษัท Forma Scientific, USA
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
  - Mini Sub-cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA
15. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Nichiryo, Japan

16. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab<sup>TH</sup>  
Thermo- block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
18. ครอบกึ่งปิดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิเมตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
19. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA
20. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan
21. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
22. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ  
- Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
23. เครื่อง hybridization oven ของบริษัท Thermo electron, USA

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-Rad, USA
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
8. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ของบริษัท E Merck, Germany
9. กาลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France
10. สารละลายฟีนอลอิ่มตัว (Equilibrated phenol, ultrapure) ของบริษัท USB, USA
11. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E Merck, Germany
12. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany
13. 2-โพรพานอล ของบริษัท E Merck, Germany
14. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) ของบริษัท Sigma, USA

15. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Sigma, USA
16. SDS (sodium dodecyl sulfate), ( $C_{12}H_{25}OSO_3$ ) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
17. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
18. เรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*, *BamHI* และ *HindIII* ของบริษัท BioLabs, USA
19. เรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*, *SalI* และ *XhoI* ของบริษัท Fermentas, USA
20. เรสทริกชันเอนไซม์ *KpnI* และ *XbaI* ของบริษัท Promega, USA
21. 1 kb DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
22. 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
23. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท BioLabs, USA
24. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท BioExcellence, Thailand
25. *Pfu* DNA polymerase ของบริษัท Fermentas, USA
26. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท SibbsEnzyme, Russia
27. เอนไซม์ T4-ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) ของบริษัท BioLabs, USA
28. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
29. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Fermentas, USA
30. IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA
31. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
32. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
33. ชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit ของบริษัท BD Biosciences, USA
34. ชุด QIAGEN PCR Cloning Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
35. ชุด GeneJET™ PCR Cloning Kit ของบริษัท Fermentas, USA
36. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)



### 3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### 3.3.1 รา

รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่สร้างไว้โดย สุวรรณ นพพรพันธุ์ (2538) จากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

#### 3.3.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนมป์/ ฟีนอมป์	เอกสารอ้างอิง
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$	$\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> - <i>argF</i> )U169	Hanahan, 1983

### 3.4 พลาสมิดและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

## ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pDrive Cloning Vector	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , $\alpha$ lac/MCS	บริษัท Qiagen, Germany
pJET1/blunt Cloning Vector	Ap <sup>r</sup> , <i>eco47IR</i> , P <sub>lacUV5</sub>	บริษัท Fermentas, USA
pPT-1	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ Dex2F และ Dex2R ขนาดประมาณ 600 bp ในพลาสมิด pDrive Cloning Vector	สร้างในการทดลองนี้
pPT-4	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ AP2 และ Dex6R ขนาดประมาณ 2.5 kb ในพลาสมิด pDrive Cloning Vector	สร้างในการทดลองนี้
pPT-5	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ AP2 และ Dex4F ขนาดประมาณ 2.4 kb ในพลาสมิด pDrive Cloning Vector	สร้างในการทดลองนี้
pPT-6	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ Dex8F และ Dex10R ขนาดประมาณ 3.0 kb ในพลาสมิด pJET1/blunt Cloning Vector	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( $T_m$ )	เอกสารอ้างอิง
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (64 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท BD Biosciences, USA
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' (60 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท BD Biosciences, USA
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท Promega, USA
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (56 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท Promega, USA
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (55.4 <sup>o</sup> ซ)	Gardes และ Bruns, 1993
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (55.2 <sup>o</sup> ซ)	Gardes และ Bruns, 1993
Dex1F	5'-TCTGTACCTGGTGGCATGATTC-3' (59 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex1R	5'-TCGCTAATTTGACTTGAGATGC-3' (58.2 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex2F	5'-TTCCCACCAGGTGTATACTG-3' (55.6 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex2R	5'-TGTCGATTGTCACCTCCACTG-3' (55.6 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex3F	5'-CGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGC-3' (68.1 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex4F	5'-CTTTGTATATGAATCGATCCCCGGAACG-3' (67.2 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex5R	5'-ACGCAGTACCATGTTTGACCACCCCAAGG-3' (68.5 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex6R	5'-TGCAACATAGTTGTCGCCGGCATTGGCTTG-3' (68.1 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex7F	5'-GTATCGGTTTCCAGCTTCATTGC-3' (60 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex8F	5'-TAATTGACGCCTTGACAGGTGATG-3' (61 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex9R	5'-AGCTCGTACGAGATTGTTACTGC-3' (60 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex10R	5'-CATATCGTCCACGTCTTTTCAAAG-3' (60.6 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex11R	5'-TATGAGTAGGACGTAGAGTG-3' (55.2 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex12R	5'-TTGAATCTAGTGTGTGCTG-3' (54.8 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex13F	5'-CTTCTATGCAACTGGTCATG-3' (55.2 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้

### 3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### 3.5.1 การเก็บรักษา

##### 3.5.1.1 การเก็บรักษาในระยะสั้น

เชื้อสปอร์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ลงบนอาหารแข็ง เอียง malt extract (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>C จนกว่าจะนำมาใช้ และนำมาขีดลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

##### 3.5.1.2 การเก็บรักษาในระยะยาว

นำสปอร์มาทำไลโอไฟไลซ์ (lyophilization) และเก็บเชื้อในรูปสปอร์แห้ง

#### 3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *Escherichia coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก3) นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>C หลังจากนั้นนำมาผสมกับ 80% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 3:7 โดยปริมาตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>C เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>C เป็นเวลา 1 ปี

### 3.6 การสกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

#### 3.6.1 การเลี้ยงรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอ

แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract (ภาคผนวก ก1) ประมาณ 1 มิลลิลิตร จากปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในหลอดเก็บราจากข้อ 3.5.1.1 ใช้ลูปเชื้อสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วรูปกรวยเดิม บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30<sup>o</sup>C เป็นเวลา 3 วัน

### 3.6.2 การเก็บไมซีเลียมและการไลโอไฟไลซ์ (lyophilization)

นำชุดกรวยกรองต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองลงบนกรวยกรอง แล้วล้างด้วยเอทานอล 95% เพื่อฆ่าเชื้อกระดาษกรอง เทไมซีเลียมที่ได้จากข้อ 3.6.1 ลงบนกระดาษกรอง ล้างไมซีเลียมด้วยน้ำกลั่น จากนั้นรอจนไมซีเลียมแห้ง แล้วจึงเก็บเอาเฉพาะไมซีเลียมไปไลโอไฟไลซ์ (lyophilization) จะได้ไมซีเลียมที่แห้งพร้อมจะนำไปสกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอ

### 3.6.3 การสกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

สกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Raeder และ Broda (1985) ดังนี้ นำไมซีเลียมในข้อ 3.6.2 ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ในโถรงบดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมนิโตรเจนเหลวลงไป บดไมซีเลียมให้เป็นผงละเอียด แล้วถ่ายใส่หลอดไมโครพิวจ์ เติมสารละลาย Extraction Buffer (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชันนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) แล้วเติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 0.05 เท่าของส่วนใส นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ และสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนใสที่อยู่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่มาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และ absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสของโซเดียมอะซีเตตและเอทานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอน



ดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข10) โดยปริมาตรที่เพิ่มขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้

### 3.6.4 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  ซึ่งค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.7 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดคซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยใช้ชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Bioscience, USA)

3.7.1 การตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

นำดีเอ็นเอในข้อ 3.6.3 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* (BD Bioscience, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยแต่ละปฏิกิริยาใช้ส่วนผสมดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	12.5	ไมโครลิตร
10X เรสทริกชันเอนไซม์ บัฟเฟอร์	4	ไมโครลิตร
เรสทริกชันเอนไซม์ (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	28.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยการกวนกลับตลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม 5-10 วินาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

### 3.7.2 การทำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดในข้อ 3.7.1 มาเติมสารละลาย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิพซ์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิพซ์หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส (9.5 ไมโครลิตร), absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส (190 ไมโครลิตร) และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 80% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

### 3.7.3 การไลเกต (ligation) ขึ้นดีเอ็นเอเข้ากับอะแดปเตอร์ (adaptor)

ไลเกตขึ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.2 เข้ากับอะแดปเตอร์ ด้วย T4 ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) (BD Biosciences, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ขึ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.2	2	ไมโครลิตร
อะแดปเตอร์ (25 ไมโครโมลาร์)	0.95	ไมโครลิตร
10X ไลเกชันบัฟเฟอร์	0.8	ไมโครลิตร

T4 ดีเอ็นเอไลเกส (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	4	ไมโครลิตร

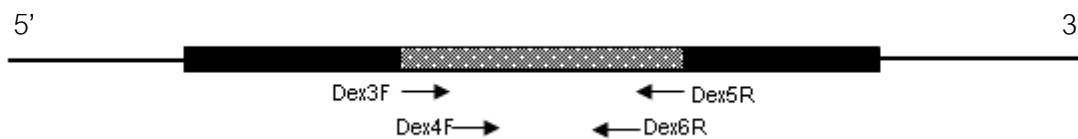
ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมนัฟเฟอ์ TE ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 40 ไมโครลิตร

3.7.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR)

#### 3.7.4.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

จากการหาลำดับอนุกรมยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้โปรแกรม ClustalX โดยใช้ลำดับของยีนเดกซ์แทรนเนสของราที่มีรายงานแล้ว 3 ลำดับ ได้แก่ pUDEX ของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (หมายเลขเข้าถึง L41562 และ Garcia และคณะ, 1996), Dex2 ของ *Penicillium minioluteum* (หมายเลขเข้าถึง AF 020619) และ DexA ของ *Pencillium funiculosum* (หมายเลขเข้าถึง AJ272066) ดังแสดงในภาคผนวก ค1 ร่วมกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ Dex1F, Dex1R และ Dex2F, Dex2R โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นแม่แบบ ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ดังนั้นจึงออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนเดกซ์แทรนเนสที่บริเวณปลาย 5' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ทราบแล้วนี้ เพื่อใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยู่ถัดลงมา โดยออกแบบ forward primer 2 เส้น คือ forward primer ที่อยู่ด้านนอก (outer forward primer) และ forward primer ที่อยู่ด้านใน (nested forward primer) โดยตั้งชื่อว่า Dex3F และ Dex4F ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์บริเวณปลาย 3' โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ทราบแล้วดังกล่าว เพื่อใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยออกแบบ reverse primer 2 เส้น คือ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก (outer reverse primer) และ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (nested reverse primer) โดยตั้งชื่อว่า Dex5R และ Dex6R ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) และ nested adaptor primer 2 (AP2) จากชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Bioscience, USA) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

แสดงดังตารางที่ 3.3 ซึ่งทั้ง AP1 และ AP2 เป็นลำดับที่อยู่บนอะแดปเตอร์ที่ต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอ ในข้อ 3.7.3



รูปที่ 3.1 แผนทีแสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และบริเวณปลาย 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ทราบแล้ว (■) คือ ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส และ → แสดงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

#### 3.7.4.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1

##### 3.7.4.2.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex5R และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex5R ขึ้นไป ได้ใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก (Dex5R) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยาเป็นดังนี้

- 10X BD Advantage 2 PCR buffer	5	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)		
- สารละลาย Dex5R primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย AP1 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว)	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)		
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X)	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase)		

ดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งตัดด้วยเวสทริกชันเอนไซม์

และไลเกตเข้ากับอะแดปเตอร์แล้วจากข้อ 3.7.3

1 ไมโครลิตร

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ

40 ไมโครลิตร

ปริมาตรสุทธิ

50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

- 7 รอบ ที่

อุณหภูมิ 94<sup>o</sup>ซ

เป็นเวลา 2 วินาที

อุณหภูมิ 70<sup>o</sup>ซ

เป็นเวลา 3 นาที

- 32 รอบ ที่

อุณหภูมิ 94<sup>o</sup>ซ

เป็นเวลา 2 วินาที

อุณหภูมิ 69<sup>o</sup>ซ

เป็นเวลา 3 นาที

รอบสุดท้าย ที่

อุณหภูมิ 67<sup>o</sup>ซ

เป็นเวลา 4 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เกล่งในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข14) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid-2 ให้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้านหนึ่ง แล้วย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข13) เป็นเวลา 5-10



นาที่ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

#### 3.7.4.2.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex3F และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex3F ลงมา ได้ใช้ forward primer ที่อยู่ด้านนอก (Dex3F) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

- 10X BD Advantage 2 PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย Dex3F primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย AP1 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase)	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และไลเกตเข้ากับอะแดปเตอร์แล้วจากข้อ 3.7.3	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	40	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

### 3.7.4.2.3 ชุดควบคุมผลบวก (positive control)

ใช้ Human Positive Control Library จากชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Positive Control tPA primer (PCP1) ที่จำเพาะกับยีน tPA บนโครโมโซมของมนุษย์ ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) จากชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสและโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.4.2.1

### 3.7.4.2.4 ชุดควบคุมผลลบ (negative control)

ใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ ในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลลบของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.7.4.2.1 และ 3.7.4.2.2 โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.4.2.1 และ 3.7.4.2.2

## 3.7.4.3 ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2

### 3.7.4.3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex6R และ AP2

เจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 ในข้อ 3.7.4.2.1 ประมาณ 50 เท่า โดยใช้ น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 โดยใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (Dex6R) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

- |  |   |           |
|--|---|-----------|
| - 10X BD Advantage 2 PCR buffer<br>(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)       | 5 | ไมโครลิตร |
| - สารละลาย Dex6R primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์<br>(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |

- สารละลาย AP2 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase) 1 ไมโครลิตร

- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.7.4.2.1 ที่เจือจางแล้ว 1 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 ไมโครลิตร
- ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เป็นดังนี้

- 5 รอบ ที่
  - อุณหภูมิ 94<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 70<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 3 นาที
- 20 รอบ ที่
  - อุณหภูมิ 94<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 60<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 3 นาที
- รอบสุดท้าย ที่
  - อุณหภูมิ 67<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 4 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

## 3.7.4.3.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex4F และ AP2

เชื้อจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 ในข้อ 3.7.4.2.2 ประมาณ 50 เท่า โดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 ใช้ forward primer ที่อยู่ด้านใน (Dex4F) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเป็นดังนี้

- 10X BD Advantage 2 PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลาย Dex4F primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย AP2 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase)	1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.7.4.2.2 ที่เชื้อจางแล้ว	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	40 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.3.1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

### 3.8 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสครั้งที่ 2

#### 3.8.1 การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ออกจากอะกาโรสเจล ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ ตัดชิ้นอะกาโรสเจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนัอะกาโรสเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนัอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจีใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บรักษาสารละลายของชิ้นดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ

#### 3.8.2 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ไลเกตชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pDrive Cloning Vector (QIAGEN PCR Cloning Kit) (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข22) โดยใช้ไลเกส (ligase) (QIAGEN PCR Cloning Kit) (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตโดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.1	4 ไมโครลิตร (ประมาณ 100 นาโนกรัม)
pDrive Cloning Vector	1 ไมโครลิตร (ประมาณ 50 นาโนกรัม)
2X ไลเกชันมาสเตอร์มิกซ์	5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10 ไมโครลิตร



ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอ สอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.8.3 การทรานสฟอร์มมีคอมปิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  และการคัดเลือกทรานสฟอร์มเม้นท์ที่มีรีคอมปิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

### 3.8.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ด้วยวิธีแคลเซียคลอไรด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5 $\alpha$  ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ไปยัง arm flask ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ หลว LB ปริมาตร พลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร ทั้งหมด 5 พลาสก์ โดยถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ หลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ จนกระทั่ง OD<sub>550</sub> เท่ากับ 0.5

ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้เตรียมสารละลายแคลเซียคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายแคลเซียคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสก์ขนาด 1 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายแคลเซียคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้ จากนั้นเตรียมสารละลายแคลเซียคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผสมกลีเซอรอล 80% โดยแบ่งสารละลายแคลเซียคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เตรียมไว้มาปริมาตร 44.4 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล 80% ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 5.6 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD<sub>550</sub> ที่ต้องการแล้ว นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง นำไปปั่นผสมโดยใช้เครื่องปั่นผสม เพื่อกระจายตะกอนเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วรวมตะกอนเซลล์

ในหลอดเซนตริฟิวจ์แต่ละหลอด ให้อยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์เพียงหลอดเดียว เติมนสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง นำไปปั่นผสมเพื่อ กระจายตะกอนเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วเติมนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็นปริมาตร 125 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง นำไปปั่นผสมเพื่อกระจายตะกอนเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วเติมนสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม กลีเซอรอล 80% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากันเบาๆ สุดท้ายแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>ซ

### 3.8.3.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.8.2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5 $\alpha$  ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตได้จากข้อ 3.8.2 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป

### 3.8.3.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E.coli* DH5 $\alpha$  ที่มีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* DH5 $\alpha$  ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วในข้อ 3.8.3.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข2) ซึ่งผ่านการเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข

17) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข18) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร (โดยเกลี่ยสารละลายทั้งสองนี้ก่อนใช้) หลังจากเกลี่ยเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง)

คัดเลือกทรานสเฟอร์แมนที่มีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสโดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาทำโคโลนี PCR (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ เชื้อโคโลนีสีขาวมาครึ่งโคโลนีใส่ในหลอดไมโครพิพิจที่มีน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 10 โคโลนี ต่อ 1 หลอดไมโครพิพิจ นำไปปั่นผสมเบาๆด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5-10 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส

จากนั้นนำสารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

- 10X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย Dex4F primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย Dex6R primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นของแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิโมลาร์)	8	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 หน่วย)	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	10	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	20.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โดยชุดควบคุมผลบวกนั้นใช้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและชุดควบคุมผลลบใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นแม่แบบ

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 45 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 30 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1 แต่ใช้อะกาโรสเข้มข้น 0.8% และใช้ 100 bp DNA ladder (BioExcellence, Thailand) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

เมื่อได้กลุ่มโคลนที่ให้ผลบวกเช่นเดียวกับชุดควบคุมผลบวกแล้ว นำแต่ละโคลนในกลุ่มโคลนนั้นมาแยกทำโคลน PCR ซ้ำอีกครั้ง เพื่อหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการ

### 3.9 การคัดเลือกโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.9.1 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3)

นำโคลนสีขาวในข้อ 3.8.3.3 ที่มีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินปริมาณ 5 มิลลิกรัม บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในหลอดไมโครพิพาว์จด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสใส่ลงใน QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพจีใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.9.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4

### 3.9.3 การยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำพลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.9.1 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อยืนยันผลที่ได้ในข้อ 3.8.3.3 โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

- |  |   |           |
|--|---|-----------|
| - 10X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer<br>(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer) | 5 | ไมโครลิตร |
| - สารละลาย Dex4F primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์<br>(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)           | 1 | ไมโครลิตร |



- สารละลาย Dex6R primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นของแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิโมลาร์)	8	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 หน่วย)	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.9.1	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	30	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรส และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3

### 3.9.4 การทดสอบทิศทางการเข้าของชั้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.9.1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sa*I (Fermentas, USA) อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

ดีเอ็นเอจากข้อ 3.9.1	0.5-10	ไมโครกรัม
10X บัฟเฟอร์ O	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	3-5	ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ตรวจสอบรูปแบบพลาสมิดที่ตัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

3.9.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.9.1 โดยใช้บริการของบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) และ/หรือ บริษัท 1<sup>st</sup> Base (ประเทศมาเลเซีย)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

**3.10 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium sp.* สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

3.10.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณก่อนถึงโปรโมเตอร์ และหลัง terminator ของยีนเดกซ์แทรนเนส เพื่อให้ได้ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่สมบูรณ์ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่หาได้ในข้อ 3.9.5 ออกแบบ forward primer 2 เส้น ตั้งชื่อว่า Dex7F และ Dex8F และ reverse primer 2 คู่ ตั้งชื่อว่า Dex9R และ Dex10R ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.3

3.10.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *Penicillium sp.* สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่สกัดได้ในข้อ 3.6.3 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 3.10.1 ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

- 10X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย forward primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย reverse primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 หน่วย)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Pfu</i> DNA polymerase ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 หน่วย)	0.2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.3 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32.8	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 5 นาที	} 30 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 45 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 12 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

### 3.11 การโคลนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.11.1 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.1 ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.1 จากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.1

3.11.2 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

3.11.2.1 การทำให้ปลายของผลิตภัณฑ์ PCR เป็น blunt end

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.1 มีบริเวณปลายเป็น A-overhang จึงทำให้ปลายของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.11.1 เป็นปลายทู่ (blunt end) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ DNA blunting enzyme (GeneJET™ PCR Cloning Kit) (Fermentas, USA) (ภาคผนวก ข23) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

2X reaction buffer	10	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.11.	1-2	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		ปรับปริมาตรให้เป็น 17 ไมโครลิตร
DNA blunting enzyme	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	18	ไมโครลิตร

นำไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 3-5 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 นาที

3.11.2.2 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ (blunt end) แล้วเข้ากับ พลาสมิตเวกเตอร์

ไลเกตชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.11.2.1 เข้ากับพลาสมิตเวกเตอร์ pJET1/blunt Cloning Vector (GeneJET™ PCR Cloning Kit) (Fermentas, USA) (ภาคผนวก ข 23) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.11.2.1 ปริมาตรทั้งหมด	18	ไมโครลิตร
pJET1/blunt Cloning Vector ประมาณ 50 นาโนกรัม	1	ไมโครลิตร
T4 ดีเอ็นเอไลเกส ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	20	ไมโครลิตร

นำไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 3-5 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 22<sup>o</sup>ซ) เป็นเวลา 30 นาที

### 3.11.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิตเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิตในข้อ 3.11.2.2 เข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.2

### 3.11.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนส

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสสอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิตซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน มาทำโคโลนี PCR ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3 โดยใช้ forward primer และ reverse primer คือ Dex2F และ Dex2R ตามลำดับ โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3



โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 45 วินาที	} 30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 2 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3

3.11.5 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

นำโคโลนีสีขาวในข้อ 3.11.4 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.1

3.11.6 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำพลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.11.5 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันผลที่ได้ในข้อ 3.11.4 โดยใช้ forward primer และ reverse primer คือ Dex8F และ Dex10R ตามลำดับ โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.3

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 45 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 4 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1

### 3.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีนเดกซ์แทรนเนส

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.11.5 โดยใช้บริการของบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) และ/หรือ บริษัท 1<sup>st</sup> Base (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีนเดกซ์แทรนเนสที่สมบูรณ์แล้วด้วยโปรแกรม DNASIS, BlastX, ClustalX, PHYLIP, Neighbor Joining, Seqboot, Consense และ TreeView

### 3.13 การตรวจสอบยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้ว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

#### 3.13.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำพลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.11.5 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เพื่อเพิ่มยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้ forward primer และ reverse primer คือ Dex8F และ Dex10R ตามลำดับ ที่ออกแบบในข้อ 3.10.1 ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเป็นตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.3 และโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเป็นตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.6

### 3.13.2 การติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP โดยวิธี Random Labeling

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ในข้อ 3.13.1 มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการออกจากดีเอ็นเออื่นๆ และสกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.1 จากนั้นติดฉลากด้วยชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข31) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ใส่สารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 16 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ไมโครกรัม) ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1 ของชุดสำเร็จรูป) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย EDTA ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข32) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ

เจือจางดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) แล้ว ด้วย DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3 ของชุดสำเร็จรูป) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับนำไปเจือจาง ตามตารางที่ 3.4 ต่อไป

ตารางที่ 3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลาก

หลอดที่	ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครลิตร)	เจือจางจากหลอดที่	DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3 ของชุดสำเร็จรูป) (ไมโครลิตร)	ความเจือจาง	สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้นสุดท้าย
1		ดีเอ็นเอตั้งต้น			1 ng/μl
2	2	1	198	1:100	10 pg/ μl
3	15	2	35	1:3.3	3 pg/ μl
4	5	2	45	1:10	1 pg/ μl
5	5	3	45	1:10	0.3 pg/ μl
6	5	4	45	1:10	0.1 pg/ μl
7	5	5	45	1:10	0.03 pg/ μl
8	5	6	45	1:10	0.01 pg/ μl
9	0	-	50	-	0 pg/ μl

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอดที่ 1-9 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาว โดยทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (หลอดหมายเลข 2 ของชุดสำเร็จรูป) โดยเจือจางเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นแล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนเช่นเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวางเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ประมาณ 3 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไนลอนเมมเบรนที่ได้ใส่ในกล่องพลาสติกแล้วเติม maleic acid buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2 นาที (ภาคผนวก ข31) เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข31) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายแอนติบอดี (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข31) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1:5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย washing buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer (ภาคผนวก ข31) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา

5 นาที เทปฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซบสเตรต NBT/BCIP (ภาคผนวก ข31) โดยเจือจางสารละลายในหลอดหมายเลข 5 ของชุดสำเร็จรูป ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มป้องกันแสง) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องพลาสติกกล่องใหม่แล้วเทซบสเตรตที่เตรียมไว้ลงบนไนลอนเมมเบรน บ่มไนลอนเมมเบรนในที่มืดจนเกิดจุดสัญญาณสีม่วงน้ำเงิน เมื่อจุดสีบนไนลอนเมมเบรนเกิดขึ้นจนชัดเจนแล้วให้ล้างไนลอนเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง ประเมินประสิทธิภาพการติดฉลากโดยการเทียบสีที่เกิดขึ้นจากดีเอ็นเอความเข้มข้นต่างๆ กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.13.3 การเตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 สำหรับการไฮบริดซ์

3.13.3.1 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

นำดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ที่สกัดได้ในข้อ 3.6.3 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 6 ชนิด ได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III (Biolabs, UAS), *Pst*I (Fermentas, USA), *Kpn*I และ *Xba*I (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	5-10	ไมโครกรัม
10X บัฟเฟอร์	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
10X BSA สำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	1-1.5	ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.13.3.2 การย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

