หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย
เรื่อง
การโคลนยีนของเอนไซม์ไซลาเนส
จากยีสต์สายพันธุ์ *Pichia stipitis*
Cloning of Xylanase Gene from
Pichia stipitis

โดย

อมรรัตน์ พงศ์ดารา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ม. สงขลานครินทร์

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะวิทยาศาตร์
ม. สงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2536-2537

Order Key 17655
BIB Key 152351

050 เลขหมู่ QP702.X87 อ44
เลขทะเบียน 4537 ค 1
2/2 S.A. 2541

บทคัดย่อ

ได้เตรียม cDNA library ของ *Pichia stipitis* แล้วสำรวจ plaque จำนวน 60,000 plaque ด้วยดีเอ็นเอตรวจจับที่เตรียมจากโคลนของ *Xyn A, Xyn B and Xyn C* จากเชื้อ *Aspergillus kawachii.* ซึ่งติดฉลากด้วย DIG แต่ไม่ปรากฏว่าได้ยีนที่ต้องการ จึงเปลี่ยนไปใช้วิธี RT-PCR โดยออกแบบ specific primer จาก data bank แล้ว subclone ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้เข้าสู่เวคเตอร์ pGEM ผลการทดลองปรากฏว่าได้โคลนที่น่าสนใจ 9 โคลน และได้นำสองโคลนไปหาลำดับเบส ในที่สุดได้ข้อมูลของลำดับเบสเพียงหนึ่งโคลน โคลนที่ได้มีขนาด 658 เบสซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 171 หน่วย และลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกับยีนของ *Xyn C* 50%

Abstract

A cDNA library was constructed from *Pichia stipitis* and about 60,000 individual plaques were screened with DIG-labelled probes derived from *Xyn A, Xyn B and Xyn C* clones from *Aspergillus kawachii.* There was no positive clone detected. Therefore a pair of specific primer for xylanase gene was desired from data bank and used for the RT-PCR reaction. The PCR products were subcloned into pGEM vector. Nine clones were obtained and the nucleotides of two inserts were sequenced by dideoxy method. The perfect sequences data was obtained only from the clone *X5*. The clone comprises 658 nucleotides with the deduced amino acid sequence of 171 residues. Comparison of DNA sequences showed that the *Pichia* xylanase had about 50% homology with xylanases from *Xyn C*

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	15
วิจารณ์ผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22
สรุปผลการวิจัย	25

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของไซแลนและประเภทของเอนไซม์ที่ใช้ตัดให้เป็นหน่วยย่อย	3
2	แสดงวิถีการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสของแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา	3
3	แสดง restrcition map ของ λ Excell	16
4	แสดงผลการตรวจสอบ library ด้วยดีเอ็นเอตรวจจับ *Xyn C* ที่ติดฉลากด้วย DIG	16
5	แสดง restriction map ของยีน *Xyn C* จาก *A. kawachii*	17
6	แสดง restriction map ของเวคเตอร์ pGEM	18
7	แสดงโคลนที่เกิดจากการเชื่อมดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR และ เวคเตอร์ pGEM	19
8	แสดงผลของการหาลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่คาดคะเนจากลำดับเบสโดยมี ATG เป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส	20

บทนำ

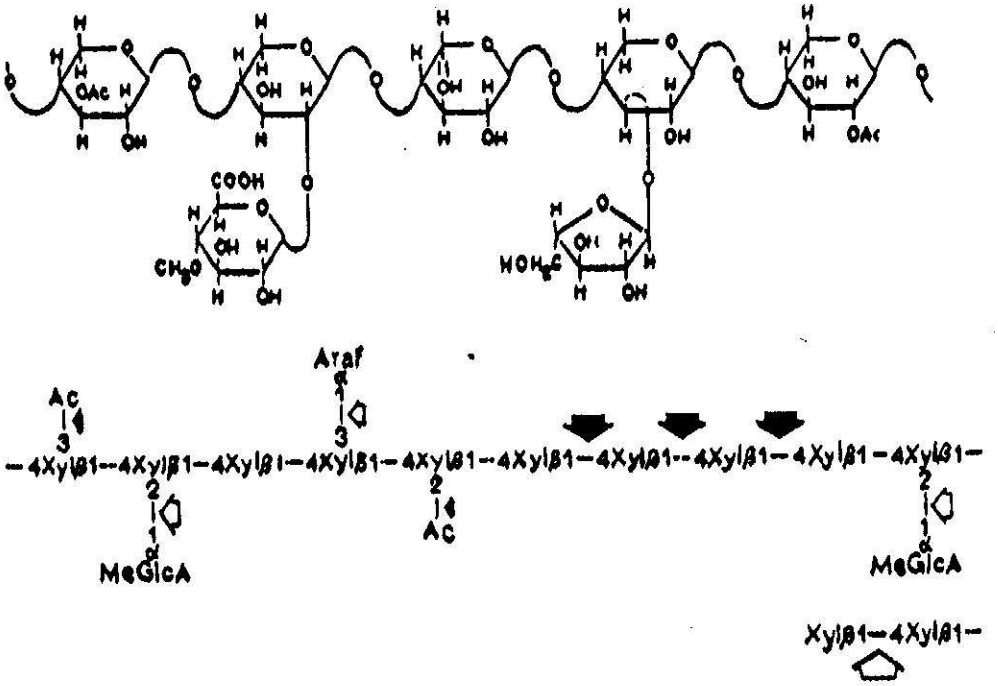
ไซแลนหรือเฮมิเซลลูโลสคือสารประกอบคาร์บอนที่มีมาก (คิดเป็น 15%-35%) ในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง และผลิตผลทางการเกษตร หรือที่เรียกรวมๆว่าชีวมวลของพืช (plant biomass) จัดเป็นสารประกอบคาร์บอนในธรรมชาติที่อาจนำหมุนเวียนกลับมาใช้ได้อีก โดยอาจใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) หรือ สับสเตรทของชีวโมเลกุลสำคัญบางชนิดเช่น ยาปฏิชีวนะ หรือผลิตสารเคมีที่มีคุณค่าต่างๆ (1, 2) ในความพยายามที่จะนำไซแลนมาใช้นั้น จุลินทรีย์นับว่ามีบทบาทสำคัญค่อนข้างมาก เนื่องจากมีเอนไซม์ในวิถีการสลายไซแลนให้เป็นหน่วยย่อย

ไซแลนมีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (D-xylose) ต่อกันด้วยพันธะ β-(1--->4) เป็นสายยาวขนาดประมาณ 20,000 ดาลตัน อาจมีกิ่งโซ่เชื่อมกับ L-arabinose หรือ glucuronic acid จุลินทรีย์ที่เจริญได้บนไซแลนจะผลิตกลุ่มของเอนไซม์ทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 1) ได้แก่ 1. เอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยกิ่งโซ่ออกจากสายหลักซึ่งมีอยู่หลายประเภท ได้แก่ arabinofuranosidase และ glucuronidase เป็นต้น 2. ไซลาเนส (xylanase) มีหน้าที่ตัดสายหลักให้เป็นสายสั้น ๆ (oligomer) หน่วยเล็กที่สุดที่ได้จากการย่อยคือไซโลไบโอส และ 3. ไซโลไซเดส (xylosidase) มีหน้าที่ย่อยไซโลไบโอสเป็นไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอนห้าตัวที่ถูกหมักได้ (fermentable sugar) (3, 4)

