

การโคลนการแสดงออกการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอินูลิเนสจาก

Streptomyces sp. CP01 ใน *Escherichia coli*



นางสาวสุภาภรณ์ วน้ำค้าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
Streptomyces sp. CP01 INULINASE IN *Escherichia coli*

Miss Supaporn Wanamkang



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial
Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การโคลนการแสดงออกการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะ
สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ใน
Escherichia coli

โดย

นางสาวสุภาภรณ์ วน้ำค้าง

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ์ สิริศรีธธา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุคนธ์ ต้นติไพบูลย์วุฒิ)

5672122723 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: INULINASE / STREPTOMYCES SP.CP01 / RECOMBINANT / EXPRESSION

SUPAPORN WANAMKANG: CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Streptomyces* sp. CP01 INULINASE IN *Escherichia coli*. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., 112 pp.

Due to the versatile applications of fructose and fructooligosaccharide (FOS) in food industry and medical areas, high demand in massive production of these compounds is called-for. In fructose manufacturing process, polysaccharides such as starch generally serve as the precursor for fructose production but yielding the product with low quality via chemical processes. Recently, inulinase; an enzyme responsible for hydrolysis of inulin found in several microorganisms, e.g., *Arthrobacter* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., etc. has been used to simultaneously produce fructooligosaccharides and fructose. Therefore, this project is focused on overproducing inulinase in *Streptomyces* sp. CP01 using molecular cloning as the tool. Because the sequence of the inulinase has not been established, degenerated primers were designed based on the conserved sequence of the protein followed by PCR amplification. After the contig sequencing and *in silico* alignment (BLAST, NCBI database), the PCR product showed high sequence similarity to the inulinase in *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, suggesting the putative gene is endo-inulinase. Subsequently, specific primers were thus constructed to clone the gene encoded for inulinase in *Streptomyces* sp.CP01. The sequencing data indicated that the cloned gene consisted of 2,892 nucleotides encoding for 963 amino acids. Then, the target gene was ligated into pET28a(+) vector and transformed into *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3)pLys S and BL21(DE3) to overexpress the protein by 0.1mM IPTG induction at 30°C. Characterized by SDS-PAGE and Western blot, the cloned protein has the molecular weight of 107 kDa with hydrolytic activity towards inuline but showed partial solubility in aqueous phase. The inulinase derived from Rosetta-pET28a-SA34 exhibited the highest activity to inulin and thus was deliberately selected for testing enzymatic property after purification through affinity column chromatography. After optimizing the condition for inulin digestion, the reaction condition facilitating the work of recombinant enzyme is 40 °C at pH 7 with the optimal concentration of 20 mg/ml. In addition, the kinetics of the enzyme were studied and obtained as Michaelis-Menten parameters including the Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum rate of the reaction (V_{max}) with the value of 11 mg/mL and 0.088 mg/min/ml, respectively. The result also suggested that the recombinant protein can partially hydrolyze inulin to sucrose and fructose as confirmed by Thin Layer Chromatography.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และสอนเทคนิควิธีทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลต่างๆ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี ที่กรุณาเป็นประธาน ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆที่เป็นประโยชน์อย่างมาก และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 2014 ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือ ตลอดการทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจสำคัญ และคอยสนับสนุนในด้านต่างๆ จนทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้	2
บทที่ 2 บริหารศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 อินูลิน	3
2.2 อินูลินอส.....	3
2.3 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide, FOS).....	5
2.4 ประโยชน์ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	5
2.4.1 พร็ไบโอติก (prebiotic).....	5
2.4.2 ประโยชน์ต่อผู้ป่วยเบาหวาน.....	5
2.4.3 ช่วยในการดูดซึมแคลเซียม	6
2.5 ฟรุคโทส.....	6
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
บทที่ 3 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	10

3.1	แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	10
3.1.1	<i>Streptomyces</i> sp. CP01	10
3.1.2	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	10
3.1.3	<i>E. coli</i> Rosetta-gami (DE3)pLys S.....	10
3.1.4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	10
3.2	พลาสมิด	11
3.2.1	pJET1.2/blunt cloning (Thermo scientific)	11
3.2.2	pGEM-T Easy (Promega).....	12
3.2.3	pET28a (+) (Novagen).....	13
3.3	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	14
บทที่ 4	วิธีการดำเนินการทดลอง	15
4.1	โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส	15
4.1.1	สกัดจีโนมิกส์.....	15
4.1.2	เพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	15
4.1.3	ทำบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอ.....	18
4.1.4	โคลนยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส	19
4.1.5	คัดเลือกโคลนด้วยวิธี Rapid size screening.....	20
4.1.6	สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB).....	21
4.1.7	ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์	21
4.2	ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส.....	22
4.2.1	แสดงออกและตรวจสอบโปรตีน.....	22
4.2.2	ตรวจสอบว่าโปรตีนอยู่ในรูป soluble form หรือ insoluble form.....	24

4.3	ทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	25
4.3.1	เตรียมโปรตีนอินูลิเนส	25
4.3.2	เตรียมคอลัมน์ Ni-NTA affinity chromatography สำหรับทำบริสุทธิ์โปรตีน	25
4.3.3	ทำโปรตีนอินูลิเนสให้บริสุทธิ์.....	25
4.4	วัดปริมาณโปรตีน.....	26
4.5	วัดกิจกรรมรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส.....	26
4.6	ศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส.....	26
4.6.1	ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	26
4.6.2	ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	26
4.6.3	ศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	27
4.6.4	ศึกษาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์.....	27
4.7	การศึกษาผลของอิออนของโลหะ ที่ส่งผลต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	27
4.8	การตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC).....	27
บทที่ 5	ผลการทดลอง.....	28
5.1	โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส	28
5.1.1	สกัดจีโนมิกส์ของ <i>Streptomyces</i> sp. CP01.....	28
5.1.2	เพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	30
5.1.3	โคลนยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส	31
5.1.4	สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับ การแสดงออกใน <i>E. coli</i>	51
5.2	ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส.....	75
5.3	ทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส	83
5.4	ศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์	85

5.4.1 ศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริษัท	85
5.4.2 ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริษัท	86
5.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริษัท	87
5.4.4 ศึกษาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์	88
5.5 ศึกษาผลของอ็อนของโลหะต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริษัท	89
5.6 ตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)	90
บทที่ 6 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	91
รายการอ้างอิง	95
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก ข้อมูลดิบ	100
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	105
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	106
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน	111
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	112

สารบัญตาราง

ตารางที่ 4-1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์.....	16
ตารางที่ 4-2 องค์ประกอบการเตรียม SDS-PAGE.....	22
ตารางที่ 5-1 แสดงสรุปการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลินอส 82	82
ตารางที่ 5-2 แสดงเปอร์เซ็นต์กิจกรรมเอนไซม์เมื่อแปรผันอออนของโลหะ.....	89



สารบัญรูป

รูปที่ 2-1 แสดงกระบวนการย่อยยีนของอินูลิเนส	4
รูปที่ 2-2 แสดงลักษณะทางโปรตีนของอินูลิเนส	4
รูปที่ 2-3 แสดงกระบวนการผลิตฟรุกโทส	7
รูปที่ 3-1 แสดง pJET1.2/blunt Cloning vector	11
รูปที่ 3-2 แสดง pGEM-T Easy	12
รูปที่ 3-3 แสดง pET28a(+).	13
รูปที่ 4-1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนบางส่วนของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจาก แบคทีเรีย <i>Arthrobacter</i> sp. S37 (AJ131562), <i>Thermotoga maritima</i> (AJ001073), <i>Geobacillus licheniformis</i> (BAC45010) และ <i>Bacillus</i> sp. Snu7 (AF234992)	17
รูปที่ 5-1 แสดงโคโลนีของ <i>Streptomyces</i> sp. CP01 ที่เจริญบน Basal medium ที่มี 1% อินูลิน	28
รูปที่ 5-2 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบจีโนมิกส์	29
รูปที่ 5- 3 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	30
รูปที่ 5-4 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก <i>E. coli</i> ที่ได้รับ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJETAG1 (1kb) (A) หรือ pJETAG1.5 (1.5kb) (B) ด้วย Rapid size screening	31
รูปที่ 5-5 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบพลาสมิด pJETAG1 (1kb) ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Xba</i> I	32
รูปที่ 5-6 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบพลาสมิด pJETAG1.5 (1.5kb) ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Xba</i> I	33
รูปที่ 5-7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสAG1 ที่เชื่อมกับ pJET	34
รูปที่ 5- 8 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสAG1ที่ เชื่อมกับ pJET	36

รูปที่ 5-9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสAG1.5 ที่เชื่อมกับ pJET	38
รูปที่ 5-10 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส AG1.5 ที่เชื่อมกับ pJET	40
รูปที่ 5-11 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ SA .	41
รูปที่ 5-12 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก <i>E. coli</i> ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMSA ด้วย Rapid size screening.....	42
รูปที่ 5-13 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ พลาสมิด pGEMSAด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I.....	43
รูปที่ 5-14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสที่เชื่อมกับ pGEM-T	44
รูปที่ 5-15 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนสที่เชื่อมกับ pGEM-T	49
รูปที่ 5-16 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophore เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ full length inulinase	51
รูปที่ 5-17 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I.....	52
รูปที่ 5-18 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก <i>E. coli</i> ที่ได้รับ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 (A) หรือ SA34 (B) ด้วย Rapid size screening.....	53
รูปที่ 5-19 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis แสดงการแยกพลาสมิด pET28a-SA22 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I.....	54
รูปที่ 5-20 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis แสดงตรวจสอบพลาสมิด pET28a-SA34 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I	55
รูปที่ 5-21 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 ที่เชื่อมกับ pET28a.....	56
รูปที่ 5-22 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 ที่เชื่อมกับ pET28a	59
รูปที่ 5-23 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a.....	61

รูปที่ 5-24 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a	65
รูปที่ 5-25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 และ SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a เทียบกับ <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877.....	69
รูปที่ 5-26 แสดงลำดับกรดอะมิโนจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 และ SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a เทียบกับ <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877.....	74
รูปที่ 5-27 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การแสดงออกของโปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA22 (A) และ BL21-pET28a-SA22 (B).....	76
รูปที่ 5-28 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การแสดงออกของโปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA34 (A) และ BL21-pET28a-SA34 (B).....	78
รูปที่ 5-29 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การละลายของโปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA22 (A) และ BL21-pET28a-SA22 (B).....	80
รูปที่ 5-30 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การละลายของโปรตีนจาก Rosetta- pET28a-SA34	81
รูปที่ 5-31 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การทำบริสุทธิ์โปรตีนอินูลิเนสจาก Rosetta- pET28a-34	83
รูปที่ 5-32 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis โปรตีนอินูลิเนสที่ผ่านการกำจัด imidazole ออก.....	84
รูปที่ 5-33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับอุณหภูมิต่างๆ	85
รูปที่ 5-34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับความเป็นกรดต่างๆ	86
รูปที่ 5-35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับความเข้มข้นของอินูลินต่างๆ	87
รูปที่ 5-36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์กับความเข้มข้นของอินูลินต่างๆ	88
รูปที่ 5-37 แสดงผลการตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)..	90

คำย่อ

APS = Ammonium persulfate

$^{\circ}\text{C}$ = Degree celsius

FOS = Fructooligosaccharide

μg = Microgram

μM = Micromolar

μl = Microliter

mg = Milligram

ml = Milliliter

mM = Milimolar

SDS = Sodium dodecyl sulfate

TEMED = Tetramethylethylenediamine

U = Unit of enzyme

v/v = Volumn per volumn

w/v = Weight per volumn



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟรุกโทสเป็นน้ำตาลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะผลิตน้ำตาลฟรุกโทสโดยเฉพาะ, ลูกกวาด และน้ำอัดลม แต่โดยทั่วไปกระบวนการผลิตฟรุกโทสนั้นจะเริ่มต้นจากการใช้พอลิแซ็กคาไรด์จำพวกแป้งเป็นสารตั้งต้นจึงต้องใช้เอนไซม์เพื่อย่อยให้พอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็นกลูโคส จากนั้นทำให้กลูโคสบริสุทธิ์แล้วจึงเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุกโทสด้วยไอโซเมอเรเชชัน การที่จะได้ฟรุกโทสออกมานั้นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด และผ่านหลายขั้นตอนจะได้ฟรุกโทสที่บริสุทธิ์และบางครั้งอาจมีสิ่งอื่นเจือปนอยู่ด้วยจำนวนมาก

อินูลินประกอบด้วยฟรุกโทสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 2,1 และมีกลูโคสอยู่ทางด้านปลาย การใช้อินูลินเป็นสารตั้งต้น โดยใช้อินูลินสมาย่อยอินูลินนั้นเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดขั้นตอนการผลิตและลดค่าใช้จ่ายในการผลิตฟรุกโทส ซึ่งฟรุกโทสที่ได้มีความบริสุทธิ์ 98% มากกว่าวิธีการข้างต้นที่ได้จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จำพวกแป้ง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอินูลินนอกจากฟรุกโทสแล้วยังได้ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharide, FOS) ซึ่งปัจจุบัน FOS เป็นสิ่งที่น่าความสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจาก FOS มีองค์ประกอบเป็นโมเลกุลของฟรุกโทสต่อกันเป็นสายสั้นๆ มีกลูโคสด้านปลาย มีการค้นพบว่า FOS นั้นมีประโยชน์มากมาย อาทิเช่น ช่วยป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ เนื่องจากเป็นพรีไบโอติก ช่วยให้จุลินทรีย์ในลำไส้แข็งแรงและทำงานได้ดี หรือเป็นสารให้ความหวานที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน เนื่องจากไม่ส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด และ FOS ไม่สามารถย่อยและดูดซึมไม่ได้ในร่างกาย ซึ่งจะดีกว่าการรับประทานน้ำตาลชนิดอื่น ในประเทศไทยมีคนจำนวนไม่น้อยที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งและเบาหวาน ปัจจุบันคนไทยจึงหันมาดูแลสุขภาพมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการออกกำลังกาย และดูแลสุขภาพ หรือจนกระทั่งหาอาหารเสริมมารับประทาน ดังนั้น FOS จึงเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วย รวมถึงบุคคลที่ร่างกายแข็งแรงสามารถบริโภคเพื่อสุขภาพที่ดีได้

ปัจจุบันมีการค้นพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตอินูลินได้ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่จุลินทรีย์บางชนิดใช้เวลาในการเจริญเติบโตนาน มีการย่อยอินูลินในระยะเวลาที่นาน ดังนั้นการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม ในการตัดต่อยีนประมวลรหัสอินูลินสมาย่ออินูลิน เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อินูลินสลายตัวเร็วขึ้นเพื่อในระยะเวลาที่ย่อยอินูลิน และสามารถนำไปประยุกต์หรือพัฒนากระบวนการย่อยอินูลินให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อโคลน แสดงออก ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์อินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01 ใน *Escherichia coli*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 สามารถแสดงออกใน *Escherichia coli* ทำให้บริสุทธิ์ และทราบลักษณะสมบัติของอินูลิเนส



บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

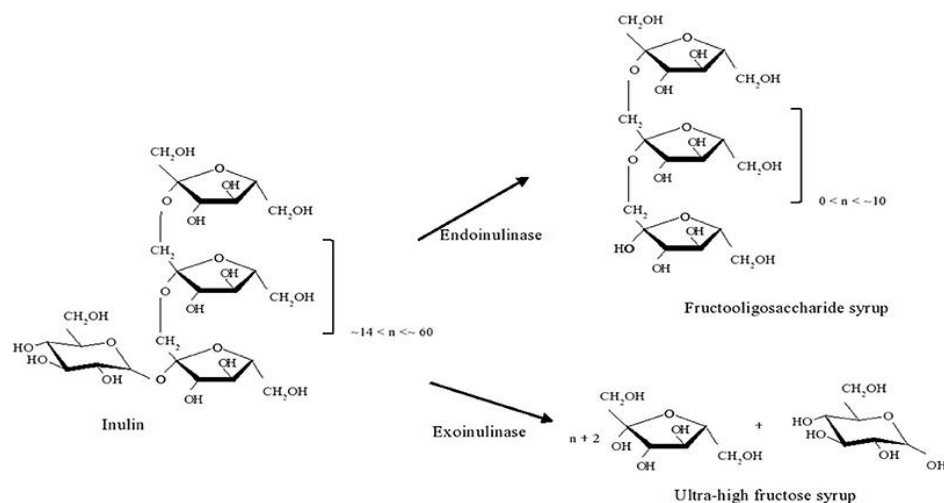
2.1 อินูลิน

อินูลินเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ มีลักษณะเป็นเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (Tohamy, 2006) สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช โดยพบมากในส่วนหัวหรือราก เช่น หัวหอม กระเทียม และแก่นตะวัน (Chi และคณะ, 2011) โครงสร้างของอินูลินประกอบด้วยเส้นตรงสายยาวของ D-fructofuranose เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 2,1 ที่มีกลูโคสอยู่ด้านบน/ปลายสุดของสาย (Chen และคณะ, 2013) เป็นสารให้ความหวาน แคลอรีต่ำ (12 กิโลจูลต่อกรัม) และมีสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Gao และคณะ, 2009); (Singh และ Gill, 2006) อินูลินถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม การผลิตอาหารและยา และยังใช้เป็นแหล่งสำหรับผลิตฟรุคโทส (Tinrat และคณะ, 2012)

2.2 อินูลิเนส

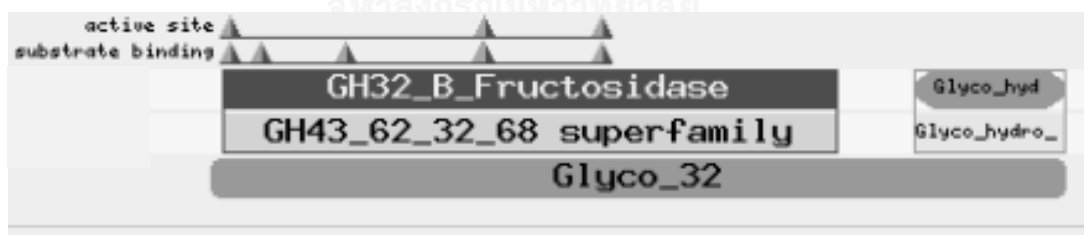
อินูลิเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยอินูลินได้ สามารถแบ่งตามกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ เอ็กโซอินูลิเนส (exo-inulinase) และเอนโดอินูลิเนส (endo-inulinase) (รูปที่ 2-1) โดย เอ็กโซอินูลิเนส หรือ fructan beta-fructosidase; EC 3.2.1.80 จะย่อยส่วนปลายสายของอินูลินที่ไม่เกิดการรีดิวซ์ได้เป็นฟรุคโทส นอกจากนี้เอ็กโซอินูลิเนสสามารถย่อย ซูโครส (กลูโคสเชื่อมกับ ฟรุคโทส), ราฟฟิโนส (กาแลคโทสเชื่อมกับซูโครส) และเลแวน (ฟรุคโทสต่อกันเป็นสายยาวเชื่อมกับ ซูโครส)ได้ ส่วนเอนโดอินูลิเนส หรือ fructanohydrolase; EC 3.2.1.7 จะย่อยภายในพันธะเบต้า 2,1 ของอินูลินได้เป็น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, โอลิโกฟรุคโทส และฟรุคโทส (Li และคณะ, 2012) ซึ่ง เอนโดอินูลิเนสไม่สามารถย่อยราฟฟิโนส และ เลแวนได้ เนื่องจากมีความจำเพาะกับพันธะเบต้า 2,1 ระหว่างฟรุคโทสเชื่อมกับฟรุคโทสสูงมาก เมื่อใช้เอ็กโซอินูลิเนสร่วมกับเอนโดอินูลิเนส เอนโดอินูลิเนส จะตัดพันธะภายในโมเลกุลของอินูลิน ทำให้เกิดปลายที่ไม่เกิดการรีดิวซ์มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่ม ซับสเตรทให้แก่เอ็กโซอินูลิเนส ทำให้การย่อยอินูลินได้เป็นฟรุคโทสมากขึ้น (ปรักกะมะกุล, 2555)

เอนไซม์อินูลิเนสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ในแบคทีเรีย เช่น *Arthrobacter* sp. และ *Staphylococcus* sp. เป็นต้น ในรา เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นต้น ใน ยีสต์ เช่น *Kluyveromyces* sp. และ *Pichia* sp. เป็นต้น (Pouyez และคณะ, 2012)



รูปที่ 2-1 แสดงกระบวนการย่อยอินูลินของอินูลิเนส (Fernandes, 2014)

ลักษณะทางโปรตีนของอินูลิเนสส่วนใหญ่ (รูปที่ 2-2) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ GH32_B_Fructosidase โดยเป็นบริเวณ active site ซึ่งส่วนนี้จะทำการย่อยภายในพันธะเบต้า-2,1 ของสายพรุทโทส ได้เป็นพรุทโทโอลิโกแซคคาไรด์ และพรุทโทส อีกส่วนหนึ่งคือ Glyco-hydrolase จะเป็นส่วนที่ย่อยด้านปลายสายที่มีกลูโคสอยู่ของอินูลินได้เป็นกลูโคส



รูปที่ 2-2 แสดงลักษณะทางโปรตีนของอินูลิเนส (Li และคณะ, 2012)

2.3 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide, FOS)

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของฟรุคโตสต่อกันด้วยพันธะเบต้า 2,1 เป็นสายยาวจำนวน 2-60 โมเลกุลและมีโมเลกุลของกลูโคสอยู่ด้านปลายสาย จัดเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ โดยให้พลังงานน้อยกว่าพลังงานจากซูโครส กล่าวคือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 กรัมให้พลังงานประมาณ 2 กิโลแคลอรี เนื่องจากฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ได้ จึงเหมาะกับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (เคยอาษา, 2554) เมื่อเปรียบเทียบกับซูโครสแล้วฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีความเหนียวมากกว่าในความเข้มข้นที่เท่ากันเนื่องจากฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีมวลโมเลกุลที่มากกว่า นอกจากนี้ยังทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าและทนกว่าในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4-7 โดยทั่วไปฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ แบ่งออกเป็น

- 1) อินูลินเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่จับกันเป็นโครงสร้างที่มีฟรุคโทสต่อกันประมาณ 2-60 ตัว
- 2) โอลิโกฟรุคโตส เกิดจากการย่อยอินูลินได้เป็นส่วนย่อยๆ ของโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีฟรุคโตสต่อกันประมาณต่ำกว่า 40 ตัว
- 3) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นการรวมกันของสายฟรุคโทสกับกลูโคสด้านปลายซึ่งพบมากที่สุดเพียง 5 ตัว ซึ่งได้จากน้ำตาลที่ผ่านกระบวนการหมักแบบธรรมชาติ เช่น 1-kestose (GF2), nistose (GF 3) และ 1-fructosyl-nistose (GF 4) (Sabater-Molina และคณะ, 2009)

2.4 ประโยชน์ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

2.4.1 프리ไบโอติก (prebiotic)

เมื่อรับประทานฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ติดต่อกันเป็นเวลานานจะช่วยเพิ่มปริมาณบิฟิโดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่และแลคโตบาซิลลัสในลำไส้เล็กซึ่งจะส่งผลให้ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคอีกด้วย เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิต เอนไซม์ไกลโคลิติกมาย่อย FOS ได้เป็น โมโน หรือ ไดแซคคาไรด์ โดยแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ (Grizard และ Barthomeuf, 1999)

2.4.2 ประโยชน์ต่อผู้ป่วยเบาหวาน

เนื่องจากฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารได้ ดังนั้นไม่ส่งผลต่อระดับน้ำตาลในกระแสเลือด เพราะร่างกายไม่สามารถดูดซึมได้ จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน (Roberfroid และคณะ, 1993)

2.4.3 ช่วยในการดูดซึมแคลเซียม

กระบวนการหมักฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยแบคทีเรียจำพวกแลคโตบาซิลลัส และสเตรปโตคอกคัสในร่างกายเพื่อผลิตได้เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ซึ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง ทำให้แคลเซียมซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำสามารถละลายน้ำได้ ช่วยให้ร่างกายสามารถดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้น (Gibson และ Roberfroid, 1995)

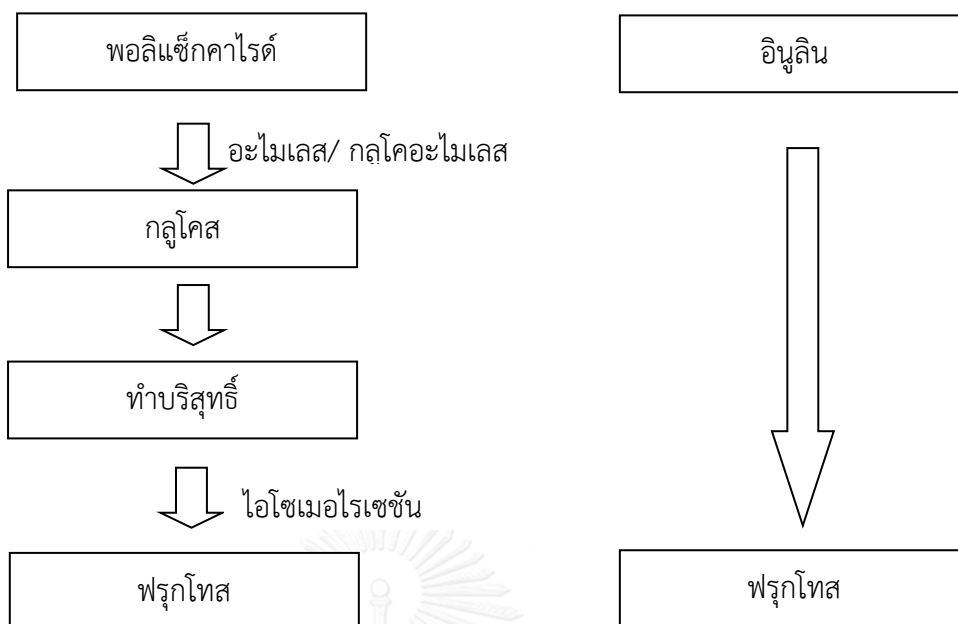
2.4.4 ลดความเสี่ยงของมะเร็งลำไส้

อาหารส่วนใหญ่จะประกอบด้วยไขมันสัตว์สูงและความเข้มข้นโปรตีนที่สูงและมีเส้นใยน้อยซึ่งจะเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ แต่ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จะช่วยเพิ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์และหมักฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในลำไส้ได้ โดยในงานวิจัยของ Sabater-Molina และคณะ (2009) พบว่าการรับประทานฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จำนวน 4-15 กรัมต่อวัน จะช่วยลดอาการท้องผูกได้ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของมะเร็งลำไส้ (Sabater-Molina และคณะ, 2009)

2.5 ฟรุทโทส

ฟรุทโทสเป็นน้ำตาลที่มีความหวานมากที่สุดมากกว่าซูโครส 1.73 เท่า (Hanover และ White, 1993) และให้พลังงานน้อยกว่า จึงมีประโยชน์ในทางด้านการแพทย์ เนื่องจากสามารถใช้ฟรุทโทสเป็นอาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยได้รับฟรุทโทสเข้าสู่กระแสเลือดเพียงเล็กน้อยจะสามารถช่วยให้ผู้ป่วยรู้สึกหายอ่อนเพลียได้ ไม่ส่งผลให้ปริมาณระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงมากขึ้น โดยฟรุทโทสสามารถพบได้มากที่สุดคือน้ำผึ้ง และยังมีพบในผลไม้ต่างๆ นอกจากนี้ฟรุทโทสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นส่วนประกอบในการผลิตขนมปัง แยม น้ำผลไม้ และน้ำอัดลม โดยทั่วไปฟรุทโทสผลิตจากกระบวนการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ และเปลี่ยนไปเป็นฟรุทโทสซึ่งต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดและหลายขั้นตอน (รูปที่ 2-3) เช่น อะไมเลส และกลูโคสอะไมเลส (Eskin, 1990)

ซึ่งปัจจุบันมีการใช้อินูลิเนสเพื่อทำการผลิตฟรุทโทสจากอินูลินที่มีความบริสุทธิ์โดยตรงมากกว่าการผลิตจากกระบวนการที่ผ่านหลายขั้นตอน โดยอินูลิเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ มีปริมาณน้อยและมีเอนไซม์อื่นๆ จากจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ รวมถึงมีการปนเปื้อนของอนุพันธ์อื่นๆ อาทิเช่น bioethanol (Lim และคณะ, 2011), butanediol และ lactic acid (Chi และคณะ, 2009) เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันมีการนำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส เพื่อนำไปใช้ในการผลิตอินูลิเนสมาใช้ในการผลิตฟรุทโทส หรือสารต่างๆ ที่ต้องการ



รูปที่ 2-3 แสดงกระบวนการผลิตฟรุกโทส (Granarog, 1999)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยที่ได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อให้ได้ปริมาณและความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยการโคลนยีนประมวลรหัสเพื่อทำการศึกษารหัสออกในเซลล์เจ้าบ้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Escherichia coli* โดยมิงงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษารหัสออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ดังเช่น ในงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2003) ใน *E. coli* JM 109 มาใช้ในการศึกษารหัสออกของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส (*inu A1*) จาก *Aspergillus niger* AF10 โดยใช้เวกเตอร์ pUC118 เมื่อใช้โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนที่อิ่มตัวด้วยด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และใช้ anion exchange column ในการแยกโปรตีนในขั้นตอนสุดท้าย และวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี neocuproin พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออกได้และมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก *A. niger* AF10 ในสภาวะที่อุณหภูมิ 55 °C pH 5.5 (Zhang และคณะ, 2003) ในงานวิจัยของ Lim และคณะ (2010) ได้โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส (*INU1*) จาก *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2887 เพื่อแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้เวกเตอร์ pYEG alpha พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออกและมีกิจกรรมเอนไซม์มากขึ้นโดยใช้ crude protein ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNSA) ในสภาวะที่อุณหภูมิ 50 °C pH 5.2 เมื่อเปรียบเทียบกับ crude protein จาก *K. marxianus* NCYC 2887 (Lim และคณะ, 2010)

รวมถึงงานวิจัยของ Li และคณะ (2012) ได้นำยีนประมวลรหัสอินูลิเนส (*EnIA*) จาก *Arthrobacter* sp. S37 เพื่อแสดงออกใน *Yarrowia lipolytica* โดยใช้เวกเตอร์ pINA 317 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออก และเมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ได้ด้วยการใช้ DEAE Sepharose Fast Flow anion exchange column, Sephadex™ G-75 column และผ่าน AmiconYM3 membrane ก่อนมาวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi พบว่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 50 ° C pH 4 เมื่อเปรียบเทียบกับ crude protein จาก *Arthrobacter* sp. S37 (Li และคณะ, 2012) และงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2012) ได้โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส (*KmINU*) จาก *K. marxianus* CBS 6556 เพื่อแสดงออกใน *Pichia pastoris* พบว่ามีการแสดงออกและเมื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 ° C pH 4 โดยใช้ crude protein พบว่ามีค่าที่สูงมากกว่าเอนไซม์อินูลิเนสที่ได้จากการสกัด crude protein ออกมาจาก *K. marxianus* CBS 6556 โดยตรงโดยวัดด้วยวิธี DNSA (Zhang และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมี He และคณะ (2013) ได้นำยีนประมวลรหัสอินูลิเนส (*Enlnu*) จาก *Aspergillus niger* CICIM F0620 มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pPIC9K เพื่อแสดงออกใน *Pichia pastoris* พบว่ามีการแสดงออกเอนไซม์มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ crude protein เมื่อใช้โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนที่อิ่มตัวด้วยด้วย 70% (NH₄)₂SO₄ จากนั้นใช้ DEAE-cellulose column และ MonoQ chromatography ก่อนวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี DNSA ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 60 ° C pH 6 (He และคณะ, 2014) นอกจากนี้งานวิจัยของ Chen และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกโดยนำยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจาก *Aspergillus ficuum* มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pET28a และทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* Rosetta เมื่อนำโปรตีนทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column และวัดกิจกรรมด้วยวิธี DNSA พบว่ามีการแสดงออกเอนไซม์มากขึ้นภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 60 ° C pH 4 เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่สภาวะอื่นๆ (Chen และคณะ, 2013) และในปี 2014 Gao และคณะ (2014) ได้ทำการโคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส จาก *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 เชื่อมกับ pET28a และทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* BL21 เมื่อทำการแสดงออกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA column ก่อนวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี DNSA พบว่ามีการแสดงออกเอนไซม์มากขึ้นเช่นกัน โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25 ° C pH 6 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *P. polymyxa* ZJ-9 (Gao และคณะ, 2014)

ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาการโคลนยีนประมวลดรหัสอินูลิเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. CP01 นำมาแสดงออกใน *E. coli* ซึ่งได้มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนประมวลดรหัสจาก *Streptomyces* sp. ในเซลล์เจ้าบ้านต่างๆ และพบว่าสามารถช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์นั้นสูงขึ้น ดังในงานวิจัยของ ตาลาวนิช (2536) ได้โคลนยีนประมวลดรหัสกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไอโซเมอร์ เช่น ฟรุกโทส จาก *Streptomyces* sp. strain 190-1 และนำมาแสดงออกใน *Streptomyces lividans* TK21 โดยใช้เวกเตอร์ pTJ4090 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออก และมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จาก crude protein มากขึ้นประมาณ 25% เมื่อเทียบกับ crude protein ที่สกัดจาก *Streptomyces* sp. strain 190-1 (ตาลาวนิช, 2536) สำหรับงานวิจัยของ ธนะ (2541) ได้โคลนยีนประมวลดรหัสปีตา-ไซโลลิตเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสายหลักของไซแลน โดยจะย่อยไซโลโอลิโกแซกคาไรต์ได้เป็นไซโลส จาก *Streptomyces* sp. CH7 เพื่อแสดงออกใน *E. coli* DH5alpha โดยใช้เวกเตอร์ pUC18 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออกและมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จาก crude protein สูง 30 เท่า เมื่อเทียบกับ crude protein ที่ได้จาก *E. coli* DH5alpha pUC18 (ธนะ, 2541) และในงานวิจัยของ Sugimori และคณะ (2014) ได้นำ *E. coli* HST08 premium มาเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการศึกษาการแสดงออกของยีนประมวลดรหัส glycerophosphocholine cholinesterase ที่จัดเป็นเอนไซม์ที่ย่อย glycerol-3-phosphocholine ได้เป็นกลีเซอรอล และฟอสโฟโคลีน จาก *Streptomyces sanglieri* โดยใช้เวกเตอร์ pUC702 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงออกและมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อเทียบกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *S. sanglieri* โดยตรงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Sugimori และคณะ, 2014) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่ายีนจาก *Streptomyces* sp. สามารถถูกนำมาให้แสดงออกในระบบการแสดงออกของ *E. coli* ได้

งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ทั้งโคลนยีนประมวลดรหัสอินูลิเนสของ *Streptomyces* sp. CP01 ที่แยกได้จากดิน (Laowklom และคณะ, 2012) และนำมาแสดงออกใน *E. coli* เพื่อที่จะผลิตเอนไซม์อินูลิเนสที่มีความบริสุทธิ์ได้เพื่อโคลน แสดงออก ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 และนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตได้

บทที่ 3 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 *Streptomyces* sp. CP01

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร (Laowklom และคณะ, 2012)

3.1.2 *Escherichia coli* DH5 alpha

จีโนมไทป์ : $F^- \Phi_{80lacZ\Delta M15} \Delta (lacZYA^- argF) U169 recA1 endA1 hsdR17$

$(r_K^-, m_K^+) phoA supE44 \lambda^- thi^- 1 gyrA96 relA1$

3.1.3 *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLys S

จีโนมไทป์ : $\Delta (ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vull} phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE^2 (Cam^R, Kan^R, Str^R, Tet^R)^4$

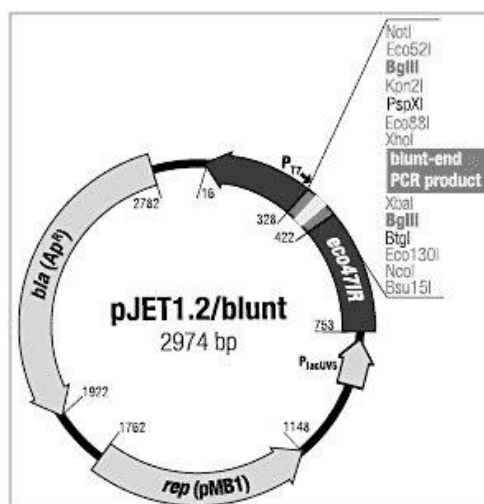
3.1.4 *E. coli* BL21 (DE3)

จีโนมไทป์ : $F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm (DE3)$

3.2 พลาสมิด

3.2.1 pJET1.2/blunt cloning (Thermo scientific)

เป็น vector ปลายทู่ ที่มี 5'-phosphoryl group สามารถทำการเชื่อมต่อกับชิ้นยีนโดยไม่จำเป็นต้องมีปลายของชิ้นยีนเป็น sticky end ที่เป็นจำเพาะบริเวณเดียวกับของ vector และมี T7 promoter สำหรับถอดรหัสยีนที่เชื่อมเข้าไป มียีน *bla* สำหรับในการการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

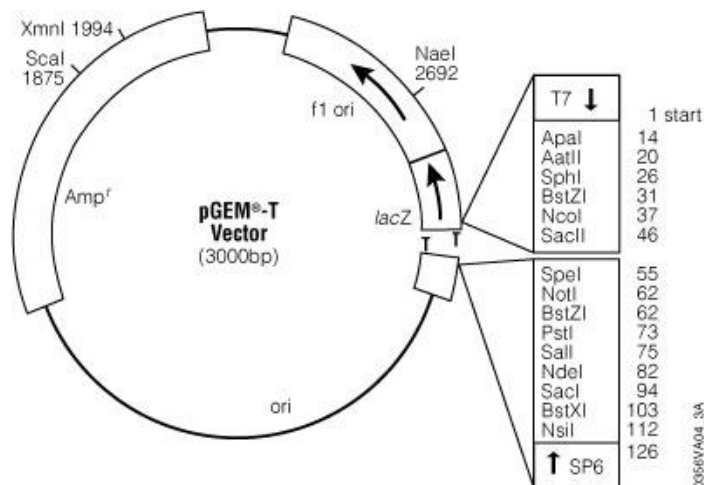


รูปที่ 3-1 แสดง pJET1.2/blunt Cloning vector (<https://www.thermofisher.com>)

rep (pMB1)	1762-1148
Replication start	1162±1
<i>bla</i> (Ap ^R)	2782-1922
<i>eco 47IR</i>	753-16
P _{lacUV5}	892-769
T7 promoter	305-324
Multiple cloning site (MCS)	422-328
Insertion site	371-372

3.2.2 pGEM-T Easy (Promega)

เป็น vector ที่มี T overhang สามารถเชื่อมต่อกับชิ้นยีนที่มี A overhang ซึ่งเป็นชิ้นยีนที่ได้จากการทำ PCR ด้วย *Taq* DNA polymerase ได้โดยตรง หรือการเติมนิวคลีโอไทด์ A' ลงไปในผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยอาศัย *Taq* DNA polymerase นอกจากนี้ประกอบด้วย *Lac* promoter และยีน *LacZ* สำหรับการคัดเลือกด้วย blue-white colony screening

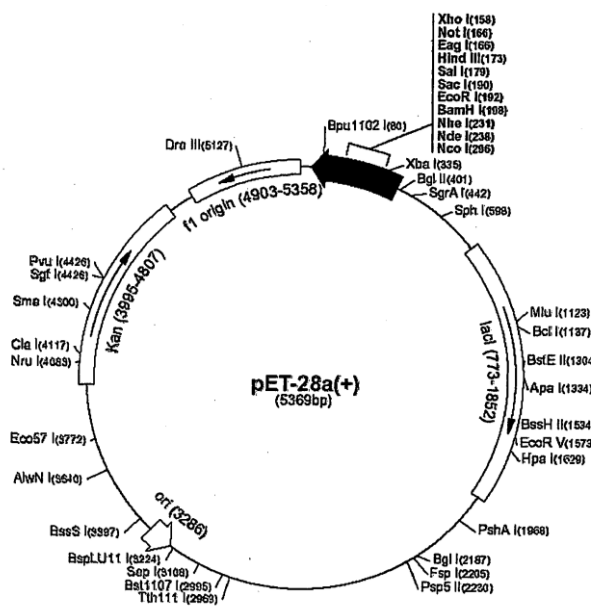


รูปที่ 3-2 แสดง pGEM-T Easy (<https://www.promega.com>)

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
Multiple cloning sites region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
<i>lac</i> operon sequences	151-380, 2821-2981
pUC/M13 reverse sequencing primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
Beta-lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
pUC/M13 forward sequencing primer binding site	2941-2957

3.2.3 pET28a (+) (Novagen)

ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกโปรตีน ซึ่งมี T7 promoter สำหรับถอดรหัสยีนประมวลรหัสยีนที่เชื่อมเข้าไป โดยอาศัย T7 RNA polymerase นอกจากนี้มียีน *Kan* สำหรับในการคัดเลือกด้วยกานาไมซิน



รูปที่ 3-3 แสดง pET28a(+) (<http://www.helmholtz-muenchen.de>)

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His Tag coding sequence	270-287
T7 Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I- <i>Xho</i> I)	158-203
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
<i>Kan</i> coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณตัดจำเพาะ 5' → 3'	buffer	อุณหภูมิที่ใช้ (°C)	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)
<i>Nde</i> I	CA ^V TATG	1x Fast Digest	37	5
<i>Xba</i> I	T ^V CTAGA	2x Tango	37	16
<i>Xho</i> I	C ^V TCGAG	1x R หรือ 2x Tango	37	16