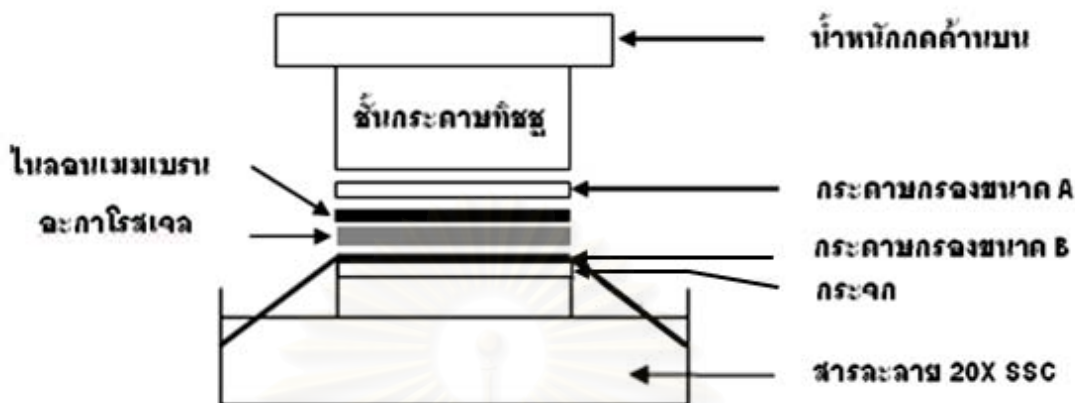


นำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วจากข้อ 3.13.3.1 มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder โดยใช้ดีเอ็นเอของราชนิดอื่นที่ไม่มี ยีนประมวลรหัสเดคซ์แทรนเนสที่ตัดด้วย *Bam*HI เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) จากนั้นย่อยอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบ ด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่น ไนลอนเมมเบรน โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้องดังนี้ แช่วอะกาโรสเจลด้วย depurination solution (ภาคผนวก ข25) ในกล่องพลาสติก โดยให้สารละลายท่วมเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นเติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข26) ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำ ปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นเติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข27) ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม 20X SSC (ภาคผนวก ข28) ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆ เป็น เวลา 10 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง

ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) โดยการวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่ เตรียมไว้ โดยกำหนดให้ขนาด A คือขนาดเท่ากับขนาดของแผ่นอะกาโรสเจล ขนาด B คือขนาด ความกว้างเท่ากับด้านกว้างของอะกาโรสเจลแต่ความยาวจะยาวกว่าด้านยาวของอะกาโรสเจล ตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาด A จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด A จำนวน 3 แผ่น และขนาด B จำนวน 2 แผ่น ตัดกระดาษทิชชูให้มีขนาด A เพื่อใช้เป็น paper tower สูงประมาณ 15 เซนติเมตร การจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน แสดงไว้ในรูปที่ 3.2 โดยเริ่มจากการเติม 20X SSC ซึ่งเป็น transfer buffer ลงในถาดพลาสติก ปริมาตรพอประมาณ นำกระดาษกรองขนาด B ที่อ้อมตัวด้วย 20X SSC วางพาดบนแผ่นกระจก โดยให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแซ่ในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นสะพานให้ 20X SSC เคลื่อนที่ ขึ้นมา จากนั้นวางกระดาษกรองขนาด B อีกแผ่นหนึ่งที่อ้อมตัวด้วย 20X SSC ลงบนกระดาษแผ่น แรก แล้วนำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงด้านบนในลักษณะที่คว่ำหน้าเจลลงด้านล่าง แล้ววาง ไนลอนเมมเบรนที่อ้อมตัวด้วย 20X SSC ลงบนเจล โดยต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในแต่ละ ชั้น จากนั้นจึงวางกระดาษกรองขนาด A ทีละแผ่น จำนวน 3 แผ่นลงไป แล้ววางชั้นของกระดาษ ทิชชูและน้ำหนักกดด้านบน ตามลำดับ ยึดชั้นต่างๆให้มั่นคงด้วยกระดาษกาว และระวังไม่ให้ชั้น

ที่ขลุแต่โตนอะกาโรสเจลหรือกระดาศกรองด้ำนล่าง ตั้งท้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลือ่นที่ขึ้นมำเป็นเวลำข้ำมคีน



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต้งๆในกำรย่ำยดีเอ็นเอจกอะกาโรสเจลไปยังไบอลอนเมมเบรน โดยวิธี Capillary transfer

ภำยหล้งจกกำรเคลือ่นย่ำยดีเอ็นเอจกอะกาโรสเจลไปยังไบอลอนเมมเบรน ยกชั้นที่อยู่เหนือไบอลอนเมมเบรนออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้ำนหนึ่งเพื่อเป็นการบ่งบอกถึงด้ำนของไบอลอนที่มีดีเอ็นเออยู่ รอให้ไบอลอนเมมเบรนแห้ง แล้วตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไบอลอนเมมเบรนด้ำนกำรนำไบอลอนเมมเบรนด้ำนที่มีดีเอ็นเอไปขำยด้ำนด้วยแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นำนี ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บไบอลอนเมมเบรนไว้ระหว่งกระดาศกรอง 2 แผ่น ที่อุณหภูมิห้องได้นำน 6 เดือน

### 3.13.3.3 พรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชันด้ำนดีเอ็นเอติดตำม

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไบอลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจกข้อ 3.13.3.2 ใส่ในหลอดไฮบริไดเซชัน เต็มส่ำรละลาย DIG Easy Hyb (ภำคผนวก ข31) ซึ่งอุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 100 ตารางเซนติเมตร นำไปปมในเครื่อง hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ ด้วยอัตราการหมุนข้ำและคงที่เป็นเวลา 30 นำนี

เตรียมส่ำรละลายดีเอ็นเอติดตำมส่ำหรับกำรไฮบริไดซ์ โดยนำดีเอ็นเอติดตำมที่เตรียมได้ในข้อ 3.13.2 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อ

สารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตาม แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้นนำไปผสมกับสารละลาย DIG Easy Hyb ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ

เมื่อทำปรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้ว เทสารละลาย DIG Easy Hyb ที่ทิ้งแล้วใส่สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป นำไปป้อนในเครื่อง hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ ด้วยอัตราการหมุนช้าและคงที่ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่แช่แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง ด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ เมื่อนำกลับมาใช้ในครั้งต่อไปต้องดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำไปไฮบริไดซ์)

เมื่อเสร็จสิ้นการไฮบริไดซ์แล้ว นำในลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออก โดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับในลอนเมมเบรนออกด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1% SDS (ภาคผนวก ข29) ปริมาตร 25-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5%SSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข30) ปริมาตร 25-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 68<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข31) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตตั้งนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากการนำในลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย washing buffer (ภาคผนวก ข31) ในกล่องพลาสติกโดยให้ปริมาณท่วมในลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข31) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายแอนติบอดี (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข31) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1:5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti- DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย washing buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer (ภาคผนวก ข31)

ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซัพสเตรต NBT/BCIP (ภาคผนวก ข31) โดยเจือจางสารละลายในหลอดหมายเลข 5 ของชุดสำเร็จรูป ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มป้องกันแสง) ย้ายในลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องพลาสติกกล่องใหม่ จากนั้นเทซัพสเตรตที่เตรียมไว้ลงบนในลอนเมมเบรน นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่า จะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง-16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับซัพสเตรตแล้วล้างเมมเบรนในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและปล่อยให้แห้ง แล้วบันทึกผลการทดลอง

### 3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

#### 3.14.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่สกัดได้ใน ข้อ 3.6.3 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ universal ITS ไพรมเมอร์ ซึ่งได้แก่ ไพรมเมอร์ ITS1 และ ITS4 (ตารางที่ 3.3) ในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

- 10X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS1 primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS4 primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นของแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	4	ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 หน่วย)	0.5	ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.3	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	36.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 45 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 2 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 <sup>o</sup> ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3

### 3.14.2 การสกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสในข้อ 3.14.1 จากอะกาโรส เจล ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรส เจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.1

### 3.14.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.14.2 โดยใช้ บริการของบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c



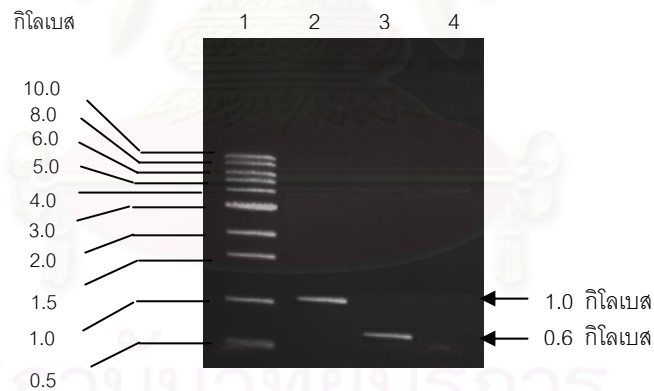
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดซท์แทรนเนสจากโครโมโซมของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

##### 4.1.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

จากการวิเคราะห์ยีนที่ประมวลรหัสเดซท์แทรนเนส 3 ลำดับ จากรา 2 สายพันธุ์ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Clustal X เวอร์ชัน 1.83 ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค1 และสามารถออกแบบไพรเมอร์ Dex1F, Dex2F, Dex1R และ Dex2R ตามที่ระบุตำแหน่งในภาคผนวก ค1 ผลการทดลองจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R และคู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1.0 กิโลเบส และ 600 คู่เบส ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R และคู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R

ช่องที่ 1	1 kb DNA ladder
ช่องที่ 2 และ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R และคู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R ตามลำดับ
ช่องที่ 4	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)

เมื่อโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับพลาสมิด pDrive Cloning Vector (แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pDrive Cloning Vector แสดงในภาคผนวก ค2) แล้วทรานสฟอร์มเข้าใน *E.coli* DH5 $\alpha$  สามารถคัดเลือกโคลนที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pPT-1 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-1 โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนพลาสมิด pDrive Cloning Vector เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือน 99% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996), 97% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066), และ 88% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสไฮโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (AF020619) ดังแสดงในภาคผนวก ค3, ค4, และ ค5 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1.0 กิโลเบส ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือน 99% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996), 96% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066), และ 88% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสไฮโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (AF020619) ดังแสดงในภาคผนวก ค6, ค7, และ ค8 ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จาก pPT-1 และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวมีความต่อเนื่องกัน ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้จึงใช้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนส สำหรับใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสที่ทราบแล้ววันที่บริเวณปลาย 5' เพื่อใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสที่อยู่ถัดลงมา โดยออกแบบ forward primer 2 เส้น คือ forward primer ที่

อยู่ด้านนอก (outer forward primer) และ forward primer ที่อยู่ด้านใน (nested forward primer) โดยตั้งชื่อว่า Dex3F และ Dex4F ตามลำดับ (รูปที่ 3.1 และ 4.2) และออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่บริเวณปลาย 3' เพื่อให้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยออกแบบ reverse primer 2 เส้น คือ reverse primer ที่อยู่ด้านนอก (outer reverse primer) และ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (nested reverse primer) โดยตั้งชื่อว่า Dex5R และ Dex6R ตามลำดับ (รูปที่ 3.1 และ 4.2) ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.1

```

5'      1 GCAAC CTGTC CACCA GGGAA CGTGC GCCAA TCTCA CAAGT ATTCC GTGCA
                                         Dex3F primer →
51 AGTGA GCCTA GCTGG TACAA ACAAT TTTCA TGACT CCTTT GTATA TGAAT
                                         Dex4F primer →
101 CGATC CCCCG GAACG GAAAT GGTCG CATCT ATGCT CCCAC CGATC CACCC
151 AACAG CAACA CACTA GATTC AAGTG TGGAT GATGG AATCT CGATT GAGCC
201 TAGTA TCGGC CTTAA TATGG CATGG TCCCA ATTCG AGTAC AGCCA CGATG
251 TAGAT GTAAA GATCC TGGCC ACTGA TGGCT CATCG TTGGG CTCGC CAAGT
301 GATGT TGTTA TTCGC CCCGT CTCAA TCTCC TATGC GATTT CTCAG TCTGA
351 CGATG GTGGG ATTGT CATCC GGGTC CCAGC CGATG CGAAC GGCCG CAAAT
401 TTTCA GTTGA GTTCA AACT GACCT GTACA CATT CTCTC TGATG GCAAT
451 GAGTA CGTCA CATCG GGAGG CAGCG TCGTC GGCGT TGAGC CTACC AACGC
501 ACTTG TGATC TTCGC AAGTC CGTTT CTTCC TTCTG GCATG ATTCC TCATA
551 TGACA CCCGA CAACA CGCAG ACCAT GACGC CAGGT CCTAT CAATA ACGGC
601 GACTG GGGCG CCAAG TCAAT TCTTT ACTTC CCACC AGGTG TATAC TGGAT
651 GAACC AAGAT CAATC GGGCA ACTCG GGGAA GTTAG GATCT AATCA TATAC
701 GTCTA AACTC GAACA CTTAC TGGGT CTACC TTGCC CCCGG TGCGT ACGTG
751 AAGGG TGCTA TAGAG TATTT TACCA AGCAG AACTT CTATG CAACT GGTC
801 TGGTA TCCTA TCGGG TGAAA ACTAT GTTTA CCAAG CCAAT GCCGG CGACA
                                         ← Dex6R primer
851 ACTAT GTTGC AGTCA AGAGC GATTC AACCA GCCTC CGGAT GTGGT GGCAC
901 AATAA CCTTG GGGGT GGTCA AACAT GTTAC TGCGT T 3'
                                         ← Dex5R primer

```

รูปที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 อักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ และลูกศรแสดงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

#### 4.1.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1

หลังจากตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1 แล้วขึ้นดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาไลเกตเข้ากับอะแดปเตอร์ ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3 และ

จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากโครโมโซมของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆ ดังนี้

#### 4.1.2.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex5R และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex5R ขึ้นไป ได้ใช้ reverse primer (Dex5R) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.1 หลังจากดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากรูปพบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะจากโครโมโซมดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *DraI* (ช่องที่ 2), *EcoRV* (ช่องที่ 3), *PvuII* (ช่องที่ 4) และ *StuI* (ช่องที่ 5) ซึ่งดีเอ็นเอแม่แบบจากเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 3.9, 2.6, 3.0 และ 2.0 กิโลเบส ตามลำดับ ในขณะที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR กับชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 6)

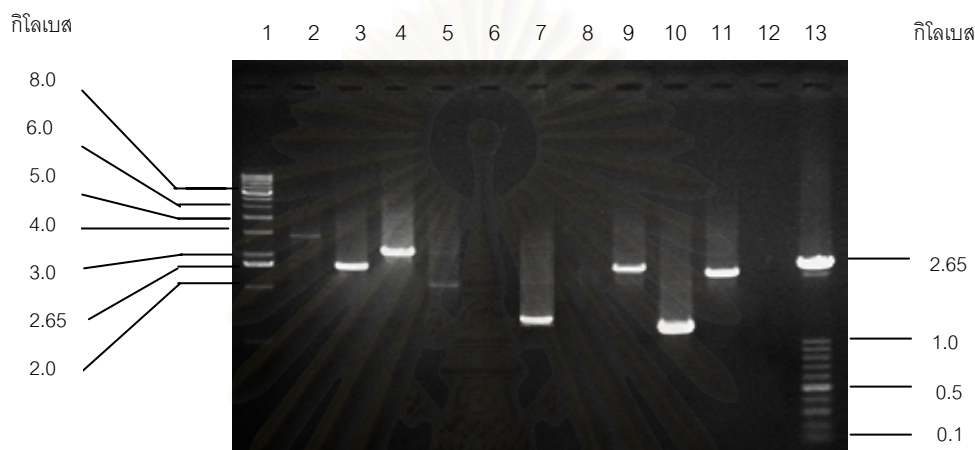
#### 4.1.2.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex3F และ AP1

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex3F ลงมา ได้ใช้ forward primer ที่อยู่ด้านนอก (Dex3F) ร่วมกับ outer adaptor primer 1 (AP1) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.2 หลังจากดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากรูปพบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะจากโครโมโซมดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *DraI* (ช่องที่ 9), *EcoRV* (ช่องที่ 10) และ *PvuII* (ช่องที่ 11) ซึ่งดีเอ็นเอแม่แบบจากเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 2.6, 1.4 และ 2.5 กิโลเบส ตามลำดับ ในขณะที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR จากดีเอ็นเอแม่แบบจากเรสทริกชันเอนไซม์ *StuI* (ช่องที่ 12) และจากชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 8)

#### 4.1.2.3 ชุดควบคุมผลบวก

ชุดควบคุมผลบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันได้ใช้ Human Positive Control Library เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Positive Control tPA primer (PCP1) ร่วมกับ

outer adaptor primer 1 (AP1) จากชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ในการทำปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.2.3 หลังจากดำเนินการปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรสแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์ PCR กับชุดควบคุมผลบวก ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ช่องที่ 7)



รูปที่ 4.3 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1

- ช่องที่ 1 และ 13 1 kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder ตามลำดับ
- ช่องที่ 2-5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใส่ดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *Dral*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ตามลำดับ จากนั้นไลเกตเข้ากับอะแดปเตอร์ แล้วใช้เป็นแม่แบบสำหรับ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex5R กับ AP1
- ช่องที่ 6 และ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอດประจุปลอດเชื้อแทนดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex5R กับ AP1 และคู่ไพรเมอร์ Dex3F กับ AP1 ตามลำดับ (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใส่ BD GenomeWalker Human Positive Control Library เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ PCP1 กับ AP1 (เป็นตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องที่ 9-12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใส่ดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *Dral*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* ตามลำดับ จากนั้นไลเกตเข้ากับอะแดปเตอร์ แล้วใช้เป็นแม่แบบสำหรับ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex3F กับ AP1



#### 4.1.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.2 ให้มีความจำเพาะมากขึ้น ได้ใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ Nested PCR โดยไพรเมอร์คู่ที่อยู่ด้านใน ซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

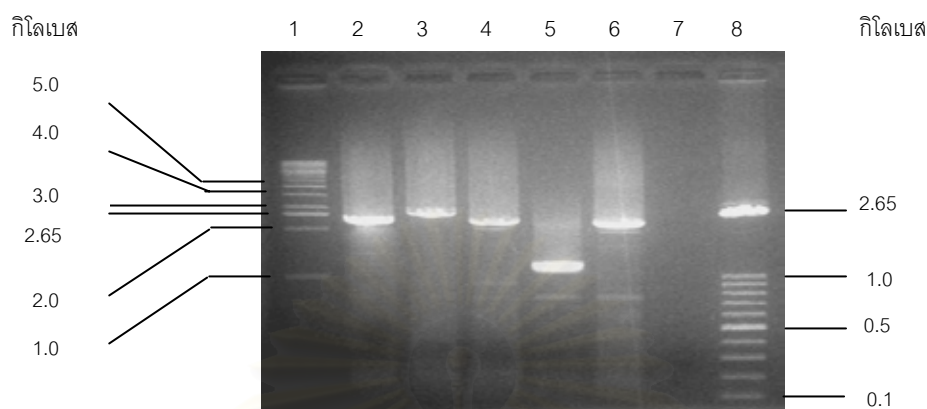
##### 4.1.3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex6R และ AP2

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex5R ขึ้นไป ได้นำผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 ในข้อ 4.1.2.1 ที่ได้จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *EcoRV* และ *PvuII* มาเจือจางประมาณ 50 เท่า เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 โดยใช้ reverse primer ที่อยู่ด้านใน (Dex6R) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) แล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.3.1 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งพบว่า ชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยู่เหนือไพรเมอร์ Dex6R ขึ้นไป เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRV* เป็นแม่แบบ (ช่องที่ 2) และ ผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII* เป็นแม่แบบ (ช่องที่ 3) มีขนาดประมาณ 2.5 และ 2.65 กิโลเบส ตามลำดับ

##### 4.1.3.2 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex4F และ AP2

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex3F ลงมา ได้นำผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 1 ในข้อ 4.1.2.2 ที่ได้จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *DraI*, *EcoRV* และ *PvuII* มาเจือจางประมาณ 50 เท่า เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2 โดยใช้ forward primer ที่อยู่ด้านใน (Dex4F) ร่วมกับ nested adaptor primer 2 (AP2) แล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4.3.2 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งพบว่า ชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex4F ลงมา เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *DraI* เป็นแม่แบบ (ช่องที่ 4), ผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRV* เป็นแม่แบบ (ช่องที่ 5) และ ผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII* เป็น

แม่แบบ (ช่องที่ 6) มีขนาดประมาณ 2.5, 1.3 และ 2.4 กิโลเบส ตามลำดับ ในขณะที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR กับชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 7)



รูปที่ 4.4 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์สครั้งที่ 2

ช่องที่ 1 และ 8	1 kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder ตามลำดับ
ช่องที่ 2 และ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์สครั้งที่ 1 ของ <i>EcoRV</i> และ <i>PvuII</i> เป็นแม่แบบ ตามลำดับ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex6R กับ AP2
ช่องที่ 4-6	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์สครั้งที่ 1 ของ <i>DraI</i> , <i>EcoRV</i> และ <i>PvuII</i> เป็นแม่แบบ ตามลำดับ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2
ช่องที่ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2 (ตัวควบคุมผลลบ)

#### 4.2 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์สครั้งที่ 2 เข้าใน pDrive Cloning Vector

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.3.1 ได้เลือกผลิตภัณฑ์ PCR จากแม่แบบที่ตัดด้วยเอนไซม์รีstriction EcoRV และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex6R กับ AP2 (รูปที่ 4.4 ช่องที่ 2) และจากผลการทดลองในข้อ 4.1.3.2 ได้เลือกผลิตภัณฑ์ PCR จากแม่แบบที่ตัดด้วยเอนไซม์รีstriction PvuII และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2 (รูปที่ 4.4 ช่องที่ 6) โดยผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่อยูเหนือจากไพรเมอร์ Dex 6R ขึ้นไป และอยู่ถัดจากไพรเมอร์ Dex4F ลงมา ซึ่งมี

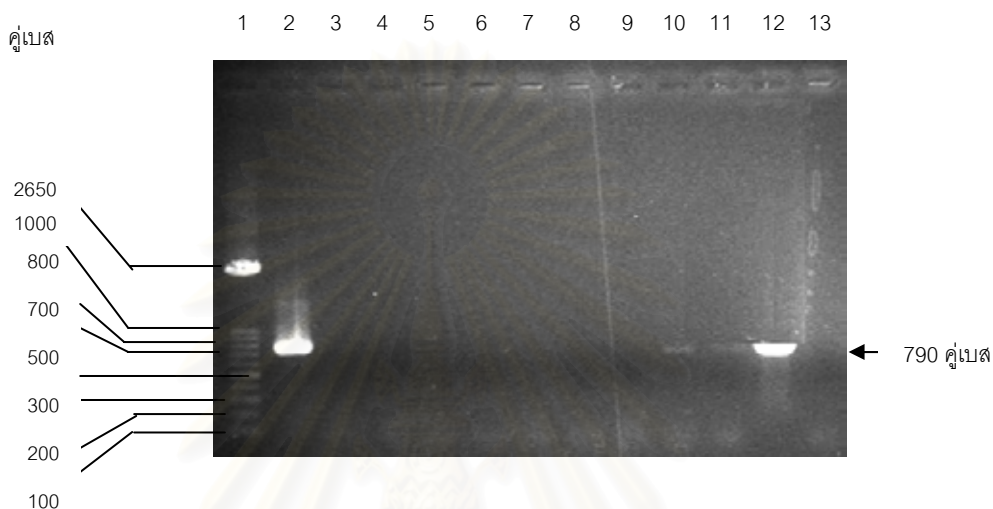
ขนาดประมาณ 2.5 และ 2.4 กิโลเบสตามลำดับ เพื่อการโคลน โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าว เข้ากับพลาสมิด pDrive Cloning Vector ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.2 จากนั้นทรานสฟอร์ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$

การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสซอดแทรกอยู่ทำโดย คัดเลือกด้วยวิธี Blue/White Selection โดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) อยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คัดเลือกโคลน ดังกล่าวมาทดสอบจำนวนชนิดละ 10 โคลน ตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกโดยทำโคโลนี PCR โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ Dex6R ที่ออกแบบในข้อ 4.1.1 ซึ่งจำเพาะกับยีนเดกซ์แทรนเนส ในการทำ ปฏิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6 ซึ่งจากรูปที่ 4.5 พบว่า โคลนที่ 1 (ช่องที่ 2) ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 790 คู่เบส เช่นเดียวกับปฏิริยาในชุดควบคุมผลบวก (ช่องที่ 12) แสดงว่า โคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วน ของยีนเดกซ์แทรนเนสจากคู่ไพรเมอร์ Dex6R กับ AP2 แทรกอยู่ จึงคัดเลือกโคลนที่ 1 มาสกัด พลาสมิด และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pPT-4 ส่วนรูปที่ 4.6 พบว่า โคลนที่ 6 (ช่องที่ 7) ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 790 คู่เบส เช่นเดียวกับปฏิริยาในชุดควบคุมผลบวก (ช่องที่ 12) แสดง ว่า โคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจากคู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2 แทรก อยู่ จึงคัดเลือกโคลนที่ 6 มาสกัดพลาสมิด และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pPT-5

จากนั้นเพื่อยืนยันผลที่ได้จากโคโลนี PCR และเพื่อตรวจสอบพลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ที่สกัดได้ว่ามียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จึงนำพลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 เป็นแม่แบบในปฏิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ Dex6R ตามวิธีการ ที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9.3 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 790 คู่เบส ตามที่ต้องการ ดัง แสดงในรูปที่ 4.7