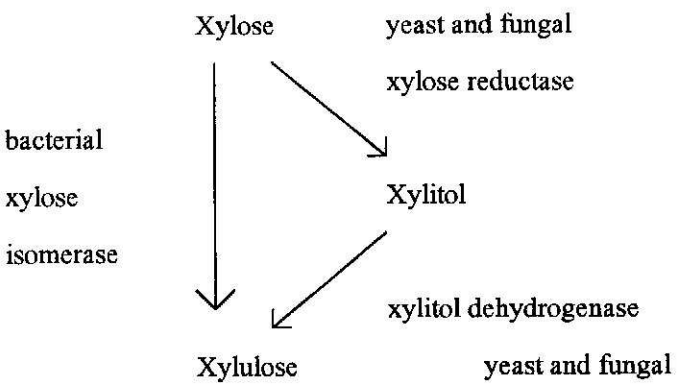
จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ไซแลนดังกล่าวข้างต้นหรือจุลินทรีย์กลุ่มอื่นในธรรมชาติสามารถหมักไซโลสต่อได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นแอลกอฮอลล์, กรดอินทรีย์ (organic acid), คีโตน (ketones) หรือ สารระเหย ทั้งนี้แล้วแต่ประเภทของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียมีวิธีการเปลี่ยนแปลงไซโลสในกระบวนการหมักที่แตกต่างจากยีสต์และเชื้อรา (5, 6) กล่าวคือแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ xylose isomerase เพื่อเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อในวิถี Pentose-phosphate shunt และ Emben-Meyerhof ในขณะที่ยีสต์และเชื้อราต้องใช้เอนไซม์สองชนิดคือ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase เพื่อเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล (xylitol) และ ไซลิทอลเป็นไซลูโลส ตามลำดับ (รูปที่ 2)

จุลินทรีย์ที่ผู้วิจัยให้ความสนใจได้แก่ พวกที่สามารถเปลี่ยนสับสเตรทเป็นแอลกอฮอลล์ เพราะแอลกอฮอลล์เป็นสารเคมีที่มีประโยชน์นานับประการ โดยเฉพาะการนำมาผสมเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอลล์สูงคือ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้ไซแลนหรือไซโลส

ต้องหมักจากกลูโคสหรือไซลูโลสเท่านั้น ทำให้ต้นทุนการผลิตแอลกอฮอล์มีราคาสูงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้งาน (7)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของไซแลนและประเภทของเอนไซม์ที่ใช้ตัดให้เป็นหน่วยย่อย ชื่อเต็มของตัวย่อในรูป Ac, Acetyl group; Araf, L-arabinofuranose; Meglc, 4-o-methyl-D-glucuronic acid; Xyl, D-xylose



รูปที่ 2 แสดงวิถีการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสของแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

จึงได้มีนักวิจัยให้ความสนใจลดต้นทุนการผลิตด้วยวิธีการต่างๆเช่น สุ่มหาเชื้อใหม่ที่สามารถใช้สับสเตรทอื่นที่มีราคาถูกหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของ *S. cerevisiae* ด้วยเทคนิคการโคลนนิ่งเพื่อให้ยีสต์ใช้สับสเตรทอื่น (1, 8-9) และด้วยวิธีโคลนนิ่งนี้จึงได้มีผู้พยายามนำยีน xylose isomerase จากแบคทีเรียใส่เข้าไปใน *S. cerevisiae* แต่ไม่ประสบความสำเร็จเพราะยีนไม่แสดงออก ต่อมา Kotter และคณะ (10) จึงเปลี่ยนไปใช้ยีนของยีสต์ด้วยกัน โดยโคลนยีน xylose reductase และ xylitol dehydrogenase จาก *Pichia stipitis* ใส่ใน *S. cerevisiae* พบว่ายีนทั้งสองแสดงออกได้ดี ได้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นแอลกอฮอลล์

อย่างไรก็ตามไซโลสยังไม่ใช่สับสเตรทเริ่มต้นที่นำมาใช้ได้ทันทีเพราะไซโลสส่วนหนึ่งในธรรมชาติอยู่ในรูปองค์ประกอบของไซแลนของชีวมวลพืช การนำมาใช้ต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงด้วยกลุ่มเอนไซม์ข้างต้นหรือไฮโดรไลซีสด้วยกรดและความร้อน ดังนั้นหากจะให้
S. cerevisiae ใช้ชีวมวลพืชเป็นวัตถุดิบภายใต้วิถีที่ต่อเนื่อง ก็ควรทำให้ *S. cerevisiae* ที่หมักไซโลสได้มียีนไซลาเนสและไซโลไซเคสด้วย แม้ยีนของไซลาเนสจะได้รับการโคลนและศึกษากันมามาก แต่ส่วนใหญ่เป็นของแบคทีเรีย การโคลนเข้าไปในยีสต์ก็อาจเกิดปัญหาเช่นเดียวกับยีน xylose isomerase และข้อมูลที่ได้จากการติดต่อกับคณะวิจัยที่ Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University ยืนยันว่ายีน xylanase จากแบคทีเรียไม่แสดงออกในยีสต์ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดก็คือโคลนจากยีสต์ด้วยกัน ปัจจุบันพบว่ามียีสต์อยู่ไม่กี่สายพันธุ์ที่ผลิตไซแลเนสได้ ได้แก่ *Candida ergatensis, Cryptococcus albidus,* และ *Pichia stipitis* (11-13) นักวิจัยที่มียีสต์เหล่านี้กำลังพยายามโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายไซแลนและศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในจำนวนนี้ก็มีเพียง *C. albidus* เท่านั้นที่มีการศึกษาในรายละเอียด (13, 14) แต่ยังไม่ถึงขั้นได้ยีสต์ที่หมักไซแลนเป็นแอลกอฮอลล์โดยตรงในปริมาณมาก

การมียีสต์อยู่เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ใช้ไซแลนได้ ทำให้ข้อมูลที่เกี่ยวกับสมบัติของเอนไซม์ องค์ประกอบ โครงสร้างและการทำงานของยีนมีไม่มาก ผู้วิจัยเล็งเห็นความสำคัญและความเป็นไปได้ของการใช้วัสดุเหลือจากการเกษตรด้วยยีสต์ การผลิต single cell protein การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมในประเทศไทย ตลอดจนการศึกษาความรู้พื้นฐานระดับโมเลกุลของกระบวนการย่อยสลายไซแลนซึ่งต้องใช้เอนไซม์หลายประเภท (multi-enzymes system) ทำงานร่วมกันแบบต่อเนื่อง ดังนั้นในปี 2536 ผู้วิจัยและคณะจึงได้รับยีสต์สายพันธุ์ *Pichia stipitis* จาก Prof. Dr. C.P. Hollenberg โดยเป็นยีสต์ที่ใช้ไซแลนได้ดี มีค่า

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและไซโลไซเดสในระดับสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลน เอนไซม์ไซลาเนสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40°ซ เมื่อทดลองแยกเอนไซม์โดยตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีพบว่า *Pichia stipitis* ผลิต เอนไซม์ไซลาเนสอย่างน้อย 1 ชนิด มีความสามารถในการตัดสายไซแลนที่แตกต่างจากไซลา เนสอื่นๆและยังไม่เคยมีรายงานในยีสต์คือตัดแบบ exoxylanase โดยปราศจากสมบัติในการตัด เซลลูโลส (15) เอนไซม์ที่มีสมบัติเช่นนี้นับว่าสำคัญต่อการนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมฟอก กระดาษที่ต้องการให้เกิดการย่อยไซแลนเพียงอย่างเดียว (16, 17) จากข้อมูลที่ได้ผู้วิจัยมีความ ตั้งใจที่จะทำการโคลนยีนของไซลาเนส เพื่อศึกษารายละเอียดโครงสร้างของยีน transform และศึกษาการแสดงออกใน *S. cerevisiae* เพื่อให้ได้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ใหม่ที่หมักไซแลน เป็นแอลกอฮอลล์โดยตรง

สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

สารเคมี

อาหารเหลว LB (tryptone 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, NaCl 5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย lysis (50 mM glucose; 25mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH8.0 ก่อนใช้ ให้เติมเอนไซม์ lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)

สารละลาย NaOH/SDS (0.2 N NaOH, 1%sodium dodecyl sulphate; ผสมก่อนใช้ ไม่สามารถ เก็บไว้ได้นาน)

สารละลาย 3 M potassium acetate pH 4.8 (potassium acetate 296 กรัม ละลายใน glacial acetic acid ประมาณ 115 มิลลิลิตร หรือให้ได้ pH 4.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น)

Phenol/chloroform/isoamyl alcohol ด้วยอัตราส่วน 25:24:1 ตามลำดับ

Absolute ethanol ที่แช่เย็น

70% ethanol ที่แช่เย็น

สารละลายทุกตัว (ยกเว้น Phenol และ ethanol) ให้นึ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำลายเอนไซม์ nuclease ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงแบคทีเรียใน LB 5 มิลลิลิตร นาน 14-16 ชั่วโมง
2. เทแบคเรียใส่ลงในหลอด microcentrifuge ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง (ต้องนำไปฆ่าเชื้อทิ้งก่อน เททิ้งในอ่างน้ำทิ้ง)
3. เติมสารละลาย lysis ปริมาตร 88 ไมโครลิตร ผสมให้เซลล์ละลายด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 10 นาที
4. เติมสารละลาย NaOH/SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที

5. เติมสารละลาย potassium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เซลล์ละลายด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000-15000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทเก็บส่วนใสไว้ในหลอดใหม่
6. นำสารละลายพลาสมิดมาสกัดโปรตีนทิ้งด้วยการเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทเก็บส่วนสารละลายพลาสมิดไว้ในหลอดใหม่
7. เติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่ -70°ซ นาน 10 นาที หรือ -20°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม
8. ทำให้ตะกอนพลาสมิดแห้งด้วย ชุดทำสูญญากาศ
9. ละลายตะกอนพลาสมิดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 40-50 ไมโครลิตร
10. อาจนำสารละลายพลาสมิดไปทำลายอาร์เอ็นเอที่ปนมาด้วยเอนไซม์ RNase หรือเก็บพลาสมิดไว้เพื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำ electrophoresis ที่ 4°ซ

2. Agarose Gel Electrophoresis

สารเคมีและอุปกรณ์

Agarose gel

สารละลายบัฟเฟอร์ TAE (0.04M Tris-acetate, 0.002M EDTA)

สารละลาย Ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

10x บัฟเฟอร์ loading (20% Ficoll 400, 0.1 M EDTA, pH8.0, 1.0% SDS, 0.25% Bromphenol blue, 0.25% Xylene cyanol)

ชุด Horizontal gel electrophoresis

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรง (DC power supply)

วิธีการทดลอง

1. ชั่ง agarose ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อการพิจารณาแยกขนาดของดีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด
2. นำ agarose มาทำให้หลอมเป็นเจลในเตาไมโครเวฟ หรือต้ม จนแน่ใจว่า agarose หลอมหมด แล้วจึงปล่อยทิ้งไว้ให้พออุ่น
3. ประกอบอุปกรณ์ chamber สำหรับทำ electrophoresis ตามแต่ละชนิดของผู้ผลิต

4. เทเจลลงในแบบพิมพ์ที่มีที่กั้นเพื่อไม่ให้เจลรั่ว ปล่อยให้เจลแข็งนานประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นถอดอุปกรณ์การกั้นขอบของ chamber และ comb ออกให้นุ่มนวลที่สุดเพื่อมิให้ผนังของหลุมแตกได้ นำเจลไปวางใน chamber
5. เทสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ลงใน chamber จนมีระดับสูงกว่าผิวหน้าเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นให้ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 10xloading buffer ด้วยอัตราส่วน 10:1 แล้วใส่สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ลงในหลุม (wells) พร้อมกับใส่ดีเอ็นเอมาตรฐานทุกครั้ง
6. ปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ chamber ให้มีความต่างศัก ย์อยู่ระหว่าง 1 ถึง 10 โวลท์ต่อความยาวของเจล โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านหลุมของสารละลายดีเอ็นเอ
7. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีน้ำเงินของ Bromophenol blue วิ่งเข้าใกล้สุดปลายทางของเจล นำเจลออกจาก chamber แล้วแช่ไว้ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5 นาที ล้าง ethidium bromide ที่เกาะตามผิวเจลออกด้วยการแช่เจลในน้ำกลั่นนานประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงนำเจลไปดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต

3. การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอจากยีสต์

สารเคมี

อาหารเหลว YEPD (yeast extract 10 กรัม, peptone 20 กรัม, glucose 20 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

Lysing solution (2% Triton X-100, 1%SDS, 10mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

Phenol:Cloroform:Isoamyl (25:24:1)

Acid washed glass beads ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (ล้าง glass beads ด้วย conc. nitric acid แล้วต่อด้วยน้ำกลั่นหลายๆเที่ยว)

เอนไซม์ RNase (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

4 M Ammonium acetate

สารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

10% SDS (10 กรัม sodium dodecylsulphate ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชม.
2. ตกตะกอนเซลล์ แล้วละลายในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายไปไว้ในหลอด eppendorf
3. เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ Lysing solution

4. เติม 0.2 มิลลิลิตรของ phenol:chloroform:isoamyl alcohol และ 0.3 มิลลิลิตรของ acid washed glass beads
5. Vortex ที่ความเร็วสูงสุดนาน 3-5 นาที
6. เติม TE (pH 8.0) 0.2 มิลลิลิตร
7. ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสใส่ลงในหลอดใหม่ แล้วเติม 96% ethanol 1 มิลลิลิตร
8. ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บตะกอน ปล่อยให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE (pH 8.0) 0.4 มิลลิลิตร เติม RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 30 นาที
9. เติม 4 M Ammonium acetate 10 ไมโครลิตร
10. เติม ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา
11. ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol หนึ่งครั้ง ปั่นอีกทีด้วยความเร็วเท่าเดิมนาน 1 นาที แล้วละลายตะกอนใน 50 ไมโครลิตร ของสารละลาย TE (pH 8.0) จะได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.1-1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

4. การสกัด mRNA

สารเคมี

AE buffer (50 mM NaOAc pH 5.3, 10 mM EDTA)

10%SDS

Phenol (Pre-equilibrated with AE)

Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

3M Potassium acetate (potassium acetate 29.6 กรัม ละลายน้ำ ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ปริมาตร 11.5 มล. และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

Absolute Ethanol

70% Ethanol

วิธีการทดลอง

1. เขี่ยเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลวที่มีไซแลน 0.5% เป็นส่วนประกอบ เขย่าที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชม.
2. ถ่ายเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มล. ปั่นแยกเชื้อที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
3. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งครั้ง

4. เติมสารละลาย AE buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้ตะกอนละลาย เติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
5. นำเซลล์ไปแช่ที่อุณหภูมิ -80°C นาน 4 ชม. แล้วนำออกมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปปั่นแยกเศษเซลล์ทิ้งที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนไว้
7. ทำดีเอ็นเอให้สะอาดด้วย phenol และ chloroform:isoamyl alcohol
8. เติม 3M KOAc ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.3 M
9. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -20°C นาน 1-4 ชม.
10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 15-20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
11. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol
12. ทำตะกอนให้แห้งด้วยชุดทำสุญญากาศ
13. ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 40-50 ไมโครลิตร

5. การตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Blotting และ Hybridization

ก. การถ่ายโอน phage สู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส

สารเคมีและวัสดุ

LB plate. TB top agar

แบคทีเรีย *E. coli* NM 522

0.2M NaOH, 5M NaCl

0.4M Tris-HCl pH 7.6

2x SSC

0.1 % SDS

กระดาษ 3 MM Whatman และ กระดาษทิชชู

แผ่นไนโตรเซลลูโลสหรือไนลอน

กล่องพลาสติก

วิธีการทดลอง

1. นำ phage lysate ที่เตรียมไว้มาทำ dilution ให้ได้ plaque ประมาณ 50-100 plaque/plate
2. ผสม phage lysate ในข้อ1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับแบคทีเรีย *E. coli* NM 522 ปริมาตร 100 ไมโค ลิตร บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที
3. ต้มเพื่อละลาย top agar อุ่นไว้ที่ 45°C

4. เติมสารละลายผสมของเชื้อและ phage lysate ที่ได้จากข้อ 2 ลงใน top agar อุ่นๆ ผสมอย่างรวดเร็ว แล้วเทบน LB plate รอจน top agar แข็ง แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชม.
5. เมื่อครบเวลา นำ plate ในข้อ 4 ไปแช่ในตู้เย็นนานอย่างน้อย 1 ชม.
6. ทำสัญญลักษณ์ประมาณ 5 ตำแหน่งในลักษณะที่ไม่ได้สมมาตรกันบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้ววางทับลงบนวุ้นใน plate ที่เพิ่งเอาออกมาจากตู้เย็น
7. แทงเข็มที่อบฆ่าเชื้อผ่านไนโตรเซลลูโลสณ.ตำแหน่งที่ทำสัญญลักษณ์ไว้ให้ครบทั้ง 5 ตำแหน่ง
8. ปล่อยให้ไนโตรเซลลูโลสวางทับบนวุ้นนาน 2-10 นาที แล้วใช้ forcep ค่อยๆดังแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้หลุดออกมา แล้ววางหงายบนแผ่น Whatman 3MM ปล่อยให้ plaque ที่ติดมาแห้งประมาณ 10-20 นาที
9. เตรียมถาดที่บรรจุด้วยกระดาษ
10. ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethedium bromide และถ่ายรูปเก็บไว้
11. ล้างเจลให้สะอาดด้วยน้ำ
12. แช่เจลในสารละลาย 0.2 N HCl เขย่าเบาๆ 10 นาที (การแช่ในกรดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ขั้นตอนนี้อาจงดได้หากดีเอ็นเอที่ต้องการย้ายมีขนาดเล็กกว่า 10 kb)
13. เทกรดออก ล้างเจลด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง
14. แช่ใน denaturation solution เขย่าเบาๆ 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง
15. แช่ใน neutralization solution เขย่าๆเบาๆ 30 นาที
16. วัดขนาดเจล แล้วตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้ได้ขนาดเล็กว่าเจลเล็กน้อย (ประมาณ 3 มิลลิเมตรจากปลายทุกด้าน) แช่แผ่นที่ตัดในน้ำ 1 นาที และแช่ต่อใน 20xSSC 5-10 นาที
17. ตัดกระดาษ Whatman 3 MM 3-5 แผ่นให้มีขนาดเล็กกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลส (7 มิลลิเมตร จากปลายทุกด้าน)
18. ทำที่รองรับเจลด้วยกระดาษ Whatman 3 MM ให้มีความกว้างมากกว่าขนาดเจลเล็กน้อยและยาว 30-40 เซนติเมตร กระดาษนี้ถูกทำให้ชุ่มด้วย 20xSSC แล้ววางทับบนแผ่นกระจกหรือแผ่นพลาสติกซึ่งออกแบบให้ลอยอยู่เหนือภาชนะบรรจุสารละลาย 20xSSC ปลายสองด้านของกระดาษ 3 MM ต้องสัมผัสกับสารละลาย 20xSSC
19. วางเจลบนที่รองรับในข้อ 18

20. วางแผ่น 3 MM ในข้อ19 ซึ่งชุ่มด้วยสารละลาย 20xSSC ทับบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส
21. วางกระดาษทิชชูทับบนแผ่น 3 MM ให้สูงขึ้นมา 3 เซนตริเมตร
22. วางของหนักทับบนกระดาษทิชชู
23. ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ดีเอ็นเอจะถูก transfer
24. เมื่อครบเวลา ให้ใช้ forcep ค่อยๆคีบไนโตรเซลลูโลสออกมาล้างเบา ๆ ด้วย 2xSSC วางบนกระดาษ 3 MM ปล่อยให้แห้ง แล้วเปลี่ยนไปวางบนกระดาษ 3 MM แผ่นใหม่ และนำไปอบที่ 80°ซ นาน 2 ชั่วโมง
25. แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านการอบแล้ว สามารถนำไปทำ hybridization ต่อได้ทันที หรืออาจเก็บไว้ในที่แห้งได้นานเป็นปีโดยก่อนนำไปใช้ควรอบอีกครั้งที่ 80°ซ นาน 2 ชั่วโมง

ข. การติดฉลากดีเอ็นเอด้วย DIG (digoxigenin) หรือ DIG-labeling

สารเคมี

Hexanucleotide mixture

dNTP labeling mixture(1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP pH 7.5)

Klewnow enzyme

0.2 M EDTA (เจือจางจากสารละลายตั้งต้น 0.5 M EDTA)

4 M LiCl (ละลาย LiCl 1.69 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร)

Absolute ethanol

70% ethanol

วิธีการทดลอง

1. ต้มดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
2. ผสมสารละลายดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe)	5	ไมโครลิตร
hexanucleotide mixture	2	ไมโครลิตร
dNTP labeling mixture	2	ไมโครลิตร
H_2O	10	ไมโครลิตร
Klenow enzyme	1	ไมโครลิตร

3. บ่มที่ 37°ซ นานไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง
4. เติม 0.2 M EDTA 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

5. เติม LiCl 2.5 ไมโครลิตร, Absolute ethanol 75 ไมโครลิตร แช่ที่ -20°ซ นาน 2 ชั่วโมง
6. ปั่นที่ 12,000xg ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol
7. ละลายตะกอนในน้ำ 20-50 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ค. Hybridization

สารเคมี

20xSSC (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate; pH 7.0)

5xSSC (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate; pH 7.0)

Prehybridization solution [5XSSC, 1%(w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02 % SDS]

Hybridization solution [มีส่วนผสมเช่นเดียวกับ prehybridization solution แต่เติมดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากและผ่านการ denature ด้วยความร้อนแล้ว]

Washing 1 (2XSSC, 0.1%SDS)

Washing 2 (0.1XSSC, 0.1%SDS)

วิธีทดลอง

1. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีดีเอ็นเอติดอยู่มาแช่ในสารละลาย prehybridization solution โดยมีสัดส่วนของสารละลายต่อขนาดไนโตรเซลลูโลส คือ 20 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตรบ่มที่ 68°ซ นาน 1 ชั่วโมง. (หรืออาจนานกว่าก็ได้)
2. เมื่อครบเวลา เท prehybridization solution ออก แล้วใส่ hybridization solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อไนโตรเซลลูโลสขนาด 100 ตารางเซนตริเมตร
3. ต้มดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากแล้ว (labeled DNA probe) ที่ 95°ซ นาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
4. ใส่ดีเอ็นเอตรวจจับในข้อ 4 ลงไปใน hybridization solution 5 ไมโครลิตร
5. บ่มที่ 68°ซ นาน 6-12 ชั่วโมง
6. เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วย Washing solution 1 ที่อุณหภูมิห้อง สองครั้งๆ ละ 5 นาทีและ Washing solution 2 ที่ 68°ซ สองครั้ง ๆ ละ 15 นาที
7. ปล่อยให้แผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้งที่อุณหภูมิห้อง และสามารถนำไปตรวจสอบผลการ hybridized ได้ทันที หรือเก็บไว้ในที่แห้งได้นาน 1 สัปดาห์