บทที่ 4

วิธีการดำเนินการทดลอง

4.1 โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส

4.1.1 สกัดจีโนมิกส์

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. CP01 เลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium (0.7% (w/v) tryptone, 0.1% (w/v) K₂HPO₄, 0.05% (w/v) KCl, 0.25% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.001% (w/v) FeSO₄·7H₂O) ที่มี 1% (w/v) อินูลิน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกส์ด้วยชุด NucleoSpin Tissue (Macherey-nagel) จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน และทำการเก็บจีโนมิกส์ที่อุณหภูมิ 4 °C

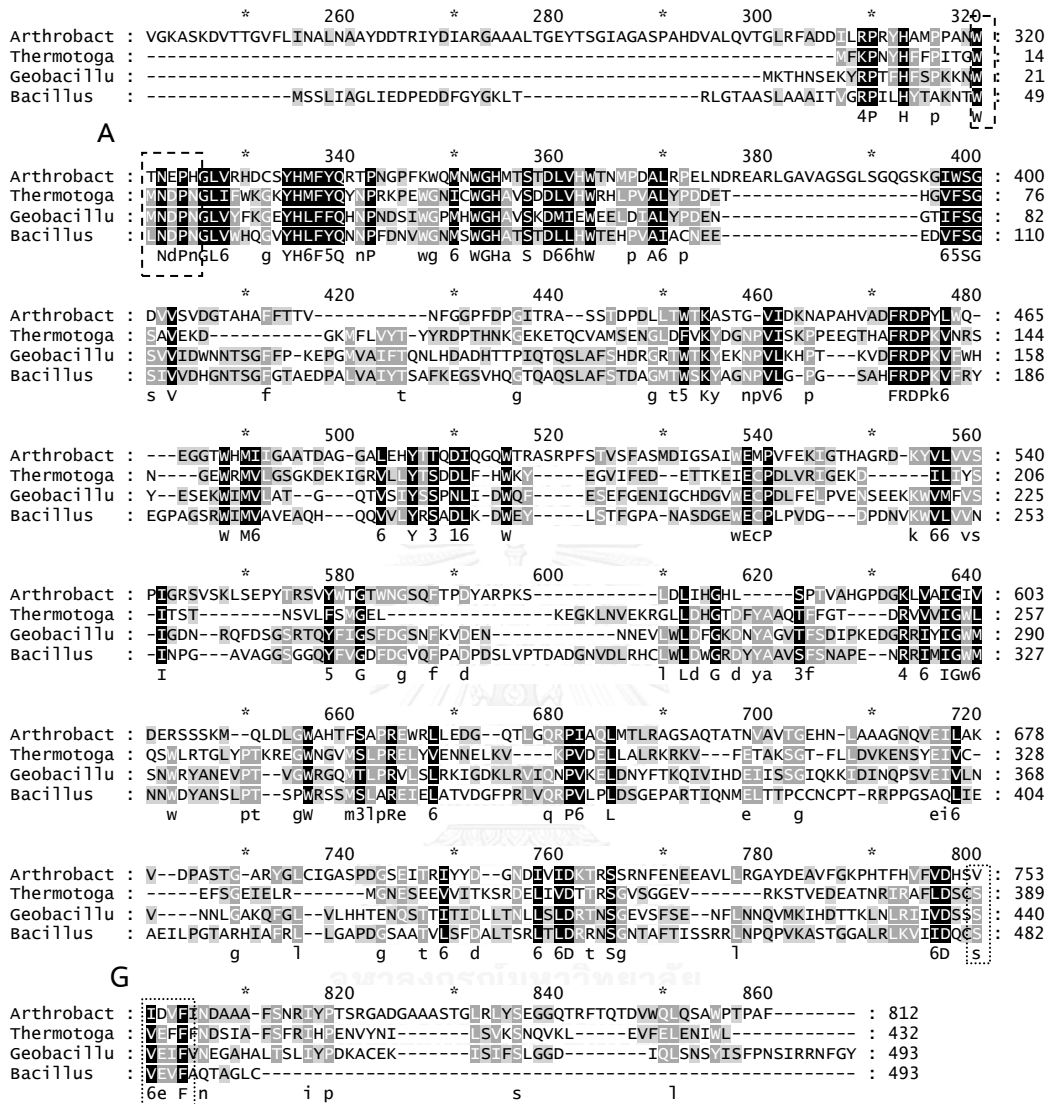
4.1.2 เพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การเพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase ทำโดยนำจีโนมิกส์ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส สำหรับค้นหาชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสที่ไม่ทราบลำดับทำโดยเปรียบเทียบจากลำดับของกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส บริเวณที่มีความเหมือนกันมากที่สุดของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจากแบคทีเรีย ได้แก่ *Arthrobacter* sp. S37 (AJ131562), *Geobacillus licheniformis* (BAC45010) และ *Bacillus* sp. Snu7 (AF234992) ดังในรูปที่ 4-1 และนำส่วนที่มีความเหมือนกันของยีนมาออกแบบ Degenerated primer (INU_A_F' และ INU_G_R', ตารางที่ 4-1) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 7.6 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 2.4 ไมโครลิตร, 10 μM INU_A_F' ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM INU_G_R' ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, จีโนมิกส์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5U/μl *Taq* DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มีปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้ pre-denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที, annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ซึ่งคาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

ส่วนไพรเมอร์ strep-amboF' คู่กับ strep-amboR' (ตารางที่ 4-1) ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้น ยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ซึ่งไพรเมอร์ได้ทำการออกแบบมาจาก putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 7.6 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 2.4 ไมโครลิตร, 10 μM strep-amboF' ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM strep-amboR' ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, จีโนมิกส์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5U/μl Taq DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มีปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้ pre-denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบขนาดของ ผลิตภัณฑ์ซึ่งคาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

ตารางที่ 4-1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'	จำนวน นิวคลีโอไทด์
INU_A_F'	TGG AYG AAC GAN CCS MAY G	19
INU_G_R'	GAA TTC AAW ACY TCW ACW GA	20
strep-amboF'	ATG CGA ACC CGT GCA CCA TC	20
strep-amboR'	TCA GTC GGT CAT GTT GCC CA	20
full inulinaseF'	GGG GCA TAT GCG AAC CCG TGC ACC ATC G <i>Nde</i> I	28
full inulinaseR'	GGG GCT CGA GTT AGT CGG TCA TGT TGC CCA T <i>Xho</i> I	31



รูปที่ 4-1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนบางส่วนของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. S37 (AJ131562), *Thermotoga maritima* (AJ001073), *Geobacillus licheniformis* (BAC45010) และ *Bacillus* sp. Snu7 (AF234992)

หมายเหตุ --- แสดงบริเวณสำหรับออกแบบไพรเมอร์ INU_A_F' และ
 แสดงบริเวณสำหรับออกแบบไพรเมอร์ INU_G_R'

เมื่อทราบยีนประมวลรหัสอินูลิเนสทั้งหมดจึงทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ประมวลรหัสอินูลิเนสที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (full inulinaseF' และ full inulinaseR') เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกทำโดยนำรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนสมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ดังนี้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 12.78 ไมโครลิตร, 10x Thermo Pol Reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 100 mM MgSO₄ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, 10 μM full inulinaseF' ปริมาตร 0.88 ไมโครลิตร, 10 μM full inulinaseR' ปริมาตร 0.88 ไมโครลิตร, รีคอม บิแนนท์พลาสมิด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาตร 0.66 ไมโครลิตร และ 2,000 U/μl Vent DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ สภาวะดังนี้ pre-denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที, annealing ที่ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ของยีน ประมวลรหัส full length inulinase ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

4.1.3 ทำบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จึงได้ ทำการตัดเจลบริเวณที่ต้องการ จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำเจลที่ตัดมาเติม Buffer QG 3 เท่าของปริมาตรเจล (100 มิลลิกรัม~100 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 °C vortex ทุกๆ 2-3 นาที จนเจลละลายหมด เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของเจล ผสมให้เข้ากัน นำทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วย Buffer QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วย Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง ใหม่ ชะดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ถูกชะออก มาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำ การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

4.1.4 โคลนยีนที่คาดว่าเป็ยีนประมวลดห้สอินูลิเนส

โคลนยีนที่คาดว่าเป็ยีนประมวลดห้สอินูลิเนสที่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนยีน AG ด้วยไพรเมอร์ INU_A_F' และ INU_A_R' (ตารางที่ 4-1) เข้าสู่เวคเตอร์ pJET1.2/blunt cloning (Thermo scientific) ด้วยอัตราส่วน 3:1 โดยใช้ยีนประมวลดห้สอินูลิเนส AG ขนาด 1 kb จำนวน 50 นาโนกรัม หรือขนาด 1.5 kb จำนวน 75 นาโนกรัม กับเวคเตอร์ pJET1.2/blunt cloning 50 นาโนกรัม เริ่มจากการผสม 2xReaction Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, DNA Blunting Enzyme ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ยีนประมวลดห้สอินูลิเนสAG และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำเป็น 18 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยทำให้เย็นบนน้ำแข็ง จากนั้นทำการเติม 50 ng/μl pJET1.2/blunt Cloning vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 5 U/μl T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวบ่มกับเซลล์คอมพิเทนต์ของ *E. coli* DH5 alpha บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที และนำไปบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติม LB broth (1% (w/v) tryptone, 1% (w/v) NaCl และ 0.5% (w/v) yeast extract) 850 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเลี้ยง บน LB Agar (1% (w/v) tryptone, 1% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) yeast extract และ 1.5% (w/v) Agar) ที่มี 100 μg/ml แอมพิซิลลิน เป็นเวลาข้ามคืน และทำการคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาเลี้ยงบน LB Agar ที่มี 100 μg/ml แอมพิซิลลิน เพื่อทำเป็น master plate ก่อนจะนำมาคัดเลือกโคลนเบื้องต้นด้วยวิธี Rapid size screening ตามข้อ 4.1.5

ส่วนการโคลนยีนที่คาดว่าเป็ยีนประมวลดห้สอินูลิเนส SA ที่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนยีนยีนด้วยไพรเมอร์ strep-amboF' และ strep-amboR' (ตารางที่ 4-1) อ้างอิงจาก putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 เข้าสู่เวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) โดยผสมยีนประมวลดห้สอินูลิเนสกับ pGEM-T Easy vector ด้วยอัตราส่วน 3:1 ซึ่งใช้ยีนประมวลดห้สอินูลิเนส SA 145 นาโนกรัม กับเวคเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม จากนั้นทำการเติม 2x Rapid Ligation Buffer 10 ไมโครลิตร, 100U T4 DNA Ligase 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ของ *E. coli* DH5 alpha ด้วยวิธี heat shock และคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทำ master plate บน LB Agar ที่มี 100 μg/ml แอมพิซิลลิน ก่อนจะนำมาคัดเลือกโคลนเบื้องต้นด้วยวิธี Rapid size screening ตามข้อ 4.1.5

สำหรับการแสดงออกโปรตีนใน *E. coli* โดยสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวล full length inulinase ที่ได้จากข้อ 4.1.2 เข้าในเวกเตอร์ pET28a ด้วยอัตราส่วน 3:1 ซึ่งจะใช้นี้นประมวลรหัสอินูลิเนส 145 นาโนกรัม กับเวกเตอร์ pET28a 50 นาโนกรัม เริ่มจากการตัดชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสและเวกเตอร์ pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I เมื่อต้องการตัดยีนประมวลรหัสอินูลิเนส โดยผสม 10x FastDigest buffer 2 ไมโครลิตร กับยีนประมวลรหัสอินูลิเนส 0.2 ไมโครกรัมต่อ FastDigest *Nde* I 1 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แต่ถ้าต้องการตัดเวกเตอร์ pET28a ใช้จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อ FastDigest *Nde* I 1 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มทั้ง 2 ส่วนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำทั้งหมดไปตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน เพื่อตัดส่วนที่ตัดด้วย *Nde* I เรียบร้อยไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit ตามข้อ 4.1.3 และนำไปตัดต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I โดยผสม 10x R buffer 2 ไมโครลิตร กับยีนประมวลรหัสอินูลิเนสหรือ เวกเตอร์ pET28a 0.5 ไมโครกรัมต่อ 10 U/μl *Xho*I 0.5 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ และนำมาตรวจสอบความถูกต้องของขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน จากนั้นนำชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสมาเชื่อมกับเวกเตอร์ pET28a ด้วย 10x T4 DNA ligase buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับเวกเตอร์ pET28a 50 นาโนกรัม ยีนประมวลรหัสอินูลิเนส 145 นาโนกรัม และ 400U/μl T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ *E. coli* DH5 alpha และคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาทำ master plate บน LB Agar ที่มี 50 mg/ml กานาไมซิน ก่อนจะตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นด้วยวิธี Rapid size screening ก่อนทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLys S หรือ BL21 (DE3) ด้วยวิธี heat shock จะได้เป็นรีคอมบิแนนท์โคลนสำหรับศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

4.1.5 คัดเลือกโคลนด้วยวิธี Rapid size screening

โดยทำการนำโคลนของโคลนที่สนใจมาทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (10% (w/v) sucrose, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.25% (w/v) SDS, 5mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue) 30 ไมโครลิตร โดยบ่มที่ 37 °C 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ต่อมานำส่วนสารละลายมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับขนาดเวกเตอร์ที่ไม่มีชิ้นยีนเชื่อมอยู่

4.1.6 สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกไว้มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 100 mg/ml แอมพิซิลลิน หรือ 50 mg/ml กานาไมซิน ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดด้วย CTAB โดยปั่นเหวี่ยงโคลนที่เลี้ยงไว้ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นำส่งเซลล์ที่ได้มาเติม STET buffer (8% (w/v) sucrose, 50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM EDTA pH8 และ 0.1% (v/v) Triton-x-100) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10 mg/ml lysozyme 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์ออก แล้วเติม 2 mg/ml RNase A 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตกตะกอนด้วย 5% (w/v) CTAB 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำส่วนตะกอนมาละลายด้วย 1.2 M NaCl 300 ไมโครลิตร จากนั้นผสม chloroform 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนละลายชั้นบนมาผสมกับ isopropanol ในปริมาณที่เท่ากัน ตกตะกอนที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนล้างด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส และทำให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ถ้าใช้เวกเตอร์ pJET1.2/blunt cloning ตัดด้วย *Xba* I และ *Xho* I โดยผสม 10x Buffer Tango 4 ไมโครลิตร กับ รีคอมบิแนนท์ พลาสมิด 0.5 ไมโครกรัม และ 10U/μl *Xba* I และ 10U/μl *Xho* I 0.5 ไมโครลิตรปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ้าเวกเตอร์ pGEM-T Easy ตัดด้วย *Nde* I เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4

แต่ถ้าใช้เวกเตอร์ pET28a จะตัดด้วย *Nde* I และ *Xho* I ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1.4 หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

4.1.7 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อพบว่าพลาสมิดที่ได้มีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่ จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนั้นไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE DNA Sequencing Services, Malaysia

4.2 ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

4.2.1 แสดงออกและตรวจสอบโปรตีน

เลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้จากข้อ 4.1.5 ใน LB broth ที่มี 50 µg/ml กานาไมซิน และ 34 µg/ml คลอแรมเฟนิคิล บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) เพื่อทำการลงเชื้อในอัตราส่วน เชื้อ 1 OD₆₀₀ ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 จากนั้นชักนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mM และบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนคลีนแสงและเก็บตะกอนเซลล์จำนวน 1 OD₆₀₀ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อนำตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์การแสดงออกด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยนำตะกอนเซลล์มาละลาย 1x PBS 32.5 ไมโครลิตร, 4x sample buffer 12.5 ไมโครลิตร และ beta-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีและนำมาโหลดลงใน SDS-PAGE ซึ่งเตรียมดังตารางที่ 4-2 จำนวน 2 เจล และทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 100 Volt เป็นเวลา 110 นาที

ตารางที่ 4-2 องค์ประกอบการเตรียม SDS-PAGE

10% Resolving /Separating gel		5% Stacking gel	
สารเคมี	ปริมาตร (ml)	สารเคมี	ปริมาตร (ml)
น้ำกลั่น	7.9	น้ำกลั่น	5.5
30% Acrylamide mix	6.7	30% Acrylamide mix	1.3
1.5 MTris-HCl (pH8.8)	5	1.0M Tris-HCl (pH6.8)	1
10% (w/v) SDS	0.2	10% (w/v) SDS	0.08
10% (w/v) APS	0.2	10% (w/v) APS	0.08
TEMED	0.008	TEMED	0.008
ปริมาตรทั้งหมด	20	ปริมาตรทั้งหมด	8

นำเจล SDS-PAGE 1 เจลที่ได้มาย้อมด้วย Staining solution (0.2% (w/v) Coomassie blue R-255, 45% (v/v) Methanol, 25% (v/v) Glacial acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย Destain solution (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Glacial acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น fix ด้วย Fixing solution (10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Glacial acetic acid, 5% (v/v) กลีเซอรอล)

ส่วนอีก 1 เจลนำมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสด้วยวิธี Western blotting analysis เตรียม Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-rad) ขนาดพอดีกับเจลมาแช่ใน absolute methanol ล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเจล, Membrane และ thick blot paper มาแช่ transfer blotting buffer (80 % (v/v) 1x Transfer buffer และ 20% (v/v) Methanol) นำทั้งหมดมาวางบนเครื่อง semi-dry transfer blot (Bio-rad) โดยวาง thick blot paper, Membrane, เจล และ thick blot paper จากล่างสุดไปบนสุดตามลำดับ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมมเบรนมาเติม 5% (w/v) skim milk ใน PBST (0.8% (w/v) NaCl, 0.02% (w/v) KCl, 0.02% (w/v) KH_2PO_4 , 0.29% (w/v) Na_2HPO_4 และ 0.05% (v/v) Tween-20) pH7.4 (5% SK-PBST) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ต่อมาใช้แอนติบอดีปฐมภูมิเป็น Anti-His monoclonal antibody (R&D systems, USA) 1: 4000 ใน 5% SK-PBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และปมต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิเป็น Anti-mouse IgG HRP (Invitrogen) 1: 4000 ใน 5% SK-PBST เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนโดยใช้ 100 mM Tris-HCl pH8.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ 90mM coumaric acid ปริมาตร 11 ไมโครลิตร 250 mM luminal ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ตามลำดับเพื่อนำไปปมกับเมมเบรน จากนั้นนำไปประกอบกับฟิล์มในที่มืดจนเกิดแถบสัญญาณ

4.2.2 ตรวจสอบว่าโปรตีนอยู่ในรูป soluble form หรือ insoluble form

นำตะกอนเซลล์ 1 OD ที่ได้จากข้อ 4.2.1 มาเติม 0.1 M phosphate buffer pH7 (5.78% (v/v) 1M Na_2HPO_4 และ 4.24% (v/v) 1M NaH_2PO_4) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonicate เป็นเวลา 3 นาที โดยตั้งค่า pulse on 10 วินาที pulse off 9 วินาที และวางตัวอย่างบนน้ำแข็งตลอดเวลา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกโปรตีนส่วนละลายได้กับไม่ได้ออกจากกัน โดยนำส่วนใ้ย้ายมาหลอดใหม่เพื่อวัตถุประสงค์การเอนไซม์ตามข้อ 4.4 หรือตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid (TCA) ซึ่งให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ TCA เป็น 10% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งส่วนใสแล้วล้างตะกอนโปรตีนด้วย acetone 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งส่วนใสแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.4N NaOH 32.5 ไมโครลิตร จนตะกอนละลายหมดจึงเติม 4x sample buffer 12.5 ไมโครลิตร และ beta-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ส่วนตะกอนเซลล์เป็นส่วนโปรตีนที่ไม่ละลาย นำไปเติม 1x PBS 32.5 ไมโครลิตร, 4x sample buffer 12.5 ไมโครลิตร และ beta-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาไหลลง ใน SDS-PAGE ทำการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เช่นเดียวกับข้อ 4.2.1

4.3 ทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

4.3.1 เตรียมโปรตีนอินูลิเนส

นำรีคอมบิแนนท์ Rosetta-pET28a-SA34 ที่เจริญเติบโตที่ 30 °C ชักการนำผลิตโปรตีนด้วย 0.1 mM IPTG เดียวกับข้อ 4.2.1 จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่เก็บได้มาผสมกับ 0.1 M phosphate buffer 5 มิลลิลิตร ต่อ 50 OD ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonicate เป็นเวลา 3 นาที ตั้งค่าเป็น pulse on 10 วินาที pulse off 9 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกโปรตีนที่อยู่ส่วนที่ละลายได้มาหลอดใหม่ แล้วนำไปกรองผ่าน filter 0.45 ไมโครเมตร

4.3.2 เตรียมคอลัมน์ Ni-NTA affinity chromatography สำหรับทำบริสุทธิ์โปรตีน

นำคอลัมน์ Ni-NTA affinity chromatography ขนาด 5 มิลลิลิตร มาผ่านด้วยน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำมาเติม 0.1M NiSO₄ 2.5 มิลลิลิตร และด้วยน้ำปลอดประจุ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำให้คอลัมน์อิ่มตัวด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.3.3 ทำโปรตีนอินูลิเนสให้บริสุทธิ์

นำโปรตีนอินูลิเนสที่ได้จากข้อ 4.3.1 มาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA affinity chromatography ที่ผ่านการเตรียมตามข้อ 4.3.2 เรียบร้อยแล้ว จำนวน 5 รอบ เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ไว้ (FT) จากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง (W) เริ่มชะโปรตีนในคอลัมน์ด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7 ที่มี 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM และ 100 mM imidazole อย่างละ 5 มิลลิลิตร (E20, E40, E60, E80, E100) ตามด้วย 0.1 M phosphate buffer pH7 ที่มี 500 mM imidazole ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง (E500) สุดท้ายชะด้วย strip buffer (0.1 M phosphate buffer pH7 ที่มี 50 mM EDTA) (Strip) เก็บทุกส่วนที่ผ่านคอลัมน์มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย TCA แล้วตรวจสอบโปรตีนโดยทำ SDS-PAGE และวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เช่นเดียวกับข้อ 4.2.1

เมื่อได้โปรตีนอินูลิเนสที่บริสุทธิ์แล้วนำมาทำให้เข้มข้นด้วย Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter unites 50KDa (Merck) โดยนำโปรตีนที่ได้ใน E500 มาผ่านคอลัมน์ จากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH7 จำนวน 3 ครั้ง สุดท้ายเติม 0.1 M phosphate buffer pH 7 ให้โปรตีนละลายอยู่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนแล้วตรวจสอบโปรตีนโดยทำ SDS-PAGE และวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เช่นเดียวกับข้อ 4.2.1

4.4 วัดปริมาณโปรตีน

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นโปรตีนมาตรฐาน นำโปรตีนที่ต้องการวัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Protein Assay Dye reagent (Bio-rad) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตร

4.5 วัดกิจกรรมรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

ทำโดยนำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 1% อินูลิน ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และโดยมี 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0, crude protein ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp.CP01 เป็นตัวเปรียบเทียบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม 3,5-Dinitrosalicylic acid assay ในอัตราส่วน 1:1 นำไปวัดที่ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร และใช้ฟรุกโทสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Laowklom และคณะ, 2012) โดยหนึ่งหน่วยของอินูลิเนส คือ กิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวิซีได้ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 55 °C pH 7

4.6 ศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

4.6.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดกิจกรรมอินูลิเนสตามข้อ 4.5 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30, 40, 55, 70, 80 °C

4.6.2 ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดกิจกรรมอินูลิเนส โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.6.1 และแปรความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วง 4, 5, 6, 7, 8, 9

4.6.3 ศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดกิจกรรมอินูลิเนส โดยบ่มปฏิกิริยาตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.6.1 - 4.6.2 และแปรความเข้มข้นของอินูลินที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในช่วง 0, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 mg/ml

4.6.4 ศึกษาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษา Michaelis-Menten kinetic parameters ได้แก่ หาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) และความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ (V_{max}) โดยศึกษาจาก Lineweaver-Burk plots โดยใช้ อินูลินความเข้มข้น 0, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 mg/ml เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาเพื่อวัดกิจกรรมรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสเช่นเดียวกับข้อ 4.5 ภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 4.6.1-4.6.3 เพื่อนำค่ากิจกรรมรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ได้มาวาดกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอินูลิน เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max}

4.7 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ ที่ส่งผลต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดกิจกรรมรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสในทำการย่อยอินูลินเช่นเดียวกับข้อ 4.5 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.6.1-4.6.3 และทำการแปรผันไอออนของโลหะ ด้วย 1mM CaCl_2 , 1mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1mM CuCl_2 , 1mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mM HgCl_2 , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ 1mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และใช้รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ย่อยอินูลินโดยไม่เติมไอออนของโลหะเป็นตัวควบคุม

4.8 การตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสมาทำการย่อยอินูลินเช่นเดียวกับข้อ 4.5 จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส อินูลิน และน้ำตาลมาตรฐานมาหยดลงบน silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ซึ่งใช้กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส เป็นน้ำตาลมาตรฐาน และใช้อินูลินเป็นตัวควบคุมลบ แล้วนำไปจุ่มในเฟสเคลื่อนที่ (50% (v/v) n-butanol, 25% (v/v) Acetic acid และ 25% (v/v) น้ำกลั่น) จนกระทั่งเคลื่อนที่ใกล้สุดแผ่น silica gel ทำให้แห้งก่อนสเปรย์ด้วยสารผสมระหว่าง 1.7% (w/v) Alpha-diphenylamine, 1.7% (v/v) Aniline, 85.47% (v/v) Acetone และ 12.82% (v/v) Phosphoric acid จนทั่วแผ่นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C จนปรากฏผลเกิดขึ้น

บทที่ 5 ผลการทดลอง

5.1 โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส

5.1.1 สกัดจีโนมิกส์ของ *Streptomyces* sp. CP01

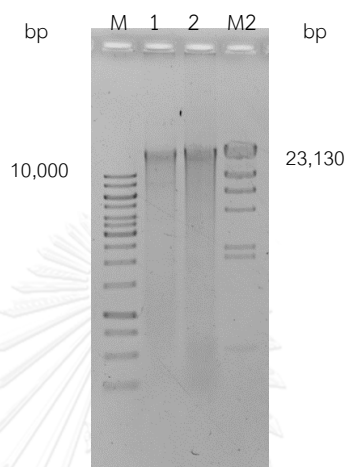
เชื้อ *Streptomyces* sp. CP01 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Mannitol soy agar (ถั่วเขียว 2% (w/v), D-Manitol 2% (w/v), agar 1.8% (w/v)) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 วันจะเกิดโคโลนีของ *Streptomyces* sp. เกิดขึ้น ซึ่งมีลักษณะกลม นูน ผิวด้าน อยู่ติดกับผิวหน้าอาหารสร้างสปอร์สีเทาขาว เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 5-1) เช่นเดียวกับเมื่อนำไปเลี้ยงใน Basal medium ที่มี 1% อินูลิน เชื้อจะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล และมีลักษณะเป็นเซลล์กลมๆ เล็กสีขาวขุ่น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย B
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 5-1 แสดงโคโลนีของ *Streptomyces* sp. CP01 ที่เจริญบน Basal medium ที่มี 1% อินูลิน (A) และ Mannitol soy agar (B)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน เพื่อนำมาปั่นเหวี่ยงแล้วทำการเก็บส่วนเซลล์ที่ได้มาสกัด
 จีโนมิกส์ด้วยชุด NucleoSpin Tissue kits ได้จีโนมิกส์ ดังรูปที่ 5-2 เพื่อนำจีโนมิกส์ใช้ในการทำ
 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสในการเพิ่มจำนวนชิ้นยืนประมวลรหัสอินูลิเนส



รูปที่ 5-2 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบจีโนมิกส์

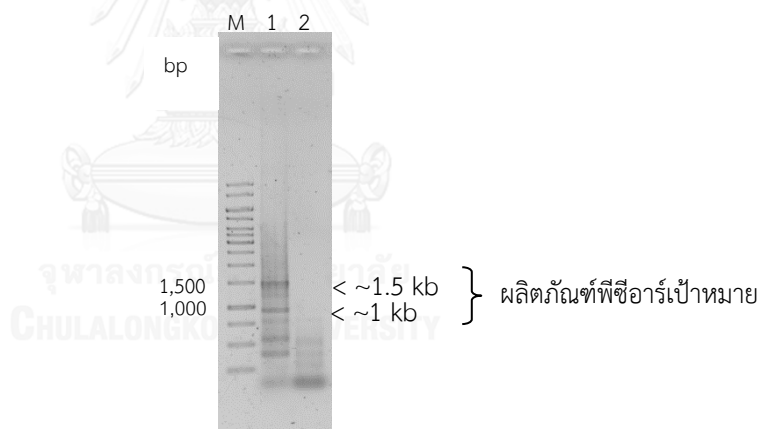
เลน M 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน) (Fermentas)

เลน 1-2 จีโนมิกส์จาก *Streptomyces* sp. CP01

เลน M2 lamda DNA/*Hin* dIII marker, 2 (200 ng/เลน) (Fermentas)

5.1.2 เพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำจีโนมิกส์ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ Degenerated Primers ที่ได้ทำการออกแบบจากลำดับของกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสบริเวณที่มีความเหมือนกันของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสจากแบคทีเรียด้วยไพรเมอร์ INU_A_F' กับ INU_G_R' (ตารางที่ 4-1) เพื่อเพิ่มชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสส่วน AG และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ซึ่งคาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ AG ที่ได้มีขนาด 1 และ 1.5 kb (รูปที่ 5-5) ขั้นตอนนี้สามารถเพิ่มชิ้นยีนซึ่งคาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสได้ แต่ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งนี้ใช้ Degenerated Primers โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์บางตัวมีโอกาสจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มากกว่า 1 ตัวเช่น M แทน A หรือ C ซึ่งสามารถจับกับ T หรือ G ได้ ตามลำดับ จึงส่งผลให้มีโอกาสไม่ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเพียงขนาดเดียว ซึ่งนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ AG ขนาด 1 และ 1.5 kb โคลนเข้า pJET 1.2/blunt Cloning vector ต่อไป

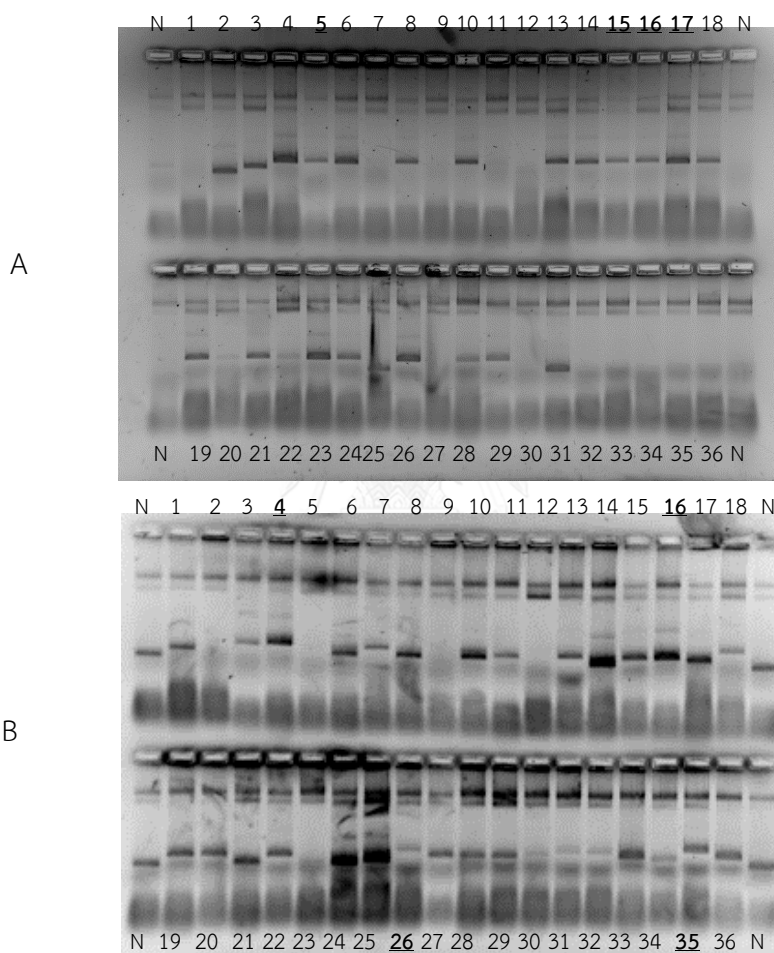


รูปที่ 5- 3 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

- เลน M 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน)
- เลน 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ INU_A_F' กับ INU_G_R'
- เลน 2 negative control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

5.1.3 โคลนยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส

โคลนยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส pJETAG ถ่ายโอนเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 alpha ด้วยวิธี heat shock และคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ โคลนเบื้องต้นด้วย Rapid size screening ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ 5-4 จึงได้ทำการคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJETAG1 โคลนที่ 5, 15, 16 และ 17 ส่วน pJETAG1.5 ได้เลือกโคลนที่ 4, 18, 26 และ 35 เพื่อนำไปทำการสกัดพลาสมิดด้วย CTAB



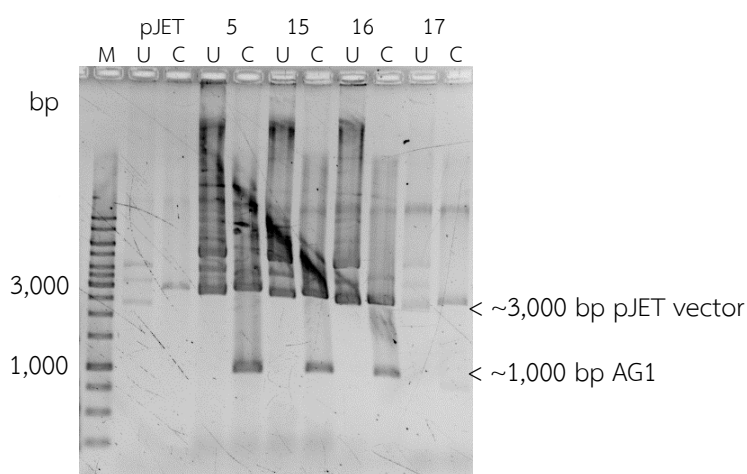
รูปที่ 5-4 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับ

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJETAG1 (1kb) (A) หรือ pJETAG1.5 (1.5kb) (B) ด้วย Rapid size screening

เลน N pJET plamid (ตัวควบคุมลบ)

เลน 1-36 *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pJETAG1 (A) หรือ pJETAG1.5 (B)

หลังจากได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJETAG1 คือโคลนที่ 5, 15, 16 และ 17 ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นด้วย Rapid size screening จึงนำมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Xba* I พบ ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนคือ pJET vector ~3,000 bp และยีนประมวลรหัสอินูลินเอส AG1 ขนาดประมาณ 1,000 bp (รูปที่ 5-5) แสดงว่าโคลนนั้นมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์อยู่ จากนั้นเลือกโคลน 5, 15 และ 16 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

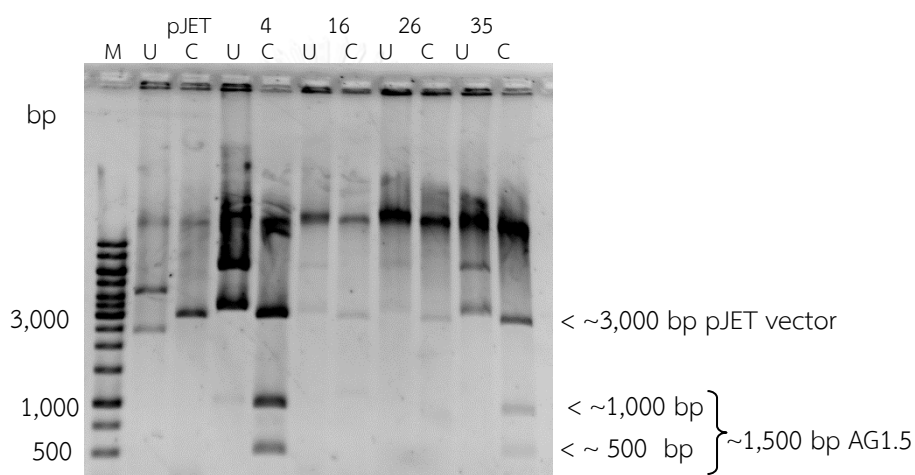


รูปที่ 5-5 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบพลาสมิด

pJETAG1 (1kb) ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Xba* I

- | | |
|-------------------|---|
| เลน M | 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน) |
| เลน pJET | พลาสมิด pJET |
| เลน 5, 15, 16, 17 | พลาสมิด pJETAG1 โคลน 5, 15, 16, 17 |
| เลน U | พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ |
| เลน C | พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ |

ส่วน pJETAG1.5 ได้เลือกโคลนที่ 4, 16, 26 และ 35 ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นด้วย Rapid size screening เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Xba* I (รูปที่ 5-6) แล้วได้ 3 ชิ้นส่วนนั้น คือ vector pJET ~3,000 bp และส่วนของยีนประมวลรหัสอินูลินเนส 2 ส่วน คือ ขนาด ~1,000 bp และ ~500 bp เนื่องจาก AG1.5 อาจจะมีบริเวณตัดจำเพาะ *Xho* I หรือ *Xba* I ดังนั้นเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I หรือ *Xba* I จึงได้ส่วนของยีนประมวลรหัสอินูลินเนส 2 ส่วน จากนั้นจึงนำโคลนที่ได้เลือกไว้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพลาสมิด pJETAG1.5 ซึ่งทำการส่งโคลน 4 และ 35 ไปวิเคราะห์ แต่เนื่องจากโคลนที่ 16 และ 26 สกัดพลาสมิดได้ปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์จึงส่งเพียง 2 โคลน คือ โคลนที่ 4 และ 35



รูปที่ 5-6 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบพลาสมิด

pJETAG1.5 (1.5kb) ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Xba* I

เลน M 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน)

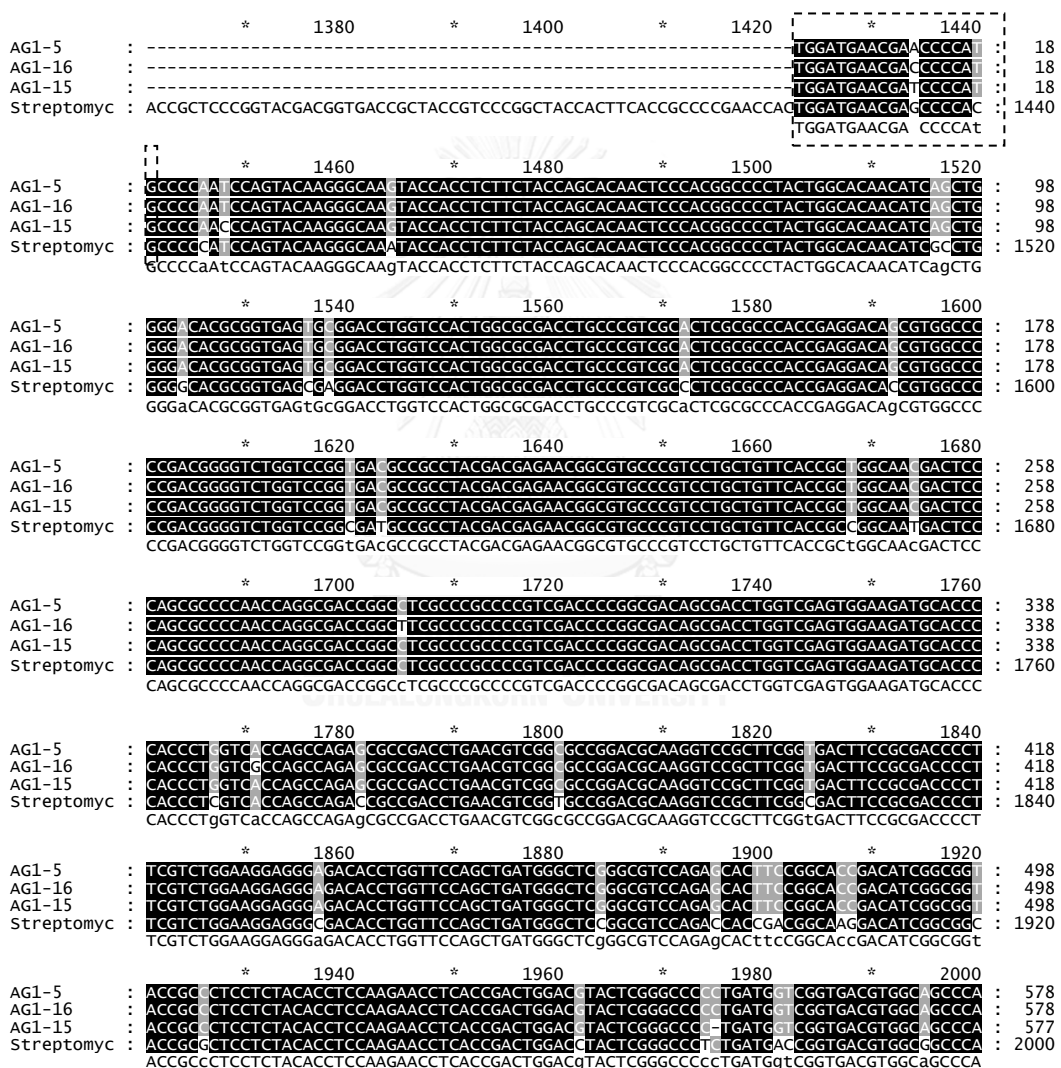
เลน pJET พลาสมิด pJET

เลน 4, 16, 26, 35 พลาสมิด pJETAG1 โคลน 4, 16, 26, 35

เลน U พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เลน C พลาสมิดที่ถูกตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากผลวิเคราะห์โคลน pJETAG1 ทั้งโคลน 5, 15 และ 16 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เหมือนกัน (รูปที่ 5-7) เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย Expsy Bioinformatics Resource Portal เมื่อนำกรดอะมิโนทั้ง 3 โคลนมาเปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 3 โคลนไม่เหมือนกันบางลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 5-8) นำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วย The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) พบว่าตรงกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 โดยลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นจะอยู่บริเวณ GH32_B_Fructosidase