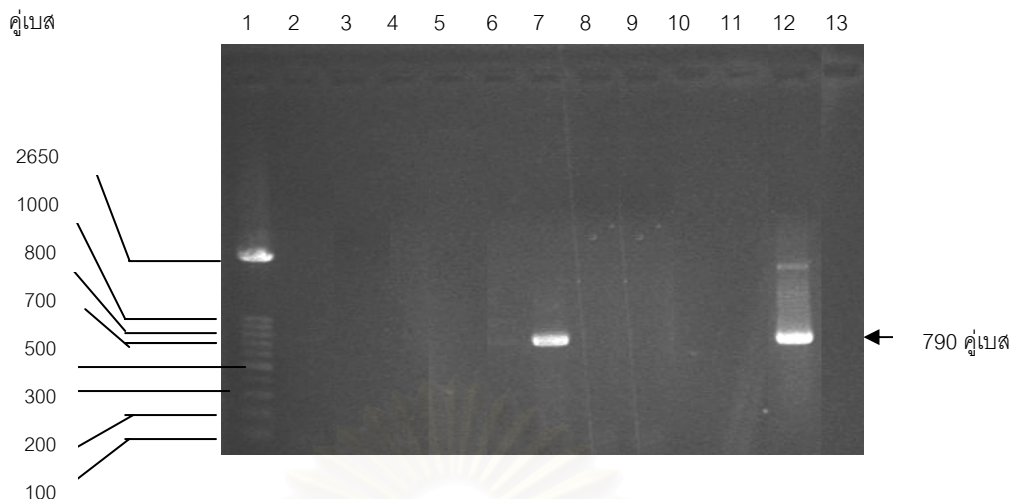
เพื่อให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' ของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดที่เพิ่มจำนวนได้ ขั้นแรกจึงตรวจสอบทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอ PT-4 และ PT-5 ในพลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ตามลำดับ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *SalI* ซึ่งตำแหน่งตัด ด้วย *SalI* นี้อยู่ในส่วนของ pDrive Cloning Vector (ภาคผนวก ค2) และ อะแดปเตอร์ (รูปที่ 2.4) ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่า เมื่อตัดพลาสมิด pPT-4 ด้วยเอนไซม์ *SalI* ดังกล่าว จะได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 1 ชิ้น ขนาดประมาณ 6.3 กิโลเบส (ช่องที่ 3) จากชิ้นดีเอ็นเอที่ ปรากฏนี้ ทำให้สามารถทราบทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอ PT-4 ในพลาสมิด pPT-4 ดังแสดงใน

รูปที่ 4.9 ก) และเมื่อตัดพลาสมิด pPT-5 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 6 กิโลเบส และ 400 คู่เบส (ช่องที่ 5) ทำให้สามารถทราบทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอ PT-5 ในพลาสมิด pPT-5 และทราบด้วยว่าใกล้เคียงกับตำแหน่งของ *SaI* ที่อยู่บน พลาสมิดนั้น ยังมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย *SaI* อยู่บนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ข)



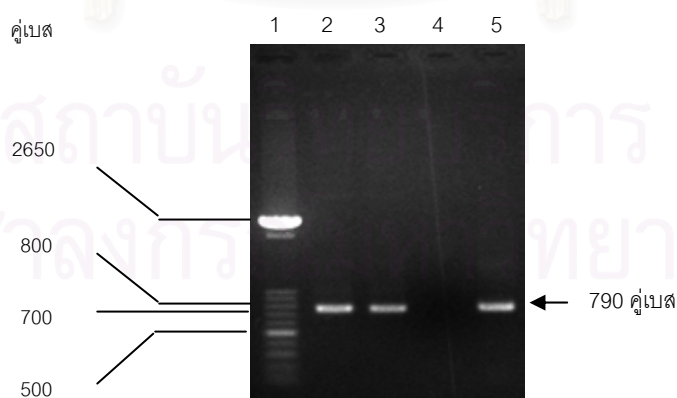
รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำโคลนนิ่ง PCR ของโคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยคู่ไพรเมอร์ Dex6R กับ AP2

- ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder
- ช่องที่ 2-11 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากโคลนที่ 1-10 ตามลำดับ
- ช่องที่ 12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRV* จากข้อ 4.1.3.1 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex6R กับ AP2 (ตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องที่ 13 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)



รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากการโคลนนิ่ง PCR ของโคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยคู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2

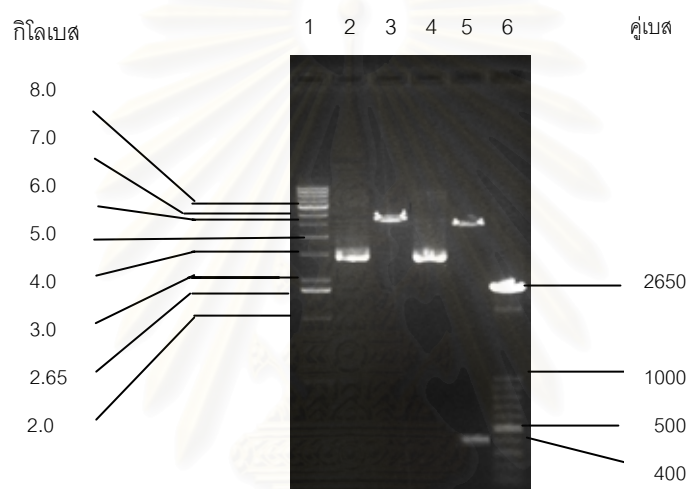
- ช่องที่ 1                      100 bp DNA ladder
- ช่องที่ 2-11                ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากโคลนที่ 1-10 ตามลำดับ
- ช่องที่ 12                    ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII* จากข้อ 4.3.1.2 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2 (ตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องที่ 13                    ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)



รูปที่ 4.7 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรสของพลาสมิด pPT-4 และ pPT-5

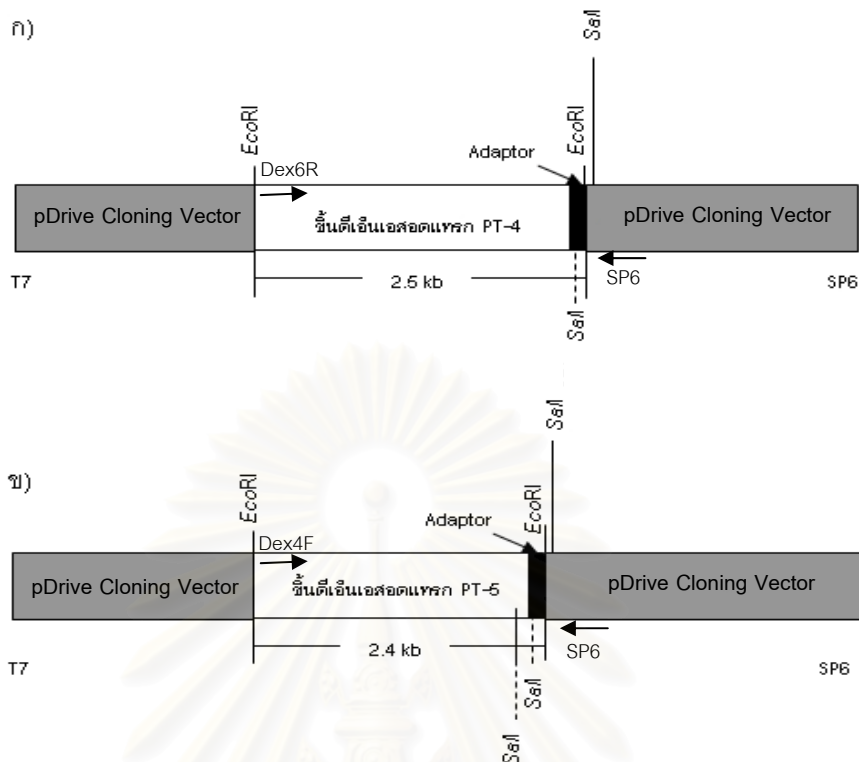


- ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder
- ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากพลาสมิด pPT-4
- ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากพลาสมิด pPT-5
- ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปอดตบระจุปอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *PvuII* จากข้อ 4.3.1.2 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex4F กับ AP2 (ตัวควบคุมผลบวก)



รูปที่ 4.8 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pPT-4 และ pPT-5 ที่ถูกตัดด้วย เเรสทริกชันเอนไซม์ *SaII*

- ช่องที่ 1 และ 6 1 kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder ตามลำดับ
- ช่องที่ 2 และ 4 พลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ก่อนตัดด้วย *SaII* ตามลำดับ
- ช่องที่ 3 และ 5 พลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ตัดด้วย *SaII* ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 ก) แผนที่แสดงทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-4  
 ข) แผนที่แสดงทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-5

#### 4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-4 และ pPT-5 ตามลำดับ

จากข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.2 ทำให้ทราบว่าปลายด้าน 5' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนได้อยู่ใกล้กับตำแหน่งของ SP6 บน pPT-4 และทราบว่าปลายด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนได้อยู่ใกล้กับตำแหน่งของ SP6 บน pPT-5 จึงใช้ไพรเมอร์ SP6 ในการหาลำดับเพื่อให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 5' และ 3' ของชิ้นส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนได้ดังกล่าว ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงในรูปที่ 4.10 ก) และ ข) ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ PT-4 และ PT-5 มีความเหมือน 92% และ 96% กับลำดับก่อนถึงโปรโมเตอร์และหลังกรอบอ่านรหัสเปิดของลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอที่อยู่บนโคลน pUDEX ของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 ตามลำดับดังแสดงในภาคผนวก ค9 และ ค10 ตามลำดับ

ก) pPT-4

```

5' 1 CTCGGGCCCCACACGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTTCGACGAATT
61 CAGATTACTATAGGGCACGGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTATCGGTTTTCCAGCTTCAT
121 TGCTCCCGCTTCGACATGGGCCGAATGAGCCTTGAATCCATCTTTGGATAGGGTGGCAA
Dex7F →
181 AGGAAGATGTCCTCTGCAGAATGAATGAATAACGAGGAGGTAATGAATGAATTGTCGTA
241 ACAATTTGTAAAAGGTAAAGGTCAACGACAACCTCAGAGGCAGATCAAGCAATATATGTAG
301 ATGCCGAAAAACAGAGCGCTTGAATTAGGGCAAGAGGTTCGAAAGTCTCTTCTCCGTAC
361 GGGTTACTTCCATCACTGTTGATTTTCCGAGTCGTACGTTTATTCTCTTCTCCATCAG
421 AATTATTGGCATAGTAATCCGCACAGCCGAGTATGATGGAGCTTCTTCGGATAATGATAG
481 CGCCACCAGACCTTGTCTTGAGCTGGAGAGCTAAACATTAAACGCCACACGACCAACTC
541 TCATTAGTTGCGATAGATGATGCTCGGAGCTGTTGAAACTCAGAAATTCCTTCTATGCGG
601 GGTCTCCAAGATCGATCCTGGGGGATGTAATCACCTACGGCGGACCTAATTGACGCCTT
661 GACAGGTGATGTTAAGCGAACCAAGGAAGAAACAATCTGGGGCTAGATGAAGAGTTGAGC
Dex8F →
721 TGTTAAGTACGGTCGTTCTTATTGGCTTTTTTCGGCGCTTCTCGGGTTACTCAGTCTTTTT
781 CGGGAGATGATCATTTTGTAATGCCCAATTAGCAGAACTGAGAGCCCCAACTCAAAC
841 CTCGGTACGAATTTCCGGAACCAGTCAGGATTTCAAAAAATGTGCTCGTGTGGGGGGAA
901 GAACTTCTTCTC 3'

```

ข) pPT-5

```

5' 1 GGTTGGGGAAAAAAGTTGGGGGGTTCCTTCCCATCCCTGGGGGGGCATTTTCATATGACG
61 TCAGTATTGGGGAGTGGCAGATTAGCGAATTCAGTTTTCGGAGGGGTGAGTGTCTTACC
121 CGCTCCTTTACCTTGTGCGAGGATAAAGGCATAAGTTAGTTTCAGGGAAGGCGATTTAGTT
181 CATTCTCTTTTTTGGAGCTTATTTCTGTTCGACCAATTGTGACACCCAATTTGCCTTTC
241 AAAAGACGTGGACGATATGTGTACGGTAATCCAGTCAAATGAACGTCAACATTCATTTAA
←Dex10R
301 TAAGGACATTTCCAGGTTTCTTACTCTGTGCGATTATGCCTAACTCGGGTTGATGTCTTG
361 TCAGGATGGAAAATCTCGTTATGTACTTCCAGTGAAATGGGCAGGGCTAAGCCCTAAACC
421 CTAACGCATACAATTTGTAGGCACCTACCCATGTAAGTTACACACAGTCGACTTATAAGT
481 CTAGATATTTATGCTATGCGAGGCTCTGGAATGATTTACAGTCCATGCTATACATAGTTAT
541 TTGCAAGAATTTGCAGACGAGATAAAAAATCAATGGACGAATAATCACGCATTACTCCACA
601 GGCTCATGCCACGGAGCAAGGGTTCCCCGAATCTAGGCCAGACCGGGATGATATTTCAAC
661 CGATTCTTTTTGCAGTAACAATCTCGTACGAGCTGCACGAGCTAAACGGCATTATATAAA
← Dex9R
721 GGTGCTGACCCAGACTTGGATCCGTACGTTATATGAAATGACTTTTAATCTCGCAGATTT
781 GGACCGTAATCATATTGAAGCGGCCGCTAGCGCCAAACCTACGGTACGTTTCAGACCAGCC
841 CGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGTAACTGAAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCC
901 TAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGCCCGAG 3'

```

รูปที่ 4.10 ก) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอ PT-4 ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด

pPT-4

ข) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอ PT-5 ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด

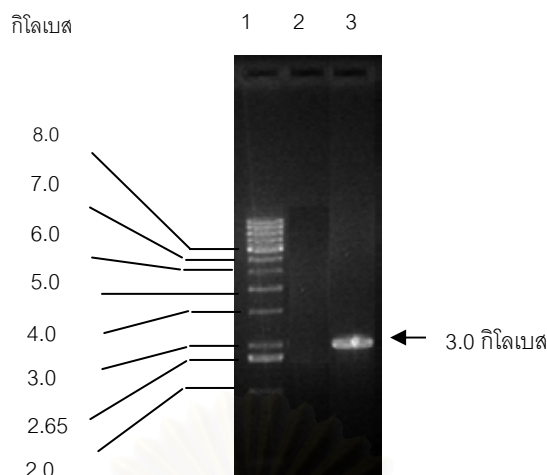
pPT-5

ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นอักษรหนาแสดงส่วนที่เป็นลำดับของ pDrive Cloning Vector ตัวอักษรเอียง แสดงส่วนของ AP2 และ อะแดปเตอร์ ตัวอักษรปกติ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นส่วนของยีนเดคซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนได้ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และลูกศรแสดงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

#### 4.4 การเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 4.3 กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) ทำให้ทราบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ PT-4 และ PT-5 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณก่อนถึงโปรโมเตอร์และหลังกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสตามลำดับ ดังนั้นเพื่อให้ได้ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่สมบูรณ์อยู่ภายในซันดีเอ็นเอเดียวกัน จึงออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ PT-4 ออกแบบ forward primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณปลายด้าน 5' และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ PT-5 ออกแบบ reverse primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณปลายด้าน 3' โดย forward primer 2 เส้น ได้ตั้งชื่อว่า Dex7F และ Dex8F และ reverse primer 2 เส้น ตั้งชื่อว่า Dex9R และ Dex10R ซึ่งบริเวณของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์เหล่านี้แสดงไว้ในรูปที่ 4.10

นำคู่ไพรเมอร์ Dex7F กับ Dex9R และคู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R ที่ออกแบบไว้ข้างต้นมาใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส โดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เป็นแม่แบบ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ร่วมกับ *Pfu* DNA polymerase ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.10.2 พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 3 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R (รูปที่ 4.11 ช่องที่ 3) แต่ไม่สามารถได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 4 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ Dex7F กับ Dex9R (รูปที่ 4.11 ช่องที่ 2)



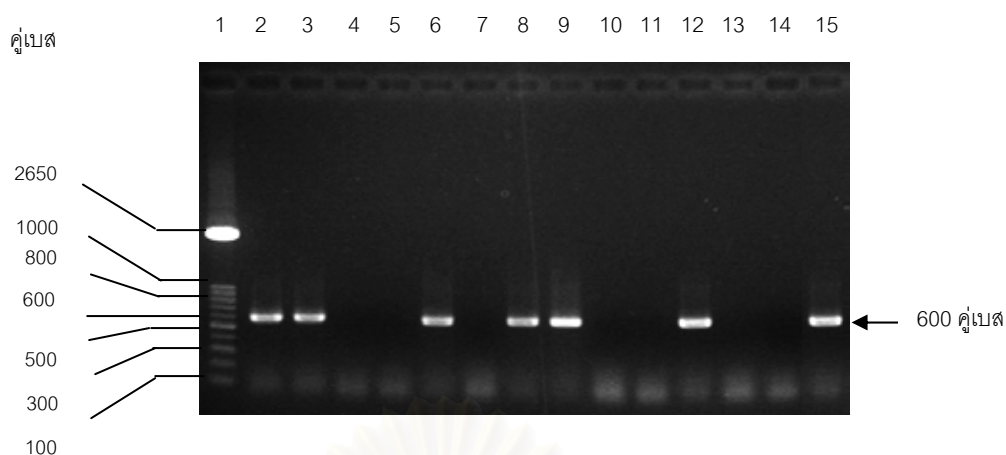
รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ช่องที่ 1	1 kb DNA ladder
ช่องที่ 2	ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex7F กับ Dex9R
ช่องที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R

#### 4.5 การโคลนผลิตภัณฑ์จีโนมดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 จากปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

โคลนยีนส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ที่ได้จากปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 4.4 โดยเชื่อมยีนส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสเข้ากับพลาสมิด pJET1/blunt Cloning Vector (แผนที่แสดงลักษณะของพลาสมิด pJET1/blunt Cloning Vector แสดงในภาคผนวก ค11) ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.2 จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  แล้วคัดเลือกโคลนที่มียีนส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสโดยทำโคลนนี้ PCR ด้วยการใส่คู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอบริเวณกลางยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.1 ในการทำปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.4 พบว่า โคลนที่ 1, 2, 5, 7, 8 และ 11 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ตามที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 4.12

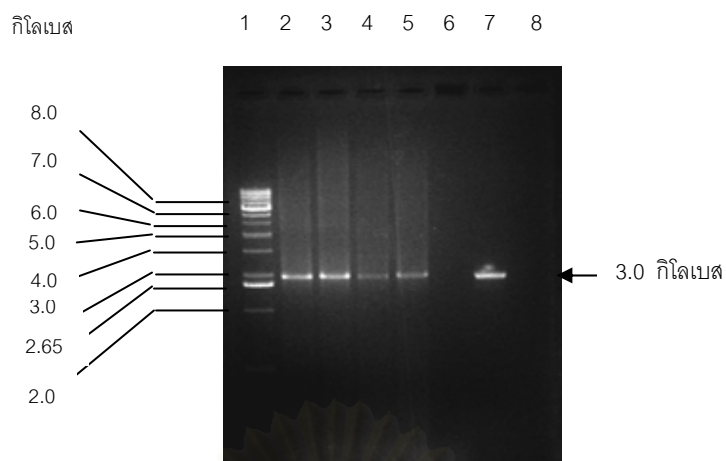




รูปที่ 4.12 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากโคลนต่างๆโดยเทคนิคการทำโคลน PCR

- ช่องที่ 1            100 bp DNA ladder
- ช่องที่ 2-13        ผลิตภัณฑ์ PCR จากโคลนที่ 1-12 ตามลำดับ เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R
- ช่องที่ 14            ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 15            ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ Dex2F กับ Dex2R เป็นแม่แบบ (ตัวควบคุมผลบวก)

คัดเลือกโคลนที่ 1, 5, 7 และ 11 มาสกัดพลาสมิด จากนั้นตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนดังกล่าวมียีนประมุขรหัสเดกซ์แทรนเนสอยู่ โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่ 1, 5, 7 และ 11 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.6 พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนยีนดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 3 กิโลเบสได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ดังนั้นจึงคัดเลือกพลาสมิดจากโคลนที่ 5 และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pPT-6



รูปที่ 4.13 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอร์ส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R

- ช่องที่ 1            1 kb DNA ladder
- ช่องที่ 2-5        ผลิตภัณฑ์ PCR    จากโคลนที่ 1, 5, 7 และ 11 ตามลำดับ เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex 10R
- ช่องที่ 6            ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 7            ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ Dex8F กับ Dex10R เป็นแม่แบบ (ตัวควบคุมผลบวก)

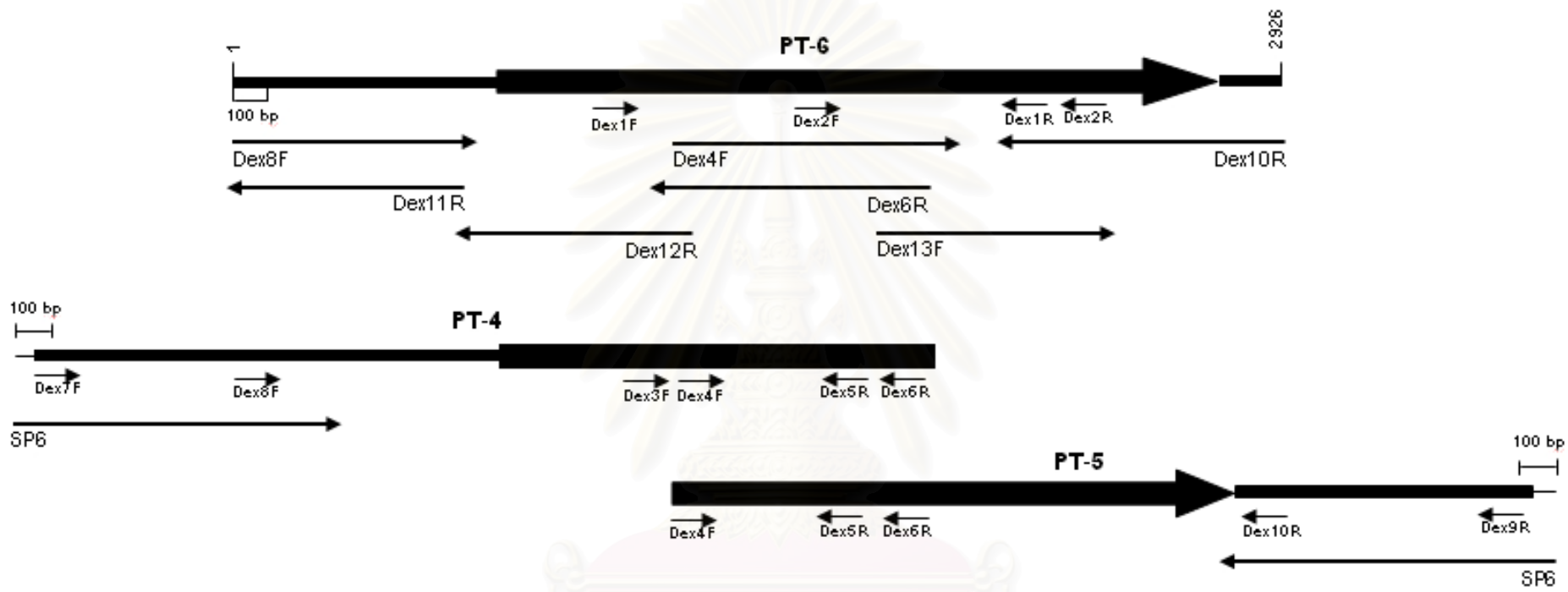
#### 4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจากพลาสมิด pPT-6 และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-6 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีอยู่แล้ว ได้แก่ Dex4F, Dex8F, Dex6R และ Dex10R รวมทั้งออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจากไพรเมอร์ข้างต้น ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ Dex11R, Dex12R และ Dex13F

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ทั้งหมดมีความต่อเนื่องกัน โดยมีการจัดเรียงดังแสดงในรูปที่ 4.14



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 แผนที่แสดงชนิดเอ็นเอ PT-6, PT-4 และ PT-5 ที่โคลนได้ทั้งหมดซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อเนื่องกัน และแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้เพื่อหาลำดับของชนิดเอ็นเอ

ลูกศร  $\Rightarrow$  คือ โปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัสเปิดและทิศทางของยีนเดกซ์แทรนเนส และ  $\rightarrow$  คือ ทิศ 5'  $\rightarrow$  3' ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละชนิดตามทีระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ทั้งหมด มาหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ด้วยโปรแกรม DNASIS พบรหัสที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นโคดอนเริ่มต้น (start codon) ATG 4 โคดอน ได้แก่ ATG<sub>1</sub>, ATG<sub>2</sub>, ATG<sub>3</sub> และ ATG<sub>4</sub> (รูปที่ 4.15) ซึ่งแต่ละ ATG ประมวลรหัสให้โปรตีนเดียวกันแต่ต่างกันที่ความยาวของปลายด้านอะมิโนเท่านั้น เมื่อพิจารณาการถอดรหัสจากโคดอนเริ่มต้น ATG ที่ 1 (ATG<sub>1</sub>) จะเห็นว่าลำดับที่จะถอดรหัสเป็นยีน เดกซ์แทรนเนส (SMCU-dex : *Penicillium* sp. SMCU 3-14 dextranase gene) เริ่มตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1,450-3,273 คิดเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดทั้งหมด 1,824 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบอ่านรหัสเปิดนี้ โดยใช้โปรแกรม Neural Network Splice Site Prediction (NNSPLICE) เวอร์ชัน 0.9 ([http://www.fruitfly.org-BDGP:Splice\\_Site\\_Prediction\\_By\\_Neural\\_Network](http://www.fruitfly.org-BDGP:Splice_Site_Prediction_By_Neural_Network)) พบว่าไม่มีอินทรอนอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบอ่านรหัสประมวลรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 608 หมู่ (SMCU-DEX : *Penicillium* sp. SMCU 3-14 dextranase) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SMCU-dex ที่ได้ในงานวิจัยนี้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX ซึ่งเป็นโปรแกรมที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต่างๆที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือน 99% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996), 97% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066), 89% กับเดกซ์แทรนเนสไฮโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (AF020619), 87% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006) และ 87% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Lipomyces starkeyi* (AY520537 และ Kang และคณะ, 2005) ดังแสดงในภาคผนวก ค12, ค13, ค14, ค15 และ ค16 ตามลำดับ

ในส่วนของลำดับควบคุมที่อยู่เหนือจาก ATG<sub>1</sub> ขึ้นมา เมื่อนำบริเวณนี้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Neural Network Promoter Prediction (NNPP) เวอร์ชัน 2.2 (<http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html>) พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย CAAT Box ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCAAT ในตำแหน่งที่ 1,281-1,285 และ TATA Box ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TATAA ในตำแหน่งที่ 1,353-1,357 รวมทั้งพบบริเวณที่คาดหมายว่าจะเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription start site) ที่ตำแหน่ง 1,400 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 เมื่อวิเคราะห์หาบริเวณที่เป็น Poly A signal โดยใช้โปรแกรม HC polyA (Hamming Clustering



polyA prediction in Eukaryotic genes) ([http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHc\\_polya.html](http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHc_polya.html)) พบบริเวณที่เป็น Poly A signal ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AATAAG อยู่ตำแหน่งที่ 3,490-3,495 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถนำไปสร้างแผนที่แสดงลักษณะของยีน *SMCU-dex* รวมทั้งแสดงตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆโดยละเอียด ดังแสดงในรูปที่ 4.16