ง. การตรวจสอบผลของ Hybridization ด้วยแอนตี้บอดี้ต่อ DIG

สารเคมี

บัฟเฟอร์ 1 (0.1 M Tris-HCl pH 7.5; 0.15 M NaCl)

บัฟเฟอร์ 2 (Blocking reagent 1%(w/v) ในสารละลาย buffer 1)

บัฟเฟอร์ 3 (0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl; 0.05 M $MgCl_2$)

บัฟเฟอร์ 4 (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0)

Color solution (ผสม NBT 45 ไมโครลิตรและ X-phosphate solution 35 ไมโครลิตรใน 10 มิลลิลิตร ของ buffer 3)

วิธีการทดลอง

1. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสในบัฟเฟอร์ 1 (ปริมาตรพอท่วม)นาน 1 นาที
2. แช่ในบัฟเฟอร์ 2 นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายออก
3. เตรียมสารละลายแอนตี้บอดี้โดยเจือจาง Anti-DIG-AP ในสัดส่วน 1:2,500 หรือ 1:5,000 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2
4. บ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนตี้บอดี้นาน 30 นาที
5. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1 สองครั้ง ๆ ละ 15 นาที
6. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 นาน 2 นาที
7. แช่ใน color solution (2-10 มิลลิลิตร) วางไว้ในที่มืด ห้ามเขย่า จะเกิดปฏิกิริยาเห็นสีภายใน 2-3 นาที ถ้ายังไม่เห็น อาจทิ้งไว้นาน 24 ชม.
8. หยุดปฏิกิริยาโดยล้างในบัฟเฟอร์ 4 สามารถเก็บแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่เห็นผลแล้วนี้ในบัฟเฟอร์ 4 ได้เป็นระยะเวลานาน

6. การทำ RT-PCR

นำ mRNA ที่เตรียมในข้อ 4 มาผสมกับสารละลายต่างๆดังต่อไปนี้

nuclease free water	เติมจนหลอดปฏิกิริยาครบ 50 ไมโครลิตร
reaction buffer	10 ไมโครลิตร
dNTP Mix (10 mM each dNTP)	1 ไมโครลิตร
Downstream primer	50 pmol
Upstream primer	50 pmol
25 mM $MgSO_4$	2 ไมโครลิตร
AMV reverse transcriptase	1 ไมโครลิตร
RNA sample	1 ไมโครกรัม

นำสารละลายที่ผสมแล้วนี้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยมีโปรแกรมคือ 48°C 45 นาที 1 รอบ 94°C 2 นาที 1 รอบ และ 94°C 30 วินาที 60°C 1 นาที 68°C 2 นาที 40 รอบ

7. การเตรียม phage lysate และ invitro packaging

ทำตามวิธีที่ระบุไว้ใน Molecular Cloning ของ Maniatis และ คณะ หน้า 256-268 (27)

ผลการทดลอง

1. *การเตรียม mRNA*

ได้ทดลองทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 30 ชม. และสุ่มตัวอย่างออกมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นแล้ว แต่ค่ากิจกรรมที่ได้ยังต่ำอยู่ และมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีค่าสูงสุดที่ 72 ชม. จึงคาดว่าที่เวลา 30 ชม.น่าจะมีปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ไซลาเนสมากเพียงพอ จึงเลือกสกัด mRNA จากเชื้อณ.เวลาดังกล่าว ผลการทดลองได้ปริมาณ RNA เท่ากับ 0.6 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปแยกเฉพาะ mRNA โดยใช้ oligo-dT column ในที่สุดได้ mRNA ปริมาณ 0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

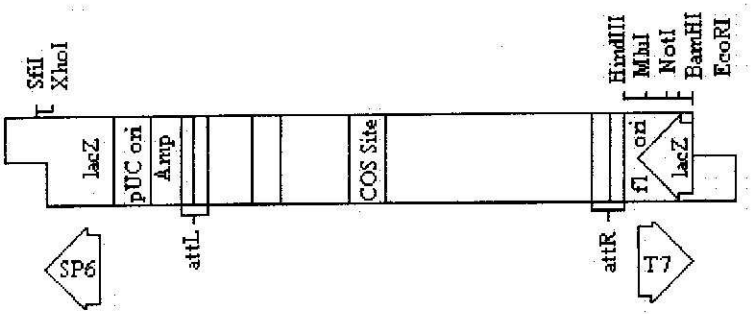
2. *การเตรียม cDNA library*

นำ mRNA ที่ได้จากข้อ 1 มาสังเคราะห์ cDNA แล้วนำ cDNA ที่ได้ไปเชื่อมกับเวคเตอร์ λ-Excell I ซึ่งมี restriction map ดังรูปที่ 3 โดยโคลนเข้าที่ตำแหน่ง *Eco*RI แล้วทำการ packaging ดีเอ็นเอลูกผสมให้อยู่ในรูปของ phage ซึ่งนำไป transfect เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมต่อไป ดังนั้นเราจะได้ cDNA อยู่ในรูปของ phage lysate ซึ่งเมื่อนำมาหาค่า titer พบว่า library ที่ได้มีค่า titer เป็น $4X10^4$ pfu/ml แต่เนื่องจากในการตรวจสอบหาโคลนที่ต้องการจาก library นี้ ต้องผ่านขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน และอาจต้องทำการทดลองซ้ำหลายครั้ง จึงเป็นการสะดวกหากจะมีการ amplify library ทั้งนี้ phage lysate ของ library ที่ถูก amplify แล้วสามารถเก็บไว้ได้นาน จึงนับว่ามีประโยชน์ถ้าต้องการโคลนยีนอื่นในอนาคต ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการ amplify library ในที่สุดได้ค่า titer เพิ่มขึ้นเป็น $6X10^6$ pfu/ml และเก็บ library ดังกล่าวไว้ที่ $-70^{\circ}C$

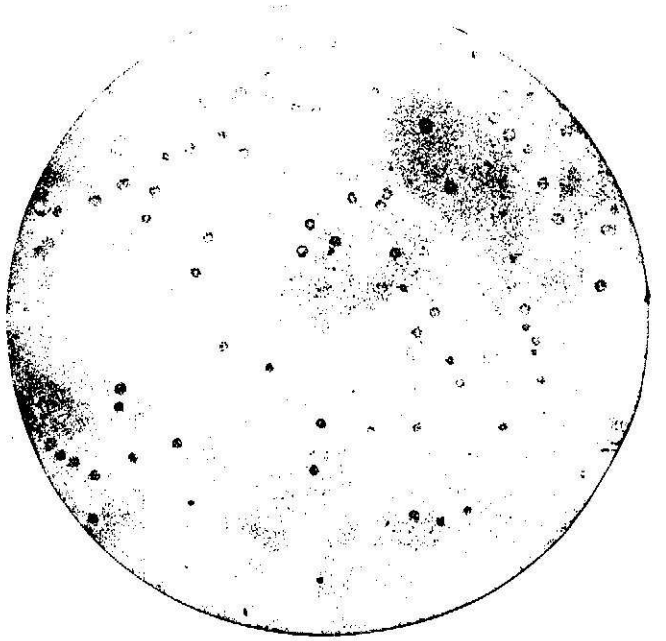
3. *การตรวจสอบหาโคลนที่มียีนของไซลาเนส*

เจือจาง phage lysate ให้มี titer ที่เหมาะสมซึ่งเมื่อคำนวณแล้วคาดว่าจะได้ plaque ประมาณ 600 plaque ต่อจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 82 มิลลิเมตร แล้วทำ transfection โดยมีเชื้อ *E. coli* NM 522 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ได้เตรียมจานเลี้ยงเชื้อที่มี plaque ในปริมาณเช่นนี้จำนวน 10 จาน ซึ่งหมายความว่าเราได้ทำการตรวจสอบโคลนเป็นจำนวนทั้งสิ้นประมาณ 6,000 โคลน ในการตรวจสอบสามารถทำได้โดยย้าย plaque จากจานสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำลายเชื้อ