รูปที่ 5-7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส AG1 ที่เชื่อมกับ pJET หมายถึง --- แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_A_F' และ แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_G_R'

```

AG1-5 : CCCAAGACCGGCCAGGTC TGGGAGCTGCCACCTTCCT CCCATCGG AAGGACGCCA GGCCGCGA GCCCGGCC : 658
AG1-16 : CCCAAGACCGGCCAGGTC TGGGAGCTGCCACCTTCCT CCCATCGG AAGGACGCCA GGCCGCGA GCCCGGCC : 658
AG1-15 : CCCAAGACCGGCCAGGTC TGGGAGCTGCCACCTTCCT CCCATCGG AAGGACGCCA GGCCGCGA GCCCGGCC : 657
Streptomyc : CCCAAGACCGGCCAGGTC TGGGAGCTGCCACCTTCCT CCCATCGG AAGGACGCCA GGCCGCGA GCCCGGCC : 2080
          CCCAAGACCGGCCAGGTC TGGGAGCTGCCACCTTCCT CCCATCGG AAGGACGCCA GGCCGCGA GCCCGGCC

AG1-5 : TGCTCGTCAACCCGGCCTTCCCCGCGGCCCGGCCGATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTCGGCACCTGGGAC : 738
AG1-16 : TGCTCGTCAACCCGGCCTTCCCCGCGGCCCGGCCGATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTCGGCACCTGGGAC : 738
AG1-15 : TGCTCGTCAACCCGGCCTTCCCCGCGGCCCGGCCGATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTCGGCACCTGGGAC : 737
Streptomyc : TGCTCGTCAACCCGGCCTTCCCCGCGGCCCGGCCGATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTCGGCACCTGGGAC : 2160
          TGCTCGTCAACCCGGCCTTCCCCGCGGCCCGGCCGATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTCGGCACCTGGGAC

AG1-5 : GCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA CCCC GGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCGG : 818
AG1-16 : GCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA CCCC GGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCGG : 818
AG1-15 : GCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA CCCC GGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCGG : 817
Streptomyc : GCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA CCCC GGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCGG : 2240
          GCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA CCCC GGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCGG

AG1-5 : AACGTGGACGACAAGGG CGCTCCCTCGTCTT CAGCATCGCCAGGACCG CGCACCGAACGCGCCCACTACGACGCGG : 898
AG1-16 : AACGTGGACGACAAGGG CGCTCCCTCGTCTT CAGCATCGCCAGGACCG CGCACCGAACGCGCCCACTACGACGCGG : 898
AG1-15 : AACGTGGACGACAAGGG CGCTCCCTCGTCTT CAGCATCGCCAGGACCG CGCACCGAACGCGCCCACTACGACGCGG : 897
Streptomyc : AACGTGGACGACAAGGG CGCTCCCTCGTCTT CAGCATCGCCAGGACCG CGCACCGAACGCGCCCACTACGACGCGG : 2320
          AACGTGGACGACAAGGG CGCTCCCTCGTCTT CAGCATCGCCAGGACCG CGCACCGAACGCGCCCACTACGACGCGG

AG1-5 : GCTGGGCCACAACGCGGGCCTGCCCATCGAACTGTCCATCGGC CGTTCGTCCTTCGCTCGGATTCGCGCCCGTGGAGGAG : 950
AG1-16 : GCTGGGCCACAACGCGGGCCTGCCCATCGAACTGTCCATCGGC CGTTCGTCCTTCGCTCGGATTCGCGCCCGTGGAGGAG : 950
AG1-15 : GCTGGGCCACAACGCGGGCCTGCCCATCGAACTGTCCATCGGC CGTTCGTCCTTCGCTCGGATTCGCGCCCGTGGAGGAG : 949
Streptomyc : GCTGGGCCACAACGCGGGCCTGCCCATCGAACTGTCCATCGGC CGTTCGTCCTTCGCTCGGATTCGCGCCCGTGGAGGAG : 2400
          GCTGGGCCACAACGCGGGCCTGCCCATCGAACTGTCCAT CGG tCgttcaTcca
    
```

รูปที่ 5-7 (ต่อเนือง)



AG1-5	:	-----	*	820	*	840	*	860	*	880	:	318																																																																		
AG1-16	:	-----									:	318																																																																		
Sam23877	:	EEVSR	L	H	T	G	E	P	L	L	D	I	S	T	P	T	T	L	A	D	A	N	T	R	L	A	G	I	K	G	D	M	L	H	I	K	L	T	L	E	R	G	S	A	D	T	F	G	L	D	V	L	R	S	P	G	D	E	E	R	T	R	L	F	Y	D	A	P	A	Q	L	G	V	D	R	T	:	878
AG1-15	:	-----									:	316																																																																		

AG1-5	:	-----	*	900	*	920	*	940	*	960	:	-																																																																					
AG1-16	:	-----									:	-																																																																					
Sam23877	:	R	S	G	N	S	S	A	E	P	G	F	I	H	K	G	P	L	A	L	S	H	G	T	L	T	L	D	V	F	L	D	R	S	M	V	E	A	Y	A	N	N	H	K	S	I	T	T	R	A	Y	P	F	R	Q	D	S	L	G	L	R	L	F	G	D	G	S	T	V	K	S	M	T	V	W	K	M	G	N	:	958
AG1-15	:	-----									:	-																																																																					

AG1-5	:	---	:	-
AG1-16	:	---	:	-
Sam23877	:	MTD	:	961
AG1-15	:	---	:	-

รูปที่ 5-8 (ต่อเนือง)



จากผลวิเคราะห์โคลน pJETAG1.5 ทั้งโคลน 4 แล 35 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันจำนวน มากบริเวณด้านท้ายของดีเอ็นเอ (รูปที่ 5-9) และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง 979-984 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ *Xho* I จึงทำให้ตัดได้ 2 ชิ้นส่วนยีนประมวลรหัสอินูลิเนส คือขนาด 1,000 bp และ 500 bp (รูปที่ 5-6) เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย Exspasy Bioinformatics Resource Portal และนำกรดอะมิโน ทั้ง 2 โคลนมาเปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 2 โคลนมีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกัน (รูปที่ 5-10) นำลำดับ กรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วย The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) พบว่าตรงกับ 6-phosphogluconate phosphatase จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งทั้ง 2 โคลนไม่ที่ เกี่ยวข้องกับยีนประมวลรหัสอินูลิเนส

```

AG15-4 : TGGATGAACGAACCCATGATCGGCGCCACGCACTCCGCGAGCAGCACAACTCCCCACAGACCGAGAAGACCCGCTCGG : 80
AG15-35 : TGGATGAACGAACCCATGATCGGCGCCACGCACTCCGCGAGCAGCACAACTCCCCACAGACCGAGAAGACCCGCTCGG : 38
          TGGATGAACGAACCATGATCGGCGCCACGCACTCCGCGAGCAGCACAACTCCCCACAGACCGAGAAGACCCGCTCGG

AG15-4 : CCCGCCGGAAGTCCACCGAGGCCCTCCCGGCCGCGGTACCGCCAGCAGCCGGTCCCACGAGCCTGCTTGGCCGCTCC : 160
AG15-35 : CCCGCCGGAAGTCCACCGAGGCCCTCCCGGCCGCGGTACCGCCAGCAGCCGGTCCCACGAGCCTGCTTGGCCGCTCC : 118
          CCCGCCGGAAGTCCACCGAGGCCCTCCCGGCCGCGGTACCGCCAGCAGCCGGTCCCACGAGCCTGCTTGGCCGCTCC

AG15-4 : CCCTTGACGAGGAAGGGCTTGAGAGCGGCCGTATCATCGGCCGCCAGCACCACCGACACCCAGGATCCCGATCCCGAT : 240
AG15-35 : CCCTTGACGAGGAAGGGCTTGAGAGCGGCCGTATCATCGGCCGCCAGCACCACCGACACCCAGGATCCCGATCCCGAT : 198
          CCCTTGACGAGGAAGGGCTTGAGAGCGGCCGTATCATCGGCCGCCAGCACCACCGACACCCAGGATCCCGATCCCGAT

AG15-4 : CGTGCTGCTGACACCGCTGCTCCTTGGCGAGCACAGCCGCGGATCCCGGAGACAAAGCTGAGCAGCAGCGACACGAGCT : 320
AG15-35 : CGTGCTGCTGACACCGCTGCTCCTTGGCGAGCACAGCCGCGGATCCCGGAGACAAAGCTGAGCAGCAGCGACACGAGCT : 278
          CGTGCTGCTGACACCGCTGCTCCTTGGCGAGCACAGCCGCGGATCCCGGAGACAAAGCTGAGCAGCAGCGACACGAGCT

AG15-4 : TCACGACCAGGATGAGCCCGGGAGCCGTTGGCCTTCCGCTCCCTGACTACCGCCACACGGTCCGCGCAGCCGGCACCC : 400
AG15-35 : TCACGACCAGGATGAGCCCGGGAGCCGTTGGCCTTCCGCTCCCTGACTACCGCCACACGGTCCGCGCAGCCGGCACCC : 358
          TCACGACCAGGATGAGCCCGGGAGCCGTTGGCCTTCCGCTCCCTGACTACCGCCACACGGTCCGCGCAGCCGGCACCC

AG15-4 : ACGTGCTCCAGGCGAGCGCCGCGAAGGTGCTCATCCCGAAGGGCTCCCGAAGAGGTAGTACGACCCGACAGGCACCGC : 480
AG15-35 : ACGTGCTCCAGGCGAGCGCCGCGAAGGTGCTCATCCCGAAGGGCTCCCGAAGAGGTAGTACGACCCGACAGGCACCGC : 438
          ACGTGCTCCAGGCGAGCGCCGCGAAGGTGCTCATCCCGAAGGGCTCCCGAAGAGGTAGTACGACCCGACAGGCACCGC

AG15-4 : CACGTCACGACCAAGGGGGCGGAAGGGTTCTGCGGCTTGTTCGCACTCGTCTGTCATGCCCTCAGCTTCCCGCCAC : 560
AG15-35 : CACGTCACGACCAAGGGGGCGGAAGGGTTCTGCGGCTTGTTCGCACTCGTCTGTCATGCCCTCAGCTTCCCGCCAC : 518
          CACGTCACGACCAAGGGGGCGGAAGGGTTCTGCGGCTTGTTCGCACTCGTCTGTCATGCCCTCAGCTTCCCGCCAC

AG15-4 : CGGGGGTCCCCCAGTAGAAAACGATCGTCCGGAGCTCGCCATGACAAATGTCAGCTACGAGGTACAGCAGCAGCCCCACC : 640
AG15-35 : CGGGGGTCCCCCAGTAGAAAACGATCGTCCGGAGCTCGCCATGACAAATGTCAGCTACGAGGTACAGCAGCAGCCCCACC : 598
          CGGGGGTCCCCCAGTAGAAAACGATCGTCCGGAGCTCGCCATGACAAATGTCAGCTACGAGGTACAGCAGCAGCCCCACC

```

รูปที่ 5-9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าเป็นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสAG1.5 ที่เชื่อมกับ

pJET

หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_A_F' และ แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_G_R'

CTCGAG แสดงบริเวณตัดจำเพาะ *Xho* I

AG15-4 : AAGTCCCCATGTCGGAGAAGAGTTGAGTGGCGTCGGCGAGCTTGTGGCGGGCGTCATGGCGGTGAACCCGTACACGTC : 720
AG15-35 : AAGTCCCCATGTCGGAGAAGAGTTGAGTGGCGTCGGCGAGCTTGTGGCGGGCGTCATGGCGGTGAACCCGTACACGTC : 678
AAGTCCCCATGTCGGAGAAGAGTTGAGTGGCGTCGGCGAGCTTGTGGCGGGCGTCATGGCGGTGAACCCGTACACGTC

AG15-4 : CATCCCGGGCCACAGCCGCCCGGACCCCGAGCGGACTGTCCTCGACGACGACACCCGCTCCGGCGTCACCCCATCC : 800
AG15-35 : CATCCCGGGCCACAGCCGCCCGGACCCCGAGCGGACTGTCCTCGACGACGACACCCGCTCCGGCGTCACCCCATCC : 758
CATCCCGGGCCACAGCCGCCCGGACCCCGAGCGGACTGTCCTCGACGACGACACCCGCTCCGGCGTCACCCCATCC

AG15-4 : GCTCGGCCGTACAGGAACAGATCCGGCGCCGGCTTCCCGCGCCACATCCTGCGAGCTGAAGATCCGGGACGCTCG : 880
AG15-35 : GCTCGGCCGTACAGGAACAGATCCGGCGCCGGCTTCCCGCGCCACATCCTGCGAGCTGAAGATCCGGGACGCTCG : 838
GCTCGGCCGTACAGGAACAGATCCGGCGCCGGCTTCCCGCGCCACATCCTGCGAGCTGAAGATCCGGGACGCTCG

AG15-4 : AACCACCGTCCAGCCCGTCGTCGATGCCACCCGAAATCCGCTCATGACTCCCGGACGAGGCCACGAGTACGGCAC : 960
AG15-35 : AACCACCGTCCAGCCCGTCGTCGATGCCACCCGAAATCCGCTCATGACTCCCGGACGAGGCCACGAGTACGGCAC : 918
AACCACCGTCCAGCCCGTCGTCGATGCCACCCGAAATCCGCTCATGACTCCCGGACGAGGCCACGAGTACGGCAC

AG15-4 : TCCCGCCCGGCCAGCTTCTCGAGCACATCCACCGCCCGCCACAGGCTTCAGCTCCCGCTCGAACCGCTCAAACACCC : 1040
AG15-35 : TCCCGCCCGGCCAGCTTCTCGAGCACATCCACCGCCCGCCACAGGCTTCAGCTCCCGCTCGAACCGCTCAAACACCC : 998
TCCCGCCCGGCCAGCTTCTCGAGCACATCCACCGCCCGCCACAGGCTTCAGCTCCCGCTCGAACCGCTCAAACACCC

AG15-4 : GCCCGTGAAGACGTCGTCGAACCTCCGCGGCAACCGCTCCCGCTACGCTCCAGCACAGATCATGGATCCGATGCATC : 1120
AG15-35 : GCCCGTGAAGACGTCGTCGAACCTCCGCGGCAACCGCTCCCGCTACGCTCCAGCACAGATCATGGATCCGATGCATC : 1078
GCCCGTGAAGACGTCGTCGAACCTCCGCGGCAACCGCTCCCGCTACGCTCCAGCACAGATCATGGATCCGATGCATC

AG15-4 : GCGGACCCCATGAGTCCCAGATGAGTCCCTCGTACGAAGCGGATGCCCGAGTTCCGTCAGATAGGGGGCCAGCAATCG : 1200
AG15-35 : GCGGACCCCATGAGTCCCAGATGAGTCCCTCGTACGAAGCGGATGCCCGAGTTCCGTCAGATAGGGGGCCAGCAATCG : 1158
GCGGACCCCA GTAGTCCCAGATG AGTCCCTCGTACGA G CGGATGCCCGAGTTCCGTCAGATAGGGGGCCAGCAATCG

AG15-4 : ATTGGAGATCGGTTCACTGTCCAGAGGAACCCGTCATTGCGGAAATACCCAAGTCTTACCGATAACCTTGAGCCTAA : 1280
AG15-35 : ATTGGAGATCGGTTCACTGTCCAGAGGAACCCGTCATTGCGGAAATACCCAAGTCTTACCGATAACCTTGAGCCTAA : 1238
ATTGGAGATCGG TCACTGTCCAC AGGA CCGTCATTG CGAA AT CCA GTC TA C ATAACCTTGAGCCTAA

AG15-4 : ACCGAATAAAGCCGGCCCGGAACCGGTGCGGGGTTTTTCAAAATTTTGTGGGCGGTTCC--TATTCCCAAGGGTCC : 1356
AG15-35 : ACCGAATAAAGCCGGCCCGGAACCGGTGCGGGGTTTTTCAAAATTTTGTGGGCGGTTCC--TATTCCCAAGGGTCC : 1318
AC A AAAACC GC C GAACCGGTGCGGGG TTT TCAAATTTT TCGG GG TA T CCAAGGGTCC

AG15-4 : -CCTGGATCAGCTCCGGCGTTGAAAGGTTAATCTCCCGGTTCCGAAATTAACCGGGCGGTTCCCTCA--GCTATTGACAC : 1433
AG15-35 : -CCTGGATCAGCTCCGGCGTTGAAAGGTTAATCTCCCGGTTCCGAAATTAACCGGGCGGTTCCCTCA--GCTATTGACAC : 1398
CCTG A AC TCGGCGCT AA G TTA TCC GG TCG AA T ACCGGGCG TTCC GCTAT CAC

AG15-4 : CGAAACAATTGGATCTC--GAACATCGCGGG-ATAACCGGACCGTGGTGAAGGTTGTCTACTTCTAGAAACCAAA : 1510
AG15-35 : CGAAACAATTGGATCTC--GAACATCGCGGG-ATAACCGGACCGTGGTGAAGGTTGTCTACTTCTAGAAACCAAA : 1466
CGAAACA T TG A CT AACAT CGC TA CG GACC TGG GG T TC C

AG15-4 : TATCCCGGAGAAAGGTCTTTTATCACAATCGT : 1544
AG15-35 : ----- : -

รูปที่ 5-9 (ต่อเนือง)

```

AG15-4 : WMNEPHDPRHALREQHNSPHDREDPLGPPEVHRGLPGRGTAQQVPRSLGRVPLDEEGLESGRHHRPPQHHRHQDPDPD : 80
AG15-35 : WMNE-----PHDREDPLGPPEVHRGLPGRGTAQQVPRSLGRVPLDEEGLESGRHHRPPQHHRHQDPDPD : 66
          WMNE-----PHDREDPLGPPEVHRGLPGRGTAQQVPRSLGR6PLDEEGLESGRHHRPPQHHRHQDPDPD

          *          20          *          40          *          60          *          80

AG15-4 : RAADHAVLGEHQPRIPGDKAEQQRHDVHDQDEPGEVPLPLPDYRPHGPRSRHHAAPGERREGAHPGEVPEEVVRPDRHR : 160
AG15-35 : RAADHAVLGEHQPRIPGDKAEQQRHDVHDQDEPGEVPLPLPDYRPHGPRSRHHAAPGERREGAHPGEVPEEVVRPDRHR : 146
          RAADHAVLGEHQPRIPGDKAEQQRHDVHDQDEPGEVPLPLPDYRPHGPRSRHHAAPGERREGAHPGEVPEEVVRPDRHR

          *          100         *          120         *          140         *          160

AG15-4 : HVQDQGAEGVLRLVRTRRRHALSFPPTGGPPVETIVRSSP-QMSATRSQQQPHQVPHVGEELSGVGELVGGRHGGEPVHV : 239
AG15-35 : HVQYLGAEGVLRLVRTRRRHALSFPPTGGPPVETIVRSSP-QMSATRSQQQPHQVPHVGEELSGVGELVGGRHGGEPVHV : 225
          HVQ GAEGVLR LVRTRRRHALSFPPTGGPPVETIVRSSP QMSATRSQQQPHQVPHVGEELSGV GELVGGRHGGEPVHV

          *          180         *          200         *          220         *          240

AG15-4 : HPGRHSRDPQRTVLDDDTPLRRHPHPLGRVQEIQRRRLPPPHILRAEDPRRLEPPVQPRRPMHPNPLMTPGRGHAVRH : 319
AG15-35 : HPGRHSRDPQRTVLDDDTPLRRHPHPLGRVQEIQRRRLPPPHILRAEDPRRLEPPVQPRRPMHPNPLMTPGRGHAVRH : 305
          HPGRHSRDPQRTVLDDDTPLRRHPHPLGRVQEIQRRRLPPPHILRAEDPRRLEPPVQPRRPMHPNPLMTPGRGHAVRH

          *          260         *          280         *          300         *          320

AG15-4 : SRPGQLLEHIHRAAHLQLPLERVKHPPVKDVVELRGQPLPRTLQHQIMDPMHRGPHVVPDVLVRSRMPEFRQIGGQQS : 399
AG15-35 : SRPGQLLEHIHRAAHLQLPLERVKHPPVKDVVELRGQPLPRTLQHQIMDPMHRGPHVVPDQLVLRGRMPEFRQIGGQQS : 385
          SRPGQLLEHIHRAAHLQLPLERVKHPPVKDVVELRGQPLPRTLQHQIMDPMHRGPHVVPD VLVLR RMPEFRQIGGQQS

          *          340         *          360         *          380         *          400

AG15-4 : IGDRVTVHKEPVIGENTQVLPDNLEPKPKKPGPEPVRGFFKFLSAVLFPK-GSPGSRSALERLISRVEN-PGSSAI--- : 474
AG15-35 : IGDRVTVHEDTVIVEDHQVIAHNLEPKRRKPRTEEPVRGFKFCSAASYSPTGSPLQYH---RR--CKA-LPQSECNRAFP : 459
          IGDR6TVH VI E1 QV6 NLEPK 4KP EPVRGF KF S 5 GSP R PG

          *          420         *          440         *          460         *          480

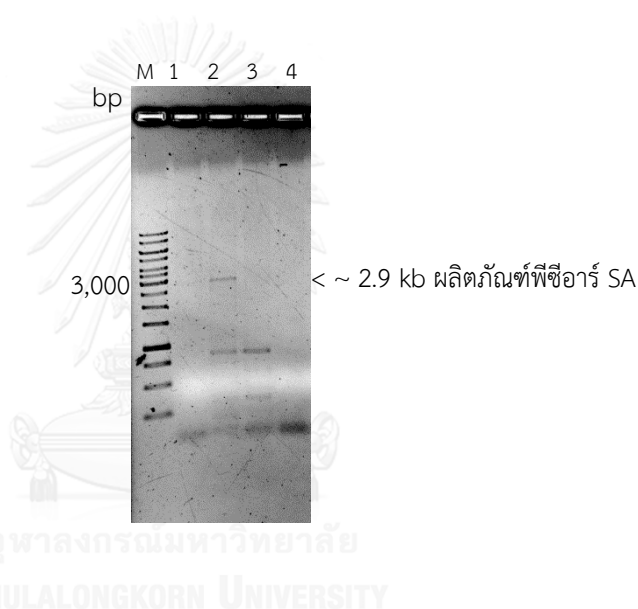
AG15-4 : ---DTETIWISNIARTGPW-RVVSTSRNOISAGERSFTI : 511
AG15-35 : SRYDHRNTMKLSNMPH-----HTVMACGSFI : 486
          T6 6SN6 63 SFI
    
```

รูปที่ 5-10 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนที่คาดว่าเป็ยีนประมวลรหัสอินูลิเนสAG1.5 ที่เชื่อมกับ pJET

หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_A_F' และ "" แสดงบริเวณไพรเมอร์ INU_G_R'

ดังนั้นจึงให้ความสนใจกับโคลน pJETAG1 เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 ในการศึกษาต่อไปจึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 เป็นต้นแบบ (GenBank Accession number AM238663) เพื่อให้ได้ยีนประมวลรหัสอินูลิเนสทั้งหมด

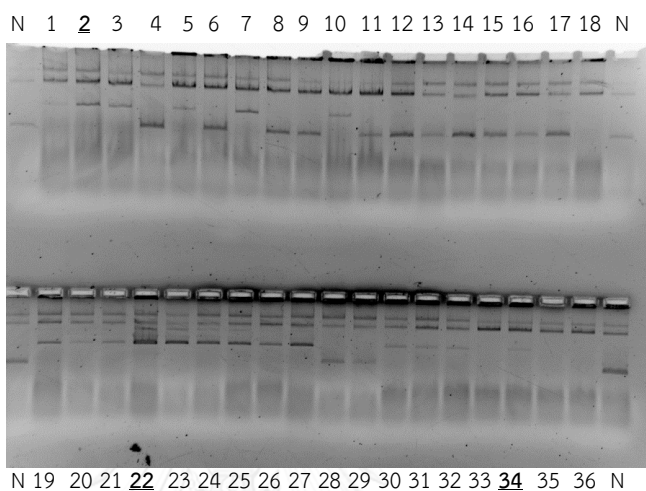
เมื่อได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่จากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนหน้านี้ จึงนำมาทำการเพิ่มขึ้น ยีนประมวลรหัสอินนูลิเนส เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 4.1.2 เพียงแต่ใช้ไพรเมอร์ strep-amboF' คู่กับ strep-amboR' (ตารางที่ 4-1) และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ซึ่งคาดว่าเป็นยีนประมวลรหัส อินนูลิเนส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐานได้แสดงดังรูปที่ 5-11 พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ SA ขนาดประมาณ 2,900 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 ส่วนขนาด 900 bp เป็นผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะ strep-amboR' เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่ใช่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ ต้องการ จึงทำการตัดเจล บริเวณขนาด 2,900 bp เพื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เฉพาะขนาด 2,900 bp มาทำการเชื่อมกับ pGEM-T Easy และทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Rapid size screening ต่อไป



รูปที่ 5-11 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ SA

เลน M	1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน)
เลน 1	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จาก strep-amboF'
เลน 2	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จาก strep-amboF' คู่กับ strep-amboR'
เลน 3	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จาก strep-amboR'
เลน 4	negative control (น้ำกลั่น)

เมื่อนำชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนสมาเชื่อมกับ pGEM-T Easy และถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α จากนั้นทำการคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMSA (รูปที่ 5-12) คือ โคลนที่ 2, 22 และ 34 เพื่อนำไปทำการสกัดพลาสมิดด้วย CTAB จากนั้นตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I ต่อไป



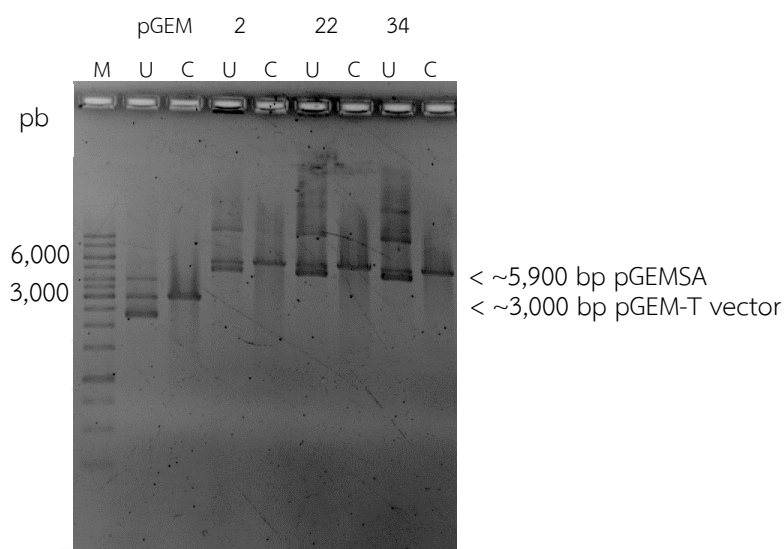
รูปที่ 5-12 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก *E. coli*

ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMSA ด้วย Rapid size screening

เลน N pGEM-T plasmid

เลน 1-36 *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMSA

หลังจากได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMSA คือโคลนที่ 2, 22 และ 34 ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นเบื้องต้นด้วย Rapid size screening เรียบร้อย จึงนำมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I (รูปที่ 5-13) พบว่าได้เวกเตอร์ pGEM-T ขนาดประมาณ 3,000 bp เชื่อมต่อกับ SA ที่มีขนาดประมาณ 2,900 bp ดังนั้นจึงมีขนาดรวมประมาณ 5,900 bp แสดงว่าโคลนนี้นั้นมียื่นที่ต้องการอยู่ จึงนำ pGEMSA โคลน 2, 22, 34 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

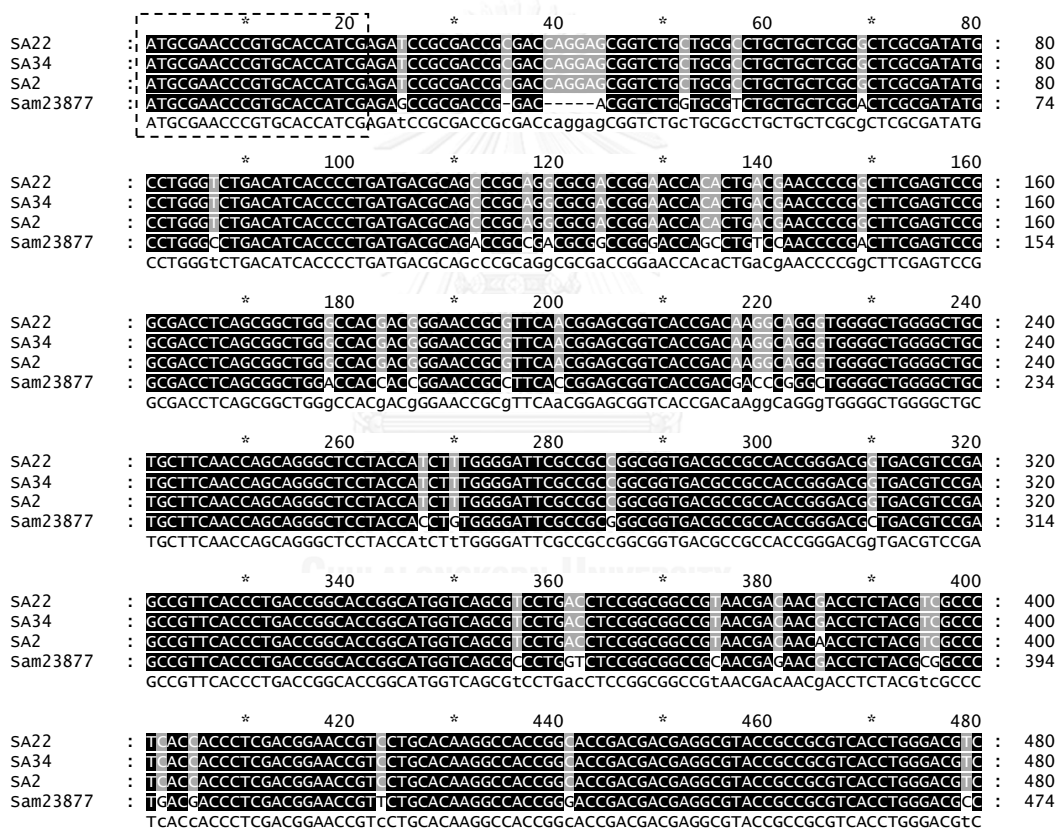


รูปที่ 5-13 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ

พลาสมิด pGEMSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I

เลน M	1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน)
เลน pGEM	พลาสมิด pGEM-T
เลน 2, 22, 34	พลาสมิด pGEMSA โคลน 2, 22, 34
เลน U	พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดจำเพาะ
เลน C	พลาสมิดที่ถูกตัดจำเพาะ

จากการส่งรีคอมบีแนนท์โคลน PGEMSA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega (รูปที่ 5-14) พบว่า โคลน pGEMSA 2 , 22 และ 34 เมื่อสังเกตุในบริเวณที่ลำดับ นิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไป จะพบว่า SA2 ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนบริเวณตำแหน่ง C ไปเป็น T จำนวน 6 ตำแหน่ง คือบริเวณที่ 879, 1,554, 1,806, 1,933, 2,612 และ 2,692 เปลี่ยนจาก C ไปเป็น G จำนวน 2 ตำแหน่ง คือบริเวณที่ 1,923 และ 2,019 และเปลี่ยนจาก C ไปเป็น A จำนวน 1 ตำแหน่ง คือบริเวณที่ 385 ส่วน SA22 มีการเปลี่ยนบริเวณตำแหน่ง G ไปเป็น A บริเวณที่ 556 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น G บริเวณที่ 623 จาก C ไปเป็น T บริเวณที่ 723 และ T ไปเป็น C บริเวณที่ 2,743 ส่วน SA34 พบบริเวณที่เปลี่ยนไปคือ A ไปเป็น G มากถึง 3 ตำแหน่ง คือบริเวณที่ 1322, 1751, 1817 พบ T ไปเป็น C ที่บริเวณ 1,259 และพบ C เปลี่ยนไปเป็น T ที่บริเวณ 672



รูปที่ 5-14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนสที่เชื่อมกับ pGEM-T
 หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ strep-amboF' และ แสดงบริเวณไพรเมอร์ strep-amboR'

```

SA22      :   *      500      *      520      *      540      *      560
SA22      :   CGCGA  CACCTCGGC  AGCAACTGCGCGT  CACCG  CGT  GACAAGGCCACCGGGGGTGGGGCCACATCAACCTCAACGA  : 560
SA34      :   CGCGA  CACCTCGGC  AGCAACTGCGCGT  CACCG  CGT  GACAAGGCCACCGGGGGTGGGGCCACATCAACCTCAACGA  : 560
SA2       :   CGCGA  CACCTCGGC  AGCAACTGCGCGT  CACCG  CGT  GACAAGGCCACCGGGGGTGGGGCCACATCAACCTCAACGA  : 560
Sam23877  :   CGCGAA  CACCTCGGC  AGCAACTGCGCGT  CACCGT  CGT  GACAAGGCCACCGGGGGTGGGGCCACATCAACCTCAACGA  : 554
           CGCGAgCACCTCGGCgAGCAACTGCGCGTCAACCGcCGTgACAAGGCCACCGGGGGTGGGGCCACATCAACCTCgACGA

SA22      :   *      580      *      600      *      620      *      640
SA22      :   CGTCCGCGTGGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCC  AGCGGGGACTCGCCGCCCACTGGG  GTTCA  CGAGGGG  AGG  : 640
SA34      :   CGTCCGCGTGGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCC  AGCGGGGACTCGCCGCCCACTGGG  GTTCA  CGAGGGG  AGG  : 640
SA2       :   CGTCCGCGTGGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCC  AGCGGGGACTCGCCGCCCACTGGG  GTTCA  CGAGGGG  AGG  : 640
Sam23877  :   CGTCCGCGTGGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCC  AGCGGGGACTCGCCGCCCACTGGG  GTTCA  CGAGGGG  AGG  : 634
           CGTCCGCGTGGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCgAGCGGGGACTCGCCGCCCACTGGGgATTCAgCGAGGGGcAGG

SA22      :   *      660      *      680      *      700      *      720
SA22      :   GCACCACGACC  GGGAGAAGGT  CAGCCAGGC  GCCGA  CCC  TCAGCTACGTCTTCA  CGACGCGCAGTACAAGCCCGAC  : 720
SA34      :   GCACCACGACC  GGGAGAAGGT  CAGCCAGGC  GCCGA  CCC  TCAGCTACGTCTTCA  CGACGCGCAGTACAAGCCCGAC  : 720
SA2       :   GCACCACGACC  GGGAGAAGGT  CAGCCAGGC  GCCGA  CCC  TCAGCTACGTCTTCA  CGACGCGCAGTACAAGCCCGAC  : 720
Sam23877  :   GCACCACGACC  GGGAGAAGGT  CAGCCAGGC  GCCGA  CCC  TCAGCTACGTCTTCA  CGACGCGCAGTACAAGCCCGAC  : 714
           GCACCACGACCcGGGAGAAGGTcAGCCAGGCcGCCGATcCCcATcAGCTACGTCTTCAcGACGCGCAGTACAAGCCCGAc

SA22      :   *      740      *      760      *      780      *      800
SA22      :   AGTGACCCGCTCTGGGCGCCGAAGAACGA  GCCGACGG  GT  CTC  CCGGGGC  CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTG  : 800
SA34      :   AGTGACCCGCTCTGGGCGCCGAAGAACGA  GCCGACGG  GT  CTC  CCGGGGC  CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTG  : 800
SA2       :   AGTGACCCGCTCTGGGCGCCGAAGAACGA  GCCGACGG  GT  CTC  CCGGGGC  CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTG  : 800
Sam23877  :   AGTGACCCGCTCTGGGCGCCGAAGAACGA  GCCGACGG  GT  CTC  CCGGGGC  CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTG  : 794
           AGcGACCCGCTCTGGGCGCCGAAGAACGAgGCCGACGGTgTgCTCgCCGGCGCCCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTG

SA22      :   *      820      *      840      *      860      *      880
SA22      :   GGTACCCCGCCCGCG  C  CAGAC  CAGCTGCCACCGGACGGCCTGACCGT  GAGGC  TGGGT  CGG  CC  CGCGCGTT  G  : 880
SA34      :   GGTACCCCGCCCGCG  C  CAGAC  CAGCTGCCACCGGACGGCCTGACCGT  GAGGC  TGGGT  CGG  CC  CGCGCGTT  G  : 880
SA2       :   GGTACCCCGCCCGCG  C  CAGAC  CAGCTGCCACCGGACGGCCTGACCGT  GAGGC  TGGGT  CGG  CC  CGCGCGTT  G  : 880
Sam23877  :   GGTACCCCGCCCGCG  C  CAGAC  CAGCTGCCACCGGACGGCCTGACCGT  GAGGC  TGGGT  CGG  CC  CGCGCGTT  G  : 874
           GGTACCCCGCCCGCGcCaCAGAcGcAGCTGCCACCGGACGGCCTGACCGTgGAGGcGtGGGTTCGgCcCaCGCGCGTTCG

SA22      :   *      900      *      920      *      940      *      960
SA22      :   AGTGGGGAGACGACGGCAAACCGT  C  GCCG  CGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCG  GGC  TCTCCCTCGG  GTC  : 960
SA34      :   AGTGGGGAGACGACGGCAAACCGT  C  GCCG  CGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCG  GGC  TCTCCCTCGG  GTC  : 960
SA2       :   AGTGGGGAGACGACGGCAAACCGT  C  GCCG  CGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCG  GGC  TCTCCCTCGG  GTC  : 960
Sam23877  :   AGTGGGGAGACGACGGCAAACCGT  C  GCCC  TCGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCG  GGC  TCTCCCTCGG  GTC  : 954
           AGTGGGGAGACGACGGCAAACCGTcCGCCCGCTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCGgGcTCTCCCTCGGtGTC

SA22      :   *      980      *      1000      *      1020      *      1040
SA22      :   GGCCGACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGG  ACCGGCGACCGCTGG  ACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC  GG  AGCCCT  : 1040
SA34      :   GGCCGACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGG  ACCGGCGACCGCTGG  ACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC  GG  AGCCCT  : 1040
SA2       :   GGCCGACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGG  ACCGGCGACCGCTGG  ACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC  GG  AGCCCT  : 1040
Sam23877  :   GGCCGACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGG  ACCGGCGACCGCTGG  ACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC  GG  AGCCCT  : 1034
           GGCCGACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGGAcCCGGCGACCGCTGGtACGAGGTGACGGTCCCGAAGCCcCGAcGCCCT

SA22      :   *      1060      *      1080      *      1100      *      1120
SA22      :   GGCCGCGGGCAAGTGGGGCACCTGT  C  GCCGTGTTTCGG  CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCT  AACGGCGA  C  : 1120
SA34      :   GGCCGCGGGCAAGTGGGGCACCTGT  C  GCCGTGTTTCGG  CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCT  AACGGCGA  C  : 1120
SA2       :   GGCCGCGGGCAAGTGGGGCACCTGT  C  GCCGTGTTTCGG  CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCT  AACGGCGA  C  : 1120
Sam23877  :   GGCCGCGGGCAAGTGGGGCACCTGT  C  GCCGTGTTTCGG  CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCT  AACGGCGA  G  : 1114
           GGCCGCGGGCAAGTGGGGCACCTGTcAgCGGTGTTTCGCCcCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCTcAACGGCGAc

SA22      :   *      1140      *      1160      *      1180      *      1200
SA22      :   AGGTGCGCC  AG  CCGCC  TCCCCACCC  CCGCGCG  CTG  CCAAGGCCGACGTTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAG  : 1200
SA34      :   AGGTGCGCC  AG  CCGCC  TCCCCACCC  CCGCGCG  CTG  CCAAGGCCGACGTTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAG  : 1200
SA2       :   AGGTGCGCC  AG  CCGCC  TCCCCACCC  CCGCGCG  CTG  CCAAGGCCGACGTTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAG  : 1200
Sam23877  :   AGGTGCGCC  AG  CCGCC  TCCCCACCC  CCGCGCG  CTG  CCAAGGCCGACGTTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAG  : 1194
           AGGTGCGCCAgAcCGCCATCCCCACcAcCGCGGcGtGAcCAAGGCCGACGTTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAG

SA22      :   *      1220      *      1240      *      1260      *      1280
SA22      :   CCGCG  ATCATCAAGGGCACGTT  CGCCGTCAACATGTTCAACGG  CTCATCGACGAGG  GAAGATCCACAACAG  GCCCT  : 1280
SA34      :   CCGCG  ATCATCAAGGGCACGTT  CGCCGTCAACATGTTCAACGG  CTCATCGACGAGG  GAAGATCCACAACAG  GCCCT  : 1280
SA2       :   CCGCG  ATCATCAAGGGCACGTT  CGCCGTCAACATGTTCAACGG  CTCATCGACGAGG  GAAGATCCACAACAG  GCCCT  : 1280
Sam23877  :   CCGCG  ATCATCAAGGGCACGTT  CGCCGTCAACATGTTCAACGG  CTCATCGACGAGG  GAAGATCCACAACAG  GCCCT  : 1274
           CCGCGcATCATCAAGGGCACGTTcCGCCGTCAACATGTTCAACGGtCTCATCGACGAGGtGAAGATCCACAACAGtGCCCT

SA22      :   *      1300      *      1320      *      1340      *      1360
SA22      :   C  CCCCC  GC  GCGGT  CACGGCCGG  CACCAGAAGGACGTAC  GACCTTCGG  GG  GGC  CCACCCCCAAGGCCGGATGG  : 1360
SA34      :   C  CCCCC  GC  GCGGT  CACGGCCGG  CACCAGAAGGACGTAC  GACCTTCGG  GG  GGC  CCACCCCCAAGGCCGGATGG  : 1360
SA2       :   C  CCCCC  GC  GCGGT  CACGGCCGG  CACCAGAAGGACGTAC  GACCTTCGG  GG  GGC  CCACCCCCAAGGCCGGATGG  : 1360
Sam23877  :   C  CCCCC  GC  GCGGT  CACGGCCGG  CACCAGAAGGACGTAC  GACCTTCGG  GG  GGC  CCACCCCCAAGGCCGGATGG  : 1354
           CaCCCCgCCCGGTcACGGCCGGtCACCAGAAGGACGTAcAgACCTTCGcAgGGgGGcGcCCACCCCCAAGGCCGGATGG

```

รูปที่ 5-14 (ต่อเนือง)

```

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
SA22      : AGATGGACCGTTCGCGTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1440
SA34      : AGATGGACCGTTCGCGTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1440
SA2       : AGATGGACCGTTCGCGTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1440
Sam23877  : AGATGGACCGTTCGCGTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1434
AGATGGACCGTTCGCGTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
SA22      : CCCACGCCCCATCCAGTACAAGGGCAAATACCACCTCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1520
SA34      : CCCACGCCCCATCCAGTACAAGGGCAAATACCACCTCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1520
SA2       : CCCACGCCCCATCCAGTACAAGGGCAAATACCACCTCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1520
Sam23877  : CCCACGCCCCATCCAGTACAAGGGCAAATACCACCTCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT : 1514
CCCACGCCCCATCCAGTACAAGGGCAAATACCACCTCTTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAACAT

*      1540      *      1560      *      1580      *      1600
SA22      : CAGCTGGGGCAGCGGGTGAGCGGGACCTGGTCACTGGCGGACCTGCCCGTCGCTCGCGCCCAACCGAGGACAAGCG : 1600
SA34      : CAGCTGGGGCAGCGGGTGAGCGGGACCTGGTCACTGGCGGACCTGCCCGTCGCTCGCGCCCAACCGAGGACAAGCG : 1600
SA2       : CAGCTGGGGCAGCGGGTGAGCGGGACCTGGTCACTGGCGGACCTGCCCGTCGCTCGCGCCCAACCGAGGACAAGCG : 1600
Sam23877  : CAGCTGGGGCAGCGGGTGAGCGGGACCTGGTCACTGGCGGACCTGCCCGTCGCTCGCGCCCAACCGAGGACAAGCG : 1594
CagCTGGGGCAGCGGGTGAGCGGGACCTGGTCACTGGCGGACCTGCCCGTCGCTCGCGCCCAACCGAGGACAAGCG

*      1620      *      1640      *      1660      *      1680
SA22      : TGGCCCCGACGGGGTCTGGTCCGGGAGGCCGCTACGACGAGAACGGCGTCCCGTCTGCTGTTACCGCGGCAAT : 1680
SA34      : TGGCCCCGACGGGGTCTGGTCCGGGAGGCCGCTACGACGAGAACGGCGTCCCGTCTGCTGTTACCGCGGCAAT : 1680
SA2       : TGGCCCCGACGGGGTCTGGTCCGGGAGGCCGCTACGACGAGAACGGCGTCCCGTCTGCTGTTACCGCGGCAAT : 1680
Sam23877  : TGGCCCCGACGGGGTCTGGTCCGGGAGGCCGCTACGACGAGAACGGCGTCCCGTCTGCTGTTACCGCGGCAAT : 1674
TGGCCCCGACGGGGTCTGGTCCGGGAGGCCGCTACGACGAGAACGGCGTCCCGTCTGCTGTTACCGCGGCAAT

*      1700      *      1720      *      1740      *      1760
SA22      : GACTCCAGCGCCCCAACCGAGGCGACGGGCTCGCCCGCCCGTCCGACCCCGGCGACAGCGACTGGTCCGCTGGAAGAT : 1760
SA34      : GACTCCAGCGCCCCAACCGAGGCGACGGGCTCGCCCGCCCGTCCGACCCCGGCGACAGCGACTGGTCCGCTGGAAGAT : 1760
SA2       : GACTCCAGCGCCCCAACCGAGGCGACGGGCTCGCCCGCCCGTCCGACCCCGGCGACAGCGACTGGTCCGCTGGAAGAT : 1760
Sam23877  : GACTCCAGCGCCCCAACCGAGGCGACGGGCTCGCCCGCCCGTCCGACCCCGGCGACAGCGACTGGTCCGCTGGAAGAT : 1754
GACTCCAGCGCCCCAACCGAGGCGACGGGCTCGCCCGCCCGTCCGACCCCGGCGACAGCGACTGGTCCGCTGGAAGAT

*      1780      *      1800      *      1820      *      1840
SA22      : GCACCCACCCCTGTCAACGAGCCAGAGCGCCGACCTGAACGTCGCGCCGACGCAAGGTCCGCTTCGGGACTTCCGCG : 1840
SA34      : GCACCCACCCCTGTCAACGAGCCAGAGCGCCGACCTGAACGTCGCGCCGACGCAAGGTCCGCTTCGGGACTTCCGCG : 1840
SA2       : GCACCCACCCCTGTCAACGAGCCAGAGCGCCGACCTGAACGTCGCGCCGACGCAAGGTCCGCTTCGGGACTTCCGCG : 1840
Sam23877  : GCACCCACCCCTGTCAACGAGCCAGAGCGCCGACCTGAACGTCGCGCCGACGCAAGGTCCGCTTCGGGACTTCCGCG : 1834
GCACCCACCCCTGTCAACGAGCCAGAGCGCCGACCTGAACGTCGCGCCGACGCAAGGTCCGCTTCGGGACTTCCGCG

*      1860      *      1880      *      1900      *      1920
SA22      : ACCCCTTCGCTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACTTCGGGCAAGGACATC : 1920
SA34      : ACCCCTTCGCTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACTTCGGGCAAGGACATC : 1920
SA2       : ACCCCTTCGCTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACTTCGGGCAAGGACATC : 1920
Sam23877  : ACCCCTTCGCTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACTTCGGGCAAGGACATC : 1914
ACCCCTTCGCTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACTTCGGGCAAGGACATC

*      1940      *      1960      *      1980      *      2000
SA22      : GGGGGTACCGGCTCTCTACACCTCCAAGAACCTCACGACTGGAGCTACTCGGGCCCCTGATGAGTCCGGTACGCTGGC : 2000
SA34      : GGGGGTACCGGCTCTCTACACCTCCAAGAACCTCACGACTGGAGCTACTCGGGCCCCTGATGAGTCCGGTACGCTGGC : 2000
SA2       : GGGGGTACCGGCTCTCTACACCTCCAAGAACCTCACGACTGGAGCTACTCGGGCCCCTGATGAGTCCGGTACGCTGGC : 2000
Sam23877  : GGGGGTACCGGCTCTCTACACCTCCAAGAACCTCACGACTGGAGCTACTCGGGCCCCTGATGAGTCCGGTACGCTGGC : 1994
GGGGGTACCGGCTCTCTACACCTCCAAGAACCTCACGACTGGAGCTACTCGGGCCCCTGATGAGTCCGGTACGCTGGC

*      2020      *      2040      *      2060      *      2080
SA22      : AGCCACCCCAAGACCGGACAGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGAAGCGCC : 2080
SA34      : AGCCACCCCAAGACCGGACAGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGAAGCGCC : 2080
SA2       : AGCCACCCCAAGACCGGACAGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGAAGCGCC : 2080
Sam23877  : AGCCACCCCAAGACCGGACAGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGAAGCGCC : 2074
AGCCACCCCAAGACCGGACAGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGAAGCGCC

*      2100      *      2120      *      2140      *      2160
SA22      : GGGCCCTGCTCTCAACCCGGCCTTCCCAGCCGCCCCGGCGAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGTCCGGCAC : 2160
SA34      : GGGCCCTGCTCTCAACCCGGCCTTCCCAGCCGCCCCGGCGAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGTCCGGCAC : 2160
SA2       : GGGCCCTGCTCTCAACCCGGCCTTCCCAGCCGCCCCGGCGAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGTCCGGCAC : 2160
Sam23877  : GGGCCCTGCTCTCAACCCGGCCTTCCCAGCCGCCCCGGCGAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGTCCGGCAC : 2154
GGGCCCTGCTCTCAACCCGGCCTTCCCAGCCGCCCCGGCGAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGTCCGGCAC

*      2180      *      2200      *      2220      *      2240
SA22      : TGGGACGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCAACCGAACCCCGGCTCATGGACTACGGGACCACTTACCAGGCC : 2240
SA34      : TGGGACGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCAACCGAACCCCGGCTCATGGACTACGGGACCACTTACCAGGCC : 2240
SA2       : TGGGACGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCAACCGAACCCCGGCTCATGGACTACGGGACCACTTACCAGGCC : 2240
Sam23877  : TGGGACGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCAACCGAACCCCGGCTCATGGACTACGGGACCACTTACCAGGCC : 2234
TGGGACGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCAACCGAACCCCGGCTCATGGACTACGGGACCACTTACCAGGCC

*      2260      *      2280      *      2300      *      2320
SA22      : CAGCGGAACGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTACGATCGCCCAAGGACCGCGCACCGAAGCGCCCACTACG : 2320
SA34      : CAGCGGAACGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTACGATCGCCCAAGGACCGCGCACCGAAGCGCCCACTACG : 2320
SA2       : CAGCGGAACGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTACGATCGCCCAAGGACCGCGCACCGAAGCGCCCACTACG : 2320
Sam23877  : CAGCGGAACGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTACGATCGCCCAAGGACCGCGCACCGAAGCGCCCACTACG : 2314
CAGCGGAACGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTACGATCGCCCAAGGACCGCGCACCGAAGCGCCCACTACG

```

รูปที่ 5-14 (ต่อเนือง)

```

*      2340      *      2360      *      2380      *      2400
SA22 : ACGCCGGCTGGGCCACAACGGGGCTGCCATCGAACTGTCCATGCGGGCCGACGG GACCTCGGATTCGGCCCGCT : 2400
SA34 : ACGCCGGCTGGGCCACAACGGGGCTGCCATCGAACTGTCCATGCGGGCCGACGG GACCTCGGATTCGGCCCGCT : 2400
SA2  : ACGCCGGCTGGGCCACAACGGGGCTGCCATCGAACTGTCCATGCGGGCCGACGG GACCTCGGATTCGGCCCGCT : 2400
Sam23877 : ACGCCGGCTGGGCCACAACGGGGCTGCCATCGAACTGTCCATGCGGGCCGACGG GACCTCGGATTCGGCCCGCT : 2394
          ACGCCGGCTGGGCCACAACGGGGCTGCCATCGAACTGTCCATGCGGGCCGACGGaGACCTCGGATTCGGCCCGCTc

*      2420      *      2440      *      2460      *      2480
SA22 : GAGGAGGTCCTCCGCCT CACACCGGCGAACC CTCCTGGACATCAGC GAAC ACC CTC CCGACGCCAACACCCG : 2480
SA34 : GAGGAGGTCCTCCGCCT CACACCGGCGAACC CTCCTGGACATCAGC GAAC ACC CTC CCGACGCCAACACCCG : 2480
SA2  : GAGGAGGTCCTCCGCCT CACACCGGCGAACC CTCCTGGACATCAGC GAAC ACC CTC CCGACGCCAACACCCG : 2480
Sam23877 : GAGGAGGTCCTCCGCCT CACACCGGCGAACC CTCCTGGACATCAGC GAAC ACC CTC CCGACGCCAACACCCG : 2474
          GAGGAGGTCCTCCGCCTcCACACCGGCGAACCgCTCCTGGACATCAGCgaaCCaCCtCCTCaCCGACGCCAACACCCG

*      2500      *      2520      *      2540      *      2560
SA22 : CCTGGCCGGCTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT GAG ATGGAACGGCGAGCGCCGACACCTTCGG CTCGACG : 2560
SA34 : CCTGGCCGGCTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT GAG ATGGAACGGCGAGCGCCGACACCTTCGG CTCGACG : 2560
SA2  : CCTGGCCGGCTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT GAG ATGGAACGGCGAGCGCCGACACCTTCGG CTCGACG : 2560
Sam23877 : CCTGGCCGGCTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT GAG ATGGAACGGCGAGCGCCGACACCTTCGG CTCGACG : 2554
          CCTGGCCGGCTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTgAcgATGGAACGGCGAGCGCCGACACCTTCGGgCTCGGgCTCGACG

*      2580      *      2600      *      2620      *      2640
SA22 : TACTCCGACGCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCT TTCTACGACGC CT CGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGACG : 2640
SA34 : TACTCCGACGCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCT TTCTACGACGC CT CGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGACG : 2640
SA2  : TACTCCGACGCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCT TTCTACGACGC CT CGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGACG : 2640
Sam23877 : TACTCCGACGCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCT TTCTACGACGC CT CGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGACG : 2634
          TaTCTCCGACGCCgGgGACGAAGAACGCACCCGCCTgTTCTACGACGCtCCCGAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGACG

*      2660      *      2680      *      2700      *      2720
SA22 : CGTCCGGGAACAACCTCCAG GCCGA CCGAA CTTCGG ATCCACAA GGC CG TTG CTCTCC ACGGCACCCCTGAC : 2720
SA34 : CGTCCGGGAACAACCTCCAG GCCGA CCGAA CTTCGG ATCCACAA GGC CG TTG CTCTCC ACGGCACCCCTGAC : 2720
SA2  : CGTCCGGGAACAACCTCCAG GCCGA CCGAA CTTCGG ATCCACAA GGC CG TTG CTCTCC ACGGCACCCCTGAC : 2720
Sam23877 : CGTCCGGGAACAACCTCCAG GCCGA CCGAA CTTCGG ATCCACAA GGC CG TTG CTCTCC ACGGCACCCCTGAC : 2714
          CgATCCGGGAACAACCTCCAGcGCCGAgCCgaaCTTCGGATCCACAAAGGCCcGtTGaCgCTCTCCaACGGCACCCCTGAC

*      2740      *      2760      *      2780      *      2800
SA22 : CTCGACGTGTTCTCGACCCG CGATGGTCGAGGGCTACGGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCGCTACCCCT : 2800
SA34 : CTCGACGTGTTCTCGACCCG CGATGGTCGAGGGCTACGGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCGCTACCCCT : 2800
SA2  : CTCGACGTGTTCTCGACCCG CGATGGTCGAGGGCTACGGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCGCTACCCCT : 2800
Sam23877 : CTCGACGTGTTCTCGACCCG CGATGGTCGAGGGCTACGGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCGCTACCCCT : 2794
          aCTCGACGTGTTCTCGACCCGtCGATGGTCGAGGGCTACGGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCGCTACCCCT

*      2820      *      2840      *      2860      *      2880
SA22 : TCCGCCAGGACTCCCT GGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAAC : 2880
SA34 : TCCGCCAGGACTCCCT GGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAAC : 2880
SA2  : TCCGCCAGGACTCCCT GGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAAC : 2880
Sam23877 : TCCGCCAGGACTCCCT GGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAAC : 2874
          TCCGCCAGGACTCCCTcGGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGtGTcGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAAC

*
SA22 : ATGACCGACTGA : 2892
SA34 : ATGACCGACTGA : 2892
SA2  : ATGACCGACTGA : 2892
Sam23877 : ATGACCGACTGA : 2886
          ATGACCGACTGA

```

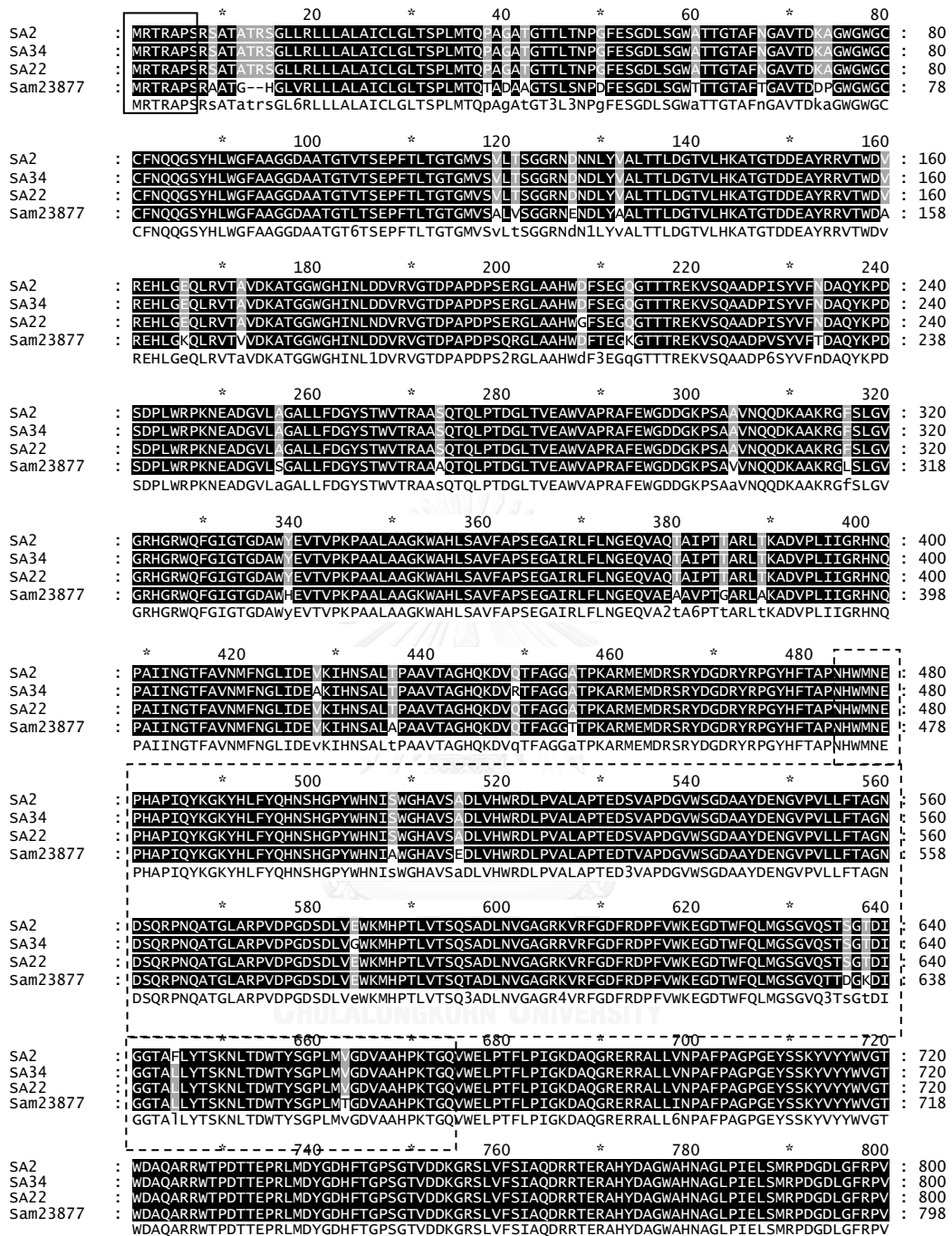
รูปที่ 5-14 (ต่อเนือง)

จากรูปที่ 5-14 จะพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปจำนวนมาก เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย ExPasy Bioinformatics Resource Portal และนำกรดอะมิโนทั้ง 3 โคลนมาเปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 3 โคลนมีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกัน (รูปที่ 5-15) SA2 มีกรดอะมิโนที่เป็น active site โดยแสดงในกรอบ ---- เปลี่ยนจาก Leucine ไปเป็น Phenylalanine ในตำแหน่งที่ 645 ส่วนบริเวณ glycosyl hydrolase จะแสดงในกรอบ เปลี่ยนจาก Proline เปลี่ยนเป็น Leucine ในตำแหน่งที่ 871 และ Proline เปลี่ยนเป็น Serine ในตำแหน่งที่ 898

ใน SA22 มีกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปคือบริเวณ active site ลำดับกรดอะมิโนไม่เปลี่ยนไป พบในบริเวณ glycosyl hydrolase 1 ตำแหน่ง คือ Serine เปลี่ยนเป็น Proline ในตำแหน่งที่ 915 นอกจากนี้พบบริเวณอื่นๆ คือ Aspartic เปลี่ยนเป็น Glycine ตำแหน่งที่ 208

ใน SA34 ในบริเวณ active site เปลี่ยนจาก Glutamic acid ไปเป็น Glycine ที่ตำแหน่ง 585 นอกจากนั้นบริเวณอื่นๆ ในตำแหน่งที่ Valine เปลี่ยนเป็น Alanin ที่บริเวณ 420 เปลี่ยนจาก Glutamine เป็น Arginine ที่ตำแหน่ง 441 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วย The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) พบว่า ใกล้เคียงกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 มากที่สุด

ดังนั้นจึงเลือก SA22 และ SA34 มาทำการทดลองต่อไปเพื่อผลิตโปรตีนอินูลิเนส เนื่องจาก SA2 มีตำแหน่งที่ต่างกับโคลนอื่นมากที่สุดในบริเวณ active site และ glycosyl hydrolase จึงไม่นำมาทำการทดลองต่อ จึงได้เลือกโคลน SA22 และ SA34 มาทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 5-15 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลินเอสที่เชื่อมกับ pGEM-T

- หมายเหตุ
- แสดงบริเวณไพรเมอร์ strep-amboF
 - - - - แสดงบริเวณไพรเมอร์ strep-amboR'
 - แสดงบริเวณ active site
 - แสดงบริเวณ glycosyl hydrolase


```

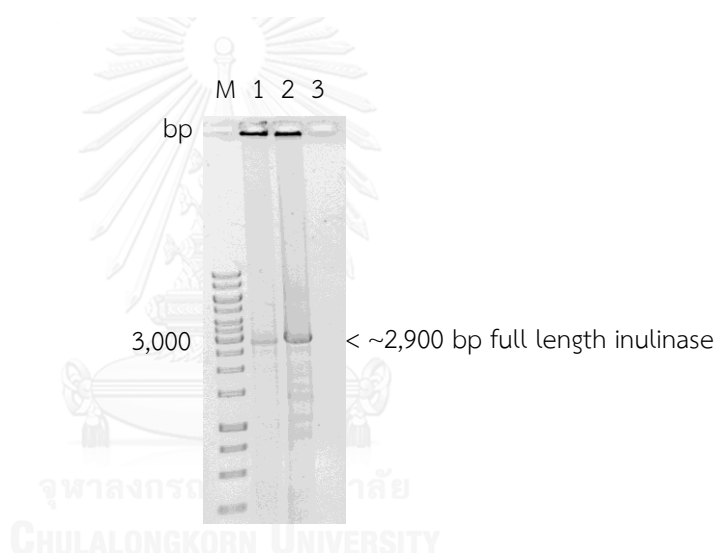
      *      820      *      840      *      860      *      880
SA2      : EEVSR|LHTGE|PLLD|IS|PTSL|DAN|TRL|AGV|KGD|ML|HI|KL|T|MER|GS|AD|T|FG|LD|V|LR|SP|G|DE|ER|TR|L|FY|DA|AG|QL|G|VD|RT|      880
SA34     : EEVSR|LHTGE|PLLD|IS|PTSL|DAN|TRL|AGV|KGD|ML|HI|KL|T|MER|GS|AD|T|FG|LD|V|LR|SP|G|DE|ER|TR|L|FY|DA|AG|QL|G|VD|RT|      880
SA22     : EEVSR|LHTGE|PLLD|IS|PTSL|DAN|TRL|AGV|KGD|ML|HI|KL|T|MER|GS|AD|T|FG|LD|V|LR|SP|G|DE|ER|TR|L|FY|DA|AG|QL|G|VD|RT|      880
Sam23877 : EEVSR|LHTGE|PLLD|IS|PTSL|DAN|TRL|AGV|KGD|ML|HI|KL|T|MER|GS|AD|T|FG|LD|V|LR|SP|G|DE|ER|TR|L|FY|DA|AG|QL|G|VD|RT|      878
          EEVSR|LHTGE|PLLD|IS|PTSL|DAN|TRL|AGV|KGD|ML|HI|KL|T|MER|GS|AD|T|FG|LD|V|LR|SP|G|DE|ER|TR|L|FY|DA|AG|QL|G|VD|RT|
      *      900      *      920      *      940      *      960      - - - -
SA2      : RSGN|SSAEP|N|FG|IH|K|G|L|L|S|N|G|T|L|D|V|F|V|DR|M|VE|AY|ANN|HK|S|IT|TR|AY|PF|RQ|DS|L|GL|RL|FG|DG|S|VK|SM|TV|WK|MG|N|      960
SA34     : RSGN|SSAEP|N|FG|IH|K|G|L|L|S|N|G|T|L|D|V|F|V|DR|M|VE|AY|ANN|HK|S|IT|TR|AY|PF|RQ|DS|L|GL|RL|FG|DG|S|VK|SM|TV|WK|MG|N|      960
SA22     : RSGN|SSAEP|N|FG|IH|K|G|L|L|S|N|G|T|L|D|V|F|V|DR|M|VE|AY|ANN|HK|S|IT|TR|AY|PF|RQ|DS|L|GL|RL|FG|DG|S|VK|SM|TV|WK|MG|N|      960
Sam23877 : RSGN|SSAEP|N|FG|IH|K|G|L|L|S|N|G|T|L|D|V|F|V|DR|M|VE|AY|ANN|HK|S|IT|TR|AY|PF|RQ|DS|L|GL|RL|FG|DG|S|VK|SM|TV|WK|MG|N|      958
          RSGN|SSAEP|N|FG|IH|K|G|L|L|S|N|G|T|L|D|V|F|V|DR|M|VE|AY|ANN|HK|S|IT|TR|AY|PF|RQ|DS|L|GL|RL|FG|DG|S|VK|SM|TV|WK|MG|N|
          - - - -
SA2      : MTD      : 963
SA34     : MTD      : 963
SA22     : MTD      : 963
Sam23877 : MTD      : 961
          MTD
    
```

รูปที่ 5-15 (ต่อเนือง)



5.1.4 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกใน *E. coli*

จากผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน pGEMSA ทั้ง 3 โคลน มีความใกล้เคียงกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 มากที่สุดจึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ คือ full inulinaseF' และ full inulinaseR' โดยเพิ่มส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I ไพรเมอร์ full inulinaseF' และ full inulinaseR' ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) ซึ่งผลการเพิ่มจำนวนยีนประมวลรหัส full length cDNA inulinase SA22 และ SA34 มีขนาดประมาณ 2,900 bp (รูปที่ 5-16) จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I เพื่อนำไปเชื่อมกับเวกเตอร์ที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* ต่อไป

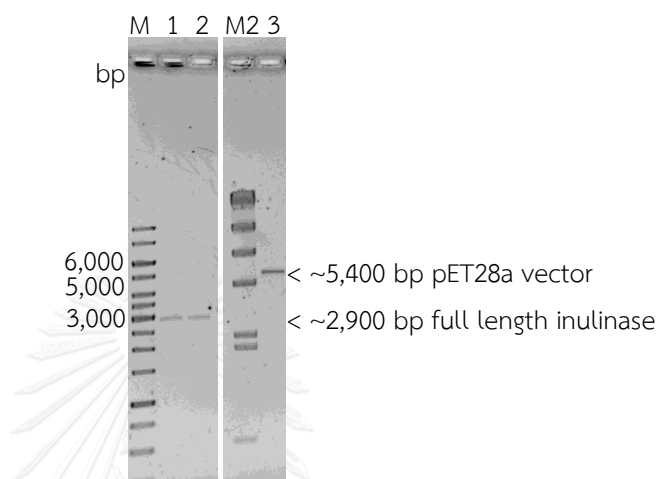


รูปที่ 5-16 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophore เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

full length inulinase

- | | |
|-------|--|
| เลน M | 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน) |
| เลน 1 | ชิ้นยีนประมวลรหัส full length inulinase โดยใช้ SA22 เป็นต้นแบบ |
| เลน 2 | ชิ้นยีนประมวลรหัส full length inulinase โดยใช้ SA34 เป็นต้นแบบ |
| เลน 3 | negative control (น้ำกลั่น) |

เมื่อได้ยีนประมวลรหัสอินูลินเนสทั้ง SA22, SA34 มีขนาดประมาณ 2,900 bp และ pET28a มีขนาดประมาณ 5,400 bp นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I เรียบร้อย (รูปที่ 5-17) จากนั้นทำการเชื่อมกันด้วย T4 DNA ligase และถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5 alpha ทำการคัดเลือกโคลน pET28a-SA22 และ pET28a-SA34

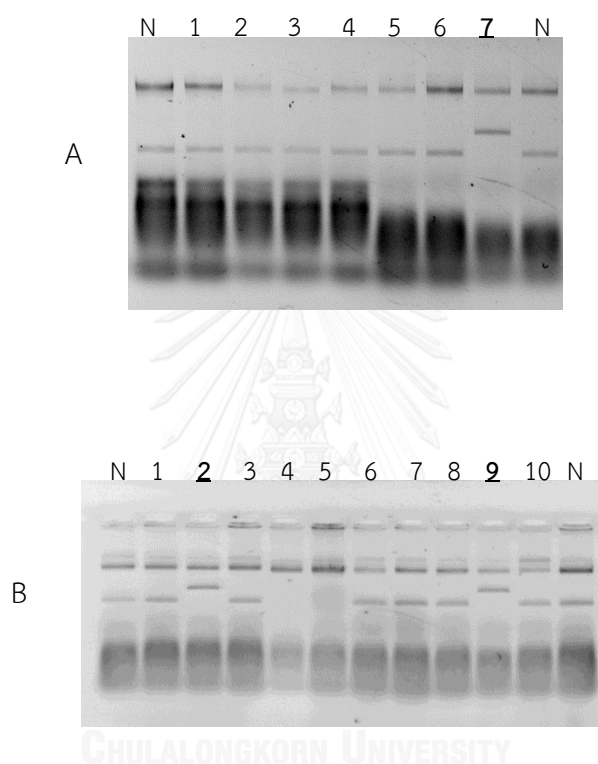


รูปที่ 5-17 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เมื่อตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

- | | |
|--------|---|
| เลน M | 1 kb DNA Ladder (200ng/เลน) |
| เลน 1 | ชิ้นยีนประมวลรหัส SA22 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I |
| เลน 2 | ชิ้นยีนประมวลรหัส SA34 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I |
| เลน 3 | เวกเตอร์ pET28a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I |
| เลน M2 | lamda DNA/ <i>Hin</i> dIII marker, 2 (200ng/เลน) |

จากการตรวจสอบการคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนสเบื้องต้นด้วย Rapid size screening (รูปที่ 5-18) พบว่า pET28a-SA22 ได้ โคลนที่ 7 (A) ส่วน pET28a-SA34 ได้ โคลน 2 และ 9 (B) จึงได้นำแต่ละโคลนมาสกัดพลาสมิดด้วย CTAB นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อวิเคราะห์ว่ามียีนประมวลรหัสอินูลิเนสเชื่อมอยู่กับ pET28a ต่อไป

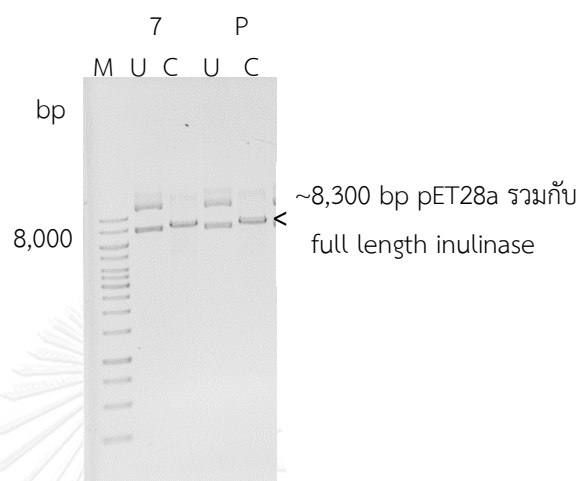


รูปที่ 5-18 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 (A) หรือ SA34 (B) ด้วย Rapid size screening

เลน N พลาสมิด pET28a

เลน 1-10 *E. coli* ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-SA22 (A) หรือ pET28a-SA34 (B)

เมื่อทำการตัดพลาสมิด pET28a-SA22 โคลน 7 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I (รูปที่ 5-19) พบว่ามีขนาดประมาณ 8,300 bp ซึ่งตรงกับขนาดพลาสมิด pET28a(+) ประมาณ 5,400 bp รวมกับ SA22 ขนาดประมาณ 2,900 bp แสดงว่าโคลนนี้นั้นมียีนประมวลรหัสอินูลิเนสอยู่ จึงนำโคลนที่ได้เลือกไว้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

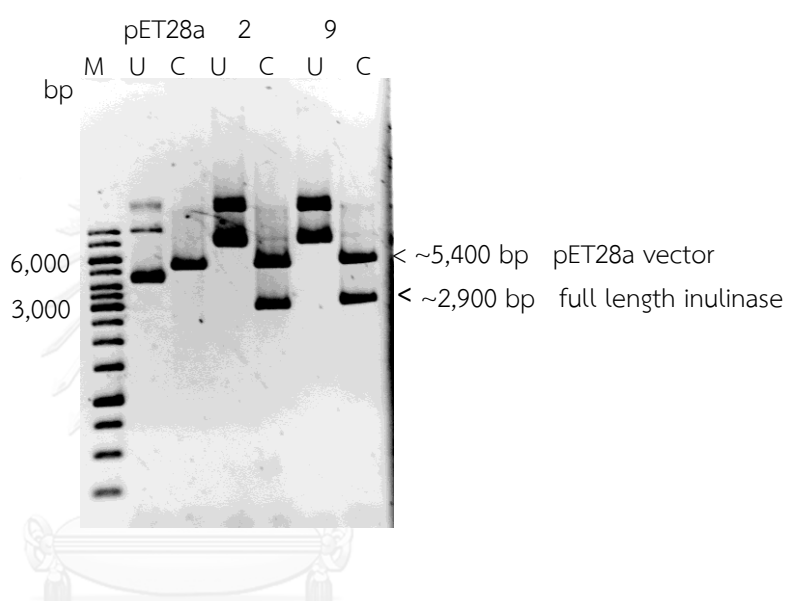


รูปที่ 5-19 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis แสดงการแยกพลาสมิด

pET28a-SA22 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I

- | | |
|-------|---|
| เลน M | 1 kb DNA Ladder (200 ng/เลน) |
| เลน 7 | pET28a-SA2 clone 7 |
| เลน P | pET28a-SA34 clone 2 (positive control) |
| เลน U | พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ |
| เลน C | พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ |

เมื่อทำการตัด pET28a-SA34 ทั้งโคลน 2 และ 9 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I (รูปที่ 5-20) แล้ว ได้ส่วนของเวกเตอร์ pET28a ขนาดประมาณ 5,400 bp มา เชื่อมต่อกับ SA34 ขนาดประมาณ 2,900 bp ซึ่งเมื่อรวมขนาดทั้ง 2 มีประมาณ 8,300 bp ตรงกับโคลนของ pET28a-SA22 แสดงว่าโคลนนี้นั้นมียีนประมวลรหัสอินูลิเนสอยู่ จึงนำโคลนที่ได้เลือกไว้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้งโคลน pGEMSA22 โคลน 7 และ pGEMSA34 โคลน 2 และ 9 ต่อไป



รูปที่ 5-20 แสดงผลการรัน 0.8% agarose gel electrophoresis แสดงตรวจสอบพลาสมิด

pET28a-SA34 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

เลน M	200 ng 1 kb DNA Ladder
เลน pET28a	พลาสมิด pET28a
เลน 2, 9	pET28a-SA34 โคลน 2, 9
เลน U	พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
เลน C	พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการส่งรีคอมบิแนนท์โคลน pET28a-SA22 โคลนที่ 7 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
เปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega (รูปที่ 5-21) เห็นได้ว่า pET28a-SA22 โคลนที่ 7 มีลำดับ
นิวคลีโอไทด์เหมือนกับต้นแบบคือ SA22

```

Sam23877 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----] 5
pET28SA22-7 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGGGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCGAACCCTGCAATGCGG] 80
SA22 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----] 5
ATGCGG]

Sam23877 : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----] 79
pET28SA22-7 : AACCCGTGCACCATCGAGATCGCGGACCGGACCGGACCGGCTCTGGTCTGCTGCTCGGACTCGCGATATGCGTGG] 160
SA22 : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----] 85
AACCCGTGCACCATcgagatCcgcgacCCGCAcCagagCGGTCTGcTGCGcCTGCTGCTCGcGcTcCGCGATATGCGTGG]

Sam23877 : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----] 159
pET28SA22-7 : GCTGTGACATCACCCCTGATGACGCAGCCGGGCGCGGACCGGACCGGCTCTGCAACCCCGACTTCGAGTCCGGCGAC] 240
SA22 : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----] 165
GCTGTGACATCACCCCTGATGACGCAGCCGGGCGCGGACCGGACCGGCTCTGCAACCCCGACTTCGAGTCCGGCGAC]
GtCTGACATCACCCCTGATGACGCAGCCGGGCGCGGACCGGACCGGACCGGCTCTGcTGCGcCTGCTGCTCGcGcTcCGCGATATGCGTGG]

Sam23877 : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----] 239
pET28SA22-7 : CTCAGCGGCTGGCCACACCGGAACCGCTTCAcCGGAGCGGTACCGAcAcCGCGGCTGGGGTGGGGTCTGCTGCT] 320
SA22 : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----] 245
CTCAGCGGCTGGCCACACCGGAACCGCTTCAcCGGAGCGGTACCGAcAcCGCGGCTGGGGTGGGGTCTGCTGCT]
CTCAGCGGCTGGcCCAcAcCGGAACCGCTTCAcCGGAGCGGTACCGAcAcCGCGGCTGGGGTGGGGTCTGCTGCT]

Sam23877 : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----] 319
pET28SA22-7 : CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGACGCTGACGTCGAGCCGT] 400
SA22 : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----] 325
CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGACGCTGACGTCGAGCCGT]
CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGACGcTGACGTCGAGCCGT]

Sam23877 : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----] 399
pET28SA22-7 : TCACCCTGACCCGGCACCCGCATGGTCAAGCTCTCGGGGGCGCAACGAGAACGACCTTACCGCGCCCTGACG] 480
SA22 : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----] 405
TCACCCTGACCCGGCACCCGCATGGTCAAGCTCTCGGGGGCGCAACGAGAACGACCTTACCGCGCCCTGACCG]
TCACCCTGACCCGGCACCCGCATGGTCAAGCTCTCGGGGGCGCTAACGAGAACGACCTTACCGCTTACCGCTTACCG]

Sam23877 : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----] 479
pET28SA22-7 : ACCCTCGACGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGGACGAGGGGTACCGCCCGCTCACTGGGACG] 560
SA22 : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----] 485
ACCCTCGACGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGGACGAGGGGTACCGCCCGCTCACTGGGACG]
ACCCTCGACGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGGACGAGGGGTACCGCCCGCTCACTGGGACGTC]

Sam23877 : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----] 559
pET28SA22-7 : ACACCTCGGAGGCAACTGCGCGTCAACCGTCTGAGCAAGGCCACCGGCGGTGGGGCCACATCAACCTCA] 640
SA22 : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----] 565
ACACCTCGGAGGCAACTGCGCGTCAACCGTCTGAGCAAGGCCACCGGCGGTGGGGCCACATCAACCTCA]
gCACTCGGcGAGCAACTGCGCGTCAACCGCTGAGCAAGGCCACCGGCGGTGGGGCCACATCAACCTCAACGAGCTCC]

Sam23877 : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----] 639
pET28SA22-7 : GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGACTTCAcGAGGGG] 720
SA22 : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----] 645
GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGACTTCAcGAGGGG]
GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGcTTCAgCAGGGGcAGGGcACC]

Sam23877 : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----] 719
pET28SA22-7 : ACGACCGGGAGAAGGTGAGCCAGGCCCGGACCGCTCAGCTACGCTTTCAcGACGGCAGTACAAGCCCGAC] 800
SA22 : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----] 725
ACGACCGGGAGAAGGTGAGCCAGGCCCGGACCGCTCAGCTACGCTTTCAcGACGGCAGTACAAGCCCGAC]
ACGACCCGGGAGAAGGTGAGCCAGGCCCGGATCCcATCAGCTACGCTTTCAcGACGGCAGTACAAGCCCGACAGTGA]

Sam23877 : -----*-----820-----*-----840-----*-----860-----*-----880-----] 799
pET28SA22-7 : CCCGCTCTGGCCCGGAAAGAACGAAGCCGACGGCTACTCTCCGGCGCGCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA] 880
SA22 : -----*-----820-----*-----840-----*-----860-----*-----880-----] 805
CCCGCTCTGGCCCGGAAAGAACGAAGCCGACGGCTACTCTCCGGCGCGCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA]
CCCGCTCTGGCCCGGAAAGAACGAgCCGACGGTGTgCTCgCCGGCGcCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA]

```

รูปที่ 5-21 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 ที่เชื่อมกับ pET28a
หมายเหตุ --- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinaseF' และ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full
inulinaseR'

Sam23877 : CCCGCGCCGGCgCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTcGAGGCATGGGTCCGACCGCGCCGTCGAGTGG : 879
pET28SA22-7 : CCCGCGCCGGCgCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTcGAGGCATGGGTCCGACCGCGCCGTCGAGTGG : 960
SA22 : CCCGCGCCGGCgCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTcGAGGCATGGGTCCGACCGCGCCGTCGAGTGG : 885
CCCGCGCCGGCgCaCAGACgCAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTgGAGGCgTGGGTCCGgCCaCGCGCTTCGAGTGG

Sam23877 : GGAGACGACGGCAAAACCGTcGCCGcGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCGcGGCCTCTCCCTCGcGTCGGCCG : 959
pET28SA22-7 : GGAGACGACGGCAAAACCGTcGCCGcGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCGcGGCCTCTCCCTCGcGTCGGCCG : 1040
SA22 : GGAGACGACGGCAAAACCGTcGCCGcGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCGcGGCCTCTCCCTCGcGTCGGCCG : 965
GGAGACGACGGCAAAACCGTcGCCGcGTCAACCAGCAGGACAAGGCGGCCAAGCGgGGCtTCTCCCTCGTGTGGCCG

Sam23877 : ACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGGcACCGGCAGCGGTGGcACGAGGTGACGGTCCCGAAGCCcGGCgGCCCTGGCCG : 1039
pET28SA22-7 : ACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGGcACCGGCAGCGGTGGcACGAGGTGACGGTCCCGAAGCCcGGCgGCCCTGGCCG : 1120
SA22 : ACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGGcACCGGCAGCGGTGGcACGAGGTGACGGTCCCGAAGCCcGGCgGCCCTGGCCG : 1045
ACACGGCAGGTGGCAGTTCGGCATCGGcACCGGCAGCGGTGGtACGAGGTGACGGTCCCGAAGCCcCaGCCCTGGCCG

Streptomyc : CGGGCAAGTGGGCGACCTGTcGCCGTGTTCCGcCCGAGGAGGGCGGATCCGGCTCTTCCcAACGGCGAcCAGGTc : 1119
pET28SA22-7 : CGGGCAAGTGGGCGACCTGTcGCCGTGTTCCGcCCGAGGAGGGCGGATCCGGCTCTTCCcAACGGCGAcCAGGTc : 1200
SA22 : CGGGCAAGTGGGCGACCTGTcGCCGTGTTCCGcCCGAGGAGGGCGGATCCGGCTCTTCCcAACGGCGAcCAGGTc : 1125
CGGGCAAGTGGGCGACCTGTcCaGCCGTGTTCCGcCCGAGGAGGGCGGATCCGGCTCTTCCcAACGGCGAcAAGGTc

Sam23877 : GCGGAGcCGCCGcTCCCAACcGcCGCGGGCTcGcCAAGGGCGAGCTTCCCTGATcATCGGCCGTcCACAACcAGCCCG : 1199
pET28SA22-7 : GCGGAGcCGCCGcTCCCAACcGcCGCGGGCTcGcCAAGGGCGAGCTTCCCTGATcATCGGCCGTcCACAACcAGCCCG : 1280
SA22 : GCGGAGcCGCCGcTCCCAACcGcCGCGGGCTcGcCAAGGGCGAGCTTCCCTGATcATCGGCCGTcCACAACcAGCCCG : 1205
GCCcAGaCCGCCaTCCCAACcAcCGCGGGCTcGaCAAGGGCGAGCTTCCCTGATcATCGGCCGTcCACAACcAGCCCGc

Sam23877 : GATcATcAaCGGCAGcTTCGGCGTCAACATGTTCAACGGcACTcATcGACGAGGTGAAGATCCACAACAGcGCCCTcGcCC : 1279
pET28SA22-7 : GATcATcAaCGGCAGcTTCGGCGTCAACATGTTCAACGGcACTcATcGACGAGGTGAAGATCCACAACAGcGCCCTcGcCC : 1360
SA22 : GATcATcAaCGGCAGcTTCGGCGTCAACATGTTCAACGGcACTcATcGACGAGGTGAAGATCCACAACAGcGCCCTcGcCC : 1285
cATcATcAaCGGCAGcTTCGGCGTCAACATGTTCAACGGtCTcATcGACGAGGTGAAGATCCACAACAGtGCCCTcACC

Sam23877 : CCGCGGGGTcACGGCCCGcCACCAGAAGGACGTACAGACCTTCCGGcGGcGGcACcACCCcCAAGGcCCGATGGAGATG : 1359
pET28SA22-7 : CCGCGGGGTcACGGCCCGcCACCAGAAGGACGTACAGACCTTCCGGcGGcGGcACcACCCcCAAGGcCCGATGGAGATG : 1440
SA22 : CCGCGGGGTcACGGCCCGcCACCAGAAGGACGTACAGACCTTCCGGcGGcGGcACcACCCcCAAGGcCCGATGGAGATG : 1365
CgGcCGCGGTcACGGCCCGtCACCAGAAGGACGTACAGACCTTCCGcGgGgGcGcCCACCCcCAAGGcCCGATGGAGATG

Sam23877 : GACCGcTcCGcGcTACGACGGTgACCGcTACCGcCCGGTcACCcTTCACCGCCCGcGAAcCAcTGGATGAACGAcGCCcA : 1439
pET28SA22-7 : GACCGcTcCGcGcTACGACGGTgACCGcTACCGcCCGGTcACCcTTCACCGCCCGcGAAcCAcTGGATGAACGAcGCCcA : 1520
SA22 : GACCGcTcCGcGcTACGACGGTgACCGcTACCGcCCGGTcACCcTTCACCGCCCGcGAAcCAcTGGATGAACGAcGCCcA : 1445
GACCGTcCaCGcTACGACGGTgACCGcTACCGcCCGGTcACCcTTCACCGCCCGcGAAcCAcTGGATGAACGAcGCCcA

Sam23877 : CGCCCCcATCCAGTAcAAGGGCAATACCACCTcTCTcACCAGCACAACCTCCcACGGCCcCTACTGGcACAACATcGCCT : 1519
pET28SA22-7 : CGCCCCcATCCAGTAcAAGGGCAATACCACCTcTCTcACCAGCACAACCTCCcACGGCCcCTACTGGcACAACATcGCCT : 1600
SA22 : CGCCCCcATCCAGTAcAAGGGCAATACCACCTcTCTcACCAGCACAACCTCCcACGGCCcCTACTGGcACAACATcGCCT : 1525
CGCCCCaATCCAGTAcAAGGGCAAgTACCACCTcTCTcACCAGCACAACCTCCcACGGCCcCTACTGGcACAACATcAgCT

Sam23877 : GGGGcCACCGGGTgAGcGAGGACcTGGTCCACTGGCGGACcTGGCCGTcGcCCTcCGCGCCcACCGAGGAcAcCGTGGCC : 1599
pET28SA22-7 : GGGGcCACCGGGTgAGcGAGGACcTGGTCCACTGGCGGACcTGGCCGTcGcCCTcCGCGCCcACCGAGGAcAcCGTGGCC : 1680
SA22 : GGGGcCACCGGGTgAGcGAGGACcTGGTCCACTGGCGGACcTGGCCGTcGcCCTcCGCGCCcACCGAGGAcAcCGTGGCC : 1605
GGGgAcACCGGGTgAGtGcGGACcTGGTCCACTGGCGGACcTGGCCGTcGcCaCTcCGCGCCcACCGAGGAcAgcGTGGCC

Sam23877 : CCCGACGGGTcTGGTCCGGcGAcTcGCCcTACGACGAGAAGGGGTGCCCGTcCTGcTGTcTACCCGcCGGCAATGACTc : 1679
pET28SA22-7 : CCCGACGGGTcTGGTCCGGcGAcTcGCCcTACGACGAGAAGGGGTGCCCGTcCTGcTGTcTACCCGcCGGCAATGACTc : 1760
SA22 : CCCGACGGGTcTGGTCCGGcGAcTcGCCcTACGACGAGAAGGGGTGCCCGTcCTGcTGTcTACCCGcCGGCAATGACTc : 1685
CCCGACGGGTcTGGTCCGGtGAcGCCcTACGACGAGAAGGGGTGCCCGTcCTGcTGTcTACCCGcCGGCAATGACTc

Sam23877 : CCAGCGCCcCAACcAGGGcGACCGCCcTCCCGCCcCGCTcGACCCCGGcGACAGCGAcCTGGTcGAGTgGAAGATGcACC : 1759
pET28SA22-7 : CCAGCGCCcCAACcAGGGcGACCGCCcTCCCGCCcCGCTcGACCCCGGcGACAGCGAcCTGGTcGAGTgGAAGATGcACC : 1840
SA22 : CCAGCGCCcCAACcAGGGcGACCGCCcTCCCGCCcCGCTcGACCCCGGcGACAGCGAcCTGGTcGAGTgGAAGATGcACC : 1765
CCAGCGCCcCAACcAGGGcGACCGCCcTCCCGCCcCGCTcGACCCCGGcGACAGCGAcCTGGTcGAGTgGAAGATGcACC

Streptomyc : CCACCcTcGTcACcAGcCAGAcCGCGGAcCTGAAcGTcGGTcGCCGAGcCAAGGTcCGcTTCGGcGAcTTCcCGGAcCCc : 1839
pET28SA22-7 : CCACCcTcGTcACcAGcCAGAcCGCGGAcCTGAAcGTcGGTcGCCGAGcCAAGGTcCGcTTCGGcGAcTTCcCGGAcCCc : 1920
SA22 : CCACCcTcGTcACcAGcCAGAcCGCGGAcCTGAAcGTcGGTcGCCGAGcCAAGGTcCGcTTCGGcGAcTTCcCGGAcCCc : 1845
CCACCcTgTcACcAGcCAGAcCGCGGAcCTGAAcGTcGGcGCGGAcCGcCAAGGTcCGcTTCGGtGAcTTCcCGGAcCCc

Sam23877 : TTCGTcTGGAAAGGAGGGcGACAcCTGGTTCAGcGTgATGGGTcCGcGGcTCCAGAcCACcGAcGGGAAGGAcATCGGGc : 1919
pET28SA22-7 : TTCGTcTGGAAAGGAGGGcGACAcCTGGTTCAGcGTgATGGGTcCGcGGcTCCAGAcCACcTTCGGAcCGGAcATCGGGc : 2000
SA22 : TTCGTcTGGAAAGGAGGGcGACAcCTGGTTCAGcGTgATGGGTcCGcGGcTCCAGAcCACcTTCGGAcCGGAcATCGGGc : 1925
TTCGTcTGGAAAGGAGGGaGACAcCTGGTTCAGcGTgATGGGTcGgGGcTCCAGAcGAcTtcCGGAcCGAcATCGGGc

รูปที่ 5-21 (ต่อเนื่อก)

Sam23877 : **CACCGCCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGACCTACTCGGGCCCTTGATGACCGGTGACGTGGGGGCC** : 1999
pET28SA22-7 : **ACCGCCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGACCTACTCGGGCCCTTGATGACCGGTGACGTGGGGGCC** : 2080
SA22 : **TACCGCCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGACCTACTCGGGCCCTTGATGACCGGTGACGTGGGGGCC**

Sam23877 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGA** : 2079
pET28SA22-7 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGA** : 2160
SA22 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGA** : 2085
ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTCCCATCGGAAGGACGCCCAAGGCCGGA

Sam23877 : **CTGCTCTCAACCCGGCCTCCCCGCCGGCCCGGCACTACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGACCTGGGA** : 2159
pET28SA22-7 : **CTGCTCTCAACCCGGCCTCCCCGCCGGCCCGGCACTACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGACCTGGGA** : 2240
SA22 : **CTGCTCTCAACCCGGCCTCCCCGCCGGCCCGGCACTACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGACCTGGGA** : 2165
CTGCTCTCAACCCGGCCTCCCCGCCGGCCCGGCACTACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGACCTGGGA

Sam23877 : **CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGCAAGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTTACCCGGCCCAAGCG** : 2239
pET28SA22-7 : **CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGCAAGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTTACCCGGCCCAAGCG** : 2320
SA22 : **CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGCAAGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTTACCCGGCCCAAGCG** : 2245
CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGCAAGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTTACCCGGCCCAAGCG

Sam23877 : **GAACTGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAAGTACGCTCGCCAGGACCGTGGACCGAACCGCCCACTACGAGCCG** : 2319
pET28SA22-7 : **GAACTGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAAGTACGCTCGCCAGGACCGTGGACCGAACCGCCCACTACGAGCCG** : 2400
SA22 : **GAACTGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAAGTACGCTCGCCAGGACCGTGGACCGAACCGCCCACTACGAGCCG** : 2325
GAACTGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAAGTACGCTCGCCAGGACCGTGGACCGAACCGCCCACTACGAGCCG

Sam23877 : **GGCTGGGCCACAACCGGGCCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGGAAGGACCTCGGATTCCGCCCCCTGGAGGA** : 2399
pET28SA22-7 : **GGCTGGGCCACAACCGGGCCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGGAAGGACCTCGGATTCCGCCCCCTGGAGGA** : 2480
SA22 : **GGCTGGGCCACAACCGGGCCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGGAAGGACCTCGGATTCCGCCCCCTGGAGGA** : 2405
GGCTGGGCCACAACCGGGCCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGGAAGGACCTCGGATTCCGCCCCCTGGAGGA

Sam23877 : **GGTCTCCCGCCTCACACCGGCGAACCCTCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCGCCGACGCAACACCCGCTGG** : 2479
pET28SA22-7 : **GGTCTCCCGCCTCACACCGGCGAACCCTCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCGCCGACGCAACACCCGCTGG** : 2560
SA22 : **GGTCTCCCGCCTCACACCGGCGAACCCTCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCGCCGACGCAACACCCGCTGG** : 2485
GGTCTCCCGCCTCACACCGGCGAACCCTCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCGCCGACGCAACACCCGCTGG

Sam23877 : **CCGGCATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGTCTACCGTGGAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAATCGAGCTGCTC** : 2559
pET28SA22-7 : **CCGGCATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGTCTACCGTGGAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAATCGAGCTGCTC** : 2640
SA22 : **CCGGCATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGTCTACCGTGGAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAATCGAGCTGCTC** : 2565
CCGGCATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGTCTACCGTGGAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAATCGAGCTGCTC

Sam23877 : **CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCTCTTCTACGACGCTCCCGCAGGACAGCTGGGCGTCCAGCCGACCGGCTC** : 2639
pET28SA22-7 : **CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCTCTTCTACGACGCTCCCGCAGGACAGCTGGGCGTCCAGCCGACCGGCTC** : 2720
SA22 : **CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCTCTTCTACGACGCTCCCGCAGGACAGCTGGGCGTCCAGCCGACCGGCTC** : 2645
CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCTCTTCTACGACGCTCCCGCAGGACAGCTGGGCGTCCAGCCGACCGGCTC

Sam23877 : **CGGGAAACAATCCAGTGGCGAACCCTCTCGGATCCACAAAGGCCGCTTGACGCTCTCCaACGGCACCTTGACaCTCG** : 2719
pET28SA22-7 : **CGGGAAACAATCCAGTGGCGAACCCTCTCGGATCCACAAAGGCCGCTTGACGCTCTCCaACGGCACCTTGACaCTCG** : 2800
SA22 : **CGGGAAACAATCCAGTGGCGAACCCTCTCGGATCCACAAAGGCCGCTTGACGCTCTCCaACGGCACCTTGACaCTCG** : 2725
CGGGAAACAATCCAGTGGCGAACCCTCTCGGATCCACAAAGGCCGCTTGACGCTCTCCaACGGCACCTTGACaCTCG

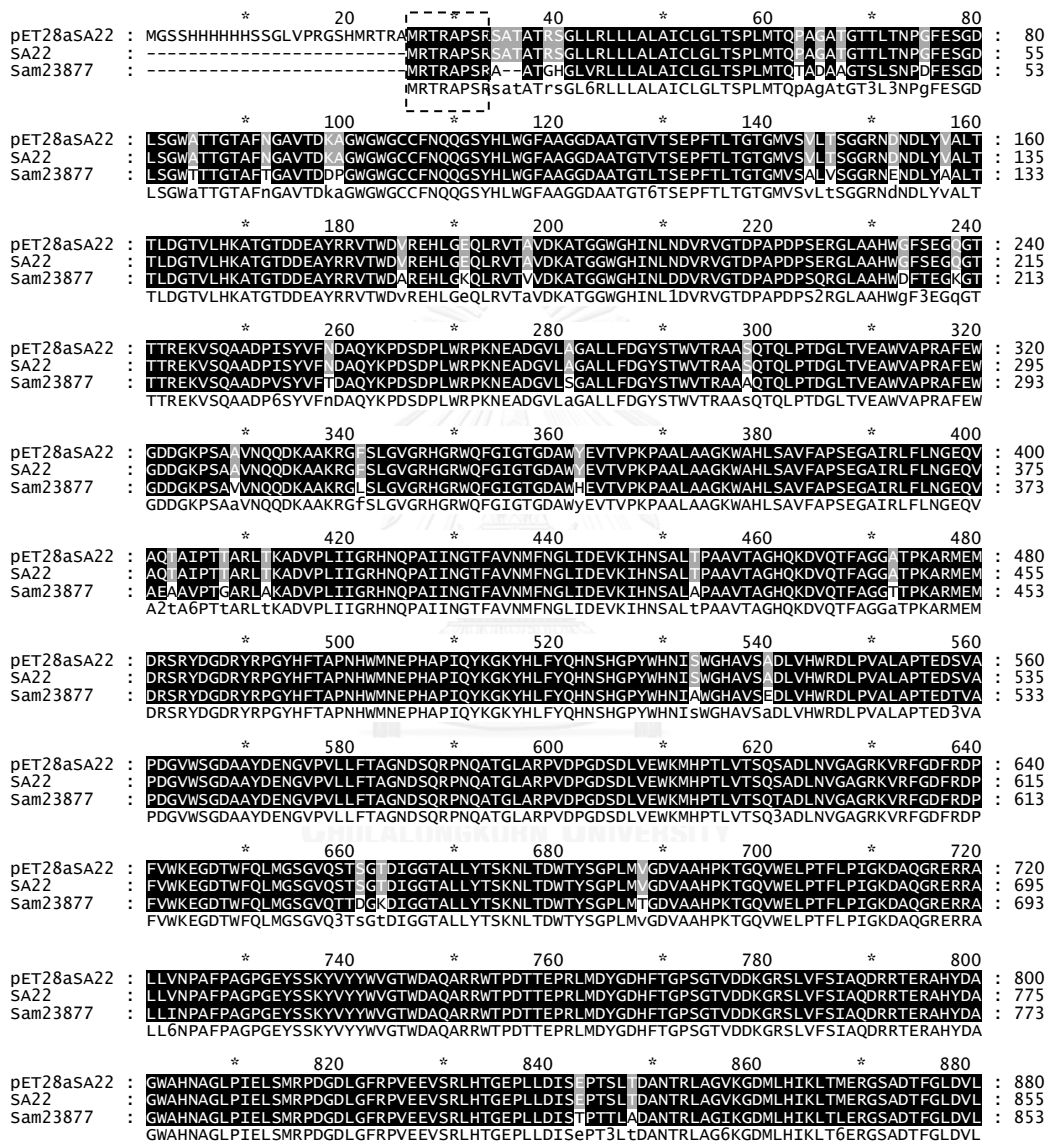
Sam23877 : **ACGTGTTCTCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACCGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGCGCTACCCCTTCCGG** : 2799
pET28SA22-7 : **ACGTGTTCTCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACCGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGCGCTACCCCTTCCGG** : 2880
SA22 : **ACGTGTTCTCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACCGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGCGCTACCCCTTCCGG** : 2805
ACGTGTTCTCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACCGGAACAACCAAGTCCATCACCACCCGCGCTACCCCTTCCGG

Sam23877 : **CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCCGGCAGCGGACGACCGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC** : 2879
pET28SA22-7 : **CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCCGGCAGCGGACGACCGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC** : 2960
SA22 : **CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCCGGCAGCGGACGACCGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC** : 2885
CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCCGGCAGCGGACGACCGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC

Sam23877 : **CGACTGA** : 2886
pET28SA22-7 : **CGACTAA** : 2967
SA22 : **CGACTAA** : 2892
CGACTAA

รูปที่ 5-21 (ต่อเนือง)

เมื่อทำการวิเคราะห์โคลน pET28a-SA22 โคลน 7 เปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย Expsasy Bioinformatics Resource Portal และนำกรดอะมิโน pET28a-SA22 โคลน 7 มาเปรียบเทียบกับ SA22 ซึ่งเป็นต้นแบบ พบว่า ทั้ง 2 โคลนมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (รูปที่5-22)

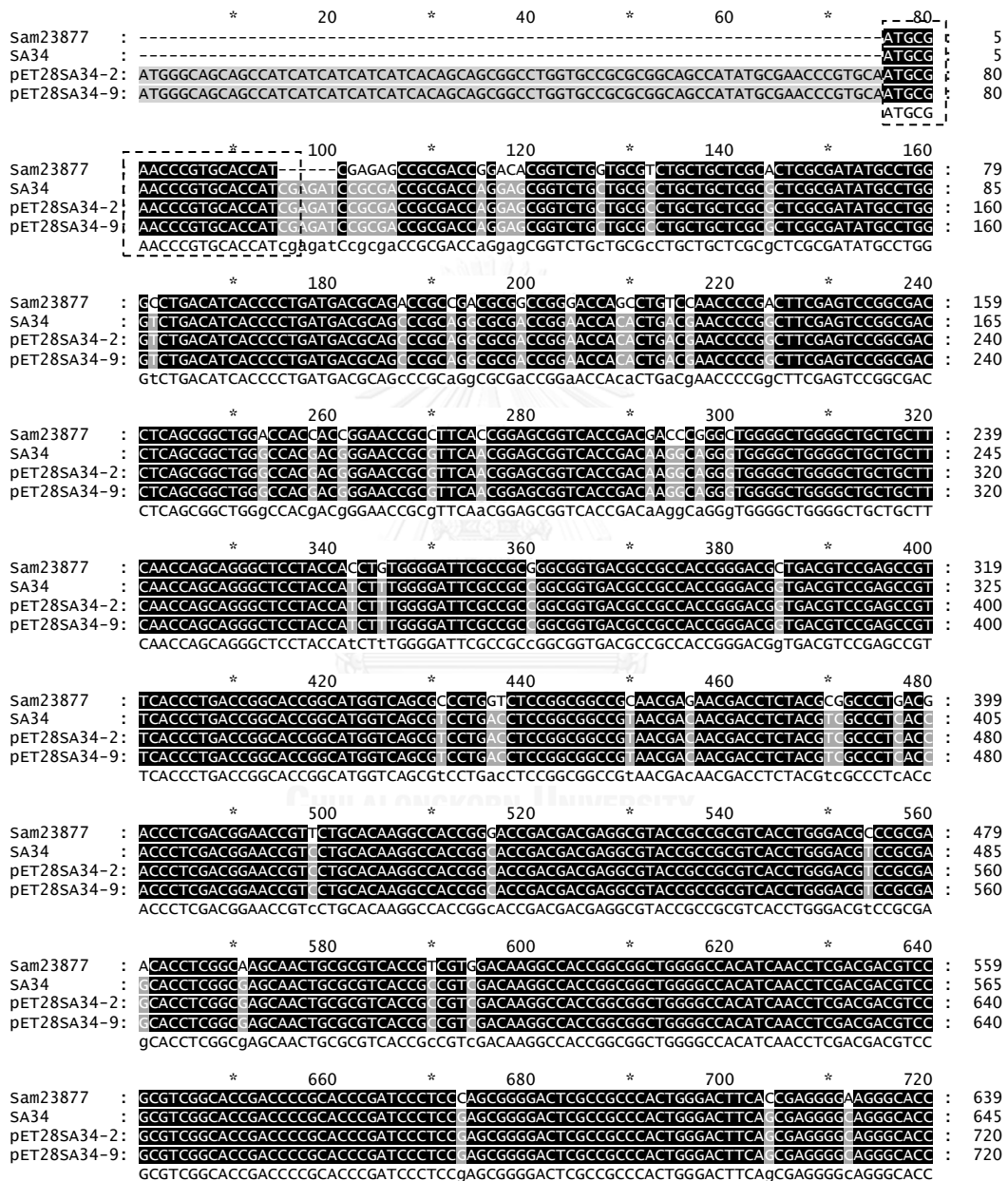


รูปที่ 5-22 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 ที่เชื่อมกับ

pET28a

หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinaseF' และ แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinaseR'

จากการส่งรีคอมบิแนนท์โคลน pET28a-SA34 ทั้งโคลนที่ 2 และ 9 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega (รูปที่ 5-23) เห็นได้ว่า pET28a-SA34 ทั้งโคลนที่ 2 และ 9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับต้นแบบคือ SA34 จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์แปลเป็นกรดอะมิโนเพื่อทำการเปรียบเทียบต่อไป



รูปที่ 5-23 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a หมายถึง --- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinaseF' และ แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinaseR'

Sam23877 : ACGACCAAGGAGAAGGT CAGCCAGGC GCCGA CCGGT CAGCTACGTCTTCA CGACGGCGAGTACAAGCCCGACAGCGA : 719
SA34 : ACGACC GGGAGAAGGT CAGCCAGGC GCCGA CCGT CAGCTACGTCTTCA CGACGGCGAGTACAAGCCCGACAGCGA : 725
pET28SA34-2: ACGACC GGGAGAAGGT CAGCCAGGC GCCGA CCGT CAGCTACGTCTTCA CGACGGCGAGTACAAGCCCGACAGCGA : 800
pET28SA34-9: ACGACC GGGAGAAGGT CAGCCAGGC GCCGA CCGT CAGCTACGTCTTCA CGACGGCGAGTACAAGCCCGACAGCGA : 800
ACGACC GGGAGAAGGT CAGCCAGGC GCCGA CCGT CAGCTACGTCTTCA CGACGGCGAGTACAAGCCCGACAGCGA

Sam23877 : CCCGCTCTGGCGCCCGAAGAACGA GCCGACGG CTTACTC CCGGCGC CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA : 799
SA34 : CCCGCTCTGGCGCCCGAAGAACGA GCCGACGG GTCTC CCGGCGC CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA : 805
pET28SA34-2: CCCGCTCTGGCGCCCGAAGAACGA GCCGACGG GTCTC CCGGCGC CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA : 880
pET28SA34-9: CCCGCTCTGGCGCCCGAAGAACGA GCCGACGG GTCTC CCGGCGC CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA : 880
CCCGCTCTGGCGCCCGAAGAACGA GCCGACGG GTCTC CCGGCGC CTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA

Sam23877 : CCCGCGCCGCGC CAGAC CAGCTGCCACGGACGGCCTGACCGT GAGGC ATGGTTCGCA CCGCGCGTTCGAGTGG : 879
SA34 : CCCGCGCCGCGC CAGAC CAGCTGCCACGGACGGCCTGACCGT GAGGC ATGGTTCGCA CCGCGCGTTCGAGTGG : 885
pET28SA34-2: CCCGCGCCGCGC CAGAC CAGCTGCCACGGACGGCCTGACCGT GAGGC ATGGTTCGCA CCGCGCGTTCGAGTGG : 960
pET28SA34-9: CCCGCGCCGCGC CAGAC CAGCTGCCACGGACGGCCTGACCGT GAGGC ATGGTTCGCA CCGCGCGTTCGAGTGG : 960
CCCGCGCCGCGT CAGAC CAGCTGCCACGGACGGCCTGACCGT GAGGC ATGGTTCGCA CCGCGCGTTCGAGTGG

Sam23877 : GGAGACGACGGCAAAACCGT CCGCT CGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGCCAAAGCG GGC TCTCCCTCGG GTCGGCCG : 959
SA34 : GGAGACGACGGCAAAACCGT CCGCT CGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGCCAAAGCG GGC TCTCCCTCGG GTCGGCCG : 965
pET28SA34-2: GGAGACGACGGCAAAACCGT CCGCT CGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGCCAAAGCG GGC TCTCCCTCGG GTCGGCCG : 1040
pET28SA34-9: GGAGACGACGGCAAAACCGT CCGCT CGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGCCAAAGCG GGC TCTCCCTCGG GTCGGCCG : 1040
GGAGACGACGGCAAAACCGT CCGCT CGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGCCAAAGCG GGC TCTCCCTCGG GTCGGCCG

Sam23877 : ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGC ACCGGCGACCGGTGG CACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC GGC GCCCTTGCCC : 1039
SA34 : ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGC ACCGGCGACCGGTGG CACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC GC GCCCTTGCCC : 1045
pET28SA34-2: ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGC ACCGGCGACCGGTGG CACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC GC GCCCTTGCCC : 1120
pET28SA34-9: ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGC ACCGGCGACCGGTGG CACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC GC GCCCTTGCCC : 1120
ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGC ACCGGCGACCGGTGG CACGAGGTGACGGTCCCGAAGCC GC GCCCTTGCCC

Sam23877 : CCGGCAAGTGGGCGCACCTGTG CCGCTGTTCGGT CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCCT AACGGCGA CAGGTC : 1119
SA34 : CCGGCAAGTGGGCGCACCTGTG CCGCTGTTCGGT CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCCT AACGGCGA CAGGTC : 1125
pET28SA34-2: CCGGCAAGTGGGCGCACCTGTG CCGCTGTTCGGT CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCCT AACGGCGA CAGGTC : 1200
pET28SA34-9: CCGGCAAGTGGGCGCACCTGTG CCGCTGTTCGGT CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCCT AACGGCGA CAGGTC : 1200
CCGGCAAGTGGGCGCACCTGT CAGCCGTGTTCCGCC CCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCCT AACGGCGA CAGGTC

Sam23877 : GCCGAGC CCGCGT CCCCACCC GCGCGCG CTG CCAAGGGCGAGCTTCCCTGATCATCGGCCGT CACAACAGCCCGC : 1199
SA34 : GCCGAG CCGCGT CCCCACCC GCGCGCG CTG CCAAGGGCGAGCTTCCCTGATCATCGGCCGT CACAACAGCCCGC : 1205
pET28SA34-2: GCCGAG CCGCGT CCCCACCC GCGCGCG CTG CCAAGGGCGAGCTTCCCTGATCATCGGCCGT CACAACAGCCCGC : 1280
pET28SA34-9: GCCGAG CCGCGT CCCCACCC GCGCGCG CTG CCAAGGGCGAGCTTCCCTGATCATCGGCCGT CACAACAGCCCGC : 1280
GCCGAG CCGCGT CCCCACCC GCGCGCG CTG CCAAGGGCGAGCTTCCCTGATCATCGGCCGT CACAACAGCCCGC

Sam23877 : GATCATCAACGGCAGCTTCGCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGG GAAGATCCACAACAG GCCCTCGCC : 1279
SA34 : GATCATCAACGGCAGCTTCGCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGG GAAGATCCACAACAG GCCCTCGCC : 1285
pET28SA34-2: GATCATCAACGGCAGCTTCGCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGG GAAGATCCACAACAG GCCCTCGCC : 1360
pET28SA34-9: GATCATCAACGGCAGCTTCGCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGG GAAGATCCACAACAG GCCCTCGCC : 1360
CATCATCAACGGCAGCTTCGCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGG GAAGATCCACAACAGTCCACAACAGTCCGCTCACC

Sam23877 : CCGCGCGGTCACGGCCCG CACCAGAAGGACGTAC GACCTTCGCG GCG GGC CACCCCCAAGGCCCGGATGGAGATG : 1359
SA34 : CCGCGCGGTCACGGCCCG CACCAGAAGGACGTAC GACCTTCGCG GCG GGC CACCCCCAAGGCCCGGATGGAGATG : 1365
pET28SA34-2: CCGCGCGGTCACGGCCCG CACCAGAAGGACGTAC GACCTTCGCG GCG GGC CACCCCCAAGGCCCGGATGGAGATG : 1440
pET28SA34-9: CCGCGCGGTCACGGCCCG CACCAGAAGGACGTAC GACCTTCGCG GCG GGC CACCCCCAAGGCCCGGATGGAGATG : 1440
CgGcCGCGT CACGGCCCGT CACCAGAAGGACGTAC GACCTTCGCG GCG GGC CACCCCCAAGGCCCGGATGGAGATG

Sam23877 : GACCGTTCAGG TACGACGGTGACCGCTACCG CCGGCTACCCTTACCAGCCCGAACCCTGGATGAACGA GCCCA : 1439
SA34 : GACCGTTCAGG TACGACGGTGACCGCTACCG CCGGCTACCCTTACCAGCCCGAACCCTGGATGAACGA GCCCA : 1445
pET28SA34-2: GACCGTTCAGG TACGACGGTGACCGCTACCG CCGGCTACCCTTACCAGCCCGAACCCTGGATGAACGA GCCCA : 1520
pET28SA34-9: GACCGTTCAGG TACGACGGTGACCGCTACCG CCGGCTACCCTTACCAGCCCGAACCCTGGATGAACGA GCCCA : 1520
GACCGTTCAGG TACGACGGTGACCGCTACCG CCGGCTACCCTTACCAGCCCGAACCCTGGATGAACGA GCCCA

Sam23877 : CGCCCC ATCCAGTACAAGGGCAA TACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAAATCGCCT : 1519
SA34 : CGCCCC ATCCAGTACAAGGGCAA TACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAAATCGCCT : 1525
pET28SA34-2: CGCCCC ATCCAGTACAAGGGCAA TACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAAATCGCCT : 1600
pET28SA34-9: CGCCCC ATCCAGTACAAGGGCAA TACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAAATCGCCT : 1600
CGCCCC ATCCAGTACAAGGGCAA TACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCACGGCCCTACTGGCACAAATCGCCT

Sam23877 : GGGG CACGCGGTGAG CAGGACCTGGTCCACTGGCGGACCTGCCGTCGC CTGCGGCCACCGAGGACA CCGTGGCC : 1599
SA34 : GGGG CACGCGGTGAG CAGGACCTGGTCCACTGGCGGACCTGCCGTCGC CTGCGGCCACCGAGGACA CCGTGGCC : 1605
pET28SA34-2: GGGG CACGCGGTGAG CAGGACCTGGTCCACTGGCGGACCTGCCGTCGC CTGCGGCCACCGAGGACA CCGTGGCC : 1680
pET28SA34-9: GGGG CACGCGGTGAG CAGGACCTGGTCCACTGGCGGACCTGCCGTCGC CTGCGGCCACCGAGGACA CCGTGGCC : 1680
GGGgCACGCGGTGAGtGcGGACCTGGTCCACTGGCGGACCTGCCGTCGCaCTCGGCCACCGAGGACAgGTGGCC

รูปที่ 5-23 (ต่อเนือง)

Sam23877 : **CCCGACGGGGTCTGGTCCGGC**GA**TGCCGCCTACGACGAGAACGGCGTGCCCGTCTGCTGTTACCCGC**GGCAA**TGACTC** : 1679
SA34 : **CCCGACGGGGTCTGGTCCGGC**GA**TGCCGCCTACGACGAGAACGGCGTGCCCGTCTGCTGTTACCCGC**GGCAA**TGACTC** : 1685
pET28SA34-2 : **CCCGACGGGGTCTGGTCCGGC**GA**TGCCGCCTACGACGAGAACGGCGTGCCCGTCTGCTGTTACCCGC**GGCAA**TGACTC** : 1760
pET28SA34-9 : **CCCGACGGGGTCTGGTCCGGC**GA**TGCCGCCTACGACGAGAACGGCGTGCCCGTCTGCTGTTACCCGC**GGCAA**TGACTC** : 1760
CCCGACGGGGTCTGGTCCGGTGA**GCCGCCTACGACGAGAACGGCGTGCCCGTCTGCTGTTACCCGC**TGGCAA**GACTC**

Sam23877 : **CCAGCGCCCCAACAGGGCAGCCGGCTCGCCCGCCCGCTCGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTCCG**AGTGGAAAGATGCACC : 1759
SA34 : **CCAGCGCCCCAACAGGGCAGCCGGCTCGCCCGCCCGCTCGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTCCG**AGTGGAAAGATGCACC : 1765
pET28SA34-2 : **CCAGCGCCCCAACAGGGCAGCCGGCTCGCCCGCCCGCTCGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTCCG**AGTGGAAAGATGCACC : 1840
pET28SA34-9 : **CCAGCGCCCCAACAGGGCAGCCGGCTCGCCCGCCCGCTCGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTCCG**AGTGGAAAGATGCACC : 1840
CCAGCGCCCCAACAGGGCAGCCGGCTCGCCCGCCCGCTCGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTCCG**AGTGGAAAGATGCACC**

Sam23877 : **CCACCCCTGTCAACGACGAGAG**CGCCGACCTGAACGT**CGGGTCCGCGACGCA**AGGTCCGCTTCGG**GACTTCCGCGACCCCC** : 1839
SA34 : **CCACCCCTGTCAACGACGAGAG**CGCCGACCTGAACGT**CGGGTCCGCGACGCA**AGGTCCGCTTCGG**GACTTCCGCGACCCCC** : 1845
pET28SA34-2 : **CCACCCCTGTCAACGACGAGAG**CGCCGACCTGAACGT**CGGGTCCGCGACGCA**AGGTCCGCTTCGG**GACTTCCGCGACCCCC** : 1920
pET28SA34-9 : **CCACCCCTGTCAACGACGAGAG**CGCCGACCTGAACGT**CGGGTCCGCGACGCA**AGGTCCGCTTCGG**GACTTCCGCGACCCCC** : 1920
CCACCCCTGTCAACGACGAGAGCGCCGACCTGAACGT**CGGGTCCGCGACGCA**AGGTCCGCTTCGGT**GACTTCCGCGACCCCC**

Sam23877 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGG**GACACCTGGTTCAGCTGATGGGCT**CGGGTCCAGA**CACCGA**CGGCAAGGACATCGGCGG** : 1919
SA34 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGG**GACACCTGGTTCAGCTGATGGGCT**CGGGTCCAGA**CACCGA**CGGCAAGGACATCGGCGG** : 1925
pET28SA34-2 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGG**GACACCTGGTTCAGCTGATGGGCT**CGGGTCCAGA**CACCGA**CGGCAAGGACATCGGCGG** : 2000
pET28SA34-9 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGG**GACACCTGGTTCAGCTGATGGGCT**CGGGTCCAGA**CACCGA**CGGCAAGGACATCGGCGG** : 2000
TTTCGTCTGGAAGGAGGAGACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGAGCAC**TTCGGCAACCGACATCGGCGG**

Sam23877 : **TAACCGCTCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGAG**CTACTCGGGCC**CTGATGAG**CGGTGACGTGGG**GCCCC** : 1999
SA34 : **TAACCGCTCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGAG**CTACTCGGGCC**CTGATGAG**CGGTGACGTGGG**GCCCC** : 2005
pET28SA34-2 : **TAACCGCTCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGAG**CTACTCGGGCC**CTGATGAG**CGGTGACGTGGG**GCCCC** : 2080
pET28SA34-9 : **TAACCGCTCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGAG**CTACTCGGGCC**CTGATGAG**CGGTGACGTGGG**GCCCC** : 2080
TAACCGCTCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTCACCGACTGGAGCTACTCGGGCC**CTGATGAG**CGGTGACGTGG**CAAGCCCC**

Sam23877 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTT**CCCATCGG**CAAGGACGCCCA**GGCCCGGA**CGCCGGGCC** : 2079
SA34 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTT**CCCATCGG**CAAGGACGCCCA**GGCCCGGA**CGCCGGGCC** : 2085
pET28SA34-2 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTT**CCCATCGG**CAAGGACGCCCA**GGCCCGGA**CGCCGGGCC** : 2160
pET28SA34-9 : **ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTT**CCCATCGG**CAAGGACGCCCA**GGCCCGGA**CGCCGGGCC** : 2160
ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTgCCCATCGG**CAAGGACGCCCA**GGCCCGGA**CGCCGGGCC**

Sam23877 : **CTGTCTCAACCCCGGCTTCCCCCGCGCCCGCCGGCGA**TACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGT**CGGCACCTGGGA** : 2159
SA34 : **CTGTCTCAACCCCGGCTTCCCCCGCGCCCGCCGGCGA**TACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGT**CGGCACCTGGGA** : 2165
pET28SA34-2 : **CTGTCTCAACCCCGGCTTCCCCCGCGCCCGCCGGCGA**TACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGT**CGGCACCTGGGA** : 2240
pET28SA34-9 : **CTGTCTCAACCCCGGCTTCCCCCGCGCCCGCCGGCGA**TACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGT**CGGCACCTGGGA** : 2240
CTGTCTCAACCCCGGCTTCCCCCGCGCCCGCCGGCA**TACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGT**CGGCACCTGGGA

Sam23877 : **CGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA**AGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTT**CACCGGCCACAGCG** : 2239
SA34 : **CGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA**AGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTT**CACCGGCCACAGCG** : 2245
pET28SA34-2 : **CGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA**AGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTT**CACCGGCCACAGCG** : 2320
pET28SA34-9 : **CGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA**AGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTT**CACCGGCCACAGCG** : 2320
CGCCCAAGCCCGCGCTGGACCCCGACACCACCGA**AGCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCACTT**CACCGGCC**ACAGCG**

Sam23877 : **GAAAGTGGAGGACACAAGGG**CGCTCCCTCGTCTT**CAGCATC**CGCAGGACCG**CGCACCGGAACCGGCCACTACGACGCC** : 2319
SA34 : **GAAAGTGGAGGACACAAGGG**CGCTCCCTCGTCTT**CAGCATC**CGCAGGACCG**CGCACCGGAACCGGCCACTACGACGCC** : 2325
pET28SA34-2 : **GAAAGTGGAGGACACAAGGG**CGCTCCCTCGTCTT**CAGCATC**CGCAGGACCG**CGCACCGGAACCGGCCACTACGACGCC** : 2400
pET28SA34-9 : **GAAAGTGGAGGACACAAGGG**CGCTCCCTCGTCTT**CAGCATC**CGCAGGACCG**CGCACCGGAACCGGCCACTACGACGCC** : 2400
GAAAGTGGAGGACACAAGGGaCGCTCCCTCGTCTT**CAGCATC**CGCAGGACCG**CGCACCGGAACCGGCCACTACGACGCC**

Sam23877 : **GGCTGGGCCCAACAACGCGGGCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCCGACGG**TGACCTCGGATTCCGCCCCGT**GAGGA** : 2399
SA34 : **GGCTGGGCCCAACAACGCGGGCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCCGACGG**TGACCTCGGATTCCGCCCCGT**GAGGA** : 2405
pET28SA34-2 : **GGCTGGGCCCAACAACGCGGGCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCCGACGG**TGACCTCGGATTCCGCCCCGT**GAGGA** : 2480
pET28SA34-9 : **GGCTGGGCCCAACAACGCGGGCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCCGACGG**TGACCTCGGATTCCGCCCCGT**GAGGA** : 2480
GGCTGGGCCCAACAACGCGGGCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCCGACGGaGACCTCGGATTCCGCCCCGT**GAGGA**

Sam23877 : **GGTCTCCCGCTTCAACCCGGGAACC**CTCCTGGACATCAGCAG**CGGACCACTCTCG**CCGACGCCAACCCCGCT**GTGG** : 2479
SA34 : **GGTCTCCCGCTTCAACCCGGGAACC**CTCCTGGACATCAGCAG**CGGACCACTCTCG**CCGACGCCAACCCCGCT**GTGG** : 2485
pET28SA34-2 : **GGTCTCCCGCTTCAACCCGGGAACC**CTCCTGGACATCAGCAG**CGGACCACTCTCG**CCGACGCCAACCCCGCT**GTGG** : 2560
pET28SA34-9 : **GGTCTCCCGCTTCAACCCGGGAACC**CTCCTGGACATCAGCAG**CGGACCACTCTCG**CCGACGCCAACCCCGCT**GTGG** : 2560
GGTCTCCCGCTTCAACCCGGGAACCgCTCCTGGACATCAGCAG**CGGACCACTCTCT**CCGACGCCAACCCCGCT**GTGG**

Sam23877 : **CCGGGATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT**ACCGTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTT**CGGA**CTCGAGCT**GTCTC** : 2559
SA34 : **CCGGGATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT**ACCGTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTT**CGGA**CTCGAGCT**GTCTC** : 2565
pET28SA34-2 : **CCGGGATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT**ACCGTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTT**CGGA**CTCGAGCT**GTCTC** : 2640
pET28SA34-9 : **CCGGGATCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCT**ACCGTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTT**CGGA**CTCGAGCT**GTCTC** : 2640
CCGGGgTCAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTgACgATGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTT**CGGg**CTCGAGCT**GTCTC**

รูปที่ 5-23 (ต่อเนือง)

```

                *           2660           *           2680           *           2700           *           2720
Sam23877 : CGCAGCCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCTTCTACGAGCC CCGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGGACCGCTC : 2639
SA34 : CGCAGCCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCTTCTACGAGCC CCGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGGACCGCTC : 2645
pET28SA34-2: CGCAGCCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCTTCTACGAGCC CCGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGGACCGCTC : 2720
pET28SA34-9: CGCAGCCC GG GACGAAGAACGCACCCGCCTTCTACGAGCC CCGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGGACCGCTC : 2720
CGCAGCCCgGgAGACGAAGAACGCACCCGCCTTCTACGAGCCtCCCGCAGGACAGCTGGGCGTCGACCCGGACCGCaTC

                *           2740           *           2760           *           2780           *           2800
Sam23877 : CGGGAACAACCTCCAGT GCCGA ACCCGCTTCGGTATCCACAA GGGCCCGCTGGCTCTCTCC ACGGCACCCCTGACCTCG : 2719
SA34 : CGGGAACAACCTCCAGT GCCGA ACCGAATTTCGGATCCACAA GGGCCCGTGGCTCTCTCC ACGGCACCCCTGACCTCG : 2725
pET28SA34-2: CGGGAACAACCTCCAGT GCCGA ACCGAATTTCGGATCCACAA GGGCCCGTGGCTCTCTCC ACGGCACCCCTGACCTCG : 2800
pET28SA34-9: CGGGAACAACCTCCAGT GCCGA ACCGAATTTCGGATCCACAA GGGCCCGTGGCTCTCTCC ACGGCACCCCTGACCTCG : 2800
CGGGAACAACCTCCAGCGCCGAgCCgaaCTTCGGcATCCACAAgGGCCCGtTGaGcTCTCCaACGGCACCCCTGACaCTCG

                *           2820           *           2840           *           2860           *           2880
Sam23877 : ACGTGTTC TCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAA CAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCCGC : 2799
SA34 : ACGTGTTC TCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAA CAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCCGC : 2805
pET28SA34-2: ACGTGTTC TCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAA CAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCCGC : 2880
pET28SA34-9: ACGTGTTC TCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAA CAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCCGC : 2880
ACGTGTTCgTCGACCGCTCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAA CAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCCGC

                *           2900           *           2920           *           2940           *           2960
Sam23877 : CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGCAC CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2879
SA34 : CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2885
pET28SA34-2: CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2960
pET28SA34-9: CAGGACTCCCTTGGCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGT CGTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2960
CAGGACTCCCTCGCCCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGtGTCTGTCaAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC
    
```

```

Sam23877 : C G A C T G A : 2886
SA34 : C G A C T A A : 2892
pET28SA34-2: C G A C T A A : 2967
pET28SA34-9: C G A C T A A : 2967
             C G A C T a a
    
```

รูปที่ 5-23 (ต่อเนือง)



เมื่อทำการวิเคราะห์โคลน pET28a-SA34 โคลน 2 และ 9 เปรียบเทียบโดยใช้ Clustal Omega นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย ExPASy Bioinformatics Resource Portal และนำกรดอะมิโน pET28a-SA34 โคลน 2 และ 9 มาเปรียบเทียบกับ SA34 ซึ่งเป็นต้นแบบ พบว่าทั้ง 3 โคลนมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (รูปที่ 5-24)

```

SA34      : -----*-----20-----40-----60-----80-----
Sam23877 : -----*-----20-----40-----60-----80-----
pET28SA34-2 : MGS SHHHHHHSSGLVPRGSHMRTRMRTRAPRSRSATATRSGLLRLLLAALICLGLTSPLMTQPAGATGTTLTNPGFESGD : 55
pET28SA34-9 : MGS SHHHHHHSSGLVPRGSHMRTRMRTRAPRSRSATATRSGLLRLLLAALICLGLTSPLMTQPAGATGTTLTNPGFESGD : 80
          : MRTRAPRSRSATATRSGLLRLLLAALICLGLTSPLMTQPAGATGTTLTNPGFESGD
          : -----*-----100-----120-----140-----160-----
SA34      : LSGWATTGTA FN GAVTDKAGWGWGCCFNQOQGSYHLWGF AAGGDAATGTVTSEPFLLTGTGMVSVLTSGGRNDNDLYYALT : 135
Sam23877 : LSGWATTGTA FN GAVTDKAGWGWGCCFNQOQGSYHLWGF AAGGDAATGTVTSEPFLLTGTGMVSVLTSGGRNDNDLYYALT : 135
pET28SA34-2 : LSGWATTGTA FN GAVTDKAGWGWGCCFNQOQGSYHLWGF AAGGDAATGTVTSEPFLLTGTGMVSVLTSGGRNDNDLYYALT : 160
pET28SA34-9 : LSGWATTGTA FN GAVTDKAGWGWGCCFNQOQGSYHLWGF AAGGDAATGTVTSEPFLLTGTGMVSVLTSGGRNDNDLYYALT : 160
          : LSGWATTGTA FN GAVTDKAGWGWGCCFNQOQGSYHLWGF AAGGDAATGTVTSEPFLLTGTGMVSVLTSGGRNDNDLYYALT
          : -----*-----180-----200-----220-----240-----
SA34      : TLDGTVLHKATGTDDEAYRRVTWVREHLGEQLRVAVDKATGGWGHINLDDVVRGTDPAAPPDPSERGLAAHWDFSEGOGT : 215
Sam23877 : TLDGTVLHKATGTDDEAYRRVTWVREHLGEQLRVAVDKATGGWGHINLDDVVRGTDPAAPPDPSERGLAAHWDFSEGOGT : 215
pET28SA34-2 : TLDGTVLHKATGTDDEAYRRVTWVREHLGEQLRVAVDKATGGWGHINLDDVVRGTDPAAPPDPSERGLAAHWDFSEGOGT : 240
pET28SA34-9 : TLDGTVLHKATGTDDEAYRRVTWVREHLGEQLRVAVDKATGGWGHINLDDVVRGTDPAAPPDPSERGLAAHWDFSEGOGT : 240
          : TLDGTVLHKATGTDDEAYRRVTWVREHLGEQLRVAVDKATGGWGHINLDDVVRGTDPAAPPDPSERGLAAHWDFSEGOGT
          : -----*-----260-----280-----300-----320-----
SA34      : TTREKVSQAADPISYVFND AQYK PDS DPLWRPKNEADGVLGALLFDGYSTWVTRAASQTQLPTDGLTVEAWVAPRAFEM : 295
Sam23877 : TTREKVSQAADPISYVFND AQYK PDS DPLWRPKNEADGVLGALLFDGYSTWVTRAASQTQLPTDGLTVEAWVAPRAFEM : 295
pET28SA34-2 : TTREKVSQAADPISYVFND AQYK PDS DPLWRPKNEADGVLGALLFDGYSTWVTRAASQTQLPTDGLTVEAWVAPRAFEM : 320
pET28SA34-9 : TTREKVSQAADPISYVFND AQYK PDS DPLWRPKNEADGVLGALLFDGYSTWVTRAASQTQLPTDGLTVEAWVAPRAFEM : 320
          : TTREKVSQAADPISYVFND AQYK PDS DPLWRPKNEADGVLGALLFDGYSTWVTRAASQTQLPTDGLTVEAWVAPRAFEM
          : -----*-----340-----360-----380-----400-----
SA34      : GDDGKPSAAVNQODKAAKRGFSLGVGRHGRWQFGITGD AWYEVTVPKPAAL AAGKWAHL SAVFAPSEGAIRLFLNGEQV : 375
Sam23877 : GDDGKPSAAVNQODKAAKRGFSLGVGRHGRWQFGITGD AWYEVTVPKPAAL AAGKWAHL SAVFAPSEGAIRLFLNGEQV : 375
pET28SA34-2 : GDDGKPSAAVNQODKAAKRGFSLGVGRHGRWQFGITGD AWYEVTVPKPAAL AAGKWAHL SAVFAPSEGAIRLFLNGEQV : 400
pET28SA34-9 : GDDGKPSAAVNQODKAAKRGFSLGVGRHGRWQFGITGD AWYEVTVPKPAAL AAGKWAHL SAVFAPSEGAIRLFLNGEQV : 400
          : GDDGKPSAAVNQODKAAKRGFSLGVGRHGRWQFGITGD AWYEVTVPKPAAL AAGKWAHL SAVFAPSEGAIRLFLNGEQV
          : -----*-----420-----440-----460-----480-----
SA34      : AQTAIPTTARLTKADVPLIIGRHNQPAIINGTFAVNMFNGLIDEAKIHNSALTPAAVTAGHQKDVRTFAGGATPKARMEM : 455
Sam23877 : AQTAIPTTARLTKADVPLIIGRHNQPAIINGTFAVNMFNGLIDEAKIHNSALTPAAVTAGHQKDVRTFAGGATPKARMEM : 455
pET28SA34-2 : AQTAIPTTARLTKADVPLIIGRHNQPAIINGTFAVNMFNGLIDEAKIHNSALTPAAVTAGHQKDVRTFAGGATPKARMEM : 480
pET28SA34-9 : AQTAIPTTARLTKADVPLIIGRHNQPAIINGTFAVNMFNGLIDEAKIHNSALTPAAVTAGHQKDVRTFAGGATPKARMEM : 480
          : AQTAIPTTARLTKADVPLIIGRHNQPAIINGTFAVNMFNGLIDEAKIHNSALTPAAVTAGHQKDVRTFAGGATPKARMEM
          : -----*-----500-----520-----540-----560-----
SA34      : DRSRYDGDYRPGYHFTAPNHWMNEPHAPIQYKGYHLFYQHNSHGPYWHNISWGHAVSADLVHWRDLPVALAPTEDSVA : 535
Sam23877 : DRSRYDGDYRPGYHFTAPNHWMNEPHAPIQYKGYHLFYQHNSHGPYWHNISWGHAVSADLVHWRDLPVALAPTEDSVA : 535
pET28SA34-2 : DRSRYDGDYRPGYHFTAPNHWMNEPHAPIQYKGYHLFYQHNSHGPYWHNISWGHAVSADLVHWRDLPVALAPTEDSVA : 560
pET28SA34-9 : DRSRYDGDYRPGYHFTAPNHWMNEPHAPIQYKGYHLFYQHNSHGPYWHNISWGHAVSADLVHWRDLPVALAPTEDSVA : 560
          : DRSRYDGDYRPGYHFTAPNHWMNEPHAPIQYKGYHLFYQHNSHGPYWHNISWGHAVSADLVHWRDLPVALAPTEDSVA
          : -----*-----580-----600-----620-----640-----
SA34      : PDGVWSGDAAYDENGVPVLLFTAGNDSQRPNQATGLARVPDPPGSDLVGWKMHPTLVTSQSADLVNAGARRVRFGDFRDP : 615
Sam23877 : PDGVWSGDAAYDENGVPVLLFTAGNDSQRPNQATGLARVPDPPGSDLVGWKMHPTLVTSQSADLVNAGARRVRFGDFRDP : 615
pET28SA34-2 : PDGVWSGDAAYDENGVPVLLFTAGNDSQRPNQATGLARVPDPPGSDLVGWKMHPTLVTSQSADLVNAGARRVRFGDFRDP : 640
pET28SA34-9 : PDGVWSGDAAYDENGVPVLLFTAGNDSQRPNQATGLARVPDPPGSDLVGWKMHPTLVTSQSADLVNAGARRVRFGDFRDP : 640
          : PDGVWSGDAAYDENGVPVLLFTAGNDSQRPNQATGLARVPDPPGSDLVGWKMHPTLVTSQSADLVNAGARRVRFGDFRDP
          : -----*-----660-----680-----700-----720-----
SA34      : FVWKEGDTWFQLMGSQVSTSGTDIGGTALLYTSKNLTDWYSGPLMVGDAVAAHPKTGQWELPTFLPIGKDAQGRERRA : 695
Sam23877 : FVWKEGDTWFQLMGSQVSTSGTDIGGTALLYTSKNLTDWYSGPLMVGDAVAAHPKTGQWELPTFLPIGKDAQGRERRA : 695
pET28SA34-2 : FVWKEGDTWFQLMGSQVSTSGTDIGGTALLYTSKNLTDWYSGPLMVGDAVAAHPKTGQWELPTFLPIGKDAQGRERRA : 720
pET28SA34-9 : FVWKEGDTWFQLMGSQVSTSGTDIGGTALLYTSKNLTDWYSGPLMVGDAVAAHPKTGQWELPTFLPIGKDAQGRERRA : 720
          : FVWKEGDTWFQLMGSQVSTSGTDIGGTALLYTSKNLTDWYSGPLMVGDAVAAHPKTGQWELPTFLPIGKDAQGRERRA

```

รูปที่ 5-24 แสดงลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีนประมวลรหัสอินูลินเนส SA34 ที่เชื่อมกับ

pET28a

หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinase^F และ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinase^R

	* 740 * 760 * 780 * 800	
SA34	: LLVNPAPFAGPGEYSSKYVYVWGTWDAQARRWTPDTTEPRLMYGDHFTGPSGTVDDKGRSLVFSTIAQDRRTERAHYDA	: 775
Sam23877	: LLVNPAPFAGPGEYSSKYVYVWGTWDAQARRWTPDTTEPRLMYGDHFTGPSGTVDDKGRSLVFSTIAQDRRTERAHYDA	: 775
pET28SA34-2:	: LLVNPAPFAGPGEYSSKYVYVWGTWDAQARRWTPDTTEPRLMYGDHFTGPSGTVDDKGRSLVFSTIAQDRRTERAHYDA	: 800
pET28SA34-9:	: LLVNPAPFAGPGEYSSKYVYVWGTWDAQARRWTPDTTEPRLMYGDHFTGPSGTVDDKGRSLVFSTIAQDRRTERAHYDA	: 800
	LLVNPAPFAGPGEYSSKYVYVWGTWDAQARRWTPDTTEPRLMYGDHFTGPSGTVDDKGRSLVFSTIAQDRRTERAHYDA	
	* 820 * 840 * 860 * 880	
SA34	: GWAHNAGLPIELSMRPGDLGFRPVEEVSRLHTGEPLLDISEPTSLTDANTRLAGVKGDMLHIKLTMERGSADTFGLDVL	: 855
Sam23877	: GWAHNAGLPIELSMRPGDLGFRPVEEVSRLHTGEPLLDISEPTSLTDANTRLAGVKGDMLHIKLTMERGSADTFGLDVL	: 855
pET28SA34-2:	: GWAHNAGLPIELSMRPGDLGFRPVEEVSRLHTGEPLLDISEPTSLTDANTRLAGVKGDMLHIKLTMERGSADTFGLDVL	: 880
pET28SA34-9:	: GWAHNAGLPIELSMRPGDLGFRPVEEVSRLHTGEPLLDISEPTSLTDANTRLAGVKGDMLHIKLTMERGSADTFGLDVL	: 880
	GWAHNAGLPIELSMRPGDLGFRPVEEVSRLHTGEPLLDISEPTSLTDANTRLAGVKGDMLHIKLTMERGSADTFGLDVL	
	* 900 * 920 * 940 * 960	
SA34	: RSPGDEERTRLFYDAPAGQLGVDRTSRGNSSAEPNFGIHKGPLTLSNGTLTLDVFDVDRSMVEAYANNHKSITTRAYPFR	: 935
Sam23877	: RSPGDEERTRLFYDAPAGQLGVDRTSRGNSSAEPNFGIHKGPLTLSNGTLTLDVFDVDRSMVEAYANNHKSITTRAYPFR	: 935
pET28SA34-2:	: RSPGDEERTRLFYDAPAGQLGVDRTSRGNSSAEPNFGIHKGPLTLSNGTLTLDVFDVDRSMVEAYANNHKSITTRAYPFR	: 960
pET28SA34-9:	: RSPGDEERTRLFYDAPAGQLGVDRTSRGNSSAEPNFGIHKGPLTLSNGTLTLDVFDVDRSMVEAYANNHKSITTRAYPFR	: 960
	RSPGDEERTRLFYDAPAGQLGVDRTSRGNSSAEPNFGIHKGPLTLSNGTLTLDVFDVDRSMVEAYANNHKSITTRAYPFR	
	* 980	
SA34	: QDSLGLRLFGDGSVVKSMVWKMGNMMD	: 963
Sam23877	: QDSLGLRLFGDGSVVKSMVWKMGNMMD	: 963
pET28SA34-2:	: QDSLGLRLFGDGSVVKSMVWKMGNMMD	: 988
pET28SA34-9:	: QDSLGLRLFGDGSVVKSMVWKMGNMMD	: 988
	QDSLGLRLFGDGSVVKSMVWKMGNMMD	

รูปที่ 5-24 (ต่อเนือง)



เนื่องจากทั้ง pET28a-SA22 และ pET28a-SA34 มีความเหมือนกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 มากที่สุด ดังนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ pET28a-SA22 และ pET28a-SA34 กับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (รูปที่ 5-25)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง pET28a-SA22, pET28-SA34 และ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (Sam23877) โดยใช้ Clustal Omega พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน คือ

บริเวณที่ Sam23877 ต่างกับทั้ง pET28a-SA22, pET28-SA34 ที่สำคัญ 3 แห่ง คือ

1. Sam23877 ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ CCAGAT บริเวณตำแหน่งที่ 95-100 แต่ pET28a-SA22 และ pET28-SA34 พบ
2. Sam23877 ในบริเวณตำแหน่งที่ 112-116 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ GAGAG แต่ใน pET28a-SA22 และ pET28-SA34 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ CGCGA
3. Sam23877 ในบริเวณตำแหน่งที่ 117-119 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ ACA แต่ pET28a-SA22 และ pET28-SA34 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็น GAG

นอกจากนี้ พบว่า Sam23877 มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งอื่นๆ ที่ต่างกับ pET28a-SA22 และ pET28-SA34 ดังนี้

มีตำแหน่งที่ A เปลี่ยนเป็น T บริเวณ 1320, 2533

มีตำแหน่งที่ A เปลี่ยนเป็น C บริเวณ 187, 712, 727, 1619, 1982, 1988, 2130

มีตำแหน่งที่ T เปลี่ยนเป็น G บริเวณ 847, 2121, 2373, 2775

มีตำแหน่งที่ T เปลี่ยนเป็น C บริเวณ 132, 437, 498, 597, 986, 1155, 1453, 1704, 1755, 1881, 2055, 2535, 2736, 2754, 2892

มีตำแหน่งที่ T เปลี่ยนเป็น A บริเวณ 214, 2454

มีตำแหน่งที่ C เปลี่ยนเป็น T บริเวณ 162, 342, 431, 450, 470, 554, 753, 840, 1021, 1084, 1350, 1380, 1446, 1617, 1701, 1749, 1905, 1980, 2001, 2063, 2493, 2685, 2770, 29919, 2921

มีตำแหน่งที่ C เปลี่ยนเป็น A บริเวณ 192, 210, 275, 773, 1068, 1143, 1449, 1527, 1653, 1938, 2340, 2526, 2599, 2718, 2782, 2796

มีตำแหน่งที่ C เปลี่ยนเป็น G บริเวณ 216, 258, 270, 294-295, 300, 385, 673, 704, 927, 1017, 1362, 1410, 1598, 1673, 1848, 1862, 1965, 1976, 2043, 2595, 2598, 2649, 2673, 2745, 2809

มีตำแหน่งที่ G เปลี่ยนเป็น A ที่บริเวณ 115, 199, 204, 292, 297, 436, 757, 894, 945, 1110, 1194, 1207, 1213, 1222, 1234, 1357, 1407, 1515, 1597, 1605, 2076, 2142, 2151, 2199, 2247, 2277, 2527, 2539, 2637, 2652, 2746-2747, 2763, 2773, 2885

มีตำแหน่งที่ A เปลี่ยนเป็น G บริเวณ 144, 194, 224, 253, 561, 578, 831, 843, 900, 933, 942, 1414, 1545, 2062, 2167, 2325, 2508, 2525, 2566, 2628, 2742, 2920

มีตำแหน่งที่ G เปลี่ยนเป็น C บริเวณ 209, 360, 456, 471, 477, 480, 516, 601, 855, 981, 1107, 1185, 1204, 1223, 1281, 1365, 1452, 1989, 2007, 2475, 2529

มีตำแหน่งที่ G เปลี่ยนเป็น T ที่บริเวณ 345, 892, 1032, 1981

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ pET28a-SA22 ต่างกับ pET28a-SA34 และ Sam23877 คือ มีตำแหน่งที่ A เป็น G บริเวณ 638

มีตำแหน่งที่ T เป็น C บริเวณ 798

มีตำแหน่งที่ C เป็น T บริเวณ 2818

มีตำแหน่งที่ G เป็น A ที่บริเวณ 698

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ pET28a-SA34 ต่างกับ pET28a-SA22 และ Sam23877 คือ มีตำแหน่งที่ A เป็น G ที่บริเวณ 2362

มีตำแหน่งที่ T เป็น C บริเวณ 747

มีตำแหน่งที่ C เป็น T บริเวณ 1334

มีตำแหน่งที่ G เป็น A บริเวณ 1230, 1397, 1826, 1892

```

Sam23877 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----
pET28aSA22 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGGCTGGTCCCGCCGCGCAGCCATATGCGAACCCGTGCAATGCG 5
pET28aSA34 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGGCTGGTCCCGCCGCGCAGCCATATGCGAACCCGTGCAATGCG 80
          atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcgccctggcgccgCGCagccatgCGAACCCGTGCAATGCG

Sam23877 : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----
pET28aSA22 : AACCCGTGCACCATCGAGATCGCGGACCGCGACCGGCTGCTGCGCTGCTGCTCGGACTTCGCGATATGCGCTGG 79
pET28aSA34 : AACCCGTGCACCATCGAGATCGCGGACCGCGACCGGCTGCTGCGCTGCTGCTCGGACTTCGCGATATGCGCTGG 160
          AACCCGTGCACCATCGAGATCGCGGACCGCGACCGGCTGCTGCGCTGCTGCTCGGACTTCGCGATATGCGCTGG

Sam23877 : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----
pET28aSA22 : GCCTGACATCACCCCTGATGACGCAGACCGCGACCGCGCGGGACCAAGCTGCTCAACCCCGACTTCGAGTCCGGGGAC 159
pET28aSA34 : GCCTGACATCACCCCTGATGACGCAGACCGCGACCGCGCGGGACCAAGCTGCTCAACCCCGACTTCGAGTCCGGGGAC 240
          GtCTGACATCACCCCTGATGACGCAGACCGCGAGCGCGGACCAAGCTGCTGAGAACCCCGACTTCGAGTCCGGGGAC

Sam23877 : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----
pET28aSA22 : CTCAGCGGCTGGCCACACCGGAACCCGCTTCAACCGAGCGGTACCGAGCAAGCGGGTGGGGTGGGGTCTGCTCTT 239
pET28aSA34 : CTCAGCGGCTGGCCACACCGGAACCCGCTTCAACCGAGCGGTACCGAGCAAGCGGGTGGGGTGGGGTCTGCTCTT 320
          CTCAGCGGCTGGCCACACCGGAACCCGCTTCAACCGAGCGGTACCGAGCAAGCGGGTGGGGTGGGGTCTGCTCTT

Sam23877 : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----
pET28aSA22 : CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGGAGCTGACGTCGGAGCGGT 319
pET28aSA34 : CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGGAGCTGACGTCGGAGCGGT 400
          CAACCAGCAGGGCTCCTACCACTTGGGGATTTCGGCGGGCGGTGACGCCGCCACCGGGAGCTGACGTCGGAGCGGT

Sam23877 : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----
pET28aSA22 : TCACCCTGACCCGACCCGGCATGGTCAAGCTCTCGGGCGGGCAAGCAAAAGACCTTACGCGCCCTAC 399
pET28aSA34 : TCACCCTGACCCGACCCGGCATGGTCAAGCTCTCGGGCGGGCAAGCAAAAGACCTTACGCGCCCTAC 480
          TCACCCTGACCCGACCCGGCATGGTCAAGCTCTCGGGCGGGCAAGCAAAAGACCTTACGCGCCCTAC

Sam23877 : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----
pET28aSA22 : ACCCTCGAGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGAGCAGAGGGGTACCGCCCGTCACTGGGAGCCCGGA 479
pET28aSA34 : ACCCTCGAGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGAGCAGAGGGGTACCGCCCGTCACTGGGAGCCCGGA 560
          ACCCTCGAGGAAACCGTCTGCACAAGGCCACCGGACCGAGCAGAGGGGTACCGCCCGTCACTGGGAGCCCGGA

Sam23877 : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----
pET28aSA22 : ACACCTCGGGAAGCAACTGCGCGTCAACCGTCTGACAAAGGCCACCGGGCTGGGGCCACATCAACCTCAACGAGCTCC 559
pET28aSA34 : ACACCTCGGGAAGCAACTGCGCGTCAACCGTCTGACAAAGGCCACCGGGCTGGGGCCACATCAACCTCAACGAGCTCC 640
          gCACCTCGGGAAGCAACTGCGCGTCAACCGTCTGACAAAGGCCACCGGGCTGGGGCCACATCAACCTCAACGAGCTCC

Sam23877 : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----
pET28aSA22 : GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGCTTCAACGAGGGGAGGGGACCC 639
pET28aSA34 : GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGCTTCAACGAGGGGAGGGGACCC 720
          GCGTCGGCACCGACCCCGACCCGATCCCTCCAGCGGGGACTCGCCGCCACTGGGCTTCAACGAGGGGAGGGGACCC

Streptomyc : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----
pET28aSA22 : ACGACCGGGAGAAGGTCAAGCAGGCGCCGACCGGTCAGTACGCTTTCACGAGGGGAGTACAAGCCCGACAGTGA 719
pET28aSA34 : ACGACCGGGAGAAGGTCAAGCAGGCGCCGACCGGTCAGTACGCTTTCACGAGGGGAGTACAAGCCCGACAGTGA 800
          ACGACCGGGAGAAGGTCAAGCAGGCGCCGATCCCATCAGCTACGCTTTCACGAGGGGAGTACAAGCCCGACAGTGA

Sam23877 : -----*-----820-----*-----840-----*-----860-----*-----880-----
pET28aSA22 : CCCGCTCTGGCGCCGAAGAAGCAAGCCGACGGTACTCTCCGGCGCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA 799
pET28aSA34 : CCCGCTCTGGCGCCGAAGAAGCAAGCCGACGGTACTCTCCGGCGCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA 880
          CCCGCTCTGGCGCCGAAGAAGCAAGCCGACGGTACTCTCCGGCGCTGCTGTTTCGACGGCTACTCCACCTGGGTCA

Sam23877 : -----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960-----
pET28aSA22 : CCGCGCCCGCTCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTGAAGGCTGGGTGCGCCCGCGGTTTCAAGTGG 879
pET28aSA34 : CCGCGCCCGCTCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTGAAGGCTGGGTGCGCCCGCGGTTTCAAGTGG 960
          CCGCGCCCGCTCAGACACAGCTGCCACGGACGGCTGACCGTGAAGGCTGGGTGCGCCCGCGGTTTCAAGTGG

```

รูปที่ 5-25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 และ SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a เทียบกับ *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877

หมายเหตุ ---- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinase^F และ

..... แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinase^R

Sam23877 : **GGAGACGACGGCAAAACCGTCCGCCGCGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGGCAAGCGCGGCCTTCCTCCCTCGGCTGTCGGCCG** : 959
 pET28aSA22 : **GGAGACGACGGCAAAACCGTCCGCCGCGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGGCAAGCGCGGCCTTCCTCCCTCGGCTGTCGGCCG** : 1040
 pET28aSA34 : **GGAGACGACGGCAAAACCGTCCGCCGCGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGGCAAGCGCGGCCTTCCTCCCTCGGCTGTCGGCCG** : 1040
 GGAGACGACGGCAAAACCGTCCGCCGCGTCAACCAGCAGGACAAGGGCGGCAAGCGCGGCCTTCCTCCCTCGGCTGTCGGCCG

Sam23877 : **ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGGACCCGGCAGCGCTGGACGAGGTGACGGTCCCAGAGCCGGCGCCCTGGCCG** : 1039
 pET28aSA22 : **ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGGACCCGGCAGCGCTGGACGAGGTGACGGTCCCAGAGCCGGCGCCCTGGCCG** : 1120
 pET28aSA34 : **ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGGACCCGGCAGCGCTGGACGAGGTGACGGTCCCAGAGCCGGCGCCCTGGCCG** : 1120
 ACACGGCAGGTGGCAGTTCCGGCATCGGACCCGGCAGCGCTGGTACGAGGTGACGGTCCCAGAGCCGGCaGCCCTGGCCG

Sam23877 : **CGGGCAAGTGGGCGCACCTGTCCGCCGTTTCGGTCCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCTCAACGGCGACAGGTC** : 1119
 pET28aSA22 : **CGGGCAAGTGGGCGCACCTGTCCGCCGTTTCGGTCCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCTCAACGGCGACAGGTC** : 1200
 pET28aSA34 : **CGGGCAAGTGGGCGCACCTGTCCGCCGTTTCGGTCCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCTCAACGGCGACAGGTC** : 1200
 CGGGCAAGTGGGCGCACCTGTCCGCCGTTTCGGTCCGCCGAGCGAGGGCGCGATCCGGCTCTTCTCAACGGCGAaCAGGTC

Sam23877 : **GCCGAGCCGCCCTCCCAACCGCGCGCGCTGCGCAAGGGCGAGCTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAGCCCGC** : 1199
 pET28aSA22 : **GCCGAGCCGCCCTCCCAACCGCGCGCGCTGCGCAAGGGCGAGCTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAGCCCGC** : 1280
 pET28aSA34 : **GCCGAGCCGCCCTCCCAACCGCGCGCGCTGCGCAAGGGCGAGCTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAGCCCGC** : 1280
 GCCGAGCCGCCCaTCCCAACCGCGCGCGCTGCaCCAGGGCGAGCTCCCTGATCATCGGCCGTCAACAACAGCCCGC

Sam23877 : **GATCATCAACGGCAGGTTCGCCGTCAACATGTTCAACGGACTCATCGACGAGGGAAGATCCACAACAGCGCCCTCGCC** : 1279
 pET28aSA22 : **GATCATCAACGGCAGGTTCGCCGTCAACATGTTCAACGGACTCATCGACGAGGGAAGATCCACAACAGCGCCCTCGCC** : 1360
 pET28aSA34 : **GATCATCAACGGCAGGTTCGCCGTCAACATGTTCAACGGACTCATCGACGAGGGAAGATCCACAACAGCGCCCTCGCC** : 1360
 CATCATCAACGGCAGGTTCGCCGTCAACATGTTCAACGGTCTCATCGACGAGGtGAAGATCCACAACAGtGCCCTCaCC

Sam23877 : **CGCCGCGGTCACGGCCCGCACCCAGAAGGACGTACAGACCTTCGCGGGCGGACACACCCCAAGGCCGGATGGAGATG** : 1359
 pET28aSA22 : **CGCCGCGGTCACGGCCCGCACCCAGAAGGACGTACAGACCTTCGCGGGCGGACACACCCCAAGGCCGGATGGAGATG** : 1440
 pET28aSA34 : **CGCCGCGGTCACGGCCCGCACCCAGAAGGACGTACAGACCTTCGCGGGCGGACACACCCCAAGGCCGGATGGAGATG** : 1440
 CGCCGCGGTCACGGCCCGCaCCAGAGGACGTACaGACCTTCGCaGGGCGGCaCCACCCCAAGGCCGGATGGAGATG

Sam23877 : **GACCGTCCCGGTACGACGGTGACCGCTACCGCCGGCTACCACCTTACCGCCCGGAACCACTGGATGAACGAAGCCCA** : 1439
 pET28aSA22 : **GACCGTCCCGGTACGACGGTGACCGCTACCGCCGGCTACCACCTTACCGCCCGGAACCACTGGATGAACGAAGCCCA** : 1520
 pET28aSA34 : **GACCGTCCCGGTACGACGGTGACCGCTACCGCCGGCTACCACCTTACCGCCCGGAACCACTGGATGAACGAAGCCCA** : 1520
 GACCGTTCaCGcTACGACGGTGACCGCTACCGCCCGGCTACCACCTTACCGCCCGGAACCACTGGATGAACGAaCCCCA

Sam23877 : **CGCCCCATCCAGTACAAGGGCAATACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCCACGGCCCTACTGGCAACAATCGCCT** : 1519
 pET28aSA22 : **CGCCCCATCCAGTACAAGGGCAATACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCCACGGCCCTACTGGCAACAATCGCCT** : 1600
 pET28aSA34 : **CGCCCCATCCAGTACAAGGGCAATACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCCACGGCCCTACTGGCAACAATCGCCT** : 1600
 CGCCCCaATCCAGTACAAGGGCAaTACCACCTCTTCTACCAGCACAACCTCCCACGGCCCTACTGGCAACAATCaGCT

Sam23877 : **GGGGCACGCGGTGAGCGAGGACCTGGTCCACTGGGCGGACCTGCCGCTCGCCCTCGGCCACCCAGGAGACAGCTGGCC** : 1599
 pET28aSA22 : **GGGGCACGCGGTGAGCGAGGACCTGGTCCACTGGGCGGACCTGCCGCTCGCCCTCGGCCACCCAGGAGACAGCTGGCC** : 1680
 pET28aSA34 : **GGGGCACGCGGTGAGCGAGGACCTGGTCCACTGGGCGGACCTGCCGCTCGCCCTCGGCCACCCAGGAGACAGCTGGCC** : 1680
 GGGGCaCAGCGGTGAGtGcGGACCTGGTCCACTGGGCGGACCTGCCGCTCGCaCTCGGCCACCCAGGAGACAGcGTGGCC

Sam23877 : **CCCCACGGGGTCTGGTCCGGCGATGCCGCTACGACGAGAAGCGGCTGCCGCTCTGCTGTTACCCGCGGGCAATGACTC** : 1679
 pET28aSA22 : **CCCCACGGGGTCTGGTCCGGCGATGCCGCTACGACGAGAAGCGGCTGCCGCTCTGCTGTTACCCGCGGGCAATGACTC** : 1760
 pET28aSA34 : **CCCCACGGGGTCTGGTCCGGCGATGCCGCTACGACGAGAAGCGGCTGCCGCTCTGCTGTTACCCGCGGGCAATGACTC** : 1760
 CCCCACGGGGTCTGGTCCGGTgAcGCCGCTACGACGAGAAGCGGCTGCCGCTCTGCTGTTACCCGCTGGCAaCGACTC

Sam23877 : **CCAGCGCCCAACAGGGCAGCGGCTCGCCCGCCCGCTGACCCCGGCGACAGCGACCTGGTTCGGTGAAGATGCACC** : 1759
 pET28aSA22 : **CCAGCGCCCAACAGGGCAGCGGCTCGCCCGCCCGCTGACCCCGGCGAGAGCGACCTGGTTCGGTGAAGATGCACC** : 1840
 pET28aSA34 : **CCAGCGCCCAACAGGGCAGCGGCTCGCCCGCCCGCTGACCCCGGCGAGAGCGACCTGGTTCGGTGAAGATGCACC** : 1840
 CCAGCGCCCAACAGGGCAGCGGCTCGCCCGCCCGCTGACCCCGGCGAGAGCGACCTGGTTCGaGtGGAAAGATGCACC

Sam23877 : **CCACCCTCGTACCAGCCAGACCGCCGACCTGAACGTCCGGTCCCGGACGCAAGGTCCGCTTCGGCGACTTCCGCGACCCC** : 1839
 pET28aSA22 : **CCACCCTCGTACCAGCCAGACCGCCGACCTGAACGTCCGGTCCCGGACGCAAGGTCCGCTTCGGCGACTTCCGCGACCCC** : 1920
 pET28aSA34 : **CCACCCTCGTACCAGCCAGACCGCCGACCTGAACGTCCGGTCCCGGACGCAAGGTCCGCTTCGGCGACTTCCGCGACCCC** : 1920
 CCACCCTgTACCAGCCAGAgCGCCGACCTGAACGTCCGGcGCCGAGCGCAAGGTCCGCTTCGGTgACTTCCGCGACCCC

Sam23877 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACCGAAGGACATCGGGCGG** : 1919
 pET28aSA22 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACCGAAGGACATCGGGCGG** : 2000
 pET28aSA34 : **TTTCGTCTGGAAGGAGGGGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGACACCGAAGGACATCGGGCGG** : 2000
 TTTCGTCTGGAAGGAGGGGAGACACCTGGTTCAGCTGATGGGCTCGGGCTCCAGAgCACTtcCGGCAcCGACATCGGGCGG

Sam23877 : **ACCCGCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTACCCGACTGGACCTACTCGGGCCCTGATGACCCGGTACCTGGCGGCC** : 1999
 pET28aSA22 : **ACCCGCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTACCCGACTGGACCTACTCGGGCCCTGATGACCCGGTACCTGGCGGCC** : 2080
 pET28aSA34 : **ACCCGCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTACCCGACTGGACCTACTCGGGCCCTGATGACCCGGTACCTGGCGGCC** : 2080
 tACCCGCTCCTCTACACCTCCAAGAACCTACCCGACTGGACgTACTCGGGCCcCTGATGgtTCGGTgACGTGGCaGCC

รูปที่ 5-25 (ต่อเนื่อก)

```

*           2100           *           2120           *           2140           *           2160
Sam23877 : ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTTCCCATCGGAAGGACGCCAGGCCGGAAGCCGGGGC : 2079
pET28aSA22 : ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTTCCCATCGGAAGGACGCCAGGCCGGAAGCCGGGGC : 2160
pET28aSA34 : ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTTCCCATCGGAAGGACGCCAGGCCGGAAGCCGGGGC : 2160
          ACCCCAAGACCGGCCAGGTCTGGGAGCTGCCACCTTCCTTCCCATCGGAAGGACGCCAGGCCGGAAGCCGGGGC

*           2180           *           2200           *           2220           *           2240
Sam23877 : CTGCTCATCAACCCGGCCTTCCCGCCGGCCCGGGCAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGGCACCTGGGA : 2159
pET28aSA22 : CTGCTCATCAACCCGGCCTTCCCGCCGGCCCGGGCAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGGCACCTGGGA : 2240
pET28aSA34 : CTGCTCATCAACCCGGCCTTCCCGCCGGCCCGGGCAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGGCACCTGGGA : 2240
          CTGCTCgTCAACCCGGCCTTCCCGCCGGCCCGGGCAATACAGCAGCAAGTACGTCTACTACTGGGTGGGCACCTGGGA

*           2260           *           2280           *           2300           *           2320
Sam23877 : CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGGACCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCG : 2239
pET28aSA22 : CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGGACCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCG : 2320
pET28aSA34 : CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGGACCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCG : 2320
          CGCCCAAGCCCGCCGTGGACCCCGACACCAGGACCCCGGCTCATGGACTACGGCGACCATTACCCGGCCCCAGCG

*           2340           *           2360           *           2380           *           2400
Sam23877 : GAACAGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAGCATCCAGGACCGTGGACCGAACCGGCCACTACGACGCC : 2319
pET28aSA22 : GAACAGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAGCATCCAGGACCGTGGACCGAACCGGCCACTACGACGCC : 2400
pET28aSA34 : GAACAGTGGACGACAAGGGCGCTCCCTCGTCTTCAGCATCCAGGACCGTGGACCGAACCGGCCACTACGACGCC : 2400
          GAACgGTGGACGACAAGGGaCGTCCCTCGTCTTCAGCATCgCCAGGACCGgCGAACCGAACCGGCCACTACGACGCC

*           2420           *           2440           *           2460           *           2480
Sam23877 : GGCTGGGCCCAACACCGGGCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGACGGTGGACTCGGATTCCGCCCGTGGAGGA : 2399
pET28aSA22 : GGCTGGGCCCAACACCGGGCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGACGGTGGACTCGGATTCCGCCCGTGGAGGA : 2480
pET28aSA34 : GGCTGGGCCCAACACCGGGCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGACGGTGGACTCGGATTCCGCCCGTGGAGGA : 2480
          GGCTGGGCCCAACACCGGGCCTGCCATCGAAGTGTCCATGCGGCCGACGGTGGACTCGGATTCCGCCCGTGGAGGA

*           2500           *           2520           *           2540           *           2560
Sam23877 : GGTCTCCCGCCTCACACCGGGCAACACTCCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCCCGACGCAACACCCGCCCTGG : 2479
pET28aSA22 : GGTCTCCCGCCTCACACCGGGCAACACTCCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCCCGACGCAACACCCGCCCTGG : 2560
pET28aSA34 : GGTCTCCCGCCTCACACCGGGCAACACTCCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCCCGACGCAACACCCGCCCTGG : 2560
          GGTCTCCCGCCTCACACCGGGCAACACTCCTGGACATCAGCAGCCGACCACTCTCCCGACGCAACACCCGCCCTGG

*           2580           *           2600           *           2620           *           2640
Sam23877 : CCGGCAACAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTCACCTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAACCTGACG : 2559
pET28aSA22 : CCGGCAACAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTCACCTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAACCTGACG : 2640
pET28aSA34 : CCGGCAACAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTCACCTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAACCTGACG : 2640
          CCGGCAACAAGGGAGACATGCTCCACATCAAGCTCACCTGGAAACCGGGCAGCGCCGACACCTTCGGAACCTGACG

*           2660           *           2680           *           2700           *           2720
Sam23877 : CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCCCTTTCTACGAGCCCGCCGACGACAGCTGGGCGTGCAGCCGACCGCTC : 2639
pET28aSA22 : CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCCCTTTCTACGAGCCCGCCGACGACAGCTGGGCGTGCAGCCGACCGCTC : 2720
pET28aSA34 : CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCCCTTTCTACGAGCCCGCCGACGACAGCTGGGCGTGCAGCCGACCGCTC : 2720
          CGCAGCCCGGGGACGAAGAAGCGACCCGCCCTTTCTACGAGCCCTTCTACGAGCTCCCGCAGGACAGCTGGGCGTGCAGCCGACCGTAC

*           2740           *           2760           *           2780           *           2800
Sam23877 : CCGGAAACAACCTCCAGTGGCGAACCCGGCTTCGGTATCCACAAAGGCCCGCTGGCTCTCTCCACGGCACCTTGACCTCG : 2719
pET28aSA22 : CCGGAAACAACCTCCAGTGGCGAACCCGGCTTCGGTATCCACAAAGGCCCGTGGCTCTCTCCACGGCACCTTGACCTCG : 2800
pET28aSA34 : CCGGAAACAACCTCCAGTGGCGAACCCGGCTTCGGTATCCACAAAGGCCCGTGGCTCTCTCCACGGCACCTTGACCTCG : 2800
          CCGGAAACAACCTCCAGTGGCGAACCCGGCTTCGGTATCCACAAAGGCCCGTGGCTCTCTCCACGGCACCTTGACCTCG

*           2820           *           2840           *           2860           *           2880
Sam23877 : ACGTGTTCTTCGACCGCCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCGGC : 2799
pET28aSA22 : ACGTGTTCTTCGACCGCCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCGGC : 2880
pET28aSA34 : ACGTGTTCTTCGACCGCCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCGGC : 2880
          ACGTGTTCTTCGACCGCCGATGGTTCGAGGCGTACGCGAAACAACCAAGTCCATCACCACCCGGCCCTACCCCTTCGGC

*           2900           *           2920           *           2940           *           2960
Sam23877 : AAGGACTCCCTTGGCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGTGCTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2879
pET28aSA22 : AAGGACTCCCTTGGCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGTGCTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2960
pET28aSA34 : AAGGACTCCCTTGGCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGTGCTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC : 2960
          AAGGACTCCCTTGGCTGGCCCTCTTCGGCGACGGCAGTGTGCTCAAGTCCATGACCGTCTGGAAGATGGGCAACATGAC

```

```

Sam23877 : CGACTGA : 2886
pET28aSA22 : CGACTGA : 2967
pET28aSA34 : CGACTGA : 2967
          CGACTaA

```

รูปที่ 5-25 (ต่อเนือง)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย ExPASy Bioinformatics Resource Portal ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง pET28a-SA22, pET28-SA34 และ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (Sam23877) โดยใช้ Clustal Omega พบว่าทั้ง 3 โคโลนิมีลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ต่างกัน (รูปที่ 5-26) คือ บริเวณที่ Sam23877 มีบริเวณที่ต่างกับทั้ง pET28a-SA22, pET28-SA34 ที่สำคัญ 2 แห่ง คือ

1. Sam23877 ตำแหน่ง 35-36 ไม่พบกรดอะมิโน Alanine-Threonine แต่ pET28a-SA22 และ pET28-SA34 พบกรดอะมิโนดังกล่าว
2. Sam23877 ตำแหน่งที่ 39-40 พบกรดอะมิโน Arginine-Serine แต่ใน pET28a-SA22 และ pET28-SA34 พบ Glycine-Histidine

นอกจากนี้ พบว่า Sam23877 มีกรดอะมิโนตำแหน่งอื่นๆ ที่ต่างกับ pET28a-SA22 และ pET28-SA34 ดังนี้

ตำแหน่งที่ 63 Sam23877 พบ Proline เปลี่ยนเป็น Threonine

ตำแหน่งที่ 34, 298, 533 พบ Serine เป็น Alanine

ตำแหน่งที่ 67, 403, 412, 453, 847, 925 พบ Threonine เปลี่ยนเป็น Alanine

ตำแหน่งที่ 75 พบ Glycine เปลี่ยนเป็น Aspartic acid

ตำแหน่งที่ 85, 472 พบ Aspartic acid เปลี่ยนเป็น Threonine

ตำแหน่งที่ 92, 258 พบ Asparagine เปลี่ยนเป็น Threonine

ตำแหน่งที่ 144, 157, 185 พบ Valine เปลี่ยนเป็น Alanine

ตำแหน่งที่ 146 พบ Threonine เปลี่ยนเป็น Valine

ตำแหน่งที่ 152 พบ Aspartic acid เปลี่ยนเป็น Glutamic acid

ตำแหน่งที่ 408 พบ Threonine เปลี่ยนเป็น Glycine

ตำแหน่งที่ 191 พบ Glutamic acid เปลี่ยนเป็น Lysine

ตำแหน่งที่ 198, 329 พบ Alanine เปลี่ยนเป็น Valine

ตำแหน่งที่ 238 พบ Glutamine เปลี่ยนเป็น Lysine

ตำแหน่งที่ 281 พบ Alanine เปลี่ยนเป็น Serine

ตำแหน่งที่ 341 พบ Pheylalanine เปลี่ยนเป็น Leucine

ตำแหน่งที่ 362 พบ Tyrosine เปลี่ยนเป็น Histidine

ตำแหน่งที่ 540 พบ Alanine เปลี่ยนเป็น Glutamic acid

ตำแหน่งที่ 661 พบ Serine เปลี่ยนเป็น Aspartic acid

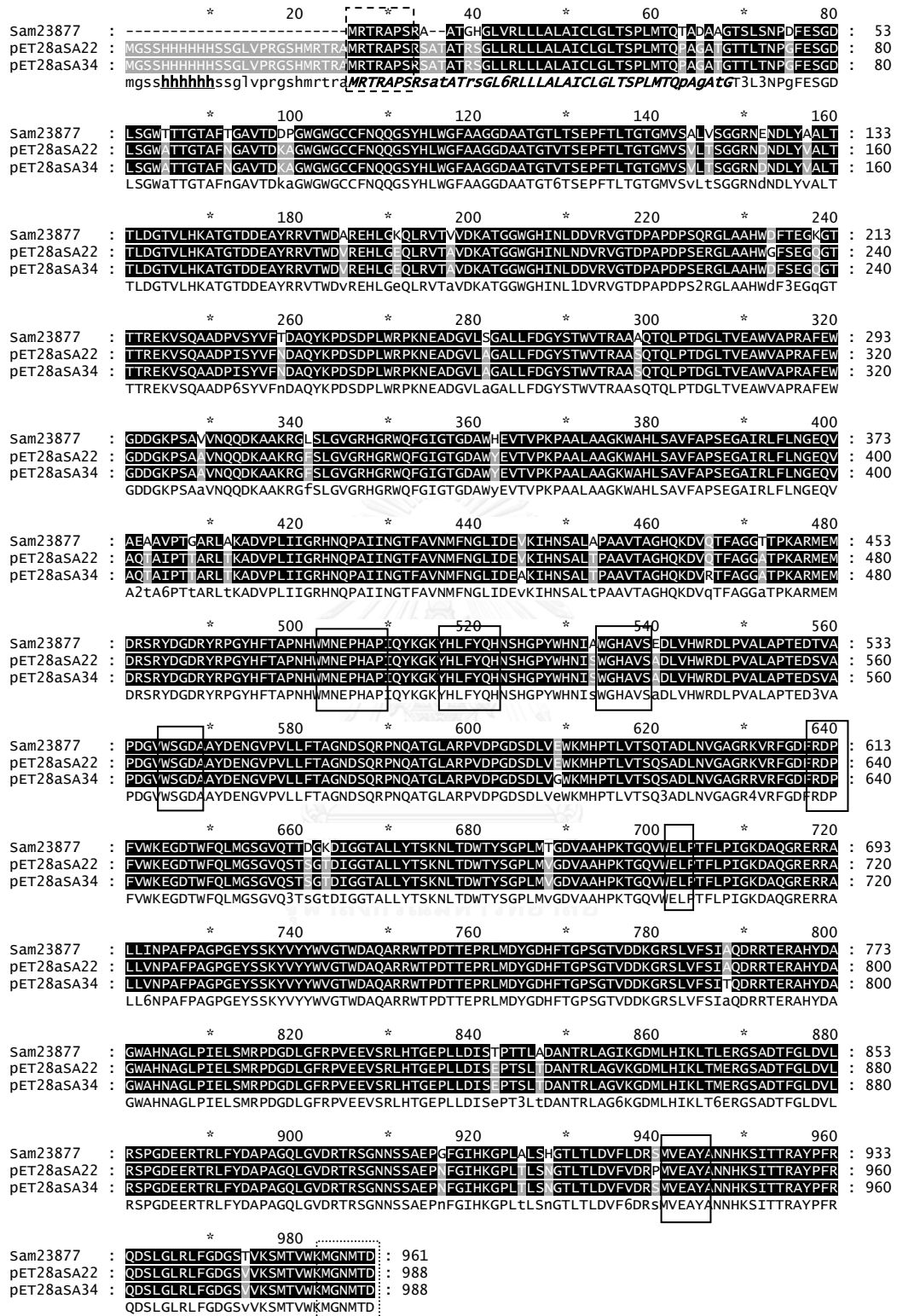
ตำแหน่งที่ 663 พบ Threonine เปลี่ยนเป็น Lysine

ตำแหน่งที่ 688, 974 พบ Valine เปลี่ยนเป็น Threonine

ตำแหน่งที่ 842 พบ Glutamic acid เปลี่ยนเป็น Threonine

ตำแหน่งที่ 916 พบ Asparagine เปลี่ยนเป็น Glycine
 ตำแหน่งที่ 928 พบ Asparagine เปลี่ยนเป็น Histidine
 จะพบว่ามีตำแหน่งที่ Threonine เปลี่ยนเป็น Alanin จำนวนมาก
 ส่วน pET28a-SA22 ต่างกับทั้ง Sam23877, pET28-SA34 คือ ตำแหน่งที่ 213 พบ
 Aspartic acid เปลี่ยนเป็น Glycine
 ตำแหน่งที่ 940 พบ Serine เป็น Proline
 ส่วน pET28a-SA34 ต่างกับทั้ง Sam23877, pET28-SA22 คือ ตำแหน่งที่ 445 พบ Valine
 เปลี่ยนเป็น Alanine
 ตำแหน่งที่ 466 พบ Glutamine เปลี่ยนเป็น Arginine
 ตำแหน่งที่ 609 พบ Glutamic acid เปลี่ยนเป็น Glycine
 ตำแหน่งที่ 788 พบ Alanine เปลี่ยนเป็น Threonine

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, pET28-SA22 และ pET28-SA34 พบบริเวณอนุรักษ์ของอินูลิเนส คือ WMNEPA, YHLFYQH, WGHAVS, RDP, ELP และ MVEA (รูปที่ 5-26) จึงได้นำ pET28-SA22 และ pET28-SA34 ย้ายเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLys S และ BL21(DE3) เพื่อศึกษาการแสดงออกรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสต่อไป



รูปที่ 5-26 แสดงลำดับกรดอะมิโนจากยีนประมวลรหัสอินูลิเนส SA22 และ SA34 ที่เชื่อมกับ pET28a เทียบกับ *Streptomyces ambifaciens* ATCC 23877
 --- แสดงบริเวณไพรเมอร์ full inulinase^F และ แสดงบริเวณไพรเมอร์
 — แสดงบริเวณอนุรักษ์ของ เอนโดอินูลิเนส full inulinase^R

5.2 ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

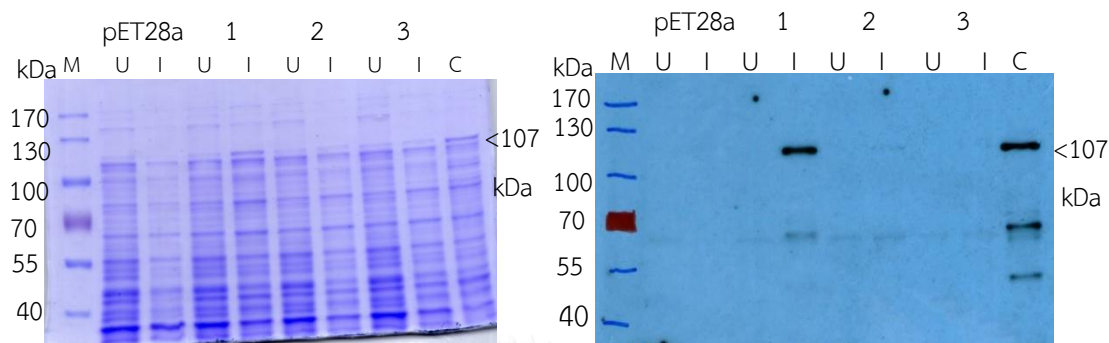
เมื่อเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนด้วย 0.1mM IPTG ในรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสทั้งใน *E.coli* Rosetta-gami (DE3) pLys S (Rosetta) และ *E.coli* BL21(DE3) (BL21) และตรวจสอบการผลิตโปรตีนด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 5-27) พบว่าทั้ง Rosetta และ BL21-pET28a-SA22 พบแถบโปรตีนขนาด 107 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส เมื่อเทียบกับรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสในสภาวะที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่มีการเชื่อมด้วยชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ซึ่งไม่ปรากฏแถบโปรตีนนี้

โดย Rosetta-pET28a-SA22 (A) โคลนที่ 1 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้มากที่สุด ส่วนโคลนที่ 2 และ 3 แสดงออกได้ในปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับ Rosetta-pET28a (เลน pET28a) และ Rosetta-pET28a-SA22 ที่ไม่ชักนำด้วย IPTG (เลน U) ไม่มีการแสดงออกโปรตีนที่ขนาด 107 kDa

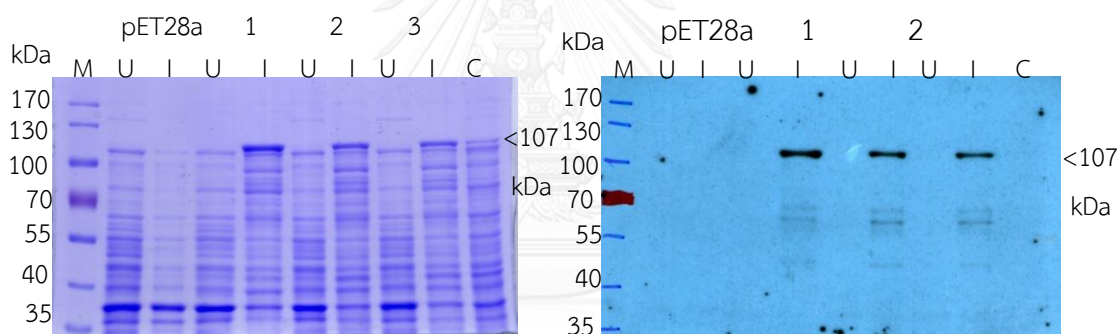
ส่วน BL21-pET28a-SA22 (B) โคลนที่ 1, 2, 3 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้ มีโคลนที่ 1 มีการแสดงออกมากที่สุด เทียบกับ BL21-pET28a (เลน pET28a) และ BL21-pET28a-SA22 ที่ไม่ชักนำด้วย IPTG (เลน U)

สังเกตได้ว่า BL21-pET28a-SA22 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้มากกว่า Rosetta-pET28a-SA22 โดยผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เป็นแอนติบอดีสำหรับติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี His₆ Tag ซึ่งรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสมี His₆ Tag ที่ตำแหน่ง N-terminal (รูปที่ 5-26) จึงสามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสได้ (รูปที่ 5-27)

A) Rosetta-pET28a-SA22



B) BL21-pET28a-SA22



รูปที่ 5-27 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การแสดงออกของ

โปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA22 (A) และ BL21-pET28a-SA22 (B)

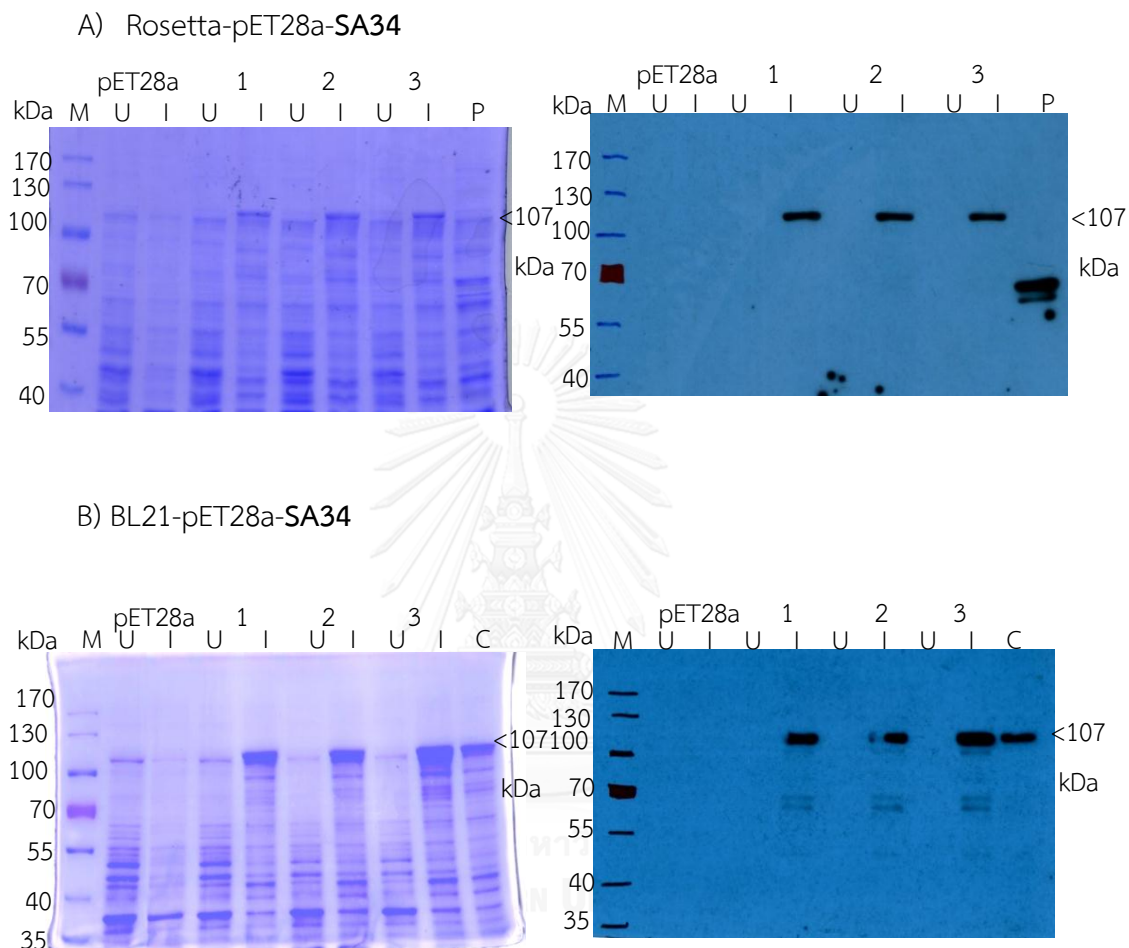
เลน M	PageRuler TM Prestained Protein Ladder
เลน pET28a	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a
เลน 1, 2, 3	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a-SA22 โคลน 1, 2, 3
เลน U	โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1mM IPTG
เลน I	โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1mM IPTG
เลน C	positive control (Rosetta-pET28a-SA34)

เมื่อเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนด้วย 0.1mM IPTG ในรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสทั้งใน *E.coli* Rosetta-gami (DE3) pLys S (Rosetta) และ *E.coli* BL21(DE3) (BL21) และตรวจสอบการผลิตโปรตีนด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 5-28) พบว่าทั้ง Rosetta และ BL21-pET28a-SA34 พบแถบโปรตีนขนาด 107 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส เมื่อเทียบกับรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสในสภาวะที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่มีการเชื่อมด้วยชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส ซึ่งไม่ปรากฏแถบโปรตีนนี้

โดย Rosetta-pET28a-SA34 (A) โคลนที่ 1, 2, 3 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับ Rosetta-pET28a (เลน pET28a) และ Rosetta-pET28a-SA34 ที่ไม่ชักนำด้วย IPTG (เลน U) ไม่มีการแสดงออกโปรตีนที่ขนาด 107 kDa

ส่วน BL21-pET28a-SA34 (B) โคลนที่ 1, 2, 3 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้ มีได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับ BL21-pET28a (เลน pET28a) และ BL21-pET28a-SA34 ที่ไม่ชักนำด้วย IPTG (เลน U)

สังเกตได้ว่า BL21-pET28a-SA34 แสดงออกโปรตีนขนาด 107 kDa ได้มากกว่า Rosetta-pET28a-SA34 โดยผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เป็นแอนติบอดีสำหรับติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี His₆ Tag ซึ่งรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสมี His₆ Tag ที่ตำแหน่ง N-terminal (รูปที่ 5-26) จึงสามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสได้ (รูปที่ 5-28) เช่นเดียวกับโปรตีน HPV ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี His₆ Tag ใช้เป็น positive control



รูปที่ 5-28 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การแสดงออกของ

โปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA34 (A) และ BL21-pET28a-SA34 (B)

เลน M	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
เลน pET28a	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a
เลน 1, 2, 3	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a-SA34 โคลน 1, 2, 3
เลน U	โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1mM IPTG
เลน I	โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1mM IPTG
เลน P	positive control (Rosetta-HPV)
เลน C	positive control (Rosetta-pET28a-SA34)

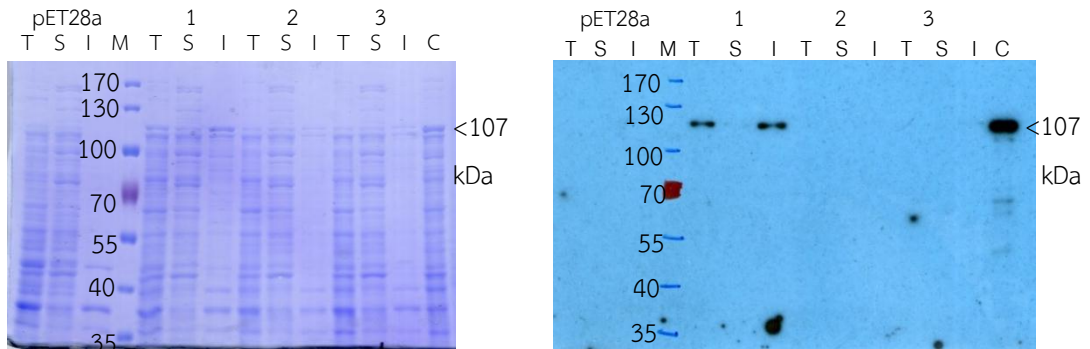
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถผลิตโปรตีนอินูลิเนส ทั้งใน Rosetta-gami (DE3)pLys S และ BL21(DE3) ซึ่งสามารถพบแถบโปรตีนอินูลิเนสได้ทั้งบนเจล SDS-PAGE และตรวจสอบได้ด้วย Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody สามารถผลิตได้ในความเข้มข้นของ 0.1 mM IPTG ที่ใช้ในการชักนำ พบว่า BL21- pET28a-SA22 และ SA34 นั้นผลิตโปรตีนได้มากกว่าจาก Rosetta-pET28a-SA22 และ SA34 ซึ่งโปรตีนมีขนาด 107 kDa และไม่มีการผลิตโปรตีนอินูลิเนสเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG และโคลนที่มีพลาสมิด pET28a ที่ไม่มีการเชื่อมด้วยชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลิเนส

เมื่อนำมาทำการตรวจสอบว่าโปรตีนอยู่ในรูปแบบ soluble form หรือ insoluble form โดยวิธีการ sonicate สามารถพบแถบโปรตีนอินูลิเนสได้ทั้งบนเจล SDS-PAGE และตรวจสอบด้วย Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (รูปที่ 5-29)

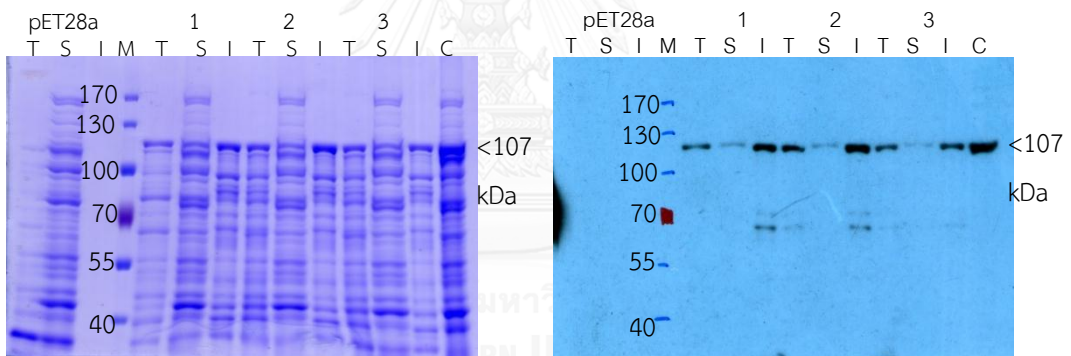
พบว่า Rosetta-pET28a-SA22 (A) โคลน 1 โปรตีนสามารถละลายได้บางส่วน ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย แต่อีก 2 โคลนไม่สามารถสังเกตการละลายได้เนื่องจากผลิตโปรตีนออกมาน้อยมาก

ส่วน BL21-pET28a-SA22 (B) ทั้ง 3 โคลนโปรตีนสามารถละลายได้บางส่วน แต่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย

A) Rosetta-pET28a-SA22



B) BL21-pET28a-SA22

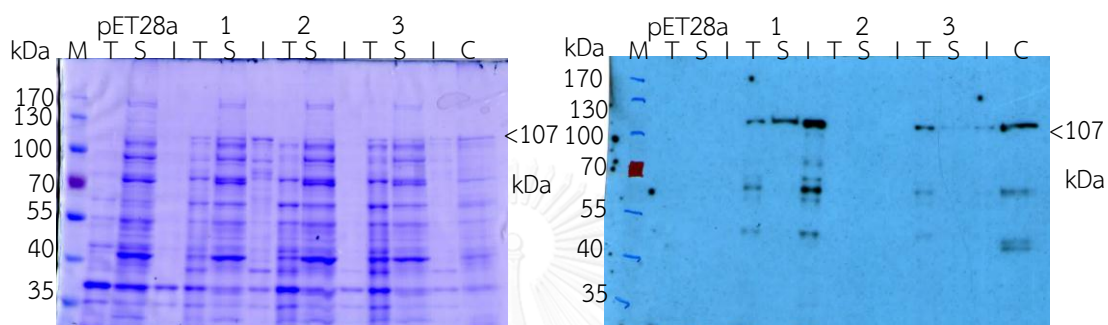


รูปที่ 5-29 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การละลายของ

โปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA22 (A) และ BL21-pET28a-SA22 (B)

เลน M	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
เลน pET28a	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a
เลน 1, 2, 3	โปรตีนจาก Rosetta หรือ BL21-pET28a-SA22 โคลอน 1, 2, 3
เลน T	โปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกก่อนทดสอบความสามารถในการละลาย
เลน S	ส่วน supernatant
เลน I	ส่วน insoluble
เลน C	positive control (Rosetta-pET28a-SA34)

เมื่อทำการทดสอบการละลายโปรตีนโดยใช้ sonicate ซึ่งสามารถพบแถบโปรตีนขนาด 107 kDa ได้ทั้งบนเจล SDS-PAGE และตรวจสอบด้วย Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (รูปที่ 5-30) พบว่า Rosetta-pET28a-SA34 โคลน 1 และ 3 โปรตีนสามารถละลายได้บางส่วน ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย ส่วนโคลนที่ 2 ไม่สามารถสังเกตการละลายได้



รูปที่ 5-30 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การละลายของ

โปรตีนจาก Rosetta- pET28a-SA34

เลน M	PageRuler TM Prestained Protein Ladder
เลน pET28a	โปรตีนจาก Rosetta-pET28a
เลน 1, 2, 3	โปรตีนจาก Rosetta-pET28a-SA34 โคลน 1, 2, 3
เลน T	โปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกก่อนทดสอบความสามารถในการละลาย
เลน S	ส่วน supernatant
เลน I	ส่วน insoluble
เลน C	positive control (Rosetta-pET28a-SA34)

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนอินูลิเนสที่ได้จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนที่สภาวะ 30 °C เหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย 0.1 mM IPTG สามารถผลิตได้ทั้งจาก Rosetta และ BL21 สามารถอยู่ส่วนละลายได้บางส่วนประมาณ 10% (w/v) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนทั้งหมด (รูปที่ 5-29 และ 5-30) ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงได้โปรตีนส่วนที่ละลายได้มาทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งทำการสอบซ้ำ 3 ซ้ำ โดยนำมาทำปฏิกิริยากับ 1% อินูลิน ซึ่งพบว่า Rosetta-pET28a-SA22 โคลน 1 มีกิจกรรมเอนไซม์ 0.0164 U/mg ส่วนอีก 2 โคลนนั้นไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้น้อยมาก ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ของ BL21- pET28a-SA22 โคลน 1 และ 2 ได้เท่ากับ 0.008 และ 0.0072 U/mg แต่โคลนที่ 3 ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อทำ

การเปรียบเทียบกับ Rosetta- pET28a-34 โคลน 1 มีกิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดคือ 0.0204 U/mg อีก 2 โคลนไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ จึงได้ทำการเลือก Rosetta- pET28a-SA34 โคลน 1 มาทำการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสต่อไป

ตารางที่ 5-1 แสดงสรุปการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสโคลน	โคลนที่	การแสดงออก รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส		โปรตีน สามารถ ละลายได้	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ(U/mg)
		SDS-PAGE	Western blotting		
Rosetta- pET28a-SA22	1	√	√	√	0.0164
	2	√	√	-	0
	3	√	√	-	0
BL21- pET28a-SA22	1	√	√	√	0.008
	2	√	√	√	0.0072
	3	√	√	√	0
Rosetta- pET28a-SA34	1	√	√	√	0.0204
	2	√	√	-	0
	3	√	√	√	0
BL21- pET28a-SA34	1	√	√	N/A	N/A
	2	√	√	N/A	N/A
	3	√	√	N/A	N/A

หมายเหตุ √ หมายถึง สามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสได้ใน SDS-PAGE และ

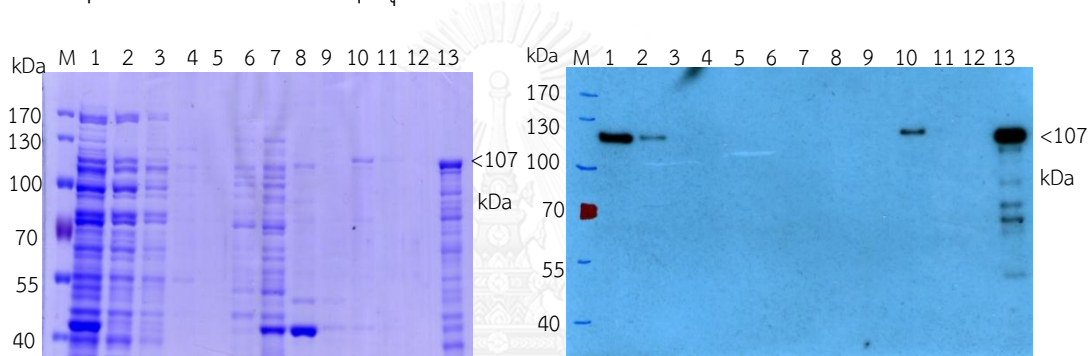
Western blotting โปรตีนสามารถละลายได้

- หมายถึง โปรตีนไม่ละลาย

N/A หมายถึง ไม่ทำการทดสอบ

5.3 ทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส

เมื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสจาก Rosetta-pET28a-34 เรียบร้อย นำโปรตีนส่วนที่ละลายได้หลังจาก sonicate มากรองผ่าน 0.45 μm ก่อนนำมาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA affinity chromatography เก็บทุกส่วนมาตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และวิธี Western blotting analysis จากผลการทดลอง (รูปที่ 5-31) พบว่ายังมีโปรตีนอินูลิเนสจับกับคอลัมน์ไม่หมดจึงมีรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสเหลืออยู่ (เลน 2) เมื่อใช้ 0.1M phosphate buffer pH 7 ที่มี 0, 20, 40, 60, 80, 100 mM imidazole จะทำให้โปรตีนไม่สามารถจับกับคอลัมน์ได้ดีเท่ารีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่มี His-tag อยู่หลุดออกมาก่อน (เลน 3-9) พบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสขนาด 107 kDa สามารถถูกชะออกมาด้วย 0.1M phosphate buffer pH 7 ที่มี 500 mM imidazole (เลน 10-11) ในส่วนที่ใช้ strip buffer ไม่มีโปรตีนใดๆหลุดออกมา (เลน 12)

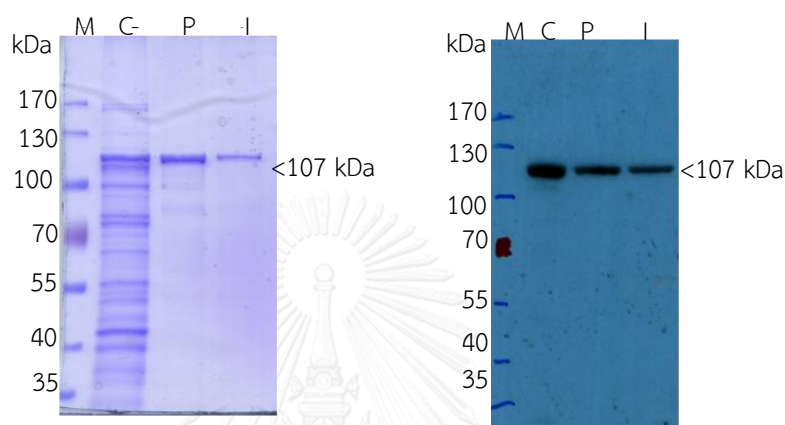


รูปที่ 5-31 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis การทำบริสุทธิ์

โปรตีนอินูลิเนสจาก Rosetta- pET28a-34

เลน M	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
เลน 1	โปรตีนที่ยังไม่นำไปผ่านคอลัมน์
เลน 2	โปรตีนที่ผ่านเข้าไปคอลัมน์ แล้วเหลือออกมา
เลน 3-4	โปรตีนที่ถูกล้างออกมา ด้วย 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 ตามลำดับ
เลน 5-9	โปรตีนที่ถูกชะ ด้วย 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 ที่มี 20, 40, 60, 80, 100 mM imidazole ตามลำดับ
เลน 10-11	โปรตีนที่ถูกชะ ด้วย 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 ที่มี 500 mM imidazole ครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
เลน 12	โปรตีนที่ถูกชะออกมาหมดด้วย strip buffer
เลน 13	positive control (Rosetta-pET28a-SA34)

รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เรียบร้อยแล้ว (เลน 10-11) มากำจัด Imidazole ออกโดยใช้ Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units และนำมาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis (รูปที่ 5-32) พบโปรตีนมีขนาด 107 kDa ซึ่งตรงกับโปรตีนก่อนทำให้บริสุทธิ์ (เลน C) และโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (เลน P) และเมื่อนำมาวัดกิจกรรมเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0244 U/mg



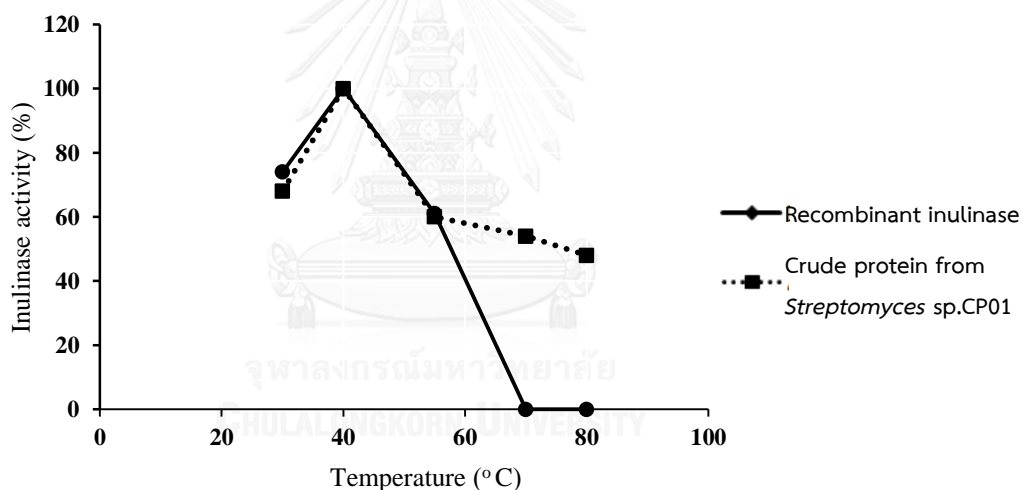
รูปที่ 5-32 แสดงผลการรัน 10% SDS-PAGE และ Western blotting analysis โปรตีนอินูลิเนส ที่ผ่านการกำจัด imidazole ออก

เลน M	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
เลน C	โปรตีนทั้งหมดก่อนการทำให้บริสุทธิ์
เลน P	โปรตีนรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
เลน I	โปรตีนรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสหลังกำจัด imidazole ออก

5.4 ศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

5.4.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

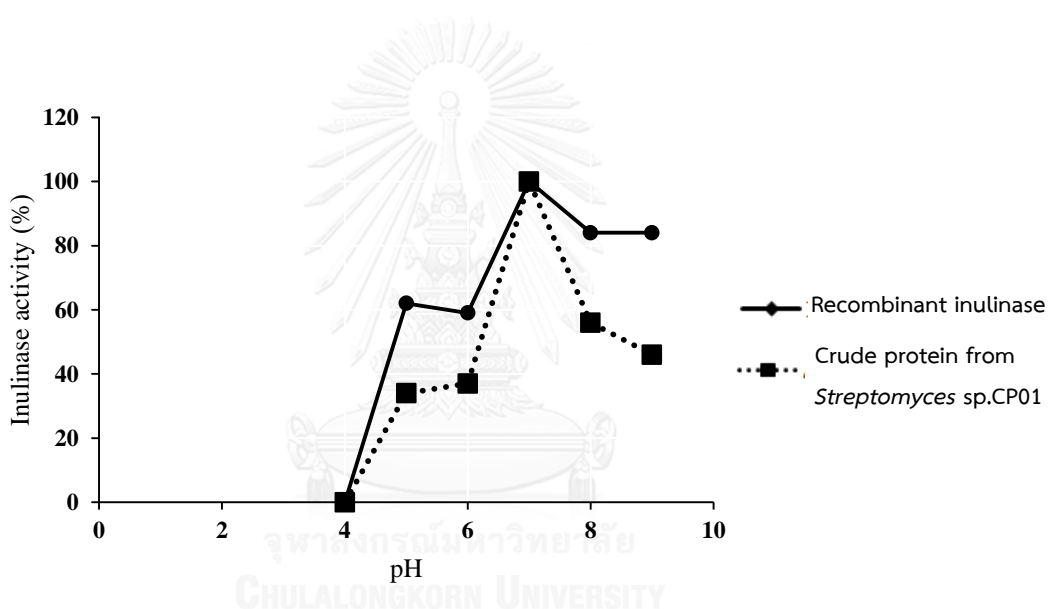
เมื่อนำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดกิจกรรมอินูลิเนส โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ 1% อินูลิน ที่ละลายอยู่ใน 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 55, 70 และ 80 ° C พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 ° C ให้กิจกรรมจำเพาะ 75% เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 40 ° C ให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมากที่สุด (100%) และเริ่มต่ำลงเป็น 60% ที่อุณหภูมิ 55 ° C จนกระทั่ง 70 และ 80 ° C ไม่เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดจาก crude protein ในอาหาร Basal medium ที่มี 1% อินูลิน จาก *Streptomyces* sp. CP01 มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการใช้รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส แต่ที่ 70 และ 80 ° C ยังเกิดกิจกรรมเอนไซม์อยู่ประมาณ 50-55% ดังรูปที่ 5-33



รูปที่ 5-33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับอุณหภูมิต่างๆ

5.4.2 ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

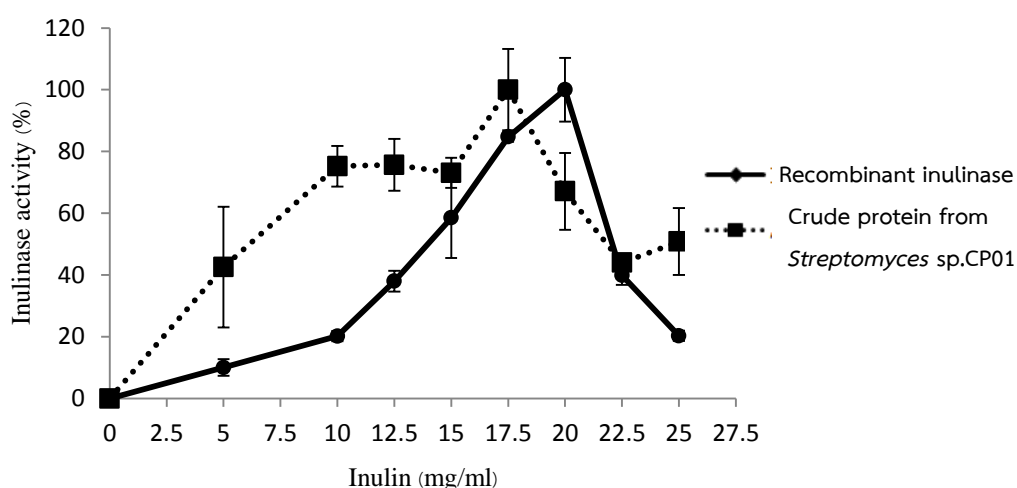
เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากผลข้อ 5.4.1 คือ 40°C ต่อไปจึงได้ทำการแปรความเป็นกรดต่างของ 0.1 M phosphate buffer ที่ใช้ในทำปฏิกิริยาวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่า pH 4 ที่ไม่เกิดกิจกรรมเอนไซม์ และพบว่า pH 5 มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 63% ซึ่งใกล้เคียงกับที่ pH 6 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 60% เมื่อเปรียบเทียบกับ pH 7 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด และกิจกรรมเอนไซม์เริ่มลดที่ pH 8-9 เป็น 85% ส่วนการใช้ crude protein ในอาหาร Basal medium ที่มี 1% อินูลิน จาก *Streptomyces* sp. CP01 มีกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดแนวโน้มนั้นเช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 5-34 ดังนั้นจึงเลือกที่ pH 7 มาทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 5-34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับความเป็นกรดต่างๆ

5.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

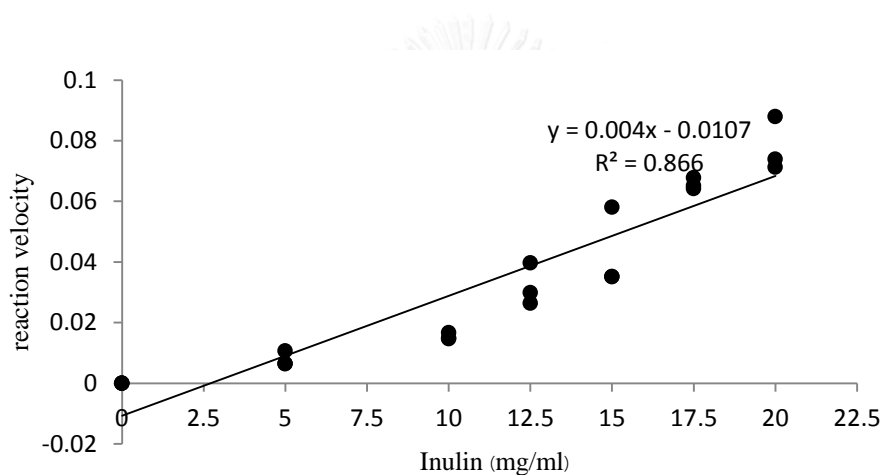
จากผลการทดลองจากข้อ 5.4.1-5.4.2 ทำให้ทราบว่าสภาวะ 0.1 M phosphate buffer pH 7 ที่อุณหภูมิ 40 ° C นั้นให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด จึงทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสม โดยเริ่มความเข้มข้นที่ 0, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 และ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น กิจกรรมเอนไซม์จะสูงขึ้น ตั้งแต่ความเข้มข้นอินูลิน 5 mg/ml มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 10% ที่ความเข้มข้นอินูลิน 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 20% ซึ่งเท่ากับที่ความเข้มข้นอินูลิน 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นอินูลิน 12.5 มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 37% ที่ความเข้มข้นอินูลิน 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 58% เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอินูลิน 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด และกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเริ่มลดลงหลังจากความเข้มข้นอินูลิน 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นอินูลิน 22.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 39% ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นอินูลิน 20 mg/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา ส่วนการใช้ crude protein ในอาหาร Basal medium ที่มี 1% อินูลิน จาก *Streptomyces* sp. CP01 มีกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดสูงสุดที่ความเข้มข้นอินูลิน 17.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลงที่ความเข้มข้นอินูลินหลังจาก 17.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนต่ำสุดที่ความเข้มข้นอินูลิน 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังรูปที่ 5-35



รูปที่ 5-35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับความเข้มข้นของอินูลินต่างๆ

5.4.4 ศึกษาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์

ในการศึกษา Michaelis-Menten kinetic parameters ได้ทำการหาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) และความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ (V_{max}) โดยศึกษาจาก Lineweaver-Burk plots โดยใช้ความเข้มข้นอินูลิน 0 ถึง 20 mg/ml เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะ 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 ที่อุณหภูมิ 40 ° C เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากนั้น นำผลที่ได้มาวาดกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอินูลิน เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} พบว่า K_m ได้เท่ากับ 11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยคำนวณได้จากจำนวนความเข้มข้นของอินูลินที่ให้ค่า 1/2 ของ V_{max} ซึ่ง V_{max} มีค่าเท่ากับ 0.088 mg/min/ml (รูปที่ 5-36)



รูปที่ 5-36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์กับความเข้มข้นของอินูลินต่างๆ

5.5 ศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลินสบริสุทธ์

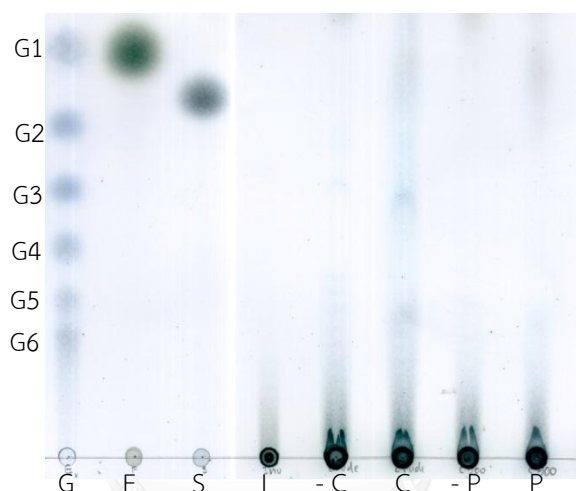
เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของรีคอมบิแนนท์บริสุทธ์ จากข้อ 5.4.1-5.4.3 ทำให้ทราบว่าสภาวะ 0.1 M phosphate buffer pH 7 ที่อุณหภูมิ 40 ° C และที่ความเข้มข้นอินูลิน 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นใช้สภาวะที่เหมาะสมนี้มาทำการศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลินสบริสุทธ์ ซึ่งจะแปรผันไอออนของโลหะ 1mM CaCl_2 , 1mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1mM CuCl_2 , 1mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mM HgCl_2 , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ 1mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเติม 1mM CaCl_2 , 1mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 1mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่ได้ทำการเติมไอออน (100%) โดยพบว่าในการเติม 1mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นมากที่สุด 552.87 % รองลงมาคือการเติม 1mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น 389.65% ในการเติม 1mM CaCl_2 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น 202% และในการเติม 1mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น 179.31% นอกจากนี้พบว่ามิเกลื้อแร่ที่ส่งผลยับยั้งการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ ได้แก่ 1mM CuCl_2 , 1mM HgCl_2 , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 1mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งเมื่อทำการเติม 1mM HgCl_2 ทำให้ไม่เกิดกิจกรรมเอนไซม์เกิดขึ้น(0%) ส่วนการเติม 1mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 68.97% การเติม 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 83.9% และการเติม 1mM CuCl_2 ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 90.8%

ตารางที่ 5-2 แสดงเปอร์เซ็นต์กิจกรรมเอนไซม์เมื่อแปรผันไอออนของโลหะ

ไอออนของโลหะ (1 mM)	กิจกรรมเอนไซม์ (%)
ไม่เติมไอออน	100
CaCl_2	202
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	552.87
CuCl_2	90.8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	179.31
HgCl_2	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	83.9
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	389.65
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	68.97

5.6 ตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำปฏิกิริยาทั้งหมดที่ผ่านการทดสอบการย่อยอินูลินมาหยดบนแผ่น TLC และทำการเคลื่อนผ่านด้วยตัวทำละลายและจากผลการทดลอง (รูปที่ 5-37) พบว่าอินูลินที่ถูกย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสที่บริสุทธิ์ (เลน P) สามารถพบแถบน้ำตาลที่ตรงกับขนาดของซูโคส (แถบจาง) ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสก่อนทำให้บริสุทธิ์ (เลน C) ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่า และมีแถบน้ำตาลที่ต่อกันเป็นสายสั้นๆอยู่ ในขณะที่รีคอมบิแนนท์อินูลิเนส บริสุทธิ์ที่เสียสภาพ และรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสก่อนทำให้บริสุทธิ์ที่เสียสภาพไม่พบแถบน้ำตาลใดๆที่ตรงกับน้ำตาลมาตรฐาน



รูปที่ 5-37 แสดงผลการตรวจสอบการย่อยอินูลินโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

เลน G	กลูโคสโกลิโกแซกคาไรด์มาตรฐาน (G1-6: จำนวนโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส 1-6 โมเลกุล)
เลน F	ฟรุกโทสมาตรฐาน
เลน S	ซูโครสมาตรฐาน
เลน I	อินูลินมาตรฐาน
เลน - C	อินูลินที่ถูกย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสก่อนทำให้บริสุทธิ์ที่เสียสภาพ
เลน C	อินูลินที่ถูกย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสก่อนทำให้บริสุทธิ์
เลน - P	อินูลินที่ถูกย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์ที่เสียสภาพ
เลน P	อินูลินที่ถูกย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และฟรุกโทส จัดเป็นสิ่งที่มีประโยชน์มากมายทั้งในทางด้านอุตสาหกรรมทางด้านอาหาร และในทางด้านสุขภาพ การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และฟรุกโทส จากสารตั้งต้นเป็นอินูลินโดยใช้อินูลินเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้อย่างอินูลิน โดยมีส่วน active site ใน beta-fructosidase เป็นบริเวณที่เกิดการย่อยพันธะเบต้า2,1-ของสายโซ่ฟรุกโทส จัดเป็นการลดกระบวนการผลิต ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์จำนวนมากสามารถย่อยอินูลินเนสได้ เช่น *Arthrobacter* sp., *Aspergillus* sp. และ *Kluyveromyces* sp. เป็นต้น (Pouyez และคณะ, 2012) และงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Streptomyces* sp.CP01 สามารถผลิตอินูลินเนสที่มีประสิทธิภาพ (Laowklor และคณะ, 2012) และในงานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์อินูลินเนส โดยการตัดต่อยีนประมวลรหัสอินูลินเนสของ *Streptomyces* sp.CP01 จากการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับ กรดอะมิโนของอินูลินเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าใกล้เคียงกับ putative endo-inulinase จาก *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (Genbank Accession CP012382) มากที่สุด โดยยีนประมวลรหัสอินูลินเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีขนาด 2,967 bp มี 988 กรดอะมิโน ต่างกับยีนประมวลรหัสอินูลินเนสจาก *S. ambofaciens* ATCC 23877 ที่มีขนาด 2,886 bp มี 961 กรดอะมิโน เนื่องจากอินูลินเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา บริเวณนิวคลีโอไทด์ 0-74 ซึ่งเป็นบริเวณของ His₆ Tag และ 95-100 ตามลำดับ ซึ่งแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้บริเวณ 0-25 และ 35-36 ตามลำดับ (รูปที่ 5-26) เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโน พบว่าเป็นเอนโดอินูลินเนส เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ WMNEPA, YHLFYQ, WGHAVS, WSGD, RDP, ELP และ MVEA ตามลำดับ (รูปที่ 5-26) ซึ่งใกล้เคียงกับเอนโดอินูลินเนสมีบริเวณอนุรักษ์คือ WMNEPNG, YHLFYQ, WGHAVS, WSGD, RDP, EVP และ SVEVF (Liu และคณะ, 2013) แต่บริเวณ ELP และ MVEA มีความแตกต่างจากบริเวณอนุรักษ์ แต่มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas muidolens* (AAF24999) (Singh และ Gill, 2006) นอกจากนี้มีบริเวณ E(V/C)P ในรา แต่พบ E(V/M/L)P ในแบคทีเรีย (Singh และ Gill, 2006) ดังนั้นจึงบ่งบอกได้ว่าอินูลินเนสจาก *Streptomyces* sp.CP01 เป็นเอนโดอินูลินเนส

จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ putative endo-inulinase จาก *S. ambofaciens* ATCC 23877 เป็นต้นแบบในการหาชิ้นประมวลรหัสทั้งหมดเนื่องจากในฐานข้อมูลมีเพียง *S. ambofaciens* ATCC 23877 สปีชีส์เดียวเท่านั้นที่เป็น *Streptomyces* sp. ที่สามารถผลิตอินูลินเนสได้ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนประมวลรหัสอินูลินเนสที่มีการเพิ่มบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะเมื่อเชื่อมเข้ากับ pET28a เพื่อทำการแสดงออก โดยถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS หรือ BL21(DE3) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แสดงออกมีขนาด 107 kDa ซึ่งรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสที่แสดงออกใน Rosetta-pET28a-SA34 สามารถละลายได้เล็กน้อย และมีกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะที่มากกว่าใน BL21(DE3) แม้ว่าใน BL21(DE3) สามารถผลิตโปรตีนได้มากกว่าใน *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS แต่รีคอมบิแนนท์อินูลินเนสที่แสดงออกมีขนาด 107 kDa ซึ่งมีขนาดไม่ตรงกับขนาดของอินูลินเนสจาก *Streptomyces* sp.CP01 ที่มีขนาด 70.8 kDa (Laowklom และคณะ, 2012) อาจเนื่องจาก *Streptomyces* sp.CP01 มีบริเวณยีนประมวลรหัสอินูลินเนสอื่นที่สามารถผลิตอินูลินเนสได้ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้นำ crude protein ใน Basal medium ที่มี 1% อินูลินใช้เป็นตัวควบคุมบวกและเปรียบเทียบ

นำรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสที่แสดงออกจาก Rosetta-pET28a-SA34 จึงถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography โดยชะด้วย 500mM imidazole ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7 เนื่องจากรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสมี His₆ Tag ที่บริเวณ N-terminal ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสจาก *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 ใน *E. coli* BL21 และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA column ซึ่งชะด้วย 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0 ที่มี 50-250 mM imidazole (Gao และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังพบในการศึกษา รีคอมบิแนนท์อินูลินเนส (*kclNU1*) ซึ่งมี His₆ Tag เช่นกัน จาก *Kluyveromyces cocerisporus* แสดงออกใน *Pichia pastoris* X-33 โดยมีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography ซึ่งพบโปรตีนบริสุทธิ์เมื่อชะด้วย 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ที่มี 300 mM NaCl และ 250 mM imidazole (Ma และคณะ, 2015)

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์อินูลินเนสบริสุทธิ์แล้วจึงศึกษาสมบัติของอินูลินเนส ในขั้นแรกทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมพบว่าที่ 40 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดซึ่งอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอินูลินเนสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp.CP01 15 °C (Laowklom และคณะ, 2012) และในการศึกษาค่าความเป็นกรดต่างโดยรีคอมบิแนนท์อินูลินเนสบริสุทธิ์ พบว่าที่ pH 7 เหมาะสมที่สุดในทำปฏิกิริยา ในขณะที่อินูลินเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp.CP01 ใช้ pH 6 ในการทำปฏิกิริยา ซึ่ง pH 7 มีความเป็นกลางจะทำให้เอนไซม์ไม่เสียสภาพ มีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมือนเดิม น่าจะเหมาะที่จะใช้ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์อินูลินเนส จาก *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาการย่อยอินูลินที่อุณหภูมิ 40 °C pH 7 มีกิจกรรมเอนไซม์ 65-70% (Gao และคณะ, 2014) ใน

งานวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิที่ 40 ° C และค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง (pH 7) ซึ่งมีงานวิจัยศึกษาการ แสดงออกของอินูลิเนสในส่วนมากมีอุณหภูมิที่สูงและค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำในสภาวะที่เหมาะสม ในการทดสอบกิจกรรมอินูลิเนส ดังเช่นในงานงานวิจัยของ Li และคณะ, 2012 ได้แสดงออกรีคอม บิแนนท์อินูลิเนส (*EnIA*) จาก *Arthrobacter* sp. S37 ใน *Yarrowia lipolytica* มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ เหมาะสมภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 50 ° C pH 4 (Li และคณะ, 2012) เช่นเดียวกับ He และคณะ (2014) ศึกษาอินูลิเนส (*EnInu*) จาก *Aspergillus niger* CICIM F0620 ใน *Pichia pastoris* พบว่า ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 60 ° C pH 6 เป็นสภาวะที่เหมาะสม (He และคณะ, 2014) และงานวิจัยที่ ทำการศึกษากรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสจาก *Aspergillus ficuum* ใน *E. coli* Rosetta พบว่ากิจกรรม เอนไซม์ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 60 ° C pH 4 เป็นสภาวะที่เหมาะสม (Chen และคณะ, 2013)

ในส่วนของความเข้มข้นของอินูลินที่ใช้เป็นสารตั้งต้น พบว่าที่ความเข้มข้นอินูลิน 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเพิ่มสูงขึ้น 70% เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอินูลิน 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ใช้เป็นความเข้มข้นแรกในการทดสอบต่างๆ สุดท้ายจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสม ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 40 ° C pH 7 ใช้อินูลินตั้งต้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การทดสอบตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ ได้ K_m ได้เท่ากับ 11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} มีค่า เท่ากับ 0.088 มิลลิกรัม/นาที่/มิลลิลิตร และซึ่งให้ผลที่ต่ำกว่าอินูลิเนสจากสิ่งมีชีวิตอื่น อาทิเช่นจาก *Aspergillus niger* 20 OSM (K_m 6.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} 0.0476 มิลลิกรัม/นาที่/ มิลลิลิตร) (Marcin และ Jan, 2005) แต่จาก *Athrobacter* sp. มีค่า K_m (37.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} (3.9 มิลลิกรัม/นาที่/มิลลิลิตร) ส่วนค่า K_m และ V_{max} จาก *Xanthomonas oryzae* No.5 มีค่าเท่ากับ 16.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 12.1 มิลลิกรัม/นาที่/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Youn และ Jong, 2002) ทั้งนี้เนื่องจากอาจขาดสารที่ช่วยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ตั้งในอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีการเติม 0.025%(w/v) Mg^{2+} และ 0.001%(w/v) Fe^{2+} (จันทนพันธ์, 2552) เช่นเดียวกับกรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Cryptococcus aureus* G7a และ *Pichia guilliermondii* strain 1 เมื่อเติม Ca^{2+} หรือ K^+ หรือ Na^+ หรือ Fe^{2+} หรือ CU^{2+} (Chi และคณะ, 2009) ซึ่งเมื่อทำการเติมเกลือแร่ในปฏิกิริยาการย่อยอินูลิน $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ช่วยให้กิจกรรมเอนไซม์ สูงขึ้นเป็น 0.481 U/mg นอกจากนี้ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ และ $CaCl_2$ ยังช่วยเพิ่มกิจกรรม เอนไซม์ แต่ $HgCl_2$ จะไปยับยั้งการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เนื่องจาก Hg เป็นโลหะหนัก จะไป ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับ สารตั้งต้นได้ (พันธ์ผล, 2537) นอกจากนี้จำนวนของฟลักโทสที่ต่อกันเป็นสายยาว (degree of polymerization; DP) ของอินูลินนั้นส่งผลกับกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้อินูลินจากหัวรักเร่ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 13-20 จึงส่งผลให้ได้กิจกรรมที่ต่างออกไปจากงานวิจัยของ Laowklom (2012) ที่ใช้ แก่นตะวัน ที่มีค่า DP เฉลี่ยเท่ากับ 6-10 เนื่องจากความแตกต่างของ DP เมื่อ DP มีสายสั้นจะช่วยให้

เอนไซม์เข้าไปตัดและได้ฟรุกโทสออกมาได้ดีกว่าที่ DP ที่มีสายยาว (Franck และ Leenheer, 2005)

กล่าวโดยสรุป งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนประมวลรหัสอินูลิเนสของ *Streptomyces* sp.CP01 แสดงออก และทำรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาสมบัติรีคอมบิแนนท์อินูลิเนส พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอินูลิเนสที่อุณหภูมิ 40°C pH 7 และ ความเข้มข้นอินูลินที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่าตัวแปรทางจลศาสตร์ของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์ในงานวิจัยนี้ K_m มีค่าเท่ากับ 11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} มีค่าเท่ากับ 0.088 มิลลิกรัม/นาที/มิลลิลิตร และ 1mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ช่วยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งคาดว่ารีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้



รายการอ้างอิง

- Chen XM, Xu XM, Jin ZY & Chen HQ (2013) Expression of an exoinulinase gene from *Aspergillus ficuum* in *Escherichia coli* and its characterization. *Carbohydrate polymers* **92**: 1984-1990.
- Chi Z, Chi Z, Zhang T, Liu G & Yue L (2009) Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied microbiology and biotechnology* **82**: 211-220.
- Chi ZM, Zhang T, Cao TS, Liu XY, Cui W & Zhao CH (2011) Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource technology* **102**: 4295-4303.
- Eskin NAM (1990) Biotechnology: enzymes in the food Industry. *Biochemistry of foods (second edition)* **11**: 467-539.
- Fernandes P (2014) Marine enzymes and food industry: insight on existing and potential interactions. *Frontiers in marine Science* **1**.
- Franck A & Leenheer LD (2005) Inulin. *Polysaccharides and polyimides in food industry* **1**: 281-322.
- Gao J, Xu YY, Yang HM, Xu H, Xue F, Li S & Feng XH (2014) Gene cloning, expression, and characterization of an exo-inulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Applied biochemistry biotechnology* **173**: 1419-1430.
- Gao W, Bao Y, Liu Y, Zhang X, Wang J & An L (2009) Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. *Applied biochemistry and biotechnology* **157**: 498-506.
- Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of nutrition* **125**: 1401-1412.
- Granarog S (1999) Sweeteners. *Charpa techcenter* Bangkok.
- Grizard D & Barthomeuf C (1999) Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction nutrition development* **39**: 563-588.

- Hanover LM & White J (1993) Manufacturing, composition, and application of fructose. *Journal of clinical nutrition* **58**: 724-732.
- He M, Wu D, Wu J & Chen J (2014) Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. *Journal of industrial and microbiology biotechnology* **41**: 105-114.
- Laowklom N, Chantanaphan R & Pinphanichakarn P (2012) Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural resources* **3**: 137-144.
- Li Y, Liu GL, Wang K, Chi ZM & Madzak C (2012) Overexpression of the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. S37 in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant endo-inulinase. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* **74**: 109-115.
- Lim SH, Ryu JM, Lee H, Jeon JH, Sok DE & Choi ES (2011) Ethanol fermentation from *Jerusalem artichoke* powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. *Bioresource technology* **102**: 2109-2111.
- Lim SH, Lee H, Sok DE & Choi ES (2010) Recombinant production of an inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 strain. *Journal microbiology biotechnology* **20**: 1529-1533.
- Liu GL, Chi Z & Chi ZM (2013) Molecular characterization and expression of microbial inulinase genes. *Critical reviews microbiology* **39**: 152-165.
- Ma JY, Cao HL, Tan HD, Hu XJ, Liu WJ, Du YG & Yin H (2015) Cloning, expression, characterization, and mutagenesis of a thermostable exoinulinase from *Kluyveromyces cicerisporus*. *Applied biochemistry and biotechnology* **178**: 44-58.
- Marcin S & Jan F (2005) Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. *Food technology and biotechnology* **44**: 53-58.
- Pouyez J, Mayard A, Vandamme AM, Roussel G, Perpete EA, Wouters J, Housen I & Michaux C (2012) First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from

- Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie* **94**: 2423-2430.
- Roberfroid M, Gibson GR & Delzenne N (1993) The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutrition reviews* **51**: 137-146.
- Sabater-Molina M, Larqué E, Torrella F & Zamora S (2009) Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of physiology and biochemistry* **65**: 315-328.
- Singh P & Gill PK (2006) Production of inulinases: Recent advances. *Food technology and biotechnology* **44**: 151-162.
- Sugimori D, Ogasawara J, Okuda K & Murayama K (2014) Purification, characterization, molecular cloning, and extracellular production of a novel bacterial glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*. *Journal of bioscience and bioengineering* **117**: 422-430.
- Tinrat S, Wongsariya K & Chomnawang MT (2012) Isolation of a novel inulinase producing bacteria from soil. *The 8th International symposium on biocontrol and biotechnology* 62-67
- Tohamy EY (2006) Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Streptomyces griseus*. *Pakistan journal of biological sciences* **9**: 911-916.
- Youn JC & Jong WY (2002) Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No.5. *Process biochemistry* **37**: 1325-1331.
- Zhang L, Wangjing, Ohta Y & Wang Y (2003) Expression of the inulinase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Process biochemistry* **38**: 1209-1212.
- Zhang S, Yang F, Wang Q, Hua Y & Zhao ZK (2012) High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Process biochemistry* **47**: 151-155.
- เคยอาษา ศ (2554) การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานพอเรสจากแก่นตะวันเพื่อนำไปผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- จันทนพันธ์ ร (2552) การคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลินและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- ตาลาวนิช ย (2536) การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces sp.* สายพันธุ์ 190-1 ใน *Streptomyces spp.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธนะ จ (2541) การโคลนยีนบีตา-ไซโลสเตรสจาก *Streptomyces sp.* CH7. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปรักกะมะกุล อ (2555) การพัฒนากรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ทางอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พันธ์ผล ส (2537) การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบ

1. ตารางแสดงผลน้ำตาลฟรุกโทสสำหรับกราฟมาตรฐาน

ฟรุกโทส (mg/ml)	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)
0	0
0.1	0.107
0.15	0.184
0.2	0.275
0.25	0.349
0.3	0.439

2. ตารางแสดงผลโปรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) สำหรับกราฟมาตรฐาน

โบวีนซีรัมอัลบูมิน (mg/ml)	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₉₅)
0	0
0.0625	0.0857
0.125	0.1816
0.25	0.3856
0.5	0.6707
1	1.01

3. ตารางแสดงผลกิจกรรมเอนไซม์

3.1 กิจกรรมเอนไซม์ของ crude protein

รีคอมบิแนนท์ อีโนลิเนสโคลน	โคลนที่	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₉₅)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ (U/mg)
Rosetta- pET28a- SA22	1	0.068	45.25×10^{-4}	0.0164
	2	0	0	0
	3	0	0	0
BL21- pET28a- SA22	1	0.017	11.84×10^{-4}	0.008
	2	0.013	11.84×10^{-4}	0.0072
	3	0	0	0
Rosetta- pET28a- SA34	1	0.073	48.26×10^{-4}	0.0204
	2	0	0	0
	3	0	0	0
BL21- pET28a- SA-34	1	N/A	N/A	N/A
	2	N/A	N/A	N/A
	3	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

3.2 กิจกรรมเอนไซม์ของรีคอมบิแนนท์อีโนลิเนสบริสุทธิ์

รีคอมบิแนนท์ อีโนลิเนสโคลน	โคลนที่	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ (U/mg)
Rosetta- pET28a-SA34	1	0.016	7.13×10^{-5}	0.0244

3.3 กิจกรรมเอนไซม์ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ
รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

อุณหภูมิ (° C)	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg)
30	0.007	10.36×10 ⁻⁴	0.02281
40	0.019	19.44×10 ⁻⁴	0.0308
55	0.001	5.83×10 ⁻⁴	0.0187
70	0	0	0
80	0	0	0

3.4 กิจกรรมเอนไซม์ในการศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ
รีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

pH	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg)
4	0	0	0
5	0.014	15.64 ×10 ⁻⁴	0.02749
6	0.012	14.16 ×10 ⁻⁴	0.02615
7	0.035	31.56×10 ⁻⁴	0.0444
8	0.028	26.24×10 ⁻⁴	0.0374
9	0.028	26.24×10 ⁻⁴	0.0374

3.5 กิจกรรมเอนไซม์ในการศึกษาความเข้มข้นของอินูลินที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

ความเข้มข้นของอินูลิน (mg/ml)	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg)
0	0	0	0
5	0.003	7.32×10^{-4}	0.0078
10	0.012	14.16×10^{-4}	0.0154
12.5	0.038	23.84×10^{-4}	0.0319
15	0.047	33.07×10^{-4}	0.0428
17.5	0.051	54.68×10^{-4}	0.0656
20	0.075	65.48×10^{-4}	0.0777
22.5	0.04	27.76×10^{-4}	0.0394
25	0.024	17.12×10^{-4}	0.0161

3.6 กิจกรรมเอนไซม์ในการศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์อินูลิเนสบริสุทธิ์

ไอออน (1 mM)	ค่าดูดกลืนคลื่นแสง (OD ₅₄₀)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg)
ไม่เติมไอออน	0.019	72.72×10^4	0.087
CaCl ₂	0.059	89.72×10^4	0.176
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.199	264.88×10^4	0.481
CuCl ₂	0.015	63.92×10^4	0.079
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	85.88×10^4	0.156
HgCl ₂	0	0	0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.012	60.54×10^4	0.073
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.134	186.68×10^4	0.339
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.006	33.24×10^4	0.06

สูตรการคำนวณ

1. หาปริมาณโปรตีน (คำนวณจากกราฟมาตรฐาน ภาคผนวก ง)

$$\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง} + 0.0067}{0.7336}$$

2. หาปริมาณน้ำตาล (คำนวณจากกราฟมาตรฐาน ภาคผนวก ง)

$$\text{ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง} + 0.0217}{1.4843}$$

3. หากิจกรรมเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของน้ำตาล}}{180.16} \times \frac{1}{\text{เวลา}} \times \frac{\text{ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด}}{\text{ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้}} \times \text{ความเจือจาง}$$

4. หากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/mg)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์}}{\text{ปริมาณโปรตีน}}$$

5. หาเปอร์เซ็นต์สำหรับวาดกราฟสถานะต่างๆ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของค่าสมบัติต่างๆ (\%)} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่ต้องการคำนวณ}}{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด}} \times 100$$

ภาคผนวก ข
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Basal medium ที่มี 1% อินูลิน

เตรียมสารดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	0.7	กรัม (0.7% (w/v))
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.1	กรัม (0.1% (w/v))
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	กรัม (0.05% (w/v))
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25	กรัม (0.25% (w/v))
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001	กรัม (0.001% (w/v))
อินูลิน (inulin from dahlia tubers)	1	กรัม (1% (w/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีขีดลวดอยู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. Luria-Bertani (LB broth และ LB Agar)

เตรียมสารดังนี้

ทริปโทน (tryptone)	1.5	กรัม (1% (w/v))
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.5	กรัม (1% (w/v))
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.75	กรัม (0.5% (w/v))
วุ้น (Agar) (สำหรับเตรียม LB Agar)	2.25	กรัม (1.5% (w/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 50x Tri-acetate (TAE) buffer

เตรียมสารดังนี้

Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม	(12.1% (w/v))
กรดอะซิติก (Gracial acetic acid)	28.55	มิลลิลิตร	(2.855% (v/v))
0.5M EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	50	มิลลิลิตร	(5% (v/v))

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกันจึงเติม กรดอะซิติก และ 0.5M EDTA ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้เจือจางให้เป็น 1x

2. 1.5M Tris-HCl pH 8.8

ชั่ง Tris-base 181.71 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วย กรดไฮโดรคลอริกจนได้ pH เท่ากับ 8.8 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. 1M Tris-HCl pH 8.5

ชั่ง Tris-base 121.14 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วย กรดไฮโดรคลอริกจนได้ pH เท่ากับ 8.5 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. 1M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris-base 121.14 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วย กรดไฮโดรคลอริกจนได้ pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

5. 30% Acrylamide

เตรียมสารดังนี้

Acrylamide	87.6	กรัม	(29.2% (w/v))
Bisacrylamide ($C_7H_{10}O_2N_2$)	2.4	กรัม	(0.8% (w/v))

ผสมสารทั้งหมดในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 300 มิลลิลิตร ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

6. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 60 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

7. 10% Ammonium persulfate (APS)

ชั่ง APS 0.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

8. 4x SDS sample running buffer

เตรียมสารดังนี้

Bromphenol blue	0.058	กรัม	(0.167% (w/v))
Tris-HCl pH 6.8	6	มิลลิลิตร	(50% (v/v))
SDS	2.4	กรัม	(8% (w/v))
DTT	1.851	กรัม	(15.43% (w/v))
99% กลีเซอรอล	12	มิลลิลิตร	(40% (v/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 12 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน

9. 10x SDS running buffer

เตรียมสารดังนี้

Tris-base	30	กรัม	(3% (w/v))
Glycine	144	กรัม	(14.4% (w/v))
SDS	10	กรัม	(1% (w/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตรจนเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เจือจางให้เป็น 1x

10. Staining solution

เตรียมสารดังนี้

Commassie blue R-255	2	กรัม	(0.2% (w/v))
Methanol	450	มิลลิลิตร	(45% (v/v))
Glacial acetic acid	250	มิลลิลิตร	(25% (v/v))

ละลาย Commassie blue R-255 ใน Methanol จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Glacial acetic acid และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมสารทั้งหมด ละลายในน้ำน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

11. Destain solution

เตรียมสารต่อไปนี้

Methanol	500	มิลลิลิตร	(50% (v/v))
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร	(10% (v/v))

ผสมสารทั้งหมด ละลายในน้ำน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

12. Fixing solution

เตรียมสารต่อไปนี้

Methanol	100	มิลลิลิตร	(10% (v/v))
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร	(10% (v/v))
99% กลีเซอรอล	50	มิลลิลิตร	(5% (v/v))

ผสมสารทั้งหมด ละลายในน้ำน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

13. 10x Transfer buffer

เตรียมสารดังนี้

Tris-base	19.3	กรัม	(2.41% (w/v))
Glycine	90	กรัม	(11.25% (w/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรจนเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 800 มิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้เจือจางให้เป็น 1x

14. Transfer blotting buffer

เตรียมสารดังนี้

1x Transfer buffer	400	มิลลิลิตร	(80% (v/v))
Methanol	100	มิลลิลิตร	(20% (v/v))

ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

15. 10xPBS

เตรียมสารดังนี้

NaCl	80	กรัม	(8% (w/v))
KCl	2	กรัม	(0.2% (w/v))
Na ₂ HPO ₄	14.4	กรัม	(1.44% (w/v))
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม	(0.24% (w/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH จนได้ pH เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

16. PBST

เตรียมสารดังนี้

10x PBS	50	มิลลิลิตร	(2.5% (v/v))
Tween 20	250	ไมโครลิตร	(12.5% (v/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตรจนเป็นเนื้อเดียวกัน

17. 1M Na₂HPO₄

ชั่ง Na₂HPO₄ 178 กรัมละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

18. 1M NaH₂PO₄

ชั่ง NaH₂PO₄ 138 กรัมละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

19. 0.1M phosphate buffer pH7

เตรียมสารดังนี้

1M Na ₂ HPO ₄	2.89	มิลลิลิตร	(5.78% (v/v))
1M NaH ₂ PO ₄	2.12	มิลลิลิตร	(4.24% (v/v))

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุ 45 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

20. DNSA reagent

เตรียมสารดังนี้

3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	1	กรัม	(1% (w/v))
2M NaOH	20	มิลลิลิตร	(20% (v/v))
C ₄ H ₄ KNaO ₆ ·4H ₂ O	30	กรัม	(30% (w/v))

(Potassium sodium L-tartrate tetrahydrate, 99%)

ละลาย DNS ในน้ำกลั่นปลอดประจุ และผสม 2M NaOH จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม C₄H₄KNaO₆·4H₂O ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

21. Mobile phase สำหรับ TLC

เตรียมสารดังนี้

N - butanol	50	มิลลิลิตร	(50% (v/v))
Glacial acetic acid	25	มิลลิลิตร	(25% (v/v))
น้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร	(25% (v/v))

ผสมสารทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในภาชนะปิดมิดชิด

22. สเปรย์สำหรับ TLC

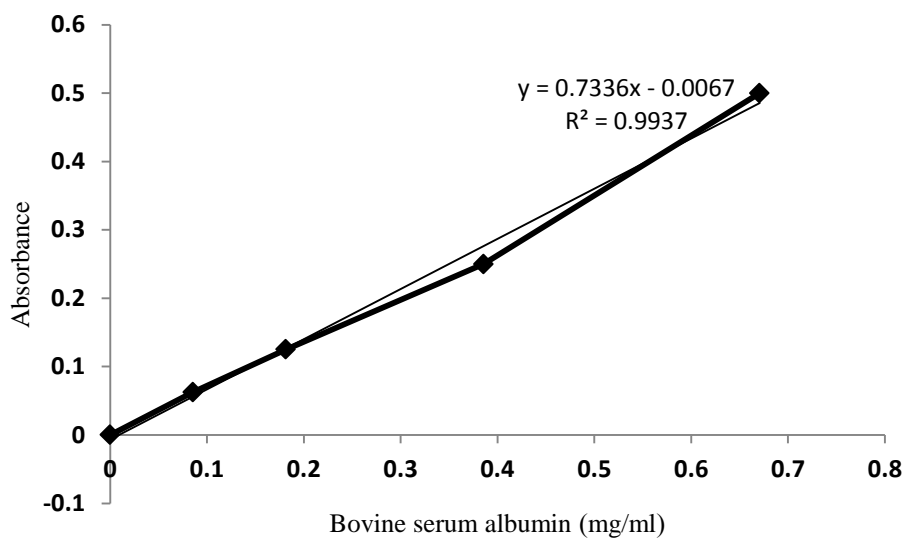
เตรียมสารดังนี้

Aniline	1	มิลลิลิตร	(1.71% (v/v))
Alpha-diphenylamine	1	กรัม	(1.71% (w/v))
Acetone	50	มิลลิลิตร	(85.47% (v/v))
70% Phosphoric acid	7.5	มิลลิลิตร	(12.82% (v/v))

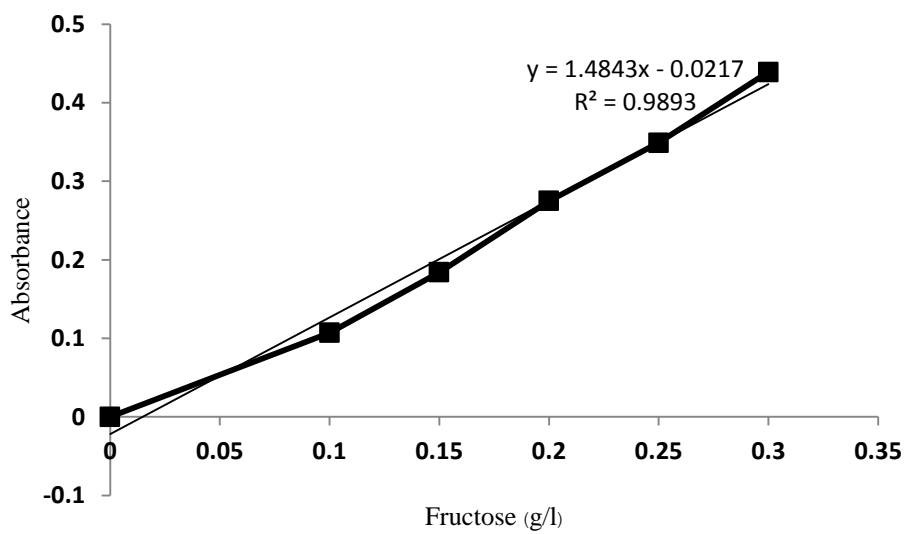
ผสมสารทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในภาชนะปิดมิดชิด

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานโปรตีน



2. กราฟมาตรฐานฟรุกโทส



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวสุภาภรณ์ วนน้ำค้าง
วันเกิด วันเสาร์ที่ 1 ธันวาคม 2533
ที่อยู่ 15/2 หมู่ 4 ตำบลบางระกำ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 73120
การศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา 2555
ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางจุลินทรีย์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