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของยีน *SMCU-dex* พบว่า บริเวณประมวลรหัส (coding region) ยีน *SMCU-dex* มี G+C content เท่ากับ 49.07% มี codon usage ที่สื่อความหมายสำหรับกรดอะมิโนที่พบเป็นจำนวนมากตามลำดับ ได้แก่ เซรีน (10.86%), ไกลซีน (9.54%), วาลีน (7.57%) และไอโซลูซีน (7.24%)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม SIGNALP เวอร์ชัน 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) พบบริเวณที่เป็นลำดับของโปรตีนที่ช่วยในการหลั่งออกนอกเซลล์ (signal peptide) โดยมีตำแหน่งตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 20 และพบตำแหน่งของ signal peptidase cleavage site อยู่ระหว่างกรดอะมิโนไกลซีนตำแหน่งที่ 20 (G<sub>20</sub>) และกรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่งที่ 21 (A<sub>21</sub>) ดังแสดงในรูปที่ 4.15

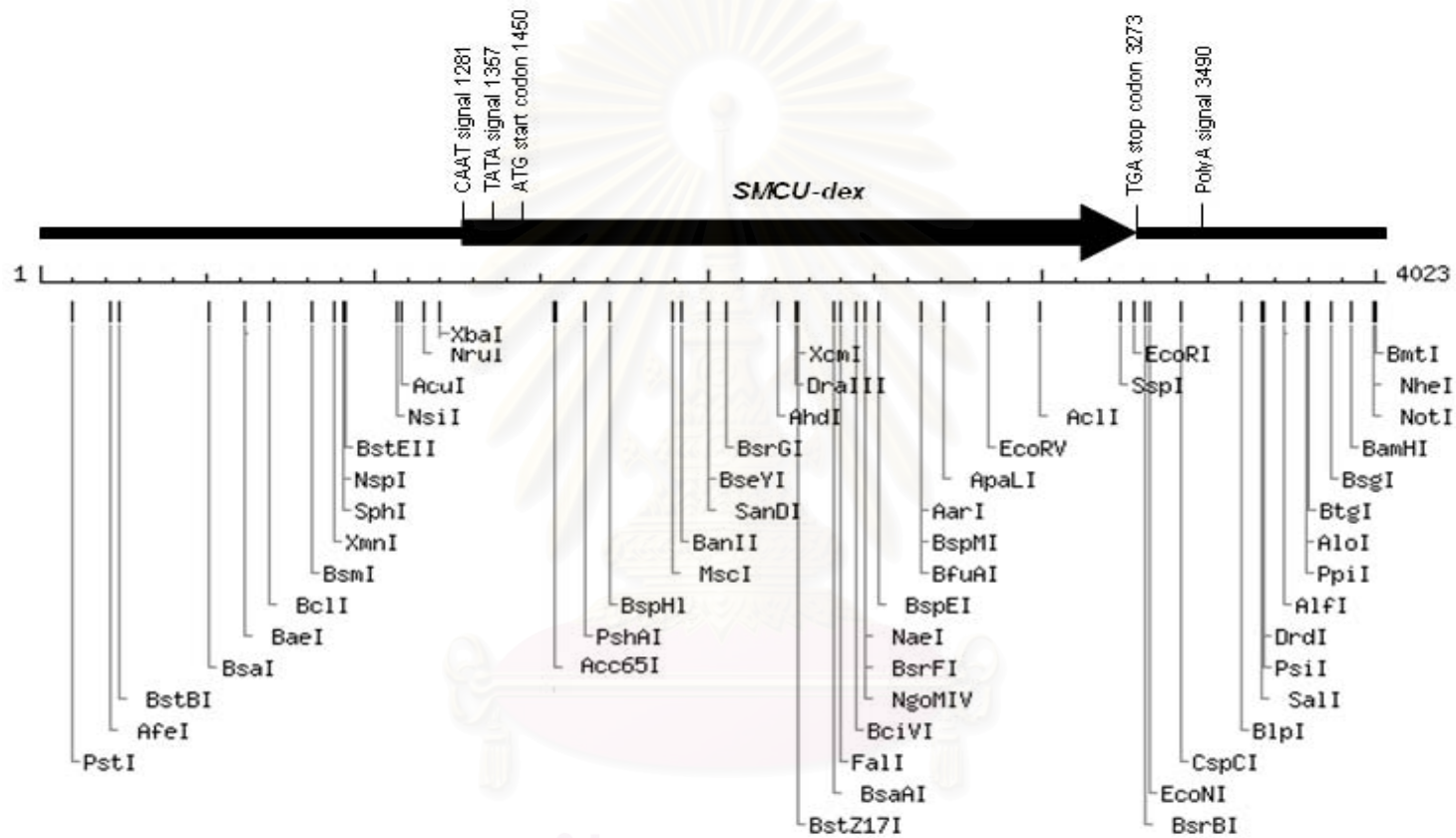
1	ATCGGTTTCCAGCTTCATTGCTCCCGCTTCGACATGGGCCGAATGAGCCTTGAATCCAT	60
61	CTTTGGATAGGGTGGCAAAGGAAGATGTCCCTCTGCAGAATGAATGAATAACGAGGAGGTA	120
121	ATGAATGAATTTGCCGTAACAATTTGTAAGGTTAAAGGTCAACGACAACCTCAGAGGCAG	180
181	ATCAAGCAATATATGTAGATGCCGAAAAACAGAGCGCTTGAATTAGGGCAAGAGGTTCCA	240
241	AAGTCTTCTCCCGTACGGGTTACTTCCATCACTGTTGATTTTCCGCAGTCGTACGTT	300
301	TATTCTCTTCTCCATCAGAATTTATTGGCATAGTAATCCGCACAGCCGAGTATGATGGAGC	360
361	TTCTTCGGATAATGATAGCGCCACCAGACCTTGCTTGAGCTGGAGAGCTAAACATTAAAC	420
421	GCCACACGACCAACTCTCATTAGTTGCGATAGATGATGCTCGGAGCTGTTGAAACTCA	480
481	GAAATTCCTTCTATGCGGGGTCTCCAAGATCGATCTCGGGGATGTGAATCACCTACGGC	540
541	GGACCTAATTGACGCCTTGACAGGTGATGTTAAGCGAACCAAGGAAGAAATAATCTGGGG	600
601	GAGATGAAGATGTTGAGCTGTAAGGTACGGTACGTTCCCTATTGGCTTTATCGGCGCTTCT	660
661	CCGGGGTTACTCAGTCTTTCCGGGAGCATGATCATTTTTGTATTGTCCAATAGTAAGCAG	720
721	AAACTGAGAGCCACCACAAACTCAAACCTCGGTAGCGAAGTTTCACGGAACCAAGTCAGG	780
781	ATTCTCAGAAACTGTGCTCGTGTGCGGGGAATCCGCATTCTACGTCGTCTGGAGCAAGG	840
841	AAATGTTCCGTGCGGGATTGAGGAGGATAGGTAGGTTGGAGAATCTCTTCGCTAACCAATC	900
901	TATAAGCATGCTCCGGTAACCTTTAGAGTTTCACGTCCAACGTAATTTCCAAGATAGCCA	960
961	GAGCGTACTTGAATTACTATGTAGAAATCCTAAAATTTCCCTCTAAAACGCAAGTCAAC	1020
1021	GAGATGCGTGCCCTCAATGTCTCTCGGCGCTACCCCGAAAATGATGCATAAGGCCAAGAA	1080
1081	TGTCACCCGGTAACTTTTTCTTCAGAATATCCTAAGTTTCCATCAAACACAGTCGAATAG	1140
1141	GTCAATGCTCGCGAGAGACTTTCTGCCTTCACTCTACGTCCTACTGATAGAAGTTCAACG	1200
1201	GCTCAATTCGGGGTAATCTAGAGTTTGGACCTCAAGTGAGATGTTGCAACAAATTTGTAC	1260
1261	TAGAACGATGCGCTTGTCTT <b>CCAAT</b> ACAGTAGTTAGCTTCATATAGCTTCCAACAAAAGG	1320
1321	GATGGGGGATGAAGGCTCTATAGCGAGAAGT <b>TATAA</b> GAAAGTGTCTCATACTGTATC	1380
1381	TCTC <b>A</b> GTCTGTCGAGAACAATCCCGGAAACTATCTTATCTTTCGAGAAAAGAACAATAT	1440
1441	CTCAAACCTT ATG <sub>1</sub> CCC ACA ATG <sub>2</sub> CTA AAG CTA CTT GCG TTG ACC CTT	1485
	M P T M L K L L A L T L	12
1486	GCA ATT AGC GAG TCC GCC ATT GGA GCA GTC ATG <sub>3</sub> CAC CCA CCT GGC	1530
13	A I S E S A I G A V M H P P G	27
1531	AAT TCT CAT CCC GGT ACC CAT ATG <sub>4</sub> GGC ACT ACG AAT AAT ACC CAT	1575
28	N S H P G T H M G T T N N T H	42
1576	TGC GGC GCC GAT TTC TGT ACC TGG TGG CAT GAT TCA GGG GAG ATC	1620
43	C G A D F C T W W H D S G E I	57
1621	AAT ACG CAG ACA CCT GTC CAA CCA GGG AAC GTG CGC CAA TCT CAC	1665
58	N T Q T P V Q P G N V R Q S H	72
1666	AAG TAT TCC GTG CAA GTG AGC CTA GCT GGT ACA AAC AAT TTT CAT	1710
73	K Y S V Q V S L A G T N N F H	87
1711	GAC TCC TTT GTA TAT GAA TCG ATC CCC CGG AAC GGA AAT GGT CGC	1755
88	D S F V Y E S I P R N G N G R	102
1756	ATC TAT GCT CCC ACC GAT CCA CCC AAC AGC AAC ACA CTA GAT TCA	1800
103	I Y A P T D P P N S N T L D S	117
1801	AGT GTG GAT GAT GGA ATC TCG ATT GAG CCT AGT ATC GGC CTT AAT	1845
118	S V D D G I S I E P S I G L N	132
1846	ATG GCA TGG TCC CAA TTC GAG TAC AGC CAC GAT GTA GAT GTA AAG	1890
133	M A W S Q F E Y S H D V D V K	147
1891	ATC CTG GCC ACT GAT GGC TCA TCG TTG GGC TCG CCA AGT GAT GTT	1935
148	I L A T D G S S L G S P S D V	162
1936	GTT ATT CGC CCC GTC TCA ATC TCC TAT GCG ATT TCT CAG TCT GAC	1980
163	V I R P V S I S Y A I S Q S D	177
1981	GAT GGT GGG ATT GTC ATC CGG GTC CCA GCC GAT GCG AAC GGC CGC	2025
178	D G G I V I R V P A D A N G R	192
2026	AAA TTT TCA GTT GAG TTC AAA ACT GAC CTG TAC ACA TTC CTC TCT	2070
193	K F S V E F K T D L Y T F L S	207

2071	GAT	GGC	AAT	GAG	TAC	GTC	ACA	TCG	GGA	GGC	AGC	GTC	GTC	GGC	GTT	2115
208	D	G	N	E	Y	V	T	S	G	G	S	V	V	G	V	222
2116	GAG	CCT	ACC	AAC	GCA	CTT	GTG	ATC	TTC	GCA	AGT	CCG	TTT	CTT	CCT	2160
223	E	P	T	N	A	L	V	I	F	A	S	P	F	L	P	237
2161	TCT	GGC	ATG	ATT	CCT	CAT	ATG	ACA	CCC	GAC	AAC	ACG	CAG	ACC	ATG	2205
238	S	G	M	I	P	H	M	T	P	D	N	T	Q	T	M	252
2206	ACG	CCA	GGT	CCT	ATC	AAT	AAC	GGC	GAC	TGG	GGC	GCC	AAG	TCA	ATT	2250
253	T	P	G	P	I	N	N	G	D	W	G	A	K	S	I	267
2251	CTT	TAC	TTC	CCA	CCA	GGT	GTA	TAC	TGG	ATG	AAC	CAA	GAT	CAA	TCG	2295
268	L	Y	F	P	P	G	V	Y	W	M	N	Q	D	Q	S	282
2296	GGC	AAC	TCG	GGG	AAG	TTA	GGA	TCT	AAT	CAT	ATA	CGT	CTA	AAC	TCG	2340
283	G	N	S	G	K	L	G	S	N	H	I	R	L	N	S	297
2341	AAC	ACT	TAC	TGG	GTC	TAC	CTT	GCC	CCC	GGT	GCG	TAC	GTG	AAG	GGT	2385
298	N	T	Y	W	V	Y	L	A	P	G	A	Y	V	K	G	312
2386	GCT	ATA	GAG	TAT	TTT	ACC	AAG	CAG	AAC	TTC	TAT	GCA	ACT	GGT	CAT	2430
313	A	I	E	Y	F	T	K	Q	N	F	Y	A	T	G	H	327
2431	GGT	ATC	CTA	TCG	GGT	GAA	AAC	TAT	GTT	TAC	CAA	GCC	AAT	GCC	GGC	2475
328	G	I	L	S	G	E	N	Y	V	Y	Q	A	N	A	G	342
2476	GAC	AAC	TAT	GTT	GCA	GTC	AAG	AGC	GAT	TCA	ACC	AGC	CTC	CGG	ATG	2520
343	D	N	Y	V	A	V	K	S	D	S	T	S	L	R	M	357
2521	TGG	TGG	CAC	AAT	AAC	CTT	GGG	GGT	GGT	CAA	ACA	TGG	TAC	TGC	GTT	2565
358	W	W	H	N	N	L	G	G	G	Q	T	W	Y	C	V	372
2566	GGC	CCG	ACG	ATC	AAT	GCG	CCA	CCA	TTC	AAC	ACT	ATG	GAT	TTC	AAT	2610
373	G	P	T	I	N	A	P	P	F	N	T	M	D	F	N	387
2611	GGA	AAT	TCT	GGC	ATC	TCA	AGT	CAA	ATT	AGC	GAC	TAT	AAG	CAG	GTG	2655
388	G	N	S	G	I	S	S	Q	I	S	D	Y	K	Q	V	402
2656	GGA	GCC	TTC	TTC	TTC	CAG	ACG	GAT	GGG	CCA	GAA	ATA	TAT	CCC	AAT	2700
403	G	A	F	F	F	Q	T	D	G	P	E	I	Y	P	N	417
2701	AGT	GTC	GTG	CAC	GAC	GTC	TTC	TGG	CAC	GTC	AAT	GAT	GAT	GCA	ATC	2745
418	S	V	V	H	D	V	F	W	H	V	N	D	D	A	I	432
2746	AAA	ATC	TAC	TAT	TCG	GGA	GCA	TCT	GTA	TCG	CGG	GCA	ACG	ATC	TGG	2790
433	K	I	Y	Y	S	G	A	S	V	S	R	A	T	I	W	447
2791	AAA	TGT	CAC	AAT	GAC	CCA	ATT	ATC	CAG	ATG	GGA	TGG	ACG	TCT	CGG	2835
448	K	C	H	N	D	P	I	I	Q	M	G	W	T	S	R	462
2836	GAT	ATC	AGT	GGA	GTG	ACA	ATC	GAC	ACA	TTA	AAT	GTT	ATT	CAC	ACC	2880
463	D	I	S	G	V	T	I	D	T	L	N	V	I	H	T	477
2881	CGC	TAC	ATC	AAA	TCG	GAG	ACG	GTG	GTG	CCT	TCG	GCT	ATC	ATT	GGG	2925
478	R	Y	I	K	S	E	T	V	V	P	S	A	I	I	G	492
2926	GCC	TCT	CCA	TTC	TAT	GCA	AGT	GGG	ATG	AGT	CCT	GAT	TCA	AGA	AAG	2970
493	A	S	P	F	Y	A	S	G	M	S	P	D	S	R	K	507
2971	TCC	ATA	TCC	ATG	ACG	GTT	TCA	AAC	GTT	GTT	TGC	GAG	GGT	CTT	TGC	3015
508	S	I	S	M	T	V	S	N	V	V	C	E	G	L	C	522
3016	CCG	TCC	CTA	TTC	CGC	ATC	ACA	CCC	CTA	CAG	AAC	TAC	AAA	AAT	TTT	3060
523	P	S	L	F	R	I	T	P	L	Q	N	Y	K	N	F	537
3061	GTT	GTC	AAA	AAT	GTG	GCT	TTC	CCA	GAC	GGG	CTA	CAG	ACG	AAT	AGT	3105
538	V	V	K	N	V	A	F	P	D	G	L	Q	T	N	S	552

3106	ATT GGC ACA GGA GAA AGC ATT ATT CCA GCC GCA TCT GGT CTA ACG	3150
553	I G T G E S I I P A A S G L T	567
3151	ATG GGA CTG AAT ATC TCC AAC TGG ACT GTT GGT GGA CAA AAA GTG	3195
568	M G L N I S N W T V G G Q K V	582
3196	ACT ATG GAG AAC TTT CAA GCC AAT AGC CTG GGG CAG TTC AAT ATT	3240
583	T M E N F Q A N S L G Q F N I	597
3241	GAC GTC AGC TAT TGG GGG GAG TGG CAG ATT AGC TGA ATTCCAGCTCT	3287
598	D V S Y W G E W Q I S *	
3288	CGGAGCGCGTGAGTGCTTCTACCCGCTCCTTTACCCCTTGTCGAGGGATAAAGGCATAAGT	3347
3348	TAGCTCATGTGAAGGCGATTTTCAGTTCATTCTCTCTTTTTGGAGCTTATTTCCGTTCGA	3407
3408	CCAATTGTGACACCAATTGCCTTTCAAAGACGTGGACGATATGTGTACGGTAATCAGTC	3467
3468	AAATGAACGTCAACATTCATTTAATAAGGACATTTCCAGGTTTCCTTACTCTGTTCGATTA	3527
3528	TGCCTAACTCGGGTTGATGCTTGTCTCAGGATGGAAAATCTCGTTATGTACTTCCAGTGAA	3587
3588	ATGGGCAGGGCTAAGCCCTAAACCCTAACGCATACAATTTGTAGGCACCTACCCATGTAA	3647
3648	GTTACACCCAGTCGACTTATAAGTCTAGATATTTATGCTATGCAGGCTCTGGAATGATTT	3707
3708	ACAGTCCATGCTATACATAGTTATTTGCAAGAATTTGCAGACGAGATAAAAAATCAATGGA	3767
3768	CGAATAATCACGCATTACTCCACAGGCTCATGCCACGGAGCAAGGGTTCCCCCGAATCTA	3827
3828	GGCCAGACCGGGATGATATTCACCGATTCCTTTTGCAGTAACATCTCGTACGAGCTGC	3887
3888	ACGAGCTAAACGGCATTATATAAAGGTGCTGACCCAGACTTGGATCCGTACGTTATATGA	3947
3948	AATGACTTTTAAATCTCGCAGATTTGGACCGTAATCATATTGAAGCGGCCGCTAGCGCCAA	4007
4008	ACCTACGGTACGTTCA	4023

รูปที่ 4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากโคดอนเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG, codon) ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPT-4, pPT-5 และ pPT-6 ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมไทโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงโคดอนหยุด (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่ง CAAT Box และ TATA Box ของโปรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงด้วยอักษรตัวหนาและขีดเส้นใต้ (A) แสดงจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (transcriptional start site) ลำดับกรดอะมิโนที่แสดงด้วยอักษรหนา 20 หมู่ (กรดอะมิโนตัวที่ 1-20) คือบริเวณที่คาดว่าเป็น signal peptide ลูกศร ↑ แสดงตำแหน่งของ signal peptidase cleavage site และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้หลังรหัสสิ้นสุดการถอดรหัสแสดงบริเวณที่เป็น PolyA signal

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 แผนที่แสดงยีน *SMCU-dex* ขนาด 4,023 bp ที่เกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้นดีเอ็นเอ PT-6 เชื่อมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ PT-4 และ PT-5 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SMCU-dex* ต่อเนื่องกัน รวมทั้งแสดงตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์รีstriction เอนไซม์ชนิดต่างๆ  
 ลูกศร ➡ คือ โปรโมเตอร์และกรอบอ่านรหัสเปิดและทิศทางของยีน *SMCU-dex*



เมื่อใช้โปรแกรม ClustalX เวอร์ชัน 1.83 วิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน *SMCU-dex* กับลำดับของโปรตีนเดคซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือน 99.5% กับเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) (โดยมีกรดอะมิโนที่ต่างกัน ดังนี้ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 เป็นอะลานีน (A) ในขณะที่ SMCU-DEX เป็นโปรลีน (P)(A2P), กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 346 ของเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 เป็นไอโซลูซีน (I) ในขณะที่ SMCU-DEX เป็นวาลีน (V)(I346V) และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 599 ของเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 เป็นไกลซีน (G) ในขณะที่ SMCU-DEX เป็นวาลีน (V)(G599V)) นอกจากนี้ยังมีความเหมือน 97% กับเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066) โดยมีการดัดแปลงที่แตกต่างกัน 14 ตำแหน่ง, 89.5% กับเดคซ์แทรนเนสไอโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (AF020619) โดยมีการดัดแปลงที่แตกต่างกัน 63 ตำแหน่ง, 87% กับเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006) โดยมีการดัดแปลงที่แตกต่างกัน 74 ตำแหน่ง ซึ่งได้สรุปข้อมูลไว้ในตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.17 ทั้งนี้จะเห็นว่ากรดอะมิโนของ SMCU-DEX ที่แตกต่างจากเดคซ์แทรนเนสอื่น ๆ นั้น ได้แก่ โปรลีนในตำแหน่งที่ 2 ( $P_2$ ) และวาลีนในตำแหน่งที่ 599 ( $V_{599}$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4.17

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซนต์ความเหมือน (% identity) ที่ได้จากการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน *SMCU-dex* กับเดคซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX

SMCU-DEX	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 (ผลจากงานวิจัยนี้)
pUDEX	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)
dexA	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium funiculosum</i> (AJ272066)
Isoform_dex	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> (AF020619)
PDex1	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> สายพันธุ์ IMI 068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006)

โปรตีนที่เปรียบเทียบ	จำนวนกรดอะมิโนทั้งหมด(หมู่)	จำนวนกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (หมู่)	%ความเหมือน (%identity)
SMCU-DEX กับ pUDEX	608	605	99.5
SMCU-DEX กับ dexA	616	602	97.0
SMCU-DEX กับ Isoform_dex	604	541	89.5
SMCU-DEX กับ PDex1	606	532	87.0

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SMCU-DEX MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ 60  
pUDEX MATMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ  
dexA MATMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGVSHPGTHTGTTNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ  
Isoform\_dex MATMLKLLALALAISESTLGAVLHPRRDSRSST--GTNATHCGTDFCTWWHDSGEINKQ  
PDex1 MATMLKLLALALAISESTLGAVLHPRCDSRSGT--GTNATHCGTDFCTWWHDSGEINKQ  
\* .\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\* \* :. . \* \*\*\*\* \* :\*\*\*\*\*. . \*

SMCU-DEX TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPDPPNSNTLDSSVD 120  
pUDEX TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPDPPNSNTLDSSVD  
dexA TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPDPPNSNTLDSSVD  
Isoform\_dex TPVQPGNVRQSHKYAVQVSLAGANNFYDSFVYESIPRNGNGRIHAPDPPNSNTLDSSID  
PDex1 TPVQPGNVRQSHKYAVQVSLAGANNFYDSFVYESIPRNGNGRIHAPDPPNSNTLDSSID  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*

SMCU-DEX DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVDKILATDGSSLGSPSDVIRPVSISYAISQSDDGG 180  
pUDEX DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVDKILATDGSSLGSPSDVIRPVSISYAISQSDDGG  
dexA DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSQDVKILATDGSSLGSPSDVIRPVSISYAISQSNDGG  
Isoform\_dex DGISIEPSIGLNMAWSQFEYDQVDKILDTGSSLGSPSDVIRPVSISYHISQSDDGG  
PDex1 DGISIEPSIGLNMAWSQFEYDQVDKILTTDGSSLGSPSDVIRPVSISYHISQSDDGG  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\* \* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*

SMCU-DEX IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVEPTNALVIFASPFLPSGM 240  
pUDEX IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVEPTNALVIFASPFLPSGM  
dexA IVIRVPADANGRKFSVEFKNDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVEPTNALVIFASPFLPSGM  
Isoform\_dex IVIRVPADANGRKFSVEFKNDLYTFRSDGNEYVTSGGSVVGVEPTNALVIFASPFLPSGM  
PDex1 IVIRVPARCEWPQIFSRVCNDLYTFRSDGNEYVTSGGSVVGVEPTNALVIFASPFLPSGM  
\*\*\*\*\* .: :. . \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SMCU-DEX IPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY 300  
pUDEX IPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY  
dexA IPHMKPHNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY  
Isoform\_dex IPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGSKSTLYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHMRLDSNTY  
PDex1 IPNMTPDNTQTMTPGPINNGDWGFKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHMRLDSNTY  
\*\*:\* .\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*

SMCU-DEX WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH 360  
pUDEX WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYIAVKSDSTSLRMWWH  
dexA WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGVLSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH  
Isoform\_dex WYFARCAVYKGAVEYFTKHNFYATGHGVLSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSAGLRMWWH  
PDex1 WYFAPGAYVKGAVEYFTKHNFYATGHGVLSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSAGLRMWWH  
\*\*\*:\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

SMCU-DEX NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNNGSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSVV 420  
pUDEX NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNNGSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSVV  
dexA NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNNGSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSVV  
Isoform\_dex NNLGGGQIWCYVG-YINAPPFNTMDFNNGSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSVV  
PDex1 NNLGGGQTWYCVGPTVNAPPFNTMDFNNGSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSVV  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SMCU-DEX HDVFHWVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI 480  
pUDEX HDVFHWVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI  
dexA HDVFHWVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI  
Isoform\_dex HDVFHWVNDDAIKTYYSGASISRVTIRKCHNDPIIQMGWTSRSISGVTIDKLNVIHTRYI  
PDex1 HDVFHWVDDDAIKTYYSGASISRATIWKCHNDPIIQMGWTSRSISGVTIDKLNVMTRYI  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\* \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*:\*\*\*\*