แบคทีเรียที่ติดมาด้วย ทำ phage ให้แตกและดีเอ็นเอหลุดออกมาติดอยู่บนไนโตรเซลลูโลส จาก ดีเอ็นเอเหล่านี้ถ้าดีเอ็นเอใดมีไซลาเนสยีนก็จะสามารถจับคู่กับดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย

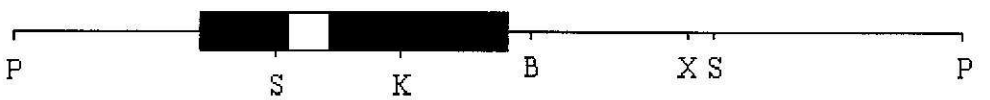


รูปที่ 3 แสดง restrcition map ของ λ Excell



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบ library ด้วยดีเอ็นเอตรวจจับ Xyn C ที่ติดฉลากด้วย DIG เห็นจุดสีม่วงจากการทำไฮบริไดเซชั้นซึ่งคาดว่าอาจเป็นโคลนที่ต้องการ

DIG และเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรท NBT และ X-Phosphate ได้เป็นสารสีม่วงตกตะกอนอยู่ ณ.บริเวณที่มีดีเอ็นเอที่สนใจอยู่ จึงทำให้เห็นเป็นจุดสีม่วง จากการทดลองในเบื้องต้นพบจุดสีม่วงหลายตำแหน่งทำให้คาดว่าอาจเป็นโคลนที่ต้องการดังรูปที่ 4 และดีเอ็นเอตรวจจับที่ใช้คือโคลนของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นในที่นี้คือ *Xyn C* ของ *A. kawachii* ซึ่งมี restriction map ดังรูปที่ 5 เนื่องจากการเตรียม plaque เพื่อการตรวจสอบในรอบแรกนี้เป็นแบบหนาแน่น จึงแน่นอนว่าจุดที่พบว่าเกิดเป็นสีม่วงมีการปนเปื้อนด้วยโคลนที่ไม่เกี่ยวข้องใดๆเลย (negative clones) จึงต้องมีการนำ phage ใน plaque นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยเจาะเนื้อวุ้นส่วนที่เป็น positive clone นำไปชะ phage ออกมาแล้ว transfect เข้าสู่เซล์เจ้าบ้านอีกครั้ง แต่คราวนี้เตรียม plaque บนจานในปริมาณที่หนาแน่นน้อยกว่าเดิมและเมื่อทำ blot และไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตวจจับเดิมอีกครั้งเราคาดหวังว่าจะพบ positive clones อีกและแต่ละโคลนอยู่ห่างกันในระยะที่ไม่เกิดการปนเปื้อนจาก negative clones เลยหรือเกิดน้อยที่สุด จากผลการทดลองพบจุดสีม่วงเต็มไปหมด ซึ่งไม่น่าจะเป็นไปได้สำหรับการทำ phage ให้บริสุทธิ์ในรอบแรกนี้ ผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า positive clones ที่ได้จากการตรวจสอบรอบแรกเป็น false positive ซึ่งก็ได้รับการยืนยันว่าเป็นจริงจากการทดลองซ้ำอีกหลายครั้งและแม้เปลี่ยนไปใช้โคลนของ *Xyn A* และ *Xyn B* แทนก็ได้ผลเช่นเดียวกัน โดยสาเหตุของ false positive อาจมาจากดีเอ็นเอตรวจจับที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปใช้วิธีการอื่นดังจะได้กล่าวต่อไป



รูปที่ 5 แสดง restriction map ของยีน *Xyn C* จาก *A. kawachii*

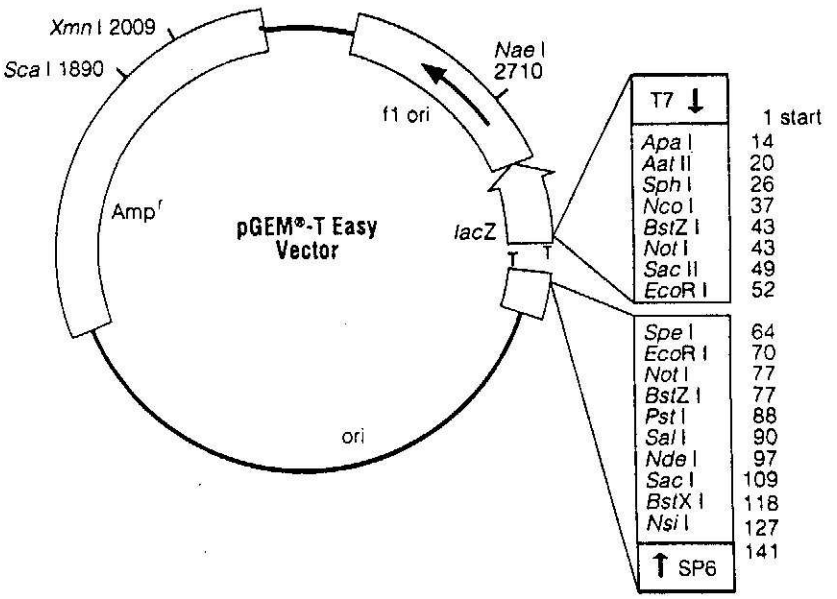
4. *การเตรียมยีนของไซลาเนสด้วยวิธี RT-PCR*

เป็นวิธีการทดลองที่นำมาใช้ทดแทนวิธีที่ 3 ที่ไม่ได้ผล โดยทำการเตรียม cDNA จาก mRNA เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 2 แต่ไม่ได้เป็นการทำ library และ primer ที่ใช้ก็เป็น specific primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสของไซลาเนสของจุลินทรีย์อื่นจาก data bank โดยเลือกส่วนที่ค่อนข้าง conserve ลำดับเบสที่ใช้เป็น primer ได้แก่

Forward primer: 5'CGATGAACTACGTGCAAAACTACAA 3'

Reverse: 5'TTAGTTGAAATGGTTGGCAAGG 3'

เมื่อได้ cDNA ที่จำเพาะขึ้นแล้วจึงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยวิธี PCRโดยใช้ primer ชุดเดิม เรียกวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า RT-PCR นำผลิตผลที่ได้นี้ไป subclone บน เวคเตอร์ pGEM ซึ่งมี restriction map ดังรูปที่ 6 แล้ว transform ดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน DH5α ในที่สุดได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมเข้าไปในขนาดต่างๆกันทั้งสิ้น 9 โคลน ดังรูปที่ 7 ขนาดของดีเอ็นเอที่เชื่อมคือ 100 bp (โคลนที่ 1-3), 150 bp (โคลนที่ 4), 700 bp(โคลนที่ 8), 1,200 bp (โคลนที่ 9-11) และ 2,000 bp (โคลนที่ 12) โคลนเหล่านี้คาดว่ามีส่วนของไซลาเนสยีนอยู่และต้องนำไปหาลำดับเบสต่อไป



รูปที่ 6 แสดง restriction map ของเวคเตอร์ pGEM

รูปที่ 7 แสดงโคลนที่เกิดจากการเชื่อมดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR และ เวคเตอร์ pGEM นำดีเอ็นเอของแต่ละโคลนมาย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และตรวจสอบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis บริเวณที่ลูกศรชี้คือชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมกับเวคเตอร์ของแต่ละโคลน โคลนหมายเลข 5-7 คือโคลนที่เกิดจาก self ligation ของเวคเตอร์ และไม่มีดีเอ็นเออื่นมาเชื่อมด้วย ส่วนโคลนที่ 1-4 และ 8-12 คือโคลนที่คาดว่าจะมียีนของไซลาเนสและต้องนำไปศึกษาต่อ (ซ้ายมือคือ molecular weight marker: λ-HindIII (23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2 kb.) และ 100 bp ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.)