SMCU-DEX KSETVVP SAIIGASPFYASGMSPDSRKSISMTVSNVVCEGLCP SLFRITPLQNYKNFVVK 540  
pUDEX KSETVVP SAIIGASPFYASGMSPDSRKSISMTVSNVVCEGLCP SLFRITPLQNYKNFVVK  
dexA KSETVVP SAIIGASPFYASGMSPDSKKSISMTVSNVVCEGLCP SLFRITPLQNYKNFVVK  
Isoform\_dex KSETVVP SAIIGASPFYASGMSPDPSQSISMTISNVVCEGL-PSLFRITPLQNYKNFVVK  
PDex1 KSETVVP SAIIGASPFYASGMSPDPSQSISMTISNVVCEGLCP SLFRITPLQNYKNFVVK  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

```

SMCU-DEX      NVAFPDGLQTNISIGTGESIIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDVS 600
pUDEX         NVAFPDGLQTNISIGTGESIIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDGS
dexA          NVAFPDGLQTNISIGTGESIIIPAASGLTMGLNISSWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDGS
Isoform_dex   NVAFPDGLQTNISIGTGESLIIPAASGLTMGLGISGWTVGGQKVTMQNFQSSSLGQFDIDGS
PDex1         NVAFPDGLQRNSIGTGESLIIPAASGFTMGLGISGWTVGGQKVTMQNLESSSLGQFDIDGS
*****      *****:*****:*****.**.******:*.:.*****:* *

SMCU-DEX      YWGEWQIS-----
pUDEX         YWGEWQIS-----
dexA          YWGEWQISRISSSQSA
Isoform_dex   YWGEWQIS-----
PDex1         YWGEWQIS-----
*****

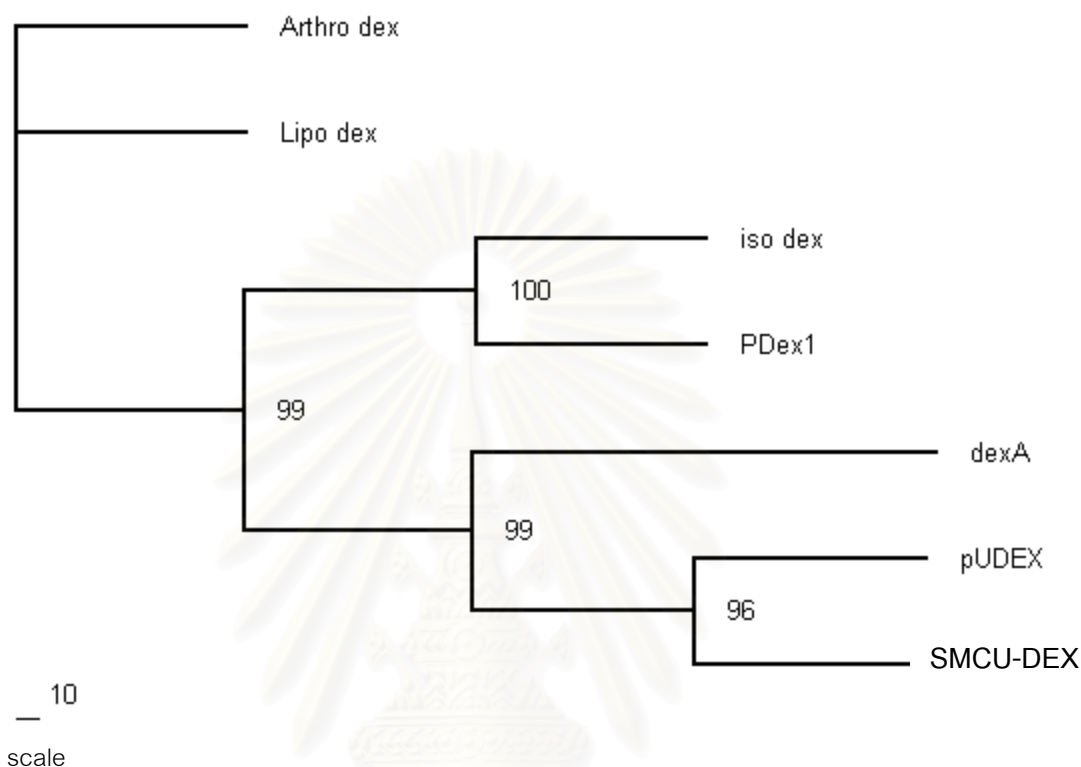
```

รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 กับเดคซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX เวอร์ชัน 1.83

SMCU-DEX	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 (ผลจากงานวิจัยนี้)
pUDEX	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)
dexA	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium funiculosum</i> (AJ272066)
Isoform_dex	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> (AF020619)
PDex1	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดคซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> สายพันธุ์ IMI 068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลดรหัสเดคซ์แทรนเนส 6 ลำดับที่มีรายงานไว้ โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3.572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ได้ผลจากการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX มีความเหมือนกับเอนโดเดคซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% ที่ค่าความเชื่อมั่น เท่ากับ 96% โดยมีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากเอนโดเดคซ์แทรนเนสของแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank เลขที่ P39652

และ Okushima และคณะ, 1991) และเอนโดเดกซ์แทรนเนสของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* (AY520537 และ Kang และคณะ, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 Phylogenetic tree ของ SMCU-DEX จากการจัดเรียงเทียบ (alignment) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส 6 ชนิดโดย Bootstrap analysis 100 replicons. Arthro dex, *Arthrobacter* sp. CB-8 (P39652); Lipo dex, *Lipomyces starkeyi* (AY520537); iso dex, *Penicillium minioluteum*, (AF020619); PDex1, *Penicillium minioluteum* IMI068219 (DQ394070); dexA, *Penicillium funiculosum* (AJ272066); pUDEX, *Penicillium minioluteum* HI-4 (L41562) โดยที่ตัวอักษรในวงเล็บแสดงหมายเลขเข้าถึงของ Genbank

การหา motif จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX โดยเทียบจากฐานข้อมูล Genbank พบว่ามี motif เป็น Glycosyl hydrolase family 49 (GH49) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเปรียบเทียบกับกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ที่ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน 5 ชนิด โดย Aoki และ Sakana (1997) โดยใช้โปรแกรม ClustalX ได้ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 4.19 ซึ่งพบบริเวณอนุรักษ์ทั้งสิ้น 7 บริเวณ โดยพบว่าบริเวณ



อนุกรมที่ 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโนคือ WVYLAPGAYVKGAIEY ที่มีความเหมือนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอนุกรมอื่น ๆ อีก 6 บริเวณ

```

Arthro-1      MPGTGLGRLAKRMTAAAVFFIISTSAVLPAQAATAPAAAPPVPAALKAERAITTVDNNGN
Arthro-2      MPGTGLGRLAKHVTAATAAVFLISTGAVLPAQAETAPGSTPSAAPAASVEKHPITANNNGN
IMTD          MPTTGLRQLARTITIAVAATLIGTGAAIPAQAG-----PDRKNPTKPVEDAPVTADVGN
SMCU-DEX      -----MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTTNNTHCGAD
Penicillium   -----MATMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTTNNTHCGAD
IPUA          -----MRSTGYLLTLSAAFQVAQAAVTAN---NSQ-----

```

I

```

Arthro-1      LHTWWHDNGVFSPATPTQSSEVRRSSFYDVQVAQ-ANQPQKLYDAFSYMSIPRSGKKGKIG
Arthro-2      LHTWWHDNGVFSPAAPTQSDEVRRSSLYDVRVAQ-ANQPQKAYDAFTYMSIPRSGKKGKIG
IMTD          LHTWWHDNAVYNTDSPTENGEVRRSSFYDVQVAQ-AHQPKFFDSFAYMSIPRSGKKGKVG
SMCU-DEX      FCTWWHDSGEINTQTPVQPGNVRQSHKYSVQVS--LAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIY
Penicillium   FCTWWHDSGEINTQTPVQPGNVRQSHKYSVQVS--LAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIY
IPUA          LLTWWHNTGEINTQTPVADGNVRQSGLYSVKVQTPASSLLYDSFVYLAIPGNG-----
: ****:.. .. :*. .:***: * :*: * .. :*: * * :*: *

```

```

Arthro-1      -----YTEEDGAEFSSDARLTMSWSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQI
Arthro-2      -----YTEEDGAEFSSSEAGLTMSWSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQI
IMTD          -----YTKEDGAEFSSSEANLSMSWSSFYAKDVWVDVSLKTGQTISSADEVQI
SMCU-DEX      APTDPPNSNTLDSVDDGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDVKILATDGSLLGSPSDVVI
Penicillium   APTDPPNSNTLDSVDDGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDVKILATDGSLLGSPSDVVI
IPUA          -----MSDQLQYTQGYNQTQAWTSFLYSHDATVKISR-SSAN--SNVVI
                . * . . . :*: * :*: * . * : . * : . . :* *

```

II

```

Arthro-1      RPSSYNFEKQLVDADTVRIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNDMSGDSGKLTTEAAGNR
Arthro-2      RPSSYNFEKQLVDADTVRIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNDMSGDSGKLTTEAEGNR
IMTD          RPSSYDFEKKLVDEDTIRIKVPYSDAGYRFSVEFDPQLYTSYNDMSGNSGKLTTEAEGNR
SMCU-DEX      RPSISYAIQSDDGGIVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGN-----EYVTSGGS
Penicillium   RPSISYAIQSDDGGIVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGN-----EYVTSGGS
IPUA          RPTSLNFPVR-YDNQSVYITVPYSPYGYRFSVEFDDDLISLAPSG-----
** * .: * : * * . * :*****. :* : .

```

```

Arthro-1      PIHTEPRNSMMVFAEPKLRGEQKERLVPTTEESGSIHYPEPGEVRNLNSVSEIIYFRPGT
Arthro-2      PIHTEPRNSMMVFAEPKLRGEQKERLVPTQESGSIHYPEPGEVRNLNSVSAEIIYFRPGT
IMTD          PIHTEPMNSMMVFAEPKLRGEEKRLIPNPSSGSIHYPEEVEKDLNTVTEEIIYFKPGT
SMCU-DEX      VVGVEPTNALVIFASPFLPSG----MIPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGV
Penicillium   VVGVEPTNALVIFASPFLPSG----MIPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGV
IPUA          --ARQPENALLIFASPFENSS----TKPQPGSPNSIAPAPGRVGLNNTTSASTVVFNPV
                :* *:::*. * . * . . * : . : . : * * .

```

III

IV

```

Arthro-1      YSMG-----PDYHAVLPANVKWVYLAPGAYVKGAFRFLHDTQSQYKVTGYVLSG
Arthro-2      YSMG-----SDYHAVLPANVKWVYLAPGAYVKGAFRFLHDTQSQYKVTGYVLSG
IMTD          YHMG-----SDYHAVLPPNVKWVYLAPGAYVKGAFRFFHDNQAQYKVTGYVLSG
SMCU-DEX      YWMNQDQSGNSGKLGSNHRLNSNTYWVYLAPGAYVKGAIEYF--TKQNFYATGHGILSG
Penicillium   YWMNQDQSGNSGKLGSNHRLNSNTYWVYLAPGAYVKGAIEYF--TKQNFYATGHGILSG
IPUA          YYFT-----GHDHMLVSSSVTWVYFAPGAYVKGAVEFLS-TASEVKASGHGVLSSG
* : . . . * * . . . *****. .: . : .:*. *

```

```

Arthro-1      EQYVYEADTNNSYHHLGSGASNCHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTVAEPPYHSFVVYG
Arthro-2      EQYVYEADTNNSYNHLGSGASNCHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTVAEPPYHSFVVYG
IMTD          EQYVYEADTANNYNALSGASNCHVTVKMLQFESSNIGQLDLQGVTVINEPPYHSFVVYA
SMCU-DEX      ENYVYQANAGDNYVAVK-SDSTS--LRMWWHNNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNG
Penicillium   ENYVYQANAGDNYIAVK-SDSTS---LRMWWHNNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNG
IPUA          EQYVWYADPDEGYQKASGANNG--LRMWRGTLGNSSQTFVLNGVTVSAPPFNMSMDWSG
*:*:*  *:. :.* . :..   ::* . * * * : *:*: :. .
    
```

V

VI

```

Arthro-1      NE-----QTFHMNVENYKQVGSWYQTDGIELYKGMTKNTFFNANDDVLKMYHSDVT
Arthro-2      NE-----QTFHMNVENYKQVGSWYQTDGIELYQGMTKNTFFNANDDVLKMYHSDVS
IMTD          HEHEKEIGVENFRMNVENYKQVGSWYQTDGIELYQGMTKNTFFNANDDVLKMYHSDVT
SMCU-DEX      NSG-----ISSQISDYKQVGAFFFQTDGPEIYPNSVVHDFVHVNDDAIKIYYSGAS
Penicillium   NSG-----ISSQISDYKQVGAFFFQTDGPEIYPNSVVHDFVHVNDDAIKIYYSGAS
IPUA          NSLD-----LITCRVDDYKQVGAFYQTDGLEMYPGTILQDVFYHTDDDGLKMYYSNVT
:.           : . : : * * * * : : * * * * * * . : : : * : : * * * * : : .
    
```

VII

```

Arthro-1      IDNTVIWKNENGPVIQWGWTPRNIIDNVNANTTVIHNRMYWKDV-----KYNTCIFNSS
Arthro-2      IDNTVVWKNENGPVVQWGWTPRNIIDNVNVTNTTVIHNRMYWKDV-----KYNTCIFNSS
IMTD          IDNTVIWKNENGPVIQWGWTPRNIIDNVNVTDTTVIHNRMYWKDP-----KYNTCILNSS
SMCU-DEX      VSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYIKSET-----VVP SAIIGAS
Penicillium   VSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYIKSET-----VVP SAIIGAS
IPUA          ARNIVMWKESVAPVVEFGWTPRNTENVLFDNVDVIHQAYANAGNNPGIFGAVNNYLYAPD
. : * * * * * * : : : * * * * * * . * * * * * * . : : .
    
```

```

Arthro-1      SHWEDMGSTTKADPNTTVKNMRFENTAVEGMTNCAIRVYALSDTENIHIKFNIGAWNGL
Arthro-2      SHWEDMGSTTKADPNTTVKNMRFENTVEGMTNCAIRVYALSDTENIHIKFNIGSWNGL
IMTD          SHWEDMGSTAKADPNTTVKNMRFENITVEGMTNCAMRIYALSNTENIHVKNLSDSWNGL
SMCU-DEX      PFYASG---MSPDRKSSIS-MTVSNVVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVKNAVFPDG---
Penicillium   PFYASG---MSPDRKSSIS-MTVSNVVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVKNAVFPDG---
IPUA          GLSSNH---STGNSNMTVRNITWNSNFRAEGSSSALFRINPIQNLNDSIKNVSIES----
. . . . : : : . * * * . : * : : : . * : * * . :
    
```

```

Arthro-1      EWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEVPDGNGLALENYSVGGQVIEKSGGNSDYQLGRLG
Arthro-2      DWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNELPDGNGLALENYSVGGQVIEKSGGNWSDYQLGRLG
IMTD          DWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEIPDGNGLALENYSVGGQVIEKSGDNWSDYQLGRLG
SMCU-DEX      -LQTN SIGTGESIIPAASGLTMG-----LNISNWTVGGQKVT--MENFQANSLGQFN
Penicillium   -LQTN SIGTGESIIPAASGLTMG-----LNISNWTVGGQKVT--MENFQANSLGQFN
IPUA          -FEPLSINTTESWMPVWYDLNNGKQITVTD-FSIEGFTVGNTTIT--ASN--AASVGRID
. . . . : . * . : : : * * . : * * * * : : * * * : :
    
```

```

Arthro-1      -FDGENWENWNAWKSAP
Arthro-2      -FDGENWDSWNAWKSAP
IMTD          -FDGENWDSWNAWKSTP
SMCU-DEX      -IDVSYWGEWQIS----
Penicillium   -IDGSYWGEWQIS----
IPUA          GVDPAYAGSVHYID---
.*           . :
    
```

รูปที่ 4.19 ผลการหาบริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสด้วยโปรแกรม Clustal X

- Arthro-1 คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991)
- Arthro-2 คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

IMTD	คือ ลำดับกรดอะมิโนของไฮโซมอลโทโทรโอ-เดกซ์แทรนเนสจาก <i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>dextranlyticum</i> (Mizuno และคณะ, 1999)
SMCU-DEX	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 (ผลจากงานวิจัยนี้)
Penicillium	คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก <i>Penicillium minioluteum</i> (Garcia และคณะ, 1996)
IPIUA	คือ ลำดับกรดอะมิโนของไอโซพูลูแลนเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> (Aoki และ Sakano, 1997)
I-VII	คือ บริเวณอนุรักษ์ 7 บริเวณของโปรตีนทั้ง 6 ชนิด

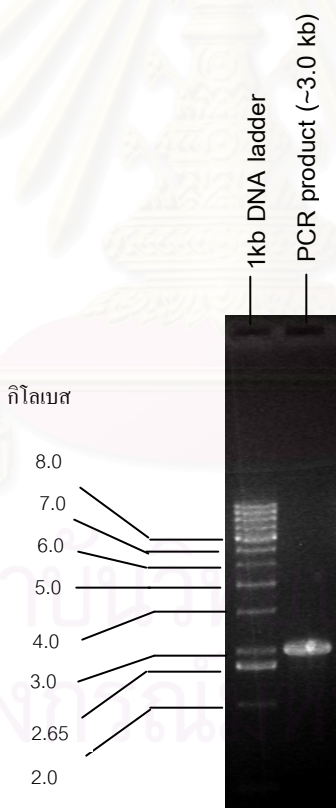


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.7 การตรวจสอบยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส PT-6 ที่โคลนได้ว่ามีอยู่ในจีโนมที่ดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

##### 4.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม

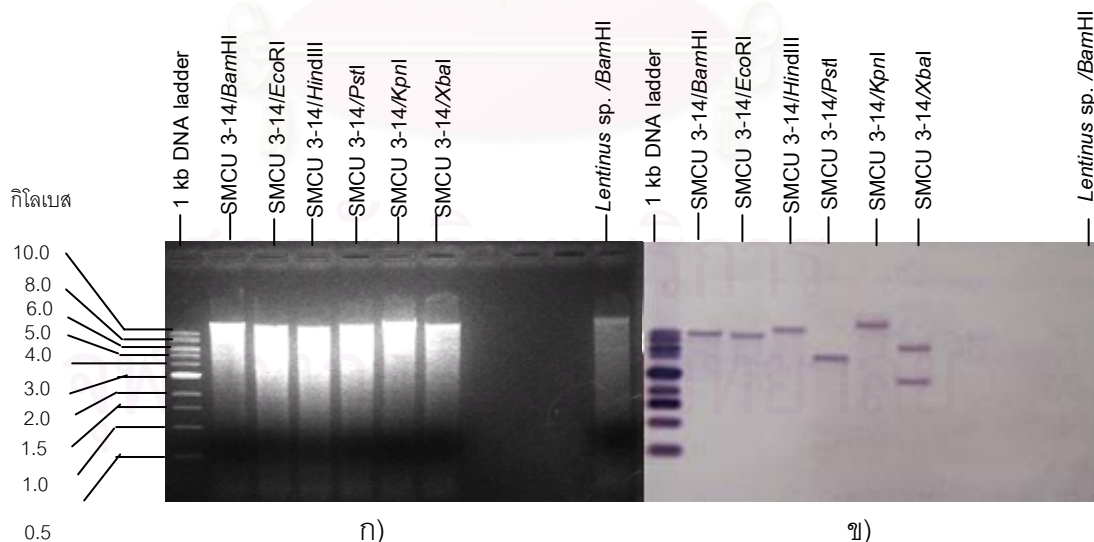
ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส PT-6 ความยาวทั้งหมดที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT-6 โดยใช้ไพรเมอร์ Dex8F และ Dex10R เป็น forward primer และ reverse primer ตามลำดับในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.1 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 3 กิโลเบสตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 4.20 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาติดฉลากด้วย DIG ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.2 ตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า PT6-probe



รูปที่ 4.20 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม

4.7.2 การไฮบริดเซชันดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอติดตามที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 6 ชนิด ได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Kpn*I และ *Xba*I และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำเซาเทิร์นไฮบริดเซชัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.13.3 โดยใช้ PT6-probe เป็นดีเอ็นเอติดตาม ผลการติดตามแสดงในรูปที่ 4.21 ซึ่งพบว่า เรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิด ให้สัญญาณจากการไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตาม PT6-probe ในขณะที่ไม่เกิดสัญญาณกับชุดควบคุมผลลบ ซึ่งใช้ดีเอ็นเอจากรา *Lentinus* sp. แสดงว่า ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส PT-6 ที่โคลนได้ในพลาสมิด pPT-6 มีในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ทั้งนี้พบว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I และ *Kpn*I ให้สัญญาณเพียงหนึ่งตำแหน่ง ซึ่งเสนอแนะได้ว่าใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 มีจำนวนชุดของยีนเดกซ์แทรนเนสเพียงหนึ่งชุด ส่วนในปฏิกิริยาที่ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 อย่างสมบูรณ์ด้วย *Xba*I แล้วเกิดสัญญาณจากการไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตาม PT6-probe 2 ตำแหน่งนั้น เกิดเนื่องจากมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย *Xba*I อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ PT-6 ที่โคลนได้ที่ตำแหน่งประมาณ 1,218 คู่เบส



รูปที่ 4.21 ก) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ

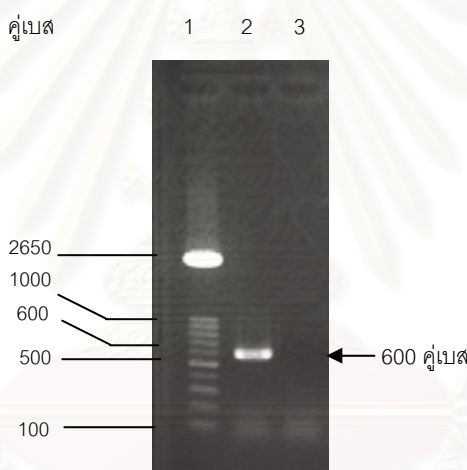
ข) สัญญาณจากเซาเทิร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม PT6-probe



## 4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

### 4.8.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ได้ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 (ตารางที่ 3.3) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.14.1 หลังดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.22 จากรูปพบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ช่องที่ 2) ในขณะที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR จากชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 3)



รูปที่ 4.22 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

- |           |  |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | 100 bp DNA ladder  |
| ช่องที่ 2 | ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมอดีเอ็นเอของ <i>Penicillium</i> sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 |
| ช่องที่ 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอ (ตัวควบคุมผลลบ)  |

#### 4.8.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

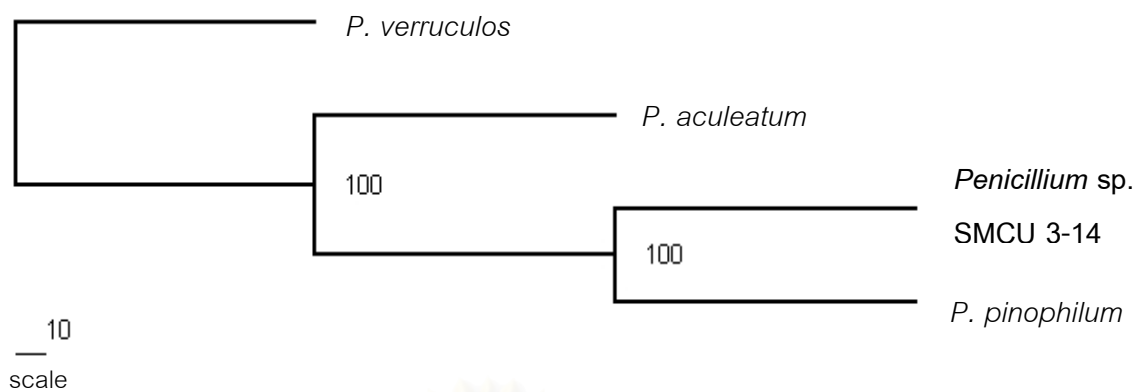
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ดังแสดงในรูปที่ 4.23 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มีความเหมือน 100% กับ *Penicillium pinophilum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF176660), 98% กับ *Penicillium verruculosum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF510496.1) และ 98% กับ *Penicillium aculeatum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF033397) ดังแสดงในภาคผนวก ค17, ค18 และ ค19 ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Penicillium* ทั้ง 3 ชนิดเหล่านี้ โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c (SEQBOOT, NEIGHBOR, และ CONSENSE) ได้ผลการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.24 ซึ่งพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มีความเหมือนกับ *Penicillium pinophilum* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100% ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 100%

```

5'      1 GACGA GGGGC CTCGC GGCCA CCTCC CACCC TTGTC TCTAT ACACC TGTTG
      51 CTTTG GCGGG CCCAC CGGGG CCACC TGGTC GCCGG GGGAC GCACG TCTCC
     101 GGGCC CGCGC CCGCC GAAGC GCTCT GTGAA CCCTG ATGAA GATGG GCTGT
     151 CTGAG TACTG TGAAA ATTGT CAAAA CTTTC AACAA TGGAT CTCTT GGTTT
     201 CGGCA TCGAT GAAGA ACGCA GCGAA ATGCG ATAAG TAATG TGAAT TGCAG
     251 AATTC CGTGA ATCAT CGAAT CTTTG AACGC ACATT GCGCC CCCTG GCATT
     301 CCGGG GGGCA TGCC TCCG AGCGT CATT CTGCC CTCAA GCACG GCTTG
     351 TGTGT TGGGT GTGGT CCCCC CGGGG ACCTG CCCGA AAGGC AGCGG CGACG
     401 TCCGT CTGGT CCTCG AGCGT ATGGG GCTCT GTCAC TCGCT CGGGA AGGAC
     451 CTGCG GGGGT TGGTC ACCAC CATGT TTTAC CACGG TTGAC CTCGG ATCAG
     501 GTAGG AGTTA CCCGC TGAAC TTAAG CATAT CAATA 3'
  
```

รูปที่ 4.23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14



รูปที่ 4.24 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 จากการจัดเรียงเทียบ (alignment) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Penicillium* 3 ชนิด โดย Bootstrap analysis 100 replicons.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ของสายเดกซ์แทรน เดกซ์แทรนเนสสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้ง รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ พบว่า ราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์ (Sidebotham, 1974; Beldarrain และคณะ, 2003) จนถึงปัจจุบันมีเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรายงานไว้เพียง 5 ยีนเท่านั้น ได้แก่ เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996), เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066), เดกซ์แทรนเนสไอโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (AF020619), เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006) และเดกซ์แทรนเนสของ *Lipomyces starkeyi* (AY520537 และ Kang และคณะ, 2005) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสจากราทั้งหมดจัดอยู่ใน family 49 ของไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Li และคณะ, 2006) ในงานวิจัยนี้ได้โคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) รวมทั้งได้เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและบริเวณอนุรักษ์ต่างๆของเดกซ์แทรนเนสที่ได้กับลำดับเดกซ์แทรนเนสอื่นๆที่มีรายงานไว้

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD BioScience, USA) ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของเดกซ์แทรนเนส 3 พลาสมิดด้วยกัน คือ pPT-4, pPT-5 และ pPT-6 (รูปที่ 4.14) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่โคลนได้ พบยีนประมวลรหัสสร้างเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,824 คู่เบส (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1,450-3,273) ซึ่งถอดรหัสเป็นยีนเดกซ์แทรนเนส (*SMCU-dex*) โดยมีโคดอนเริ่มต้นและโคดอนหยุดของการแปลรหัสเป็น ATG และ TGA เช่นเดียวกับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) และ *Penicillium funiculosum* (AJ272066) แต่ต่างจากยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของยีสต์ *Lipomyces strakeyi* (AY520537 และ Kang และคณะ, 2005) ที่มีโคดอนเริ่มต้นและโคดอนหยุดของการแปลรหัสเป็น ATG และ TAA สำหรับในส่วนของกรอบอ่านรหัสเปิดนั้นพบรหัสที่มีแนวโน้มเป็นโคดอนเริ่มต้น (start codon) ATG 4

โคดอน ได้แก่  $ATG_1$ ,  $ATG_2$ ,  $ATG_3$  และ  $ATG_4$  (รูปที่ 4.15) ซึ่งแต่ละ ATG ประมวลรหัสให้โปรตีนเดียวกันแต่ต่างกันที่ความยาวของปลายด้านอะมิโนเท่านั้น ซึ่งลักษณะเช่นนี้ปรากฏเช่นเดียวกับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) ทั้งนี้สำหรับยีนของราส่วนใหญ่แล้ว แม้ว่าจะพบโคดอนที่มีแนวโน้มเป็นโคดอนเริ่มต้นได้หลายตำแหน่งก็ตาม แต่ยีนของราส่วนใหญ่ก็มักจะถอดรหัสจาก ATG ตำแหน่งแรก (Garcia และคณะ, 1996) ซึ่งหากพิจารณาโคดอนเริ่มต้น ATG ที่ 1 แล้วยีน *SMCU-dex* จะถอดรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 608 หมู่ (*SMCU-DEX*) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ที่โปรตีนเดกซ์แทรนเนสจะเริ่มจาก ATG ที่ 2 เนื่องจากลำดับเบสที่มาก่อน ATG โคดอนที่ 2 ( $CACAATG_2$ ) จะคล้ายกับ consensus sequence ( $5' CAC/AA/CATG_2 3'$ ) สำหรับเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัสที่พบใน 99 ยีนของราสายใย (Balance และคณะ, 1990) ซึ่งหาก ATG ตำแหน่งที่ 2 เป็นโคดอนเริ่มต้น ก็จะถอดรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 605 หมู่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน ทั้งนี้ต้องมีการตรวจสอบขนาดของโปรตีนและลำดับกรดอะมิโนที่ปลายด้านอะมิโน (N-terminus) โดยใช้แมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) ต่อไปเพื่อยืนยันผล

การควบคุมการทำงานของยีนในระดับทรานสคริปชันในพวกยูแคริโอต จะอยู่ภายใต้การควบคุมของหน่วยโปรโมเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย CAAT Box และ TATA Box ที่ทำหน้าที่เป็นจุดรับเข้าของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสเพื่อการเริ่มต้นทรานสคริปชันที่แม่นยำและมีประสิทธิภาพในการสร้างอาร์เอ็นเอ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SMCU-dex* ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ *SMCU* 3-14 พบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์ ที่ประกอบด้วย CAAT Box ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCAAT ในตำแหน่ง -100 ถึง -104 และ TATA Box ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TATAA ในตำแหน่ง -28 ถึง -32 เหนือจุดเริ่มต้นการถอดรหัส ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ซึ่งเป็นลำดับที่เหมาะสมที่คล้ายคลึงกับ consensus sequence ของ CAAT region และ consensus sequence ของ TATA region ในยูแคริโอต ซึ่งมักจะพบในตำแหน่ง -70 ถึง -200 และ -20 ถึง -35 ตามลำดับ (Smale, 2001)

เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ *SMCU* 3-14 เป็นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (สุวรรณาน นพพรพันธุ์, 2538) เป็นผลให้พบลำดับของโปรตีนที่ช่วยในการหลั่งออกนอกเซลล์ (signal peptide) ที่ประกอบด้วยตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 20 และผลจากการวิเคราะห์ลำดับของโปรตีนที่ช่วยในการหลั่งออกนอกเซลล์ ทำให้พบตำแหน่ง signal peptidase cleavage site อยู่ระหว่างกรดอะมิโนไกลซีนตำแหน่งที่ 20 ( $G_{20}$ ) และกรดอะมิโน



โนอะลานีนตำแหน่งที่ 21 ( $A_{21}$ ) (รูปที่ 4.15) แสดงให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 อาจถูกสร้างเป็นพรีโพรเอนไซม์ (preproenzyme) ก่อน หลังจากนั้นจะผ่านกระบวนการตัดแปลงหลังแปลรหัส (post-translational modification) ซึ่งลำดับของโปรตีนที่ช่วยในการหลั่งออกนอกเซลล์ (signal peptide) จะถูกตัดออกระหว่างการส่งออกด้วยเอนไซม์เพปติเดส ดังนั้นกรดอะมิโนโนอะลานีนตำแหน่งที่ 21 จะเป็นกรดอะมิโนตัวแรกของ mature protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64 กิโลดาลตัน ซึ่งเล็กกว่าที่คาดประมาณจากพรีโพรเอนไซม์ (66 กิโลดาลตัน) เนื่องมาจากกระบวนการตัดแปลงหลังแปลรหัส ทั้งนี้สามารถยืนยันผลได้จากการตรวจสอบขนาดของโปรตีนและลำดับกรดอะมิโนที่ปลายด้านอะมิโน (N-terminus)

ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน *SMCU-dex* กับลำดับโปรตีนเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustal X (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.17) พบว่ามีความเหมือน 99.5% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) โดยมีกรดอะมิโนที่ต่างกัน ดังนี้ A2P, I346V และ G599V (รูปที่ 4.17) นอกจากนี้ *SMCU-dex* ยังเหมือน 97% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (AJ272066), 89% กับเดกซ์แทรนเนสไฮโซฟอรัมของ *Penicillium minioluteum* (AF020619), 87% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (DQ394070 และ Li และคณะ, 2006) และ 87% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Lipomyces starkeyi* (AY520537 และ Kang และคณะ, 2005) จากผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX ที่พบว่ามีค่าความเหมือนสูงมากกับเอนโดเดกซ์แทรนเนส จึงสอดคล้องกับงานวิจัยของ นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ (2545) ที่พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นชนิดเอนโดเดกซ์แทรนเนส

จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX (รูปที่ 4.18) พบว่า มีความเหมือน 99% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (L41562 และ Garcia และคณะ, 1996) โดยมีค่าความเชื่อมั่น เท่ากับ 96% จึงเป็นไปได้ว่าวิวัฒนาการของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 อาจมีวิวัฒนาการร่วมกัน

เดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ สามารถจัดจำแนกอยู่ใน Glycosyl hydrolase family 49 และ Glycosyl hydrolase family 66 โดยใช้หลักการความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ซึ่ง Glycosyl hydrolase family 66 จะเป็นเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย ในขณะที่

Glycosyl hydrolase family 49 จะเป็นเดกซ์แทรนเนสจากรา ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า SMCU-DEX จัดอยู่ใน Glycosyl hydrolase family 49 ที่สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ที่เชื่อมหน่วยย่อยของกลูโคสภายในสายเดกซ์แทรน เช่นเดียวกับเดกซ์แทรนเนสจากราและยีสต์อื่นๆ (Garcia และคณะ, 1996; Kang และคณะ, 2005; Li และคณะ, 2006)

การวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสโดยใช้โปรแกรม ClustalX ได้วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SMCU-DEX ร่วมกับเอนไซม์ที่มีการจัดกลุ่มโดยใช้หลักการความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม PileUp (Aoki และ Sakano, 1997) พบบริเวณอนุรักษ์ทั้งสิ้น 7 บริเวณ (รูปที่ 4.19) ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวคาดว่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ กล่าวคือ อาจจะเป็นตำแหน่งทำงาน, ตำแหน่งจับซับสเตรต หรือเป็นบริเวณที่มีความสำคัญกับการม้วนพับตัวของโปรตีนให้เกิดโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ (Mizuno และคณะ, 1999) ทั้งนี้พบว่าบริเวณอนุรักษ์ที่ 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโนคือ WVYLAPGAYVKGAIEY นั้นมีความอนุรักษ์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอนุรักษ์อื่นๆ 6 บริเวณ ซึ่งพบว่าบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโนหมู่มากและไม่ชอบน้ำเป็นส่วนมาก และจากการวิเคราะห์โดย Mizuno และคณะ (1999) ได้สรุปว่าบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนแกนที่ไม่ชอบน้ำของโครงสร้างโปรตีนที่พบได้ทั่วไปในเดกซ์แทรนเนส และจากผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX โดยใช้โปรแกรม Clustal X แสดงให้เห็นว่า SMCU-DEX มีกรดอะมิโนที่ต่างจากเอนโดเดกซ์แทรนเนสของราและยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ 2 หมู่กรดอะมิโน ได้แก่ กรดอะมิโนโปรลีน ในตำแหน่งที่ 2 ( $P_2$ ) และกรดอะมิโนวาเลอีน ในตำแหน่งที่ 599 ( $V_{599}$ ) ซึ่งกรดอะมิโนที่แตกต่างทั้ง 2 หมู่นี้ พบว่า ไม่อยู่ในบริเวณอนุรักษ์ทั้ง 7 บริเวณ จึงไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ในการย่อยเดกซ์แทรน อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของกรดอะมิโนเหล่านี้ยังไม่ทราบว่า มีผลต่อแอกติวิตีหรือลักษณะสมบัติอื่นๆ ของเอนไซม์หรือไม่ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษามาก่อน ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยการทำการกลายพันธุ์แบบเจาะจงตำแหน่ง เปรียบเทียบกับของเดกซ์แทรนเนสตั้งต้นที่ได้จาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

จากการตรวจสอบยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้ว่ามีอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชันนั้นชี้ให้เห็นว่า ยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสมีในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และมีจำนวนชุดของยีนเพียงหนึ่งชุด อีกทั้งไม่มียีนอื่นใดที่มีลำดับคล้ายคลึงกับ SMCU-dex ในราสายพันธุ์นี้ เนื่องจากพบสัญญาณที่ชัดเจนเพียงหนึ่งแถบเท่านั้น ดังนั้นเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ราสายพันธุ์นี้ผลิตขึ้นจึงน่าจะถูกประมวลรหัสมาจากยีน SMCU-dex ที่โคลนได้ในงานวิจัยนี้

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มีความเหมือน 100% กับ *Penicillium pinophilum* ที่ความเชื่อมั่น 100% ซึ่งเสนอแนะได้ว่าราสายพันธุ์นี้น่าจะเป็น *Penicillium pinophilum* และดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* ด้วย

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการนำไปโปรตีนที่ได้จากราไปใช้ในอุตสาหกรรมโดยตรงนั้นอาจไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภค (Kang และคณะ, 2005) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงควรนำยีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* สายพันธุ์ SMCU3-14 ซึ่งไม่มีอินทรอน ที่ได้ในครั้งนี้นำไปแสดงออกที่ระดับสูงในแบคทีเรียหรือยีสต์ และนอกจากนี้ก็ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในระดับสูงโดยไม่ต้องเหนี่ยวนำด้วยเดกซ์แทรนที่มีราคาสูงอีกด้วย ซึ่งเดกซ์แทรนเนสที่ได้ก็น่าจะมีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- จินตกร คุ้มผมนสุชาติ. 2542. จุลชีววิทยาช่องปาก และ ที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ. 2545. การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บริษัทอ้อยและน้ำตาลไทย. 2547. รายงานประจำปี 2547.
- บุญส่ง แสงอ่อน. 2525. บทบาทของแบคทีเรียในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฝ่ายวิชาการและแผนงาน ศูนย์บริหารการผลิต. 2547. การจำหน่ายน้ำตาลส่งออกต่างประเทศ. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. กระทรวงอุตสาหกรรม.
- ศิริโรจน์ ศรีสรการณ. 2547. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สันดี ฉายตระกูล. 2525. เดกซ์แทรน ศัตรูสำคัญของกระบวนการผลิตและคุณภาพน้ำตาลทราย. วารสารน้ำตาล. (พ.ค.-มิ.ย.) : 5-9.
- สามชัย ไชยทิพย์อาสน์. 2508. แบคทีเรียน้ำตาล. พระนคร : สำนักงานกองทุนสงเคราะห์อุตสาหกรรมน้ำตาล.
- สุวรรณ นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัศวิทย์ ปัทมเวณ. 2539. ตามรอยน้ำตาล. กรุงเทพมหานคร : ที.พี.พี. จำกัด.
- เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

## ภาษาอังกฤษ

- Abdel-Naby, M. A., Ismail, A. S. and Abdel-Fattah, A. M. 1999. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. Process Biochem. 34:391-398.
- Aoki, H. and Sakano, Y. 1997. Molecular cloning and heterologous expression of the isopullulanase gene from *Aspergillus niger* A.T.C.C. 9642. Biochem. J. 323:757-764.
- Arnold, W. N., Nguyen, T. B. and Mann, L. C. 1998. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii*. Arch. Microbiol. 170:91-98.
- Arora, D., Mukerji, K. G. and Marth, E. H. 1991. Handbook of Applied Mycology. Vol. 3 : Food and Feeds. New York: Mercel Dekker. pp. 466-467.
- Ballance, D.J. 1990. Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In Molecular Industrial Mycology. (Leong, S.A. and Berka, R.M., Ed.). New York: Mercel Dekker. pp. 29
- Beldarrain, A., Acosta, N., Betancourt, L., Gonzalez, L. J. and Pons, T. 2003. Enzymic, spectroscopic and calorimetric studies of a recombinant dextranase expressed in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Appl. Biochem. 38:211-221.
- Bigelis, R. 1991. Fungal enzymes in food processing. In: Arora, D., Mukerji, K.G., Marth, E.H. (ed.), Handbook of Applied Mycolog. New York: Mercel Dekker. pp. 466-467.
- Chaiet, L., Kempf, A. J., Harman, R., Kaczka, E., Weston, R., Nollstadt, K. and Wolf, F. J. 1970. Isolation of a dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Microbiol. 20:421-426.
- Chan, M. and Sim, T. S. 1998. Malate synthase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585 : cloning, molecular characterization and its control by acetate. Microbiolology. 144:3229-3237.
- Chawla, R. and DeMason, D. 2003. Genome walking in pea : an approach to clone unknown flanking sequences. Research paper in PI SUM GENETIC. 35:1-3.
- Cole, J. A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochem. Soc. Trans. 5(4):1232-1239



- Covacevich, M. T. and Richards, G. N. 1978. Purification of intracellular dextranase and D-glucosidases from *Pseudomonas* sp. UQM733. Carbohydr. Res. 64:169-180.
- Cuddihy, J. A., Porro, M. E. and Rauh, J. S. 2001. The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. Sugar Industry Technologists INC. 21.
- Das, D. K. and Dutta, D. K. 1996. Purification, biochemical characterisation and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28:107-113.
- Dols, M., Remaud-Simeon, M. and Monsan, P. E. 1997. Dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Enzyme Microb. Technol. 20:523-530.
- Eggleston, G. and Monge, A. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Process Biochem. 40:1881-1894.
- El Masry, H. G. 1991. Optimization of dextranase synthesis by a locally isolated *Fusarium moniliforme*. Zentralbl. Microbiol. 146:185-192.
- Finnegan, P. M., Brumbley, S. M., Shea, M. G., Nevalainen, H. and Bergquist, P. L. 2004. Isolation and characterization of genes encoding thermoactive and thermostable dextranases from two thermotolerant soil bacteria. Curr. Microbiol. 49:327-333.
- Foxgarty, W. M. and Kelly, C. J. 1984. Topics in enzyme and fermentation technology 3. in Wiseman, A. (ed.), pp. 67-69. New York.
- Fukumoto, J., Tsuji, H. and Tsuru, D. 1971. Studies on mold dextranases. I. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69:1113-1121.
- Fulcher, R. and Inkerman, P. A. 1976. Dextranase: Characterization of the enzyme for use in sugar mills. Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technol. 43<sup>th</sup> conf. 295-305.
- Garcia, B., Margolles, E., Roca, H., Mateu, D., Raices, M., Gonzales, M. E., Herrera, L. and Delgado, J. 1996. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. FEMS Microbiol. Lett. 143:175-183.

- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.
- Geronimos, G. L. and Greenfield, P. F. 1978. Viscosity increases in concentrated sugar solutions and molasses due to dextrans. Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technologists. 45<sup>th</sup> conf., 119-126. Brisbane, Queensland, Australia : Watson Ferguson and Company.
- Glavez-Mariscal, A. and Lopez-Munguia, A. 1991. Production and characterization of dextranase from the isolate *Paecilomyces lilacinus* strain 6R. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:327-331.
- Guerche, S. L., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdiou, D. and Labarere, J. 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their Internal Transcribed Spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. Curr. Microbiol. 48:405-411.
- Gutzmer, R., Mommert, S., Kuttler, U., Werfel, T. and Kapp, A. 2004. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by Light Cycler PCR. J. Med. Microbiol. 53:1207-1214.
- Hamada, S. and Slade, H. D. 1980. Bacteria adherence. Receptor and Recognition. 6:107-135.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Hatada, Y., Hidaka, Y., Nogi, Y., Uchimura, K., Katayama, K., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Goda, S., Ito, H., Matsui, H., Ito, S. and Horikoshi, K. 2004. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties, and crystallization of the recombinant enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:583-592.
- Hattori, A. and Ishibashi, K. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45:2347-2349.
- Hiraoka, N., Fukumoto, J. and Tsuru, D. 1972. Studies on mold dextranases. 3. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. J. Biochem. 71:57-64.

- Hirsoka, N., Fukumoto, J. and Tsuru, D. 1972. Studies (III) purification and some enzymatic properties of *A. carneus*. J. Biochem. 71:57-64.
- Horton, T.R. and Bruns, T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molec. Ecol. 10:1855-1871.
- Igarashi, D. A., Daniel, R. M., Martin, A. M. and Morgan, H. W. 1998. An appraisal use of dextranases. Biotechnol. Bioeng. 26:1141-1145.
- Igarashi, T., Ichikawa, K., Yamamoto, A. and Goto, N. 2001. Identification of mutans *Streptococcal* species by the PCR products of the *dex* genes. J. Microbiol. Methods. 46:99-105.
- Imrie, F. K. E. and Tilbury, R. H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. Sugar Tech. Rev. 5:291-361.
- Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Okada, G. and Chiba, S. 1996. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. J. Bacteriol. 176:7730-7734.
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H. and Rupp, M. E. 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med. Mycol. 40:87-109.
- James, G. P. and Cameron, J. M. 1971. The influence of deteriorated cane on raw sugar filterability. Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technologists. 38<sup>th</sup> conf., 247-250. Brisbane, Queensland, Australia: Watson Ferguson and Company.
- Jasalavich, C. A., Ostrofsky, A. and Jellson, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. Appl. Envi. Microbiol. 66:4725-4734.
- Jensen, B. and Olsen, J. 1996. Extracellular alpha-glucosidase with dextran-hydrolyzing activity from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. Curr. Microbiol. 33:152-155.
- Kang, H., Kim, S., Park, J., Jin, X., Oh, D., Kang, S., Kim, D. 2005. Cloning and characterization of a dextranase gene from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 22: 1239-1248.
- Khalikova, E., Petri, S., Nikolai, U. and Timo, K. 2003. Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp. J. of Chromatogr. B. 796:315-326.

- Khalikova, E., Susi, P. and Korpela, T. 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications. Microb. Molec. Biol. Rev. 69:306-325.
- Khalikova, E. F. and Usanov, N. G. 2002. An insoluble colored substrate for dextranase assay. Appl. Biochem. Microbiol. 38:89-93.
- Kobayashi, M., Takagi, S., Shiota, M., Mitsoshi, Y. and Matsuda, K. 1983. An isomaltotriose-producing dextranase from *Flavobacterium* sp. M-73 purification and properties. Agric. Biol. Chem. 47:2585-2593.
- Koenig, D. and Day, D. 1989. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur. J. Biochem. 183:161-167.
- Kosaric, N., Yu, K. and Zajic, J. E. 1973. Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. Biotechnol. Bioeng. 15:729-741.
- Lawman, P. and Bleiweis, A. S. 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 173:7423-7428.
- Leach, S. A. 1969. Dextranase and dental caries. British. Dental. J. p. 325-330.
- Lee, J. M. and Fox, P. F. 1985. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. Enzyme Microb. Technol. 7:573-577.
- Li, X., Millson, S. H., Coker, R. D. and Evans, I. H. 2006. Cloning and expression of *Penicillium minioluteum* dextranase in *Saccharomyces cerevisiae* and its exploitation as a reporter in the detection of mycotoxins. Biotechnol. Lett.
- Lichats, F. O. 2006. World Sugar Statistics. 67<sup>th</sup> Edition. pp. 112.
- Madha and Prabhu, K. A. 1984. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microb. Technol. 6:217-223.
- Maeseneire, S., Groeve, M., Dauvrin, T., Mey, M., Soetaert, W. and Vandamme, E. 2006. Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the *Myrothecium gramineum* orotidine-5'-monophosphat decarboxylase. FEMS Microbiol. Lett. 261:262-271.
- Martin, K. J. and Rygiewicz, P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol. 5:1-11.

- Melville, T. H. and Russell, C. 1981. Microbiology for dental students. Willium Heinemann Medical Book. p. 323-338.
- Minakova, A. L. and Preobrazhenskaia, M. E. 1977. Characterization of dextranase from *Penicillium purpurogenum* (Ftoll). Biochimiiia. 42:1610-1620.
- Mizuno, M., Tonozuka, T., Suzuki, S., Uotsu-Tomita, R., Kamitori, K., Nishikawa, A. and Sakano, Y. 2004. Structural insights into substrate specificity and function of glucodextranase. Biol. Chem. 279:10575-10583.
- Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Matsui, H., Kimura, A. and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:1582-1588.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Simeon, R. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11:675-685.
- Monsan, P. and Paul, F. 1991. Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides and polysaccharides. In Food Enzymology P. E. Fox, Ed. Elsevier Applied Science. p. 77-79.
- Oguma, T., Kurokawa, T., Tobe, K., Kitao, S. and Kobayashi, M. 1999. Cloning and sequence analysis of the gene for glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044 and expression in *Escherichia coli* cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:2174-2182.
- Ohnishi, Y., Kubo, S., Ono, Y., Nozaki, M., Gonda, Y., Okano, H., Matsuya, T., Matsushiro, A. and Morita, T. 1995. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. Gene. 156:93-96.
- Okami, Y., Kurasawa, S. and Hirose, Y. 1980. A new glucanase produced by a marine *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 44:1191-1192.
- Okushima, M., Sugino, D., Kouno, Y., Nakano, S., Miyahara, J., Toda, H., Kubo, S. and Matsushiro, A. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Jpn. J. Genet. 66:173-187.



- Pedersen, L. H., Skouboe, P., Boysen, M., Soule, J. and Rossen, L. 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. Int. J. Food Microbiol. 35:169–177.
- Petti, C. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Med. Microbiol. 44:1108-1114.
- Pleszczynska, M., Szczodrak, J., Rogalski, J. and Fiedurek, J. 1997. Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion product. Mycol. Res. 101:69-72.
- Preobrazhenskaia, M. E., Minakova, A. L. and Rosenfeld, E. L. 1974. Dextranase activity of pig spleen acid alpha-D-glucosidase. Carbohydr. Res. 38:267-277.
- Rauh, J. S., Cuddihy, J. A. and Falgout, R. N. 1999. Analyzing dextran in the sugar industry : A review of dextran in the factory and a new analytical technique. Sugar Industry Technologists INC. 21.
- Roca, H., Garcia, B., Rodriguez, E., Mateu, D., Coroas, L., Cremata, J., Garcia, R., Pons, T. and Delgado, J. 1996. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris*. Yeast. 12:1187-1200.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M., Teixeira, J. and Rodrigues, A. 2000. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biochem. Eng. J. 4:177-188.
- Sawai, T., Toriyama, K. and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. J. Biochem. 105-112.
- Schachtele, C. F., Staat, R. H. and Harlander, S. K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12:309-317.
- Serhir, B., Dugourd, D., Jacques, M., Higgins, R. and Harel, J. 1997. Cloning and characterization of a dextranase gene (*dexS*) from *Streptococcus suis*. Gene. 190: 257-261.

- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M. and Okada, G. 1998. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:117-122.
- Shukla, G. L., Madhu and Prabhu, K. A. 1989. Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microb. Technol. 11:533-536.
- Sidebotham, R. L. 1974. Dextranase. Adv. Carbohydr. Biochem. 30:371-444.
- Simonson, L. G., Liberta, A. E. and Richardson, A. 1975. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. Appl. Microbiol. 30:855-861.
- Smale, S. T. 2001. Core promoters; active contributors to combinatorial gene regulation. Genes Dev. 15:2503-2508.
- Staat, R. H., Gawronski, T. H. and Schachtele, C. F. 1973. Detection and preliminary studies on dextranase producing microorganism from human dental plaque. Infect. Immun. 8:1009-1016.
- Staat, R. H. and Schachtele, C. F. 1974. Dextranase from oral bacteria. Infect. Immun. 12:309-317.
- Stenstrom, E. and Ihrmark, K. 2005. Identification of *Lophodermium seditiosum* and *L. pinastri* in Swedish forest nurseries using species-specific PCR primers from the ribosomal ITS region. For. Path. 35:163-172.
- Sugiura, M., Ito, A., Ogiso, T., Kato, K. and Asano, H. 1973. Studies on dextranase: Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. Biochim. Biophys. Acta. 309:357-362.
- Sugiura, M., Ito, A. and Yamaguchi, T. 1974. Studies on dextranase. II. New exo-dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum*. Biochim. Biophys. Acta. 350:61-70.
- Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan, Z. and S., Z. 1988. A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase. Am. N. Y. Acad. Sci. 542:192-194.
- Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranase from *Bacteroides oralis* Ig4a. Microbiol. Immunol. 26:375-386.
- Tilbury, R. H. and French, S. M. 1974. Further studies on enzymatic hydrolysis of dextran in mill juices by dextranase and fungal alpha-amylase. Proc.15<sup>th</sup> ISSCT.