5. *การหาลำดับเบสจากโคลนที่ได้*

เนื่องจากในการหาลำดับเบสจากโคลนมีราคาค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง จึงไม่สามารถที่จะหาลำดับเบสของโคลนที่สนใจซึ่งมีอยู่ถึง 9 โคลนได้ ผู้ทำการวิจัยจึงเลือกโคลนที่ 8 และ 9 ไปทำการหาลำดับเบสก่อน ส่วนโคลนที่ 1-4 มีขนาดเล็กไป โคลนที่ 10, 11 มีแนวโน้มว่าจะคล้ายกับโคลนที่ 9 และโคลนที่ 12 มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ต้องทำ sub-cloning ก่อนที่จะนำไปหาลำดับเบสได้ จึงตัดโคลนเหล่านี้ออกไปก่อน ผลจากการทำ sequencing พบว่ามีเพียงโคลนที่ 4 ที่อ่าน sequence ได้สมบูรณ์ดังรูปที่ 8

CENTRAL ...
PRINCE OF ... UNIVERSITY

```
Size     658 , Select        1
  1 ATGAACTACGTGCAAAACACATCNAATGCACGCGCCNTTTCCACANGTGCCNNATNCAAA
  1  M  N  Y  V  Q  N  T  S  N  A  R  A  X  S  T  X  A  X  X  K

 61 TTTGGCCTCCGTCTCACTCATCTCACTTGTTTCACTCGCCTTACTCGTCTCGTTCGTCTC
 21  F  G  L  R  L  T  H  L  T  C  F  T  R  L  T  R  L  V  R  L

121 ACCCTCAGTCCGATACGAAAGATCTTCGTATTCGTCAAACATCTCTCCCGCGCGGTTTTC
 41  T  L  S  P  I  R  K  I  F  V  F  V  K  H  L  S  R  A  V  F

181 TATCTCAGCTGGCTGGGATGCTTGTTGGCTCTGGCAGAGACCACATGCGAATCATGCTTG
 61  Y  L  S  W  L  G  C  L  L  A  L  A  E  T  T  C  E  S  C  L

241 CAGAAACAGGAGAATCAAGTATTACGAGAACTACTGCTCTTGGCCACACCTATTTCACAT
 81  Q  K  Q  E  N  Q  V  L  R  E  L  L  L  L  A  T  P  I  S  H

301 GTGCTCCATCGCGCTGGCCTGGGCCTGTCAGAAATCGCTCTCGAAGTCGAGGATTACATT
101  V  L  H  R  A  G  L  G  L  S  E  I  A  L  E  V  E  D  Y  I

361 TACCAGCTCGGACAGATGCTCTTCGAATGGCTTCGACTGGAGTTGTCGTGGATCGTAGAG
121  Y  Q  L  G  Q  M  L  F  E  W  L  R  L  E  L  S  W  I  V  E

421 TCACTCTGGGCTGGGTTCCTTGGTTTTGGCGACTGGCTATGGGTCGCTGCAGATTGGTTC
141  S  L  W  A  G  F  L  G  F  G  D  W  L  W  V  A  A  D  W  F

481 GATCGAGGTTTGGCAATGTATGTCGCTTGGACGGCTTAGCTGCGACAGGCCTAAGGAAGA
161  D  R  G  L  A  M  Y  V  A  W  T  A  *  L  R  Q  A  *  G  R

541 ACTAGGAGAGGCAAGACCTCATCTTGAAATGACAGCAACCAGTCCCATCAACTCTAATTC
181  T  R  R  G  K  T  S  S  *  N  D  S  N  Q  S  H  Q  L  *  F

601 ATGTCCTTNATTCCGACAGCAAAAGTCTTCGCAACCTTGCCNACCATTTCAACTAACC
201  M  S  X  I  P  T  A  K  V  F  A  T  L  P  T  I  S  T  N
```

รูปที่ 8 แสดงผลของการหาลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่คาดคะเนจากลำดับเบสโดยมี ATG เป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปกติการทำโคลนนิ่งเพื่อสุ่มหายีนชนิดใดชนิดหนึ่งอาจมีวิธีการทำได้หลายวิธี ทั้งนี้แล้วแต่ข้อมูลที่มีอยู่ เอนไซม์ไซลาเนสจากยีสต์ *P. stipitis* นี้ผู้วิจัยได้เคยทำการศึกษามาก่อนโดยได้เตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปฉีดกระต่ายและเตรียมแอนติ้บอดี้ที่จำเพาะ (15) และคาดว่าจะสามารถนำแอนติ้บอดี้ที่จำเพาะนั้นมาใช้ตรวจหาโคลนที่ต้องการอย่างไรก็ตามเนื่องจากขั้นตอนการเตรียม cDNA library ที่ผ่านมาพบอุปสรรคทำให้ไม่สามารถเตรียม library ได้รวดเร็วตามกำหนด จึงไม่มั่นใจที่จะนำแอนติ้บอดี้ที่เก็บไว้นานมาใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เริ่มสุ่มหาโคลนในขั้นต้นโดยใช้ยีนของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้ออื่นมาเป็นดีเอ็นเอตรวจจับ ในที่นี้ได้แก่ *Xyn A, XynB* และ *Xyn C* ของเชื้อ *A. kawachii* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก โดยคาดหวังว่ายีนของจุลินทรีย์แม้ต่างชนิดกันน่าจะมีความคล้ายคลึงกันบ้าง และได้ทำการทดลองโดยนำดีเอ็นเอตรวจจับดังกล่าวมาลองไฮบริไดซ์กับโครโมโซมดีเอ็นเอของ *P. stipitis* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ และพบว่าเกิดการไฮบริไดซ์ขึ้น (ไม่ได้แสดงภาพผลการทดลองเนื่องจากเกิดความขัดข้องตอนถ่ายภาพ) อย่างไรก็ตามเมื่อนำดีเอ็นเอตรวจจับนี้ไปใช้ในการสุ่มหาโคลนจาก library ก็พบว่าเกิด false positive ขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากส่วนของดีเอ็นเอของไซลาเนสยีนอาจไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอของ phage เอง ทำให้ไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่มีอยู่ได้

ด้วยปัญหาดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนไปใช้วิธี RT-PCR โดยออกแบบ primer จากข้อมูลลำดับเบสของไซลาเนสยีนทั้งสามของ *A. kawachii* และข้อมูลลำดับเบสอื่นๆจาก data bank โดยเลือกเอาบริเวณที่ค่อนข้าง conserve นำ primer ดังกล่าวมาใช้ทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยมี mRNA ของ *P. stipitis* เป็นต้นแบบ ในที่สุดได้ cDNA ขนาดต่างๆกันซึ่งเมื่อนำไป subclone โดยใช้เวคเตอร์ pGEM จะได้โคลนออกมาทั้งสิ้น 9 โคลน นำโคลนที่น่าสนใจเพียง 2 โคลนไปหาลำดับเบส แต่มีเพียงโคลน *X8* เท่านั้นที่ได้ข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ และเมื่อเทียบข้อมูลของลำดับเบสจากโคลน *X8* กับ *Xyn C* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันประมาณ 50 % โคลน *X8* ที่ได้มีขนาด 658 เบส สามารถแปลรหัสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนได้ดังรูปที่ 9 ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 171 หน่วย คิดเป็นขนาดโปรตีน ประมาณ 20,000 ดาลตัน ซึ่งเล็กกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสที่เตรียมบริสุทธิ์ (15) ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าเนื่องจากไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่เป็น glycoprotein น้ำหนักโมเลกุลที่มากเกิดจากปริมาณน้ำตาล หรือโคลน *X8* ที่ได้นี้ยังมีส่วนประกอบที่เป็นยีนของไซลาเนสไม่ครบถ้วน ซึ่งก็เกิดขึ้นได้เนื่องจากเป็นการเตรียมยีนโดยการทำ PCR จาก primer เพียงหนึ่งคู่ที่ออกแบบจาก conserve sequence ภาย

ในยีนทำให้ primer ที่ใช้ไม่สามารถครอบคลุมได้ทั้งยีน จะเห็นได้จากลำดับเบสที่ได้ยังไม่ครอบคลุมถึงส่วนที่เป็นตัวควบคุม (promotor) อย่างไรก็ตามโคลน *X8* นับว่ามีประโยชน์เนื่องจากสามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับที่จำเพาะเพื่อสุ่มหาโคลนใหม่จาก genomic library ต่อไปได้ ดีเอ็นเอตรวจจับนี้ไม่น่าจะมีปัญหาดังเช่นที่ได้จากการใช้ ยีนของ *Xyn A, Xyn B* และ *Xyn C* อีก เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอตรวจจับที่ได้จากดีเอ็นเอของ *P. stipitis* เอง และ ในการเตรียม genomic library ก็อาจเลี่ยงไปใช้เวคเตอร์และเซลล์เจ้าบ้านแบบอื่น นอกจากนั้นเนื่องจากในการออกแบบ primer เพื่อทำ RT-PCR นี้ได้มีการเติม ATG ที่ปลาย 5' ไว้แล้ว ดังนั้นอาจนำโคลนที่ได้ไปทำ expression เพื่อเตรียม recombinant protein ขึ้นมา และนำโปรตีนที่ได้ไปศึกษาหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. ได้ทำการเตรียม cDNA library จากยีสต์สายพันธุ์ *Pichia stipitis* โดยมี titer $4X10^6$ pfu/ml library นี้ถูกเก็บไว้ที่ -70°C สามารถเก็บไว้ใช้ในการสุ่มหายีนของเอนไซม์อื่นนอกเหนือไปจากไซลาเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน
2. ยีนของไซลาเนสที่โคลนในครั้งนี้ได้มาจากการทำ RT-PCR จาก mRNA ที่เตรียมจาก *P. stipitis* ที่เลี้ยงในอาหารไซแลน ยีนที่ได้มีขนาด 658 bp ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วจะได้โปรตีนขนาด 20,000 ดาลตัน
3. ทราบลำดับเบสของยีนไซลาเนส ลำดับเบสนี้มีความคล้ายคลึงกับ *Xyn C* ของ *A. kawachii* อยู่ 50%
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับหากมีการทำวิจัยต่อ
    4.1 ได้เรียนรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของยีนไซลาเนสและการควบคุมการทำงานของยีน
    4.2 สามารถนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ให้สามารถหมักแอลกอฮอลล์จากไซแลน
    4.3 สามารถนำเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและกระดาษ

คำย่อ

P. stipitis	*Pichia stipitis*	*A. Kawachii*	*Aspergillus kawachii*
DIG	Digoxigenin	NBT	Nitroblue tetrazolium
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate		
RT-PCR	Reverse transcription and PCR amplification		
PCR	Polymerase Chain Reaction	bp	Base pair
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid	SDS	Sodium dodecyl sulphate

เอกสารอ้างอิง

1. Jeffries, T.W. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi. Adv. Biochem. Eng.-Biotech. 27, 1-32
2. Hollenberg, C.P. and Wilhelm, M. 1987. New substrates for old organisms. Biotec 1, 21-31.
3. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 11, 286-290.
4. Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J. Microbiol. Biotech. 8, 353-368.
5. Skoog, K., and Hahn-Hagerdal, B. 1988. Xylose fermentation. Enzyme Microb. Technol 10, 66-80.
6. Prior, B.A., Kilian, S.G., and Du Preez, J.C. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* Prospects and problems. Process. Bioc. 21-32.
7. Flannery, R.J. and Steinschneider, A. 1983. Fermentation economics in relation to genetic engineering. Biotechnol.1, 773-776.
8. Innis, M.A., Holland, M.J., McCabe, P.C., Cole, G.E., Wittman, V.P., Tal, R. Watt, K.W.K., Gelfand, D.H., Holland, J.P., and Meade, J.H. 1985. Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Science 228, 21-26.

9. Sreekrishna, K, and Dickson, R.C. 1985. Construction of strains of Saccharomyces cerevisiae that grow on lactose. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 82, 7909-7913.

10. Kotter, P., Amore, R., Hollenberg, C.P., and Clriacy, M. 1990. Isolation and characterization of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. Curr. Genet 18:493-500.

11. Lee, H., Biely, P., Latta, R.K., Barbosa, M.F.S. and Schneider, H. 1986. Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 52, 320-324.

12. Steven, B.J.H., and Payne, J. 1977. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon.* J. Gen. Microbiol. 100, 381-383.

13. Biely, P., Vrsanska, M., and Kratky, Z. 1980. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus* identification and cellular localization. Eur. J. Biochem 108, 313-321.

14. Molosoli, R. 1985. Molecular expression of xylanase gene in *Cryptococcus albidus.* Biochim. Biophys. Acta. 826, 202-207

15. Phongdara, A and Tumsuwan, P. 1996. Purification and Properties of Xylanases from *Pichia stipitis*. J. Sci. Soc. Thailand. 22, 275-284

16. Buchert, J., Ranua, M., Kantelinea, A. and Viikari, L. 1992. The role of Trichoderma reesei xylanases in the bleashing of pine kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 825-829.

17. Paice, M.G., Bernier, Jr., and Jurasek, L. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from cloned gene. Biotechnol. Bioeng. 32, 235-239.

18. Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks J.B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

19. Sambrook, J., Fritch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

20. Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Research. 20(6), 1425.

21. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

22. Bedford, M.R., and Classen, H.L. 1993. An invitro assay for prediction of broiler intestinal viscosity and growth when fed rye-based diets in the presence of exogenous enzymes. Poult. Sci. 72(1), 137-143.

23. Stockes,M.R. 1992. Effect of enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. J. Dairy. Sci. 75(3), 764-773.

24. Cheah, S.C., and Ooi, L.C-L. 1985. Development of a process for palm oil mill steriliser condensate utilization. Paper presented at the National Symposium on Palm By products for Agro-based Industry, Kuala Lumpur, Malaysia, 5-6 November 1985.

25. Senior, D.J., Mayers, P.R., and Saddler, J.N. 1991. The interaction of xylanases with commercial pulps. Biotech. Bioen. 37, 274-279

26. Yoshizawa, 1981. Development of the New Treating Method of Waste Water from Food Industry Using Yeast. Nippon Nogeikagaku Kaishi 55, 705-711.

27. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. In Molecular Cloning A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 256-268.