- Tsuchiya, H. M., Jeanes, A., Briker, C. A. and Wilham, C. A. 1952. Dextran degrading enzyme from mold. J. Bacteriol. 52:513-519.
- Tsuru, D., Hiraoka, N., Hirose, T. and Fukumoto, J. 1971. Studies on mold dextranases. Part II. Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. Agric. Biol. Chem. 35:1727-1732.
- Walker, G. J. 1978. Dextrans. Int. Rev. Biochem. 16:5-126.
- Walker, G. J. and Dewar, M. D. 1975. The action pattern of *Penicillium lilacinum* dextranase. Carbohydr. Res. 39:303-315.
- Walker, G. J. and Pulkownik, A. 1973. Degradation of dextran by an alpha-1,6 glucan glucohydrolase from *Streptococcus mitis*. Carbohydr. Res. 29:1-14.
- Watson, P. R. and Woff, A. 1955. Manufacture and refining of raw cane sugar. J. Am. Chem. Soc. 77:196.
- Wynter, C. 1996. Screening method for dextranases and amylo-dextranases from anaerobic thermophiles. J. Gen. Appl. Microbiol. 42:213-223.
- Webb, E. and Spencer-Martins, I. 1983. Extracellular endo-dextranase from the yeast *Lipomyces stakeyi*. Can. J. Microbiol. 29:1092-1095.
- Wheatley, M. A. and Moo-Young, M. 1977. Degradation of polysaccharides by endo- and exoenzymes: dextran-dextranase model systems. Biotechnol. Bioeng. 19: 219-223.
- Wolinsky, L. E. 1988. Carriers and cariology. Oral Microbiol. Immunol. 3:389-409.
- Wynter, C. V. A., Chang, M., De Jersey, J., Patel, B. K., Inkerman, P. A. and Hamilton, S. 1997. Isolation and characterization of a thermostable of dextranase. Enzyme Microb. Technol. 20:242-247.
- Yamaguchi, T. and Gocho, S. 1973. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated *Brevibacterium* sp. Agric. Biol. Chem. 37:2527-2533.
- Yamamoto, K., Yoshikawa, K., Kitahata, S. and Okada, S. 1992. Purification and properties of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus*. J. Biochem. 56: 169-173.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. 1968. Cell-bound exo-dextranase of *Bacillus* sp. Carbohydr. Res. 6: 310-318.

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract

สารสกัดจากมอลท์ (malt extract)	20	กรัม
เปปโตเน (peptone)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>C เป็นเวลา 20 นาที



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. กาลีเซอรอล 80%

นำกาลีเซอรอล 87% ปริมาตร 92 มิลลิลิตร ผสมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบ

#### 2. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/น้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ได้นาน 1 เดือน

#### 3. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

Rnase A

Collection tube

Qiaprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

#### 4. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Qiaquick column

Buffer EB

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE โดยสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

#### 5. สารละลาย 10% SDS

ซึ่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล.

#### 6. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

Trismabase ( $C_4H_{11}NO_3$ )	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 7. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ )	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 20 นาที

## 8. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ น้ำหนัก 2.9 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 50 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 20 นาที

## 9. สารละลาย Extraction buffer

Tris-HCl , pH 8.0	200	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	250	มิลลิโมลาร์
EDTA, pH 8.0	25	มิลลิโมลาร์
SDS	5	%

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 20 มล., สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มล., สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 5 มล. และสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 5 มล. ให้เข้ากัน เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 45 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 20 นาที

## 10. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 11. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 12. สารละลายฟินอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟินอลที่อิมิตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน ฟินอล:คลอโรฟอร์ม 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ

## 13. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

## 14. Loading dye

Bromphenolblue	0.025	%
ซูโครส	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ

## 15. สารละลายไซเตียมอะซีเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่าง 5.2

ละลายไซเตียมอะซีเตต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ต่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 16. สารละลาย RNase A เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายไซเตียมคลอไรด์	15	มิลลิโมลาร์
RNase A	0.2	กรัม

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่าง 8.0 ปริมาตร 0.1 มล. และสารละลายไซเตียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.15 มล. ให้เข้ากัน จากนั้นเติมผง RNase A 0.2 กรัม ผสมให้เข้ากันโดยปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครพิพิจ์หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร



### 17. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ปริมาตรเป็น 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$  ในหลอดปิดสนิทและพันหลอดด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายสัมผัสกับแสง

### 18. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ปริมาตรเป็น 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$

### 19. สารละลายผสม dNTP ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP, dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$

### 20. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ น้ำหนัก 55.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิต่ำ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที

### 21. ชุด BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.)

ประกอบด้วย

เรสทริกชันเอนไซม์

*DraI* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*EcoRI* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*PvuII* (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

*Stu*I (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)

เรสทริกชันเอนไซม์ บัฟเฟอร์

10X *Dra*I Restriction Buffer

10X *Eco*RI Restriction Buffer

10X *Pvu*II Restriction Buffer

10X *Stu*I Restriction Buffer

Control Human Genomic DNA (0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

T4 DNA Ligase (6 หน่วยต่อไมโครลิตร)

10X Ligation Buffer

BD GenomeWalker Adaptor (25 ไมโครโมลาร์)

Outer Adaptor Primer 1 (AP1;10 ไมโครโมลาร์)

Nested Adaptor Primer 2 (AP21;10 ไมโครโมลาร์)

BD GenomeWalker Human Positive Control Library

Positive Control tPA Primer (PCP1;10ไมโครโมลาร์)

Positive Control tPA Nested Primer (PCP2;10ไมโครโมลาร์)

## 22. ชุด QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Germany.)

ประกอบด้วย

Ligation Master Mix, 2X

pDrive Cloning Vector (0.5 ไมโครกรัม)

Distilled water

## 23. ชุด GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA.)

ประกอบด้วย

pJET1/blunt Cloning Vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

2X Reaction Buffer

T4 DNA Ligase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)

DNA Blunting Enzyme

pJET1 Forward Sequencing Primer (10 ไมโครโมลาร์)

pJET1 Reverse Sequencing Primer (10 ไมโครโมลาร์)

Control PCR Product (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

Water, Nuclease free

#### 24. สารละลายฟีนอลอิมิตัว (Equilibrated phenol, ultrapure) (USB, USA.)

ประกอบด้วย

ฟีนอลอิมิตัวด้วย Tris-HCl

Equilibrate Buffer

ก่อนใช้สารละลายฟีนอลอิมิตัวครั้งแรก ให้เติม Equilibrate Buffer ลงในสารละลายฟีนอลอิมิตัว เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>C

#### 25. Depurination solution

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 17 มล. ผสมน้ำปลอดประจุปริมาตร 983 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>C เป็นเวลา 20 นาที

#### 26. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5	โมลาร์
-------------------	-----	--------

โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์
----------------	-----	--------

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 27. Neutralization buffer

Trismabase	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 28. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์
โซเดียมอะซิเตต(CH <sub>3</sub> COONa)	0.3	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 29. สารละลาย 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

### 30. สารละลาย 0.5XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

### 31. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

- |                |   |
|----------------|---|
| หลอดหมายเลข 1. | DIG-High Prime, 5X conc.  |
| หลอดหมายเลข 2. | DIG-labeled control DNA 5 µg/ml   |
| หลอดหมายเลข 3. | DNA dilution buffer   |
| หลอดหมายเลข 4. | Anti-Digoxigenin-AP Conjugate 750 U/ml  |
| หลอดหมายเลข 5. | NBT/BCIP, 50X conc.   |
| ขวดหมายเลข 6.  | Blocking solution, 10X  |
| ขวดหมายเลข 7.  | DIG Easy HYb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37 <sup>o</sup> C) |

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

Washing buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์
Tween 20	0.3	%

ผสมกรดมาเลอิกและโซเดียมคลอไรด์เข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 700 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 900 มล.



จากนั้นเตรียมสารละลาย Tween 20 ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 100 มล. แล้วนำสารละลายที่เตรียมทั้งหมดไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที ก่อนใช้ค่อยเติมสารละลาย Tween 20 ที่เตรียมแยกลงไป

#### Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic buffer ที่หนึ่งชั่วโมงแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

#### Detection buffer

Trismabase	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที

### 32. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

ผสมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 2 มล. ในน้ำ  
ปลอดประจุปริมาตร 3 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>C  
เป็นเวลา 20 นาที



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Dex1F

dexA GCGGACTTCTGTACCTGGTGGCATGATTCAGGGGAGATCAACACGCAGACACCTGTCCAA  
 Dex2 ACCGATTTCTGTACCTGGTGGCATGATTCAGGGGAGATCAACAAGCAGACACCTGTCCAA  
 pUDEX GCCGATTTCTGTACCTGGTGGCATGATTCAGGGGAGATCAATACGCAGACACCTGTCCAA  
 \*\*\*\*\*

dexA CCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGCAAGTGAGTCTAGCTGGTACAAAC  
 Dex2 CCAGGGAACGTGCGTCAATCTCATAAGTATTCCGTGCAAGTGAGTCTGGCAGGTGCAAAC  
 pUDEX CCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGCAAGTGAGCTAGCTGGTACAAAC  
 \*\*\*\*\*

dexA AACTTTCATGACTCCTTTGTATATGAATCGATCCCCGGAACGAAATGGTGCATCTAT  
 Dex2 AATTTTTATGACTCCTTTGTGTATGAATCTATCCCCGGAATGGAATGGCCGCATCCAT  
 pUDEX AATTTTCATGACTCCTTTGTATATGAATCGATCCCCGGAACGAAATGGTGCATCTAT  
 \*\* \*\*\* \*\*\*\*\*

dexA GCTCCCACCGATCCATCCAACAGCAACACATTAGATTCAAGCGTGGATGATGGAATCTCG  
 Dex2 GCCCCACGACCCTCCCAACAGCAACACGCTAGATTCAAGCATTGATGATGGAATCTCA  
 pUDEX GCTCCCACCGATCCACCCAACAGCAACACACTAGATTCAAGTGTGGATGATGGAATCTCG  
 \*\* \*\*\*\*\*

dexA ATTGAGCCTAGTATCGGCCTCAATATGGCATGGTCCCAATTCGAGTACAGCCAGGATGTC  
 Dex2 ATTGAGCCTAGTATTGGTCTCAATATGGCATGGTCCCAAGTTCGAATACGACCAGGATGTG  
 pUDEX ATTGAGCCTAGTATCGGCCTTAATATGGCATGGTCCCAATTCGAGTACAGCCACGATGTA  
 \*\*\*\*\*

dexA GATATAAAGATCCTGGCAACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCACCAAGTGATGTTGTTATT  
 Dex2 GATATAAAGATCCTTGACACTGAGGGGTCTCTTTGGGCTCTCCAAGTGACGTTGTAATT  
 pUDEX GATGTAAGATCCTGGCCACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCGCCAAGTGATGTTGTTATT  
 \*\*\* \*\*\*\*\*

dexA CGCCCCGTCTCAATCTCCTATGCGATTTCTCAGTCCAACGATGGCGGGATTGTCATCCGG  
 Dex2 CGTCCCCTCTCAATCTCCTATCATATTTCTCAGTCCAGCGACGGTGGGATTGTCATCCGG  
 pUDEX CGCCCCGTCTCAATCTCCTATGCGATTTCTCAGTCTGACGATGGTGGGATTGTCATCCGG  
 \*\* \*\*\*\*\*

dexA GTCCCAGCCGATGCGAACGCGCCGAAATTTTCAGTCAATTCAAAATGACCTGTACACT  
 Dex2 GTCCCAGCCGATGCGAATGCGCCGAAATTTTCAGTAGAGTTCAAGAATGACCTGTACACA  
 pUDEX GTCCCAGCCGATGCGAACGCGCCGAAATTTTCAGTTGAGTTCAAACGACCTGTACACA  
 \*\*\*\*\*

dexA TTCCTCTCTGATGGCAACGAGTACGTACATCGGGAGGTAGCGTCGTCGGCGTTGAGCCT  
 Dex2 TTTCGCTCTGATGGCAACGAGTACGTACATCAGGAGGCAGCGTCGTCGGCGTTGAGCCC  
 pUDEX TTCCTCTCTGATGGCAACGAGTACGTACATCGGGAGGCAGCGTCGTCGGCGTTGAGCCT  
 \*\* \* \*\*\*\*\*

dexA ACCAACGCCTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCTTCTGGCATGATTCCTCATATG  
 Dex2 ACCAACGCCTTGTGATCTTTGCTAGCCCGTTTCTTCCATCAGGCATGATTCCTCATATG  
 pUDEX ACCAACGCCTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCTTCTGGCATGATTCCTCATATG  
 \*\*\*\*\*

dexA AAACCCCAACACGCAGACCATGACGCCAGGTCCTATCAATAACGGCGACTGGGGCGCC  
 Dex2 ACACCCGACAACACGCAGACCATGACGCCAGGCCCTATCAATAATGGCGACTGGGGCTCT  
 pUDEX ACACCCGACAACACGCAGACCATGACGCCAGGTCCTATCAATAACGGCGACTGGGGCGCC  
 \* \*\*\*\*\*

Dex2F

dexA AAGTCAATTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAAC  
 Dex2 AAGTCAACTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGGAAC  
 pUDEX AAGTCAATTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAAC  
 \*\*\*\*\*

dexA TCGGGTAAATTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTGGGTCTACCTT  
 Dex2 TCGGGGAAACTAGGATCCAATCATATGCGTCTAGACTCAAACACTTACTGGGTTTACTTC  
 pUDEX TCGGGGAAGTTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTGGGTCTACCTT  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

dexA GCCCCCGGTGCGTACGTGAAGGGTGCATAGAGTATTTACCAAGCAAACTTCTATGCA  
 Dex2 GCCCGGTGCGCGTATGTGAAGGGTGCATGGAATATTTACCAAACACAACCTTCTATGCA  
 pUDEX GCCCCCGGTGCGTACGTGAAGGGTGCATAGAGTATTTACCAAGCAGAACCTTCTATGCA  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA ACTGGTCATGGTGTCCATCAGGTGAAAACCTATGTTTACCAAGCCAATGCTGGCGACAAC  
 Dex2 ACCGGCCATGGTGTCCATCGGGTGAAAACCTATGTTTACCAAGCAAATGCTGGCGACAAC  
 pUDEX ACTGGTCATGGTATCCATCGGGTGAAAACCTATGTTTACCAAGCCAATGCCGGCGACAAC  
 \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA TATGTTGCAGTCAAGAGCGATTTCGACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGG  
 Dex2 TACGTTGCTGTAAAGAGCGACTCGGCTGGCCTGCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGG  
 pUDEX TACATTGCAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGG  
 \*\* \*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA GGTGGTCAAACATGGTACTGCGTTGGCCCGACGATCAATGCGCCACCATTCAACACTATG  
 Dex2 GGTGGTCAAATATGGTATGTGTTGGCT--AC-ATCAATGCGCCGCCATTCAACACTATG  
 pUDEX GGTGGTCAAACATGGTACTGCGTTGGCCCGACGATCAATGCGCCACCATTCAATACTATG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**Dex1R**

dexA GATTTCAATGAAATTTCTGGCATCTCAAGTCAAATTAGCGACTATAAGCAGGTGGGAGCC  
 Dex2 GATTTCAATGAAATTTCTGGCATCTCAAGTCAAATTAGCGATTATAAGCAGGTGGGGGCC  
 pUDEX GATTTCAATGAAATTTCTGGCATCTCAAGTCAAATTAGCGACTATAAGCAGGTGGGAGCC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA TTCTTCTTCCAGACGGATGGACCAGAAATCTATCCCAATAGTGTGCGTGCACGACGTCTTC  
 Dex2 TTCTTCTTCCAGACGGATGGACCAGAGATTTATCCCAATAGTGTGGTGCACGACGTCTTC  
 pUDEX TTCTTCTTCCAGACGGATGGACCAGAAATATATCCCAATAGTGTGCGTGCACGACGTCTTC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA TGGCAGTCAATGATGATGCAATCAAATCTACTATTCGGGAGCATCTGTATCGGGGCA  
 Dex2 TGGCATGTCAATGATGATGCAATCAAACCTACTATTCGGGGCATCTATCTCGGGGTA  
 pUDEX TGGCAGTCAATGATGATGCAATCAAATCTACTATTCGGGAGCATCTGTATCGGGGCA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*

dexA ACGATCTGAAATGTCACAATGACCCAATCATCCAGATGGGATGGACATCTCGGGATATC  
 Dex2 ACGATCCGGAAATGCCATAACGATCCAATATCCAGATGGGATGGACGTCTCGGTCTATC  
 pUDEX ACGATCTGAAATGTCACAATGACCCAATCATCCAGATGGGATGGACGTCTCGGGATATC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**Dex2R**

dexA AGTGGAGTGACAATCGACACATTAATGTTATTACACCCGCTACATCAAATCGGAGACG  
 Dex2 AGTGGAGTGACAATCGACAAGCTGAATGTTATCCACACCCGCTACATTAAGTCAGAAACG  
 pUDEX AGTGGAGTGACAATCGACACATTAATGTTATTACACCCGCTACATCAAATCGGAGACG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

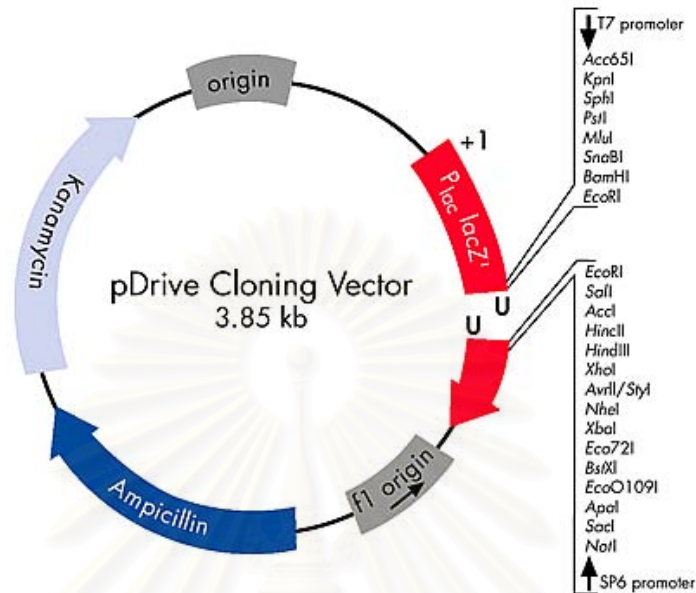
dexA GTGGTGCCTTCGGCTATCATTTGGGGCCTCTCCATTCTATGCAAGTGGGATGAGTCCCGAT  
 Dex2 GTGGTGCCTTCGGCTATCATTTGGTGCCTCTCCATTTTATGCAAGTGGAAATGAGTCCCTGAT  
 pUDEX GTGGTGCCTTCGGCTATCATTTGGGGCCTCTCCATTCTATGCAAGTGGGATGAGTCCCTGAT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

dexA TCAAGCAAGTCCATATCCATGACGGTTTCAAACGTTGTTGCGAGGGTCTTTGCCCGTCC  
 Dex2 CCAAGCCAGTCCATATCCATGACGATTTGAAACGTTGTTGCGAGGGTCTT---CCGTCC  
 pUDEX TCAAGAAAGTCCATATCCATGACGGTTTCAAACGTTGTTGCGAGGGTCTTTGCCCGTCC  
 \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*





2. แผนที่แสดงลักษณะของเวกเตอร์ pDrive Cloning Vector (Qiagen, Germany)



3. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน pPT-1 กับยีนเอนโดเดกซ์ แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)

>[gb|L41562.1|PECDEX](#) *Penicillium minioluteum* (clone pUDEX) dextranase (*Dex*) gene, complete cds

Length=3629, Score = 597 bits (301), Expect = 1e-167

Identities = 307/309 (99%), Gaps = 0/309 (0%)

Query	1	TTCCACCCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGA	60
Sbjct	1931	TTCCACCCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGA	1990
Query	61	TCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTGGGTCTACCTTGCCCCGGTGCGTAC	120
Sbjct	1991	TCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTGGGTCTACCTTGCCCCGGTGCGTAC	2050
Query	121	GTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAACTTCTATGCAACTGGTCATGGTATC	180
Sbjct	2051	GTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAACTTCTATGCAACTGGTCATGGTATC	2110
Query	181	CTATCGGGTGAAAACATATGTTTACCAAGCCAATGCCGGCGACAACATATGTTGAGTCAAG	240
Sbjct	2111	CTATCGGGTGAAAACATATGTTTACCAAGCCAATGCCGGCGACAACATACATTGAGTCAAG	2170
Query	241	AGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGGGGTGGTCAAACATGG	300
Sbjct	2171	AGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGGGGTGGTCAAACATGG	2230

```

Query 301 TACTGCGTT 309
          |||||
Sbjct 2231 TACTGCGTT 2239

```

#### 4. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน pPT-1 กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AJ272066)

>[emb|AJ272066.1|PFU272066](#) *Penicillium funiculosum* dexA gene for dextranase

Length=2225, Score = 549 bits (277), Expect = 2e-153

Identities = 301/309 (97%), Gaps = 0/309 (0%)

```

Query 1 TTCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGA 60
          |||||
Sbjct 808 TTCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGTAAATTAGGA 867

Query 61 TCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACCTTACTGGGTCTACCTTGCCCCGGTGCGTAC 120
          |||||
Sbjct 868 TCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACCTTACTGGGTCTACCTTGCCCCGGTGCGTAC 927

Query 121 GTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAATTCTATGCAACTGGTCATGGTATC 180
          |||||
Sbjct 928 GTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAAAATTCTATGCAACTGGTCATGGTATC 987

Query 181 CTATCGGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGCCGGCGACAACCTATGTTGCAGTCAAG 240
          |||||
Sbjct 988 CTATCAGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGCTGGCGACAACCTATGTTGCAGTCAAG 1047

Query 241 AGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGGGTGGTCAAACATGG 300
          |||||
Sbjct 1048 AGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAATAACCTTGGGGTGGTCAAACATGG 1107

Query 301 TACTGCGTT 309
          |||||
Sbjct 1108 TACTGCGTT 1116

```

#### 5. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน pPT-1 กับยีนเดกซ์แทรนเนสไอโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF020619)

>[gb|AF020619.1|AF020619](#) *Penicillium minioluteum* dextranase isoform (Dex2) gene, complete cds

Length=1815, Score = 313 bits (158), Expect = 2e-82

Identities = 266/302 (88%), Gaps = 0/302 (0%)

```

Query 1 TTCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGA 60
          |||||
Sbjct 802 TTCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAACTAGGA 861

Query 61 TCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACCTTACTGGGTCTACCTTGCCCCGGTGCGTAC 120
          |||||
Sbjct 862 TCCAATCATATGCGTCTAGACTCAAACCTTACTGGGTTTACTTCGCCCGGTGCGCGTAT 921

```



```

Query 483  CGTTGAGCCTACCAACGCACTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCCTTCTGGCATGAT 542
          |||
Sbjct 1786  CGTTGAGCCTACCAACGCACTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCCTTCTGGCATGAT 1845

Query 543  TCCTCATATGACACCCGACAACACGCAGACCATGACGCCAGGTCCTATCAATAACGGCGA 602
          |||
Sbjct 1846  TCCTCATATGACACCCGACAACACGCAGACCATGACGCCAGGTCCTATCAATAACGGCGA 1905

Query 603  CTGGGGCGCCAAGTCAATTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCA 662
          |||
Sbjct 1906  CTGGGGCGCCAAGTCAATTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCA 1965

Query 663  ATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTG 722
          |||
Sbjct 1966  ATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTG 2025

Query 723  GGTCTACCTTGCCCCGGTGCCTACGTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAA 782
          |||
Sbjct 2026  GGTCTACCTTGCCCCGGTGCCTACGTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAA 2085

Query 783  CTTCTATGCAACTGGTCATGGTATCCTATCGGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGC 842
          |||
Sbjct 2086  CTTCTATGCAACTGGTCATGGTATCCTATCGGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGC 2145

Query 843  CGGCGACAACATGTTGCAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAA 902
          |||
Sbjct 2146  CGGCGACAACATGTTGCAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAA 2205

Query 903  TAACCTTGGGGGTGGTCA 920
          |||
Sbjct 2206  TAACCTTGGGGGTGGTCA 2223

```

7. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AJ272066)

>[emb|AJ272066.1|PFU272066](#) *Penicillium funiculosum* dexA gene for dextranase

Length=2225, Score = 1566 bits (790), Expect = 0.0

Identities = 887/918 (96%), Gaps = 1/918 (0%)

```

Query 4  ACCTGTCCA-CCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCGGTGCAAGTGAGCCTAGC 62
          |||
Sbjct 183  ACCTGTCCAACCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCGGTGCAAGTGAGTCTAGC 242

Query 63  TGGTACAAACAATTTTCATGACTCCTTTGTATATGAATCGATCCCCGGAACGGAAATGG 122
          |||
Sbjct 243  TGGTACAAACAATTTTCATGACTCCTTTGTATATGAATCGATCCCCGGAACGGAAATGG 302

Query 123  TCGCATCTATGCTCCCACCGATCCACCAACAGCAACACACTAGATTCAAGTGTGGATGA 182
          |||
Sbjct 303  TCGCATCTATGCTCCCACCGATCCATCCAACAGCAACACATTAGATTCAAGCGTGGATGA 362

Query 183  TGGAATCTCGATTGAGCCTAGTATCGGCCCTTAATATGGCATGGTCCCAATTCGAGTACAG 242
          |||
Sbjct 363  TGGAATCTCGATTGAGCCTAGTATCGGCCCTAATATGGCATGGTCCCAATTCGAGTACAG 422

Query 243  CCACGATGTAGATGTAAAGATCCTGGCCACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCGCCAAGTGA 302
          |||
Sbjct 423  CCAGGATGTCGATATAAAGATCCTGGCAACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCACCAAGTGA 482

```

```

Query 303  TGTGTATTATCGCCCCGTCTCAATCTCCTATGCGATTTCTCAGTCTGACGATGGTGGGAT 362
          |||
Sbjct 483  TGTGTATTATCGCCCCGTCTCAATCTCCTATGCGATTTCTCAGTCCAACGATGGCGGGAT 542

Query 363  TGTCATCCGGGTCCCAGCCGATGCGAACGGCCGCAAATTTTCAGTTGAGTTCAAAACTGA 422
          |||
Sbjct 543  TGTCATCCGGGTCCCAGCCGATGCGAACGGCCGCAAATTTTCAGTCGAATTCAAAATGA 602

Query 423  CCTGTACACATTCTCTCTGATGGCAATGAGTACGTACATCGGGAGGCAGCGTCGTCGG 482
          |||
Sbjct 603  CCTGTACACTTTCTCTCTGATGGCAACGAGTACGTACATCGGGAGGTAGCGTCGTCGG 662

Query 483  CGTTGAGCCTACCAACGCACTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCTTCTGGCATGAT 542
          |||
Sbjct 663  CGTTGAGCCTACCAACGCACTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCTTCTGGCATGAT 722

Query 543  TCCTCATATGACACCCGACAACACGACAGCCATGACGCCAGGTCTATCAATAACGGCGA 602
          |||
Sbjct 723  TCCTCATATGAAACCCACAACACGACAGCCATGACGCCAGGTCTATCAATAACGGCGA 782

Query 603  CTGGGGCCCAAGTCAATTTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCA 662
          |||
Sbjct 783  CTGGGGCCCAAGTCAATTTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCA 842

Query 663  ATCGGGCAACTCGGGGAAGTTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTG 722
          |||
Sbjct 843  ATCGGGCAACTCGGGTAAATTAGGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTG 902

Query 723  GGTCTACCTTGCCCCCGGTGCGTACGTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAA 782
          |||
Sbjct 903  GGTCTACCTTGCCCCCGGTGCGTACGTGAAGGGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAAAA 962

Query 783  CTTCTATGCAACTGGTCATGGTATCCTATCGGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGC 842
          |||
Sbjct 963  CTTCTATGCAACTGGTCATGGTATCCTATCAGGTGAAAATATGTTTACCAAGCCAATGC 1022

Query 843  CGGCGACAACATATGTTGAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAA 902
          |||
Sbjct 1023  TGGCGACAACATATGTTGAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATGTGGTGGCACAA 1082

Query 903  TAACCTTGGGGGTGGTCA 920
          |||
Sbjct 1083  TAACCTTGGGGGTGGTCA 1100

```

8. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์ Dex1F กับ Dex1R กับยีนเดกซ์แทรนเนสไอโซฟอรมของ *Penicillium minioluteum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF020619)

>gb|AF020619.1|AF020619 *Penicillium minioluteum* dextranase isoform (Dex2) gene, complete cds

Length=1815, Score = 1003 bits (506), Expect = 0.0

Identities = 816/918 (88%), Gaps = 1/918 (0%)

```

Query 4  ACCTGTCCA-CCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGCAAGTGAGCCTAGC 62
          |||
Sbjct 177  ACCTGTCCAACCAGGGAACGTGCGTCAATCTCATAAGTATTCCGTGCAAGTGAGTCTGGC 236

```





9. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอ PT-4 จากการใช้ไพโรเมอร์ SP6 กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)

>gi|940289|gb|L41562.1|PECDEX *Penicillium minioluteum* (clone pUDEX) dextranase (Dex)

gene, complete cds

Length=3629, Score = 573 bits (289), Expect = 4e-160

Identities = 450/489 (92%), Gaps = 16/489 (3%)

```

Query 343  GGCATAGTAATCCGCACAGCCGAGTATGATGGAGCTTCTTCGGATAATGATAGCGCCACC 402
          |||
Sbjct 1     GGCATAGTAATCCGCACAGCCGAGTATGATGGAGCTTCTTCGGATAATGATAGCGCCACC 60

Query 403  AGACCTTGCTTGAGCTGGAGAGCTAAA-CATTAAACGCCACACGACCAACTCTCATTA 461
          |||
Sbjct 61  AGACCTTGCTTGAGCTGGAGAGCTAAAACATTAAACGCCACACGACCAACTCTCATTA 120

Query 462  GTTGCATAGATGATGCTCGGAGCTGTTGAAACTCAGAAATTCCTTCTATGCGGGGTCTC 521
          |||
Sbjct 121 GTTGCATAGATGATGCTCGGAGCTGTTGAAACTCAGAAATTCCTTCTATGCGGGGTCTC 180

Query 522  CAAGATCGATCCTGGGGGATGTGAATCACCTACGGCGGACCTAATGACGCCTTGACAGG 581
          |||
Sbjct 181  CAAGATCGATCCTGGGGGATGTGAATA--CTACGGTGGACCTAATGACGCCTTGACAGG 238

Query 582  TGATGTTAAGCGAACCAAGGAAGAAACAATCTGGGGCTAGATGAAGAAGTTGAGCTGTTA 641
          |||
Sbjct 239  TGATGTTAAGCGAACCAAGGAAGAAT-AATCTGGGGCTAGATGAAGATGTTGAGCTGTAA 297

Query 642  AGTACGGT-CGTTCTATTGGCTTTTTCGGCGCTTCTCCGGGGTTACTCAGTCTTTCCGG 700
          |||
Sbjct 298  GGTACGGTACGTTCTATTGGCTTTATCGGAGCTTCTCCGGG-TTACTCAGTCTTTCCGG 356

Query 701  GAGCATGATCATT-TGTAGTGCSCCAA--TTAGCAGAA-CTGAGAGCCCCA--AACTC 754
          |||
Sbjct 357  GAGCATGATCATTTTTGTATTGTCCAATAGTAAGCAGAACTGAGAGCCACCACAAACTC 416

Query 755  AAA-CCTCGGTA-CGAATTT--CCGGAACCAGTCAGGATTTCAAAAAACTGTGCTCGTGT 810
          |||
Sbjct 417  AAAACCTCGGTAGCGAAGTTTCCCGAACCCAGTCAGGATTTCTCAGAAACTGTGCTCGTGT 476

Query 811  TGGGGGAA 819
          ||
Sbjct 477  TCGGGGAA 485

```

10. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ PT-5 จากการใช้  
ไพรเมอร์ SP6 กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4  
(clone pUDEX) (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)

>gi|940289|gb|L41562.1|PECDEX *Penicillium minioluteum* (clone pUDEX) dextranase (Dex)

gene, complete cds

Length=3629, Score = 1080 bits (545), Expect = 0.0

Identities = 674/701 (96%), Gaps = 12/701 (1%)

```

Query 91      CATTTCATATAACGTACGGATCCAAGTCTGGGTGAGCACCTTTATATAATGCCGTTTAGC 150
          |||
Sbjct 3627     CATTTCATATAACTGACGGATCCAATGCTCAGTTAGCACCTTTATATAAT-CCGTTTAGC 3569

Query 151     TCGTGCAGCTCGTACG-AGATTGTTACTGCAAAAAGAATCGGTTGAATATCATCCCGGTC 209
          |||
Sbjct 3568     TCGTGCAGCTCGTACGGAGATAGTTACTGCAAAAAGAATCGGTTGAATATCATCCCGGTC 3509

Query 210     TGGCCTAGATTCGGGGGAACCCCTTGCTCCGTGGCATGAGCCTGTGGAGTAATGCCTGATT 269
          |||
Sbjct 3508     TGGCCTAGATTCGGGGGAACCCCTTGCTCCGTGGCATGAGCCTGTGGAGTAATGCCTGATT 3449

Query 270     ATTCGTCCATTGATTTTTATCTCGTCTGCAAATCTTGCAAATAACTATGTATAGCATGG 329
          |||
Sbjct 3448     ATTCGTCCATTGATTTTTATCTCGTCTGCAAATCTTGCAAATAACTATGTATAGCATGG 3389

Query 330     ACTGTAAATCATTCCAGAGCCTGCATAGCATAAAATATCTAGACTTATAAGTCGACT-GGT 388
          |||
Sbjct 3388     AATGTAAATCATTCCAGAGCCTGCATAGCATAAAATATCTAGACTTATAAGTCGACTGGGT 3329

Query 389     GTGAACTTACATGGGTAGGTGCCTACAAATGTATGCGTTAGGGTTTAGGGCTTAGCCCT 448
          |||
Sbjct 3328     GTGAACTTACATGGGTAGGTGCCTACAAATGTATGCGTTAGGGTTTAGGGCTTAGCCCT 3269

Query 449     GCCCATTTCACTGGAAGTACATAACGAGATTTTCCATCCTGACAAGACATCAACCCGAGT 508
          |||
Sbjct 3268     GCCCATTTCACTGGAAGTACACAACGAGATTTTCCATCCTGACAAGACATCAACCCGAGT 3209

Query 509     TAGGCATAATCGACAGAGTAAGGAAACCTGGAAATGTCCTTATTAAATGAATGTTGACGT 568
          |||
Sbjct 3208     TAGGCATAATCGACAGAGTAAGGAAACCTGGAAATGTCCTTATTAAATGAATGTTGACGT 3149

Query 569     TCATTGACTGGATTACCGTACACATATCGTCCACGTCTTTGAAAGGCAAAATGGGTGT 628
          |||
Sbjct 3148     TCATTGACT-GATTACCGTACACATATCGTCCACGTCTTTGAAAGGCAAGTT-GGTGT 3091

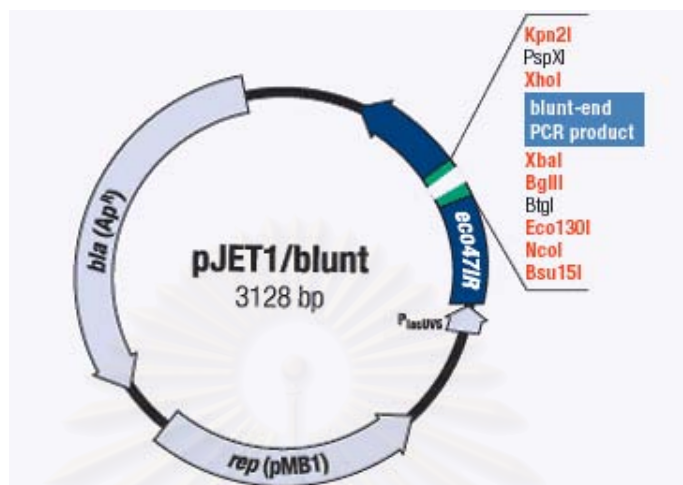
Query 629     CACAATTGGTCGAACAGGAAATAAGCTCCAAAAA-AGAGAATGAACTGAAATCGCCTTC- 686
          |||
Sbjct 3090     CACAATTGGTCGAACAGGAAATAAGCTCCAAAAAGAGAGAATGAACTGAAATCGCCTTCA 3031

Query 687     CCTGAACTAACTTATGCCTTTATC-CTCGACAA-GGTAAAGGAGCGGGTAGAAGCACTCA 744
          |||
Sbjct 3030     CATGAGCTAACTTATGCCTTTATCTCTCGACAAAGGTAAGGAGCGGGTAGAAGCACTCA 2971

Query 745     C-CCCTCCGA-AACTGGAATTC-GCTAATCTGCCACTCCCC 782
          |||
Sbjct 2970     CGCGCTCCGAGAGCTGGAATTCAGCTAATCTGCCACTCCCC 2930

```

## 11. แผนที่แสดงลักษณะของเวกเตอร์ pJET1/blunt Cloning Vector (Fermentas, USA)



## 12. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX และเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (clone pUDEX) (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank L41562 และ Garcia และคณะ, 1996)

>gi|1352244|sp|P48845|DEXT\_PENMI Dextranase precursor (Alpha-1,6-glucaan-6-gluconohydrolase)

[gi|940290|gb|AAB47720.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?gi=940290&gb|AAB47720.1) dextranase

Length=608

Score = 1258 bits (3255), Expect = 0.0

Identities = 605/608 (99%), Positives = 606/608 (99%), Gaps = 0/608 (0%)

Frame = +1

Query	937	MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPGNSHPGTHMGTTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	1116
Sbjct	1	M TMLKLLALTLAISESAIGAVMHPGNSHPGTHMGTTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	60
Query	1117	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNSNTLDSSVD	1296
Sbjct	61	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNSNTLDSSVD	120
Query	1297	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDVDVKILATDGSSLGSPSDVIRPVVISYAISQSDDGG	1476
Sbjct	121	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDVDVKILATDGSSLGSPSDVIRPVVISYAISQSDDGG	180

Query	1477	IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFLPSGM	1656
Sbjct	181	IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFLPSGM	240
Query	1657	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY	1836
Sbjct	241	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY	300
Query	1837	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH	2016
Sbjct	301	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNY+AVKSDSTSLRMWWH	360
Query	2017	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFQFDGPEIYPNSV	2196
Sbjct	361	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFQFDGPEIYPNSV	420
Query	2197	HDVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	2376
Sbjct	421	HDVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	480
Query	2377	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPSRKSISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	2556
Sbjct	481	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPSRKSISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	540
Query	2557	NVAFPDGLQTNSIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDVS	2736
Sbjct	541	NVAFPDGLQTNSIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNID S	600
Query	2737	YWGEWQIS 2760	
Sbjct	601	YWGEWQIS 608	

### 13. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX และเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium funiculosum* (หมายเลขเข้าถึงของ embl AJ272066)

>gi|7801167|emb|CAB91097.1| dextranase [*Penicillium funiculosum*]

Length=616

Score = 1233 bits (3189), Expect = 0.0

Identities = 594/608 (97%), Positives = 598/608 (98%), Gaps = 0/608 (0%)

Frame = +1

Query	937	MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	1116
Sbjct	1	M TMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPG SHPGTH GTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	60
Query	1117	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNSNTLDSSVD	1296
Sbjct	61	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDP NSNTLDSSVD	120
Query	1297	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVDVILATDGSSLGSPSDVIRPVVISYAIQSDDGG	1476
Sbjct	121	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSQVDIKILATDGSSLGSPSDVIRPVVISYAIQSNDGG	180

Query	1477	IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFLPSGM	1656
Sbjct	181	IVIRVPADANGRKFSVEFK DLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFLPSGM	240
Query	1657	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY	1836
Sbjct	241	IPHMKPHNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY	300
Query	1837	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH	2016
Sbjct	301	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGVLSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH	360
Query	2017	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	2196
Sbjct	361	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	420
Query	2197	HDVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	2376
Sbjct	421	HDVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	480
Query	2377	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPDSSRKSISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	2556
Sbjct	481	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPDSSKKSISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	540
Query	2557	NVAFPDGLQTNSIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDVS	2736
Sbjct	541	NVAFPDGLQTNSIGTGESIIPAASGLTMGLNIS+WTVGGQKVTMENFQANSLGQFNID S	600
Query	2737	YWGEWQIS 2760	
Sbjct	601	YWGEWQIS 608	

#### 14. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX และเดกซ์แทรนเนสไอโซฟอร์มของ *Penicillium minioluteum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF020619)

>gi|3821901|gb|AAC69692.1| dextranase isoform [Penicillium]

Length=604

Score = 1122 bits (2902), Expect = 0.0

Identities = 545/608 (89%), Positives = 566/608 (93%), Gaps = 4/608 (0%)

Frame = +1

Query	937	MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTTNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	1116
Sbjct	1	M TMLKLLAL LAISES +GAV+HP +S T GTTN THCG DFCTWWHDSGEIN Q	58
Query	1117	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNSNTLDSSVD	1296
Sbjct	59	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAG NNF+DSFVYESIPRNGNGRI+APTDPNSNTLDSS+D	118
Query	1297	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVDVVKILATDGSSLGSPSDVVIRPVSISYAISSQDDGG	1476
Sbjct	119	DGISIEPSIGLNMAWSQFEY DVD+KIL T+GSSLGSPSDVVIRPVSISY ISQS DGG	178



Query	1477	IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFPLPSGM	1656
Sbjct	179	IVIRVPADANGRKFSVEFK DLYTF SDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFPLPSGM	238
Query	1657	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNTY	1836
Sbjct	239	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWG+KS LYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNH+RL+SNTY	298
Query	1837	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH	2016
Sbjct	299	WVYFARCAYVKGAVEYFTKHNFYATGHGVLSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSAGLRMWWH	358
Query	2017	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	2196
Sbjct	359	NNLGGGQ WYCVG INAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	417
Query	2197	HDVFWHVNDDAIKIYYSYGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	2376
Sbjct	418	HDVFWHVNDDAIKYYSGAS+SR TI KCHNDPIIQMGWTSR ISGVTID LNVIHTRYI	477
Query	2377	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPDRSRSISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	2556
Sbjct	478	KSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPD +SISMT+SNVCEGL PSLFRITPLQNYKNFVVK	536
Query	2557	NVAFPDGLQTNSIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDVS	2736
Sbjct	537	NVAFPDGLQTNSIGTGES+IPAASGLTMGL IS WTVGGQKVTM+NFQ++SLGQF+ID S	596
Query	2737	YWGEWQIS 2760	
Sbjct	597	YWGEWQIS 604	

15. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX และเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium minioluteum* สายพันธุ์ IMI068219 (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank DQ394070 และ Li และคณะ, 2006)

>gi|88702781|gb|ABD49214.1| dextranase [*Penicillium minioluteum*]

Length=606

Score = 1113 bits (2878), Expect = 0.0

Identities = 533/608 (87%), Positives = 560/608 (92%), Gaps = 2/608 (0%)

Frame = +1

Query	937	MPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPGNSHPGTHMGTTNNTHCGADFCTWWHDSGEINTQ	1116
Sbjct	1	M TMLKLLAL LAISES +GAV+HP +S GT GTTN THCG DFCTWWHDSGEIN Q	58
Query	1117	TPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNSNTLDSSVD	1296
Sbjct	59	TPVQPGNVRQSHKY+VQVSLAG NNF+DSFVYESIPRNGNGRI+APTDPNSNTLDSS+D	118



Query	1297	DGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVVKILATDGSSLGSPSDVVIRPVSISYAISSQSDGG	1476
Sbjct	119	DGISIEPSIGLNMAWSQFEY DVD+KIL TDGSSLGSPSDVVIRPVSISY ISQS DGG	178
Query	1477	IVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFPLPSGM	1656
Sbjct	179	IVIRVPA + DLYTF SDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFPLPSGM	238
Query	1657	IPHMTPDNTQTMTPGPIINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGNSHRLNSNTY	1836
Sbjct	239	IPNMTPDNTQTMTPGPIINNGDWG KSIYFPPGVYW+NQDQSGNSGKLGNSH+RL+SNTY	298
Query	1837	WVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWWH	2016
Sbjct	299	WVY APGAYVKA+EYFTK NFYATGHG+LSGENYVYQANAGDNYVAVKSDS LRMWWH	358
Query	2017	NNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	2196
Sbjct	359	NNLGGGQTWYCVGPTVNAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFFFQTDGPEIYPNSV	418
Query	2197	HDVFWHVNDDAIKIYYSYGASVSRAIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYI	2376
Sbjct	419	HDVFWHV+DDAIK YYSYGAS+SRAIWKCHNDPIIQMGWTSR ISGVTID LNV+ TRYI	478
Query	2377	KSETVVPSAIIGASPFYASGMSPDSPSRKISMTVSNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	2556
Sbjct	479	KSETVVPSAIIGASPFYASGMSPD +SISMT+SNVCEGLCPSLFRITPLQNYKNFVVK	538
Query	2557	NVAFPDGLQTNISIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDVS	2736
Sbjct	539	NVAFPDGLQ NSIGTGES+IPAASG TMGL IS WTVGGQKVTM+N +++SLGQF+ID S	598
Query	2737	YWGEWQIS 2760	
		YWGEWQIS	
Sbjct	599	YWGEWQIS 606	

16. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SMCU-DEX และเดกซ์แทรนเนสของ *Lipomyces starkeyi* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AY520537 และ Kang และคณะ, 2005)

>gi|46371989|gb|AAS90631.1| dextranase [*Lipomyces starkeyi*]

Length=608

Score = 990 bits (2560), Expect = 0.0

Identities = 464/609 (76%), Positives = 527/609 (86%), Gaps = 12/609 (1%)

Frame = +1

Query	934	LMPTMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHPGTHMGTNNTHCGADFCTWWHDSGEINT	1113
Sbjct	12	++P++ +++ + + ++ +GA + P N T CG+ CTWWHDSGEINT	60
Query	1114	MVPSITRIVLVNILLATLVLGAAVLP-----RDNRTVCGSQLCTWWHDSGEINT	1293
Sbjct	61	QTPVQPGNVRQSHKYSVQVSLAGTNNFHDSSFVYESIPRNGNGRIYAPTDPNNTLDSSV	120
		TPVQ GNVRQS KYSV VSLA N F+DSFVYESIPRNGNGRIY+PTDPNNTL+SS+	
		GTPVQAGNVRQSRKYSVHVSLADRNFYDSFVYESIPRNGNGRIYSPTDPNNTLNSSI	

Query	1294	DDGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDVDVKILATDGSSLGSPSDVVIRPVSISYAISQSDDG	1473
Sbjct	121	DDGISIEPS+G+NMAWSQFEY DVD+KI DGS L P D+VIRP S+ Y++ + G	179
Query	1474	GIVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNEYVTSGGSVVGVVEPTNALVIFASPFLPSG	1653
Sbjct	180	GI+IRVP D NGRKFSVE K+DLY++LSDG++YVTSGGSVVGVVEP NALVIFASPFLP	239
Query	1654	MIPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPPGVYWMNQDQSGNSGKLGSNHIRLNSNT	1833
Sbjct	240	M+PHMTP +TQTM PGPINNGDWG+K ILYFPPGVYWMN+D SGN GKLGSNH+RL+ NT	299
Query	1834	YWVYLAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHGILSGENYVYQANAGDNYVAVKSDSTSLRMWW	2013
Sbjct	300	YWV+LAPGAYVKGAIEYFTKQNFYATGHG+LSGENYVYQANA DNY AVKSD TSLRMWW	359
Query	2014	HNNLGGGQTWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNSGISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNSV	2193
Sbjct	360	HNNLGGGQTW+C+GPTINAPPFNTMDFNGNS ISS+ISDYKQVGA+FFQTDGPEIY +SV	419
Query	2194	VHDFVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRY	2373
Sbjct	420	VHDFVFWHVNDDAIK YYSGAS+SRATIW+CHNDPIIQMGWTSR+++G++ID L+VIHTRY	479
Query	2374	IKSETVVPSAIIIGASPFYASGMSPSDRKSISMTVSNVVCEGLCPSLFTRITPLQNYKNFVV	2553
Sbjct	480	KSETVVPSAIIIGASPFYASGM+ D +SISMT+SNVVCEGLCPSLFTRITPLQ+Y N VV	539
Query	2554	KNVAFPDGLQTNISIGTGESIIPAASGLTMGLNISNWTVGGQKVTMENFQANSLGQFNIDV	2733
Sbjct	540	KNVAFPDGLQTN IG GESIIPAASG TM L I+NWTV GQKVTM+NFQ+ SLGQF+ID	599
Query	2734	SYWGEWQIS 2760	
Sbjct	600	SYWG+W I+ SYWQWSIN 608	

17. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium sp.* สายพันธุ์ SMCU 3-14 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium pinophilum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF176660)

>gi|10179442|gb|AF176660.1|AF176660 *Penicillium pinophilum* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=579, Score = 1001 bits (505), Expect = 0.0

Identities = 505/505 (100%), Gaps = 0/505 (0%)

Query	30	CCCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCGGGGCCACCTGGTCGCCGGGG	89
Sbjct	63	TGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCGGGGCCACCTGGTCGCCGGGG	122

```

Query 90 GACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGC 149
          |||
Sbjct 123 GACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGC 182

Query 150 TGTCTGAGTACTGTGAAAATTGTCAAAC TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 209
          |||
Sbjct 183 TGTCTGAGTACTGTGAAAATTGTCAAAC TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 242

Query 210 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 269
          |||
Sbjct 243 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 302

Query 270 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 329
          |||
Sbjct 303 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 362

Query 330 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 389
          |||
Sbjct 363 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 422

Query 390 GGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAG 449
          |||
Sbjct 423 GGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAG 482

Query 450 GACCTGCGGGGTTGGTCACCACCATGTTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAG 509
          |||
Sbjct 483 GACCTGCGGGGTTGGTCACCACCATGTTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAG 542

Query 510 TTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 534
          |||
Sbjct 543 TTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 567

```

18. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium verruculosum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF510496.1)

>[gi|21239409|gb|AF510496.1](http://gi|21239409|gb|AF510496.1) *Penicillium verruculosum* 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=5519, Score = 946 bits (477), Expect = 0.0

Identities = 499/505 (98%), Gaps = 1/505 (0%)

```

Query 30 CCCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCAGGGCCACCTGGTCGCCGGGG 89
          |||
Sbjct 1776 CCCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCAGGGCCACCTGGTCGCCGGGG 1835

Query 90 GACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGC 149
          |||
Sbjct 1836 GACGT-CGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGC 1894

Query 150 TGTCTGAGTACTGTGAAAATTGTCAAAC TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 209
          |||
Sbjct 1895 TGTCTGAGTACTATGAAAATTGTCAAAC TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 1954

Query 210 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 269
          |||
Sbjct 1955 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 2014

```

```

Query 270 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 329
          |||
Sbjct 2015 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 2074

Query 330 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 389
          |||
Sbjct 2075 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 2134

Query 390 GGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAG 449
          |||
Sbjct 2135 GGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAG 2194

Query 450 GACCTGCGGGGGTGGTACCACCATGTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAG 509
          |||
Sbjct 2195 GACCTGCGGGGGTGGTACCACCATGTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAG 2254

Query 510 TTACCCGCTGAACCTAAGCATATCA 534
          |||
Sbjct 2255 TTACCCGCTGAACCTAAGCATATCA 2279

```

19. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน *Penicillium aculeatum* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF033397)

>gi|2668637|gb|AF033397.1|AF033397 *Penicillium aculeatum* strain NRRL 2129 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1137, Score = 924 bits (466), Expect = 0.0

Identities = 497/506 (98%), Gaps = 1/506 (0%)

```

Query 30 CCCTTGCTCTATACACCTGTGCTTTGGCGGGCCACCGGGCCACCTGGTCGCCGGGG 89
          |||
Sbjct 44 CCCTTGCTCTATACACCTGTGCTTTGGCGGGCCACCGGGCCACCTGGTCGCCGGGG 103

Query 90 GACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCTGATGAAGATGGGC 149
          |||
Sbjct 104 GACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCTGATGAAGATGGGC 163

Query 150 TGTCTGAGTACTGTGAAAATTGTCAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 209
          |||
Sbjct 164 TGTCTGAGTAGTATGAAAATTGTCAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC 223

Query 210 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 269
          |||
Sbjct 224 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCG 283

Query 270 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 329
          |||
Sbjct 284 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA 343

Query 330 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 389
          |||
Sbjct 344 TTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAA 403

```



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี เกิดเมื่อวันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2524 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี 2546 และเข้ารับการศึกษาคือต่อในระดับปริญญา มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย