

บทความวิจัย

# การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนส จาก *Bacillus* sp. GA2(1)

ชนิดโครต ปิยพิทยานันต์ และ สุดาทิพย์ จันทร\*

ได้รับบทความ: 7 กันยายน 2561

ได้รับบทความแก้ไข: 11 มกราคม 2562

ยอมรับตีพิมพ์: 25 มกราคม 2562

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษายีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีการทิ้งกากข้าวเหลืองในจังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย โดยออกแบบคู่มือที่จำเพาะต่อปลายด้าน 5' และ 3' ของยีนแมนนาเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงที่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายด้าน 5' และ 3' ของยีนแมนนาเนสที่มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่าแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 42.08 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.04 และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม PROSITE และ InterPro พบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolases สกุล 26 (GH26) ซึ่งมีสมบัติเป็น mannan endo-1,4-beta-mannosidase ที่สามารถไฮโดรไลซ์ (1→4)-beta-D-mannosidic linkages ในแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนได้

คำสำคัญ: *Bacillus* sp. ยีนแมนนาเนส Glycosyl hydrolases 26

# Cloning and Nucleotide Analysis of a Mannanase Gene from *Bacillus* sp. GA2(1)

Chanitchote Piyapittayanun and Sudathip Chantorn\*

---

Received: 7 September 2018

Revised: 11 January 2019

Accepted: 25 January 2019

## ABSTRACT

We studied a mannanase gene from *Bacillus* sp. GA2(1) isolated from soybean meal in Khon Kaen province, Thailand. A pair of primers was designed from 5' and 3' end of mannanase genes of closely related species in which the nucleotide sequences were available in the GenBank database. The polymerase chain reaction was then carried out using genomic DNA as a template. The PCR product with the size of approximately 1,100 base pairs was obtained and submitted for sequencing. Using ProtParam program, the predicted Mw of the mannanase from *Bacillus* sp. GA2(1) was 42.08 kDa with the pI value of 6.04. Structural prediction by PROSITE and InterPro program suggested that this mannanase belonged to glycosyl hydrolases family 26 (GH26). The members of this enzyme family possessed mannan endo-1,4-beta-mannosidase activity in that they were able to hydrolyze (1→4)-beta-D-mannosidic linkages in mannans and galactomannans.

**Keyword:** *Bacillus* sp., mannanase gene, Glycosyl hydrolases 26

## บทนำ

ปัจจุบันเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมชีวภาพครอบคลุมตั้งแต่อุตสาหกรรมระดับพื้นฐานจนถึงอุตสาหกรรมชีวภาพขั้นสูง มีการใช้เอนไซม์ประเภทต่างๆ ในอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ เเบต้า-แมนนาเนส (Endo-1,4-beta-D-mannanase; EC 3.2.1.78) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่สำคัญทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสในสายโครงสร้างหลักของสารประกอบแมนแนน เช่น แมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และกาแลคโตกลูโคแมนแนน [1] ในลักษณะแบบสุ่มโดยจะไฮโดรไลซ์จากบริเวณภายในโมเลกุลโครงสร้าง (endo-acting) [2] และได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มีสมบัติความเป็นสารปรับโอติคจึงสามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์เพื่อลดปริมาณการใช้สารแอนติไบโอติคที่ก่อปัญหาในเรื่องของการดื้อยาของเชื้อก่อโรค [3] ประสิทธิภาพการทำงานของแมนนาเนสขึ้นอยู่กับจำนวนการแทนที่ของน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่ น้ำตาลแมนโนส นั่นคือในกรณีของสารประกอบกาแลคโตแมนแนนและกลูโคแมนแนนประสิทธิภาพการย่อยสลายของแมนนาเนสขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสในโมเลกุล [4] ดังนั้นเบต้า-แมนนาเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น เอนไซม์ที่ใช้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เอนไซม์ในอาหาร และเอนไซม์ในอาหารสัตว์ เป็นต้น

เบต้า-แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอกติโนมัยซีต [5] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus* sp. เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย และมีหลายสายพันธุ์ จึงนิยมนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายด้าน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus* sp. GA2(1) ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณที่มีกากถั่วเหลือง จังหวัดขอนแก่นสามารถผลิตแมนนาเนสได้ อย่างไรก็ตาม *Bacillus* sp. GA2(1) แสดงกิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 0.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส [6] ซึ่งยังจัดว่าเป็นปริมาณที่ไม่สูงมากนัก การโคลนยีน (gene cloning) หรือเทคโนโลยีการสร้างดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA technology) เป็นเทคโนโลยีการตัดต่อยีนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เป็นอย่างมาก โดยเกิดจากกระบวนการเคลื่อนย้ายยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตเดิมในธรรมชาติที่มีผลิตเอนไซม์ในปริมาณไม่สูงมากเข้าไปยังดีเอ็นเอพาหะหรือเวกเตอร์ (vector) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่สามารถจำลองตัวเองได้ (self-replicating genetic element) และทำให้ยีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นสามารถกระจาย (propagate) ไปกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ ปัจจุบันการพัฒนาและปรับปรุงการโคลนยีนมีความก้าวหน้าและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแมนนาเนสจากสายพันธุ์จุลินทรีย์ตามธรรมชาติกับการผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส การผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสสามารถผลิตได้ง่าย ใช้เวลาไม่นานและองค์ประกอบที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงมีราคาไม่แพง อีกทั้งยังได้เอนไซม์ในปริมาณมากขึ้นอีกด้วย

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) และสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแมนนาเนสชนิดนี้แทรกอยู่ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์รวมถึงลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล รวมถึงคาดการณ์โครงสร้างและหน้าที่ของยีนทางผู้วิจัยวางแผนจะนำรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสที่ผลิตใน *Escherichia coli* expression system นี้ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาหน้าที่และสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. GA2(1)

เลี้ยง *Bacillus* sp. GA2(1) ในอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แบ่งเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, China) โดยเติม GA buffer 400 ไมโครลิตร Lysozyme 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ต่อมาเติม Proteinase K 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ GB buffer 220 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 220 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำสารละลายทั้งหมดใส่คอลัมน์ CB3 แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ต่อมาเติม GD buffer 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ CB3 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม PW buffer 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ CB3 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม PW buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติสสารละลายทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำคอลัมน์ CB3 ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE buffer 30 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1)

รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. ในฐานข้อมูล GenBank นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 7 (CLC Bio, QIAGEN, USA) เพื่อตรวจสอบการอนุรักษ์ไว้ของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยจะออกแบบฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ที่เริ่มจากโคดอนเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน (start codon) และรีเวิร์ดไพรเมอร์ที่ครอบคลุมถึงโคดอนหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (stop codon) ต่อมาตรวจสอบความเหมาะสมในการนำไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสจากการคำนวณค่าต่างๆ ได้แก่ Tm (Melting Temperature), %GC และ primer dimer โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc, USA) นำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยเติมส่วนประกอบในปฏิกิริยาดังนี้ จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. GA2(1) (100 นาโนกรัม) บัฟเฟอร์ (1X) dNTP (0.2 มิลลิโมลาร์) MgCl<sub>2</sub> (2 มิลลิโมลาร์) คู่ไพรเมอร์ *NcoI*-*man*-F2 และ *XhoI*-*man*-R2 (อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์) และ *TaKaRa Ex Taq*<sup>TM</sup> DNA polymerase (TaKaRa Bio, Japan) 5 ยูนิต ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำปราศจาก

ไอออน กำหนดสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันนี้คือ เริ่มต้นการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ 2 วัฏจักร โดยวัฏจักรที่ 1 จำนวน 5 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 45 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นตามด้วยวัฏจักรที่ 2 จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นทำ extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ต่อมานำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, USA) โดยนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาเติม PB buffer ในปริมาณ 1: 5 เท่า ผสมสารให้เข้ากันแล้วใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติมน้ำปราศจากไอออน 40 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติมน้ำปราศจากไอออน 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแมนนาเนส (pET28a-man)

#### การสกัดพลาสมิด pET28a

เลี้ยง *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pET28a ในอาหารเหลว LB (Luria-Bertani) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมกานามัยซิน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วสกัดพลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) โดยเติม P1 buffer 250 ไมโครลิตร P2 buffer 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 3-4 ครั้ง เติมน้ำ N3 buffer 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสที่ได้ใส่ในคอลัมน์ QiAprep Spin Miniprep ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมน้ำ PB buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมน้ำ PE buffer 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมน้ำปราศจากไอออนทั้งหมดที่ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ต่อมาย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน 30-50 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### การตัดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และ pET28a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I (Promega, USA) และ *Nco*I (Promega, USA) โดยปฏิกิริยาการตัดผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันประกอบด้วย D buffer (1X) BSA (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (30  $\mu$ l) *Xho*I (0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l) และ *Nco*I (0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l) ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน ส่วนปฏิกิริยาการตัด pET28a ประกอบด้วย D buffer (1X) BSA (4  $\mu$ g/ $\mu$ l) pET28a (125 ng/ $\mu$ l) *Xho*I (0.625  $\mu$ g/ $\mu$ l)

และ *NcoI* (0.625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ปรับปริมาณเป็น 40 ไมโครลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกตามขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ และตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการภายใต้แสงยูวี จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, USA) โดยนำเจลอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอมาเติม PB buffer 500 ไมโครลิตร ต่อ 0.3 กรัมของเจลอะกาโรส จากนั้นนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนเจลอะกาโรสละลายหมด ดูดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติม PE buffer 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง เติมน้ำปราศจากไอออน 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### **การเชื่อมต่อและการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$**

นำผลผลิตปฏิกิริยาจากลูกโซ่พอลิเมอเรสมาเชื่อมเข้ากับ pET28a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ T4 DNA ligase (Fermentas, Canada) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์จากการเชื่อมด้วยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่ผ่านการทำให้เป็นคอมพีเทนต์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ ต่อมาคัดเลือกโคโลนีเดียวที่ได้รับ pET28a บนอาหารแข็ง LB ที่เติมกานามัยซิน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนแมนนาเนสแทรกอยู่ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR) โดยเติมส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้ บัฟเฟอร์ (1X) dNTP (0.2 มิลลิโมลาร์)  $\text{MgCl}_2$  (2 มิลลิโมลาร์) ไพริเมอร์ *NcoI*-*man*-F2 และ *XhoI*-*man*-R2 (อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์) *Taq* DNA Polymerase (Vivantis, Malaysia) (1.5 ยูนิต) และ *E. coli* 1 โคโลนี ปรับปริมาณเป็น 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กำหนดสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้คือ เริ่มต้นการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเข้าสู่วัฏจักรจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที หลังจากนั้นทำ extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแมนนาเนส**

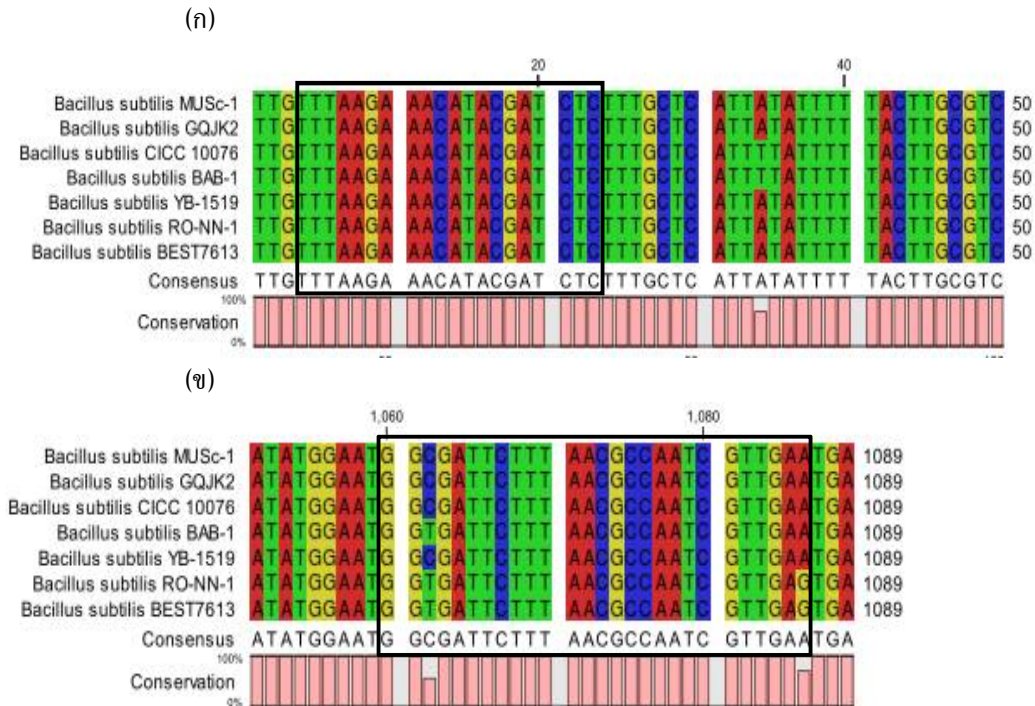
ส่งพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้คูไพรเมอร์โปรโมเตอร์ T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') และเทอมิเนเตอร์ T7 (5'-GCTAGT TATTGCTCAGCGG-3') ซึ่งคูไพรเมอร์นี้สามารถจับได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนพลาสมิด pET28a และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด ต่อมานำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn [7] จากนั้นแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม CLC sequence viewer 7 (CLC Bio,

QIAGEN, USA) แล้วนำมาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTp [8] เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่มีความใกล้เคียงกัน ต่อมานำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) กับลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* ชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยหลักการ Maximum Likelihood โดยใช้โปรแกรม Mega 7 [9] คำนวณมวลโมเลกุลและค่า pI (Isoelectric Point) ของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ProtParam [10] วิเคราะห์โครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม PROSITE [11] InterPro [12] และ SignalP 4.1 [13] เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 ด้วยโปรแกรม CLUSTAL OMEGA [14] และทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MINNOU [15]

## ผลการทดลอง

### การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนส

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ของ *Bacillus* sp. GA2(1) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า *Bacillus* sp. GA2(1) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ดังนั้นในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) จึงได้ออกแบบไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *B. subtilis* 7 สายพันธุ์ ซึ่งคัดเลือกมาจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *B. subtilis* BEST7613 (AP012495.1), *B. subtilis* BAB-1 (CP004405.1), *B. subtilis* RO-NN-1 (CP002906.1), *B. subtilis* XF-1 (CP004019.1), *B. subtilis* MUSc-1 (GU982918.1), *B. subtilis* CICC 10076 (GQ859464.1), *B. subtilis* YB-1519 (KT001238.1) และ *B. subtilis* GQJK2 (CP020367.1) ผลจากการเปรียบเทียบแสดงดังรูปที่ 1 โดยออกแบบฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์ดไพรเมอร์จากส่วนต้น (5') และส่วนปลาย (3') ของยีน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ครอบคลุมทั้งยีน ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *B. subtilis* จำนวน 7 สายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 7 (CLC Bio, QIAGEN, USA) โดยบริเวณกรอบสีดำคือ (ก) ส่วนต้นของยีน และ (ข) ส่วนปลายของยีน ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนส

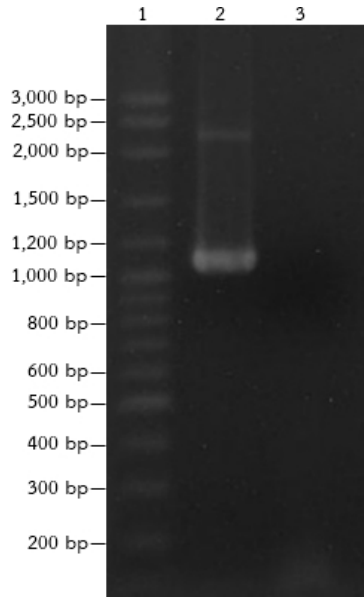
ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์	ขนาด	Tm (°C)	%CG
<i>NcoI-man-F2</i>	5'-CATGCCATGGCCTTTAAG AAACATACGATCTCTTTGCTC-3'	39	63.8	43.6
<i>XhoI-man-R2</i>	5'-CGGCTCGAGTTCAACGATTG GCGTTAAAGAATCGCC-3'	36	66.7	52.8

หมายเหตุ บริเวณ ATG ที่ขีดเส้นใต้ คือตำแหน่งโคดอนเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน

ในการเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะใช้จโนมิกดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. GA2(1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ (*NcoI-man-F2* และ *XhoI-man-R2*) ในการเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนส สำหรับการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ TaKaRa Ex Taq™ DNA



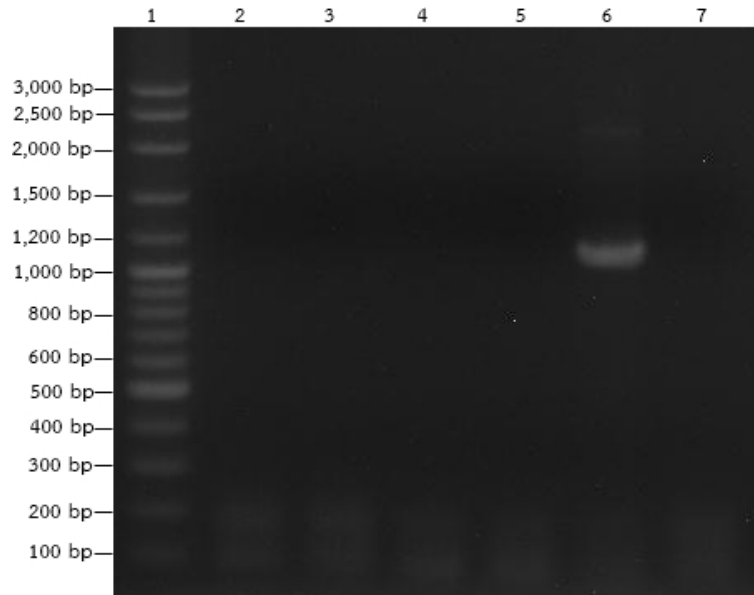
Polymerase (TaKaRa Bio, Japan) ซึ่งมีสมบัติ 3'→5' exonuclease ที่สามารถตรวจสอบและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดได้ ผลจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 2 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส จึงนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าสู่ pET28a ต่อไป



**รูปที่ 2** การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส; แถว 1: VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia); แถว 2: ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เติมจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. GA2(1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ; แถว 3: ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวควบคุมเชิงลบ)

### การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแมนนาเนส (pET28a-man)

นำพลาสมิด pET28a ที่สกัดได้จาก *E. coli* DH5 $\alpha$  (pET28a) และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xho*I จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกันด้วยดีเอ็นเอไลเกสเพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์จากการเชื่อมต่อเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนประกอบของกานามัยซิน โคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่จะมีสีน้ำเงิน ส่วนโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่จะมีสีขาวจากนั้นยืนยันการแทรกของชิ้นยีนอีกครั้งด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์ โดยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จะมีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3 พบว่าจากโคโลนีสีขาวที่สุ่มมา 5 โคโลนีมีเพียงโคโลนีที่ 5 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าโคโลนีที่ 5 นี้มีชิ้นดีเอ็นเอของยีนแมนนาเนสแทรกอยู่ในพลาสมิด ดังนั้นจึงนำโคโลนีที่ 5 ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหาร LB ที่ประกอบด้วยกานามัยซินแล้วสกัดพลาสมิด เพื่อนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดต่อไป



**รูปที่ 3** การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในเวกเตอร์; แถว 1: VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia); แถว 2-6: ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้โคลนนิ่ง 1-5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบตามลำดับ; แถว 7: ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวควบคุมเชิงลบ)

#### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนส

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) พบว่า ชิ้น ดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pET28a ถูกโคลนให้ติดอยู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดินที่ปลาย 3'-ไฮดรอกซิลของยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้มีความยาวเท่ากับ 1,089 คู่เบส เมื่อรวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดินจะมีความยาวเท่ากับ 1,116 คู่เบส เมื่อนำยีนแมนนาเนสที่ได้มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ออกแล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกันสูงสุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *B. subtilis* SRCM101392 (CP021921), *B. subtilis* WB800N (CP032310) และ *B. subtilis* NCIB 3610 (CP020102) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้จาก *Bacillus* sp. GA2(1) คือยีนแมนนาเนส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Clustal Omega ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งพบว่ายีนแมนนาเนสที่นำมาเปรียบเทียบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 13 ตำแหน่ง

```

SRCM101392      TTTGCTCATTATATTTTACTTGCCTCTACTGTTTTAGCAAACAATGAAGCGCATAC 60
GA2 (1)         TTTGCTCATTATATTTTACTTGCCTCTGCTGTTTTAGCAAACAATGAAGCGCATAC 60
WB800N         TTTGCTCATTATATTTTACTTGCCTCTGCTGTTTTAGCAAACAATGAAGCGCATAC 60
NCIB3610       TTTGCTCATTATATTTTACTTGCCTCTGCTGTTTTAGCAAACAATGAAGCGCATAC 60
*****

SRCM101392      TGTGTCCGCTGTGAATCCTAATGCCAGCAGACAACAAAAACAGTGATGAATGGCTTGC 120
GA2 (1)         TGTGTCCGCTGTGAATCCTAATGCCAGCAGACAACAAAAACAGTGATGAATGGCTTGC 120
WB800N         TGTGTCCGCTGTGAATCCTAATGCCAGCAGACAACAAAAACAGTGATGAATGGCTTGC 120
NCIB3610       TGTGTCCGCTGTGAATCCTAATGCCAGCAGACAACAAAAACAGTGATGAATGGCTTGC 120
*****

SRCM101392      GCACCTGCCGAACCGAACGGAAAAACAGATCCTTTCCGAGCGCTTCGGAGTTACAGCCA 180
GA2 (1)         GCACCTGCCGAACCGAACGGAAAAACAGATCCTTTCCGAGCGCTTCGGAGTTACAGCCA 180
WB800N         GCACCTGCCGAACCGAACGGAAAAACAGATCCTTTCCGAGCGCTTCGGAGTTACAGCCA 180
NCIB3610       GCACCTGCCGAACCGAACGGAAAAACAGATCCTTTCCGAGCGCTTCGGAGTTACAGCCA 180
*****

SRCM101392      TGACACATTTTCTATGGCTGAGGCTGATAGAATCCGAAGCGCCACCGGCAATCGCCTGC 240
GA2 (1)         TGACACATTTTCTATGGCTGAGGCTGATAGAATCCGAAGCGCCACCGGCAATCGCCTGC 240
WB800N         TGACACATTTTCTATGGCTGAGGCTGATAGAATCCGAAGCGCCACCGGCAATCGCCTGC 240
NCIB3610       TGACACATTTTCTATGGCTGAGGCTGATAGAATCCGAAGCGCCACCGGCAATCGCCTGC 240
*****

SRCM101392      TATTTATGGCTGCGATTATGCCAGAGGATGGCTTGAACAGCAAAATTTGAAGATTCAT 300
GA2 (1)         TATTTATGGCTGCGATTATGCCAGAGGATGGCTTGAACAGCAAAATTTGAAGATTCAT 300
WB800N         TATTTATGGCTGCGATTATGCCAGAGGATGGCTTGAACAGCAAAATTTGAAGATTCAT 300
NCIB3610       TATTTATGGCTGCGATTATGCCAGAGGATGGCTTGAACAGCAAAATTTGAAGATTCAT 300
*****

SRCM101392      AGATGTAAGCTGCAACGGCGATTAAATGTCGATTGGAAAAATGGCGGAATTCGCAAA 360
GA2 (1)         AGATGTAAGCTGCAACGGCGATTAAATGTCGATTGGAAAAATGGCGGAATTCGCAAA 360
WB800N         AGATGTAAGCTGCAACGGCGATTAAATGTCGATTGGAAAAATGGCGGAATTCGCAAA 360
NCIB3610       AGATGTAAGCTGCAACGGCGATTAAATGTCGATTGGAAAAATGGCGGAATTCGCAAA 360
*****

SRCM101392      CAGTTTGCACCTGGCGAACCTGCTTTTTCAGTCAGGGCATTTTAAACACCGATTACAAA 420
GA2 (1)         CAGTTTGCACCTGGCGAACCTGCTTTTTCAGTCAGGGCATTTTAAACACCGATTACAAA 420
WB800N         CAGTTTGCACCTGGCGAACCTGCTTTTTCAGTCAGGGCATTTTAAACACCGATTACAAA 420
NCIB3610       CAGTTTGCACCTGGCGAACCTGCTTTTTCAGTCAGGGCATTTTAAACACCGATTACAAA 420
*****

SRCM101392      TGATCAGTATAAAAAAATACTAGATCTTCAACAGTAGAAGGAAGCGGCTAAATGCCAT 480
GA2 (1)         TGATCAGTATAAAAAAATACTAGATCTTCAACAGTAGAAGGAAGCGGCTAAATGCCAT 480
WB800N         TGATCAGTATAAAAAAATACTAGATCTTCAACAGTAGAAGGAAGCGGCTAAATGCCAT 480
NCIB3610       TGATCAGTATAAAAAAATACTAGATCTTCAACAGTAGAAGGAAGCGGCTAAATGCCAT 480
*****

SRCM101392      GCTCAGCAAAATGCTGACGGACTTCAAGAGTTGGAGAACCAAGGTGTGCTGTCTGTT 540
GA2 (1)         GCTCAGCAAAATGCTGACGGACTTCAAGAGTTGGAGAACCAAGGTGTGCTGTCTGTT 540
WB800N         GCTCAGCAAAATGCTGACGGACTTCAAGAGTTGGAGAACCAAGGTGTGCTGTCTGTT 540
NCIB3610       GCTCAGCAAAATGCTGACGGACTTCAAGAGTTGGAGAACCAAGGTGTGCTGTCTGTT 540
*****

SRCM101392      CAGGCCGCTTGCATGAAATGAACGGCGAATGGTTTTGGTGGGACTCACATCATAPAA 600
GA2 (1)         CAGGCCGCTTGCATGAAATGAACGGCGAATGGTTTTGGTGGGACTCACATCATAPAA 600
WB800N         CAGGCCGCTTGCATGAAATGAACGGCGAATGGTTTTGGTGGGACTCACATCATAPAA 600
NCIB3610       CAGGCCGCTTGCATGAAATGAACGGCGAATGGTTTTGGTGGGACTCACATCATAPAA 600
*****

SRCM101392      AAAGGATAATGAAAGAATCTCTATATAAACAGCTCTACAAGAAAATCTATCATTAT 660
GA2 (1)         AAAGGATAATGAAAGAATCTCTATATAAACAGCTCTACAAGAAAATCTATCATTAT 660
WB800N         AAAGGATAATGAAAGAATCTCTATATAAACAGCTCTACAAGAAAATCTATCATTAT 660
NCIB3610       AAAGGATAATGAAAGAATCTCTATATAAACAGCTCTACAAGAAAATCTATCATTAT 660
*****

SRCM101392      GACCGACACAAGAGGACTTGATCATTGATTTGGTTTTACTCTCCCGACGCCAACCGAGA 720
GA2 (1)         GACCGACACAAGAGGACTTGATCATTGATTTGGTTTTACTCTCCCGACGCCAACCGAGA 720
WB800N         GACCGACACAAGAGGACTTGATCATTGATTTGGTTTTACTCTCCCGACGCCAACCGAGA 720
NCIB3610       GACCGACACAAGAGGACTTGATCATTGATTTGGTTTTACTCTCCCGACGCCAACCGAGA 720
*****

SRCM101392      TTTTAAACTGATTTTACCAGGCGCTTACGTGGATTTGTCGGATTAGATGCCTA 780
GA2 (1)         TTTTAAACTGATTTTACCAGGCGCTTACGTGGATTTGTCGGATTAGATGCCTA 780
WB800N         TTTTAAACTGATTTTACCAGGCGCTTACGTGGATTTGTCGGATTAGATGCCTA 780
NCIB3610       TTTTAAACTGATTTTACCAGGCGCTTACGTGGATTTGTCGGATTAGATGCCTA 780
*****

SRCM101392      TTTTCAAGATGCCTACTCGATCAATGGATACGATCAGCTAACAGCGCTTAATAAACCTTT 840
GA2 (1)         TTTTCAAGATGCCTACTCGATCAATGGATACGATCAGCTAACAGCGCTTAATAAACCTTT 840
WB800N         TTTTCAAGATGCCTACTCGATCAATGGATACGATCAGCTAACAGCGCTTAATAAACCTTT 840
NCIB3610       TTTTCAAGATGCCTACTCGATCAATGGATACGATCAGCTAACAGCGCTTAATAAACCTTT 840
*****

SRCM101392      TGCTTTTACAGAAGTCGGCCCGCAACAGCAATCGGCAGCTTTGATTACAGCTATTTAT 900
GA2 (1)         TGCTTTTACAGAAGTCGGCCCGCAACAGCAATCGGCAGCTTTGATTACAGCTATTTAT 900
WB800N         TGCTTTTACAGAAGTCGGCCCGCAACAGCAATCGGCAGCTTTGATTACAGCTATTTAT 900
NCIB3610       TGCTTTTACAGAAGTCGGCCCGCAACAGCAATCGGCAGCTTTGATTACAGCTATTTAT 900
*****

SRCM101392      CAATGCAATAAAACAAAGATATCCTAAAACATTTACTTTCTGGCATGGAATGATGAATG 960
GA2 (1)         CAATGCAATAAAACAAAGATATCCTAAAACATTTACTTTCTGGCATGGAATGATGAATG 960
WB800N         CAATGCAATAAAACAAAGATATCCTAAAACATTTACTTTCTGGCATGGAATGATGAATG 960
NCIB3610       CAATGCAATAAAACAAAGATATCCTAAAACATTTACTTTCTGGCATGGAATGATGAATG 960
*****

SRCM101392      GAGCCAGCTGTAACAAGGGGCTTCAGCTTTATATCATGACAGCTGGACACTCAATAA 1020
GA2 (1)         GAGCCAGCTGTAACAAGGGGCTTCAGCTTTATATCATGACAGCTGGACACTCAATAA 1020
WB800N         GAGCCAGCTGTAACAAGGGGCTTCAGCTTTATATCATGACAGCTGGACACTCAATAA 1020
NCIB3610       GAGCCAGCTGTAACAAGGGGCTTCAGCTTTATATCATGACAGCTGGACACTCAATAA 1020
*****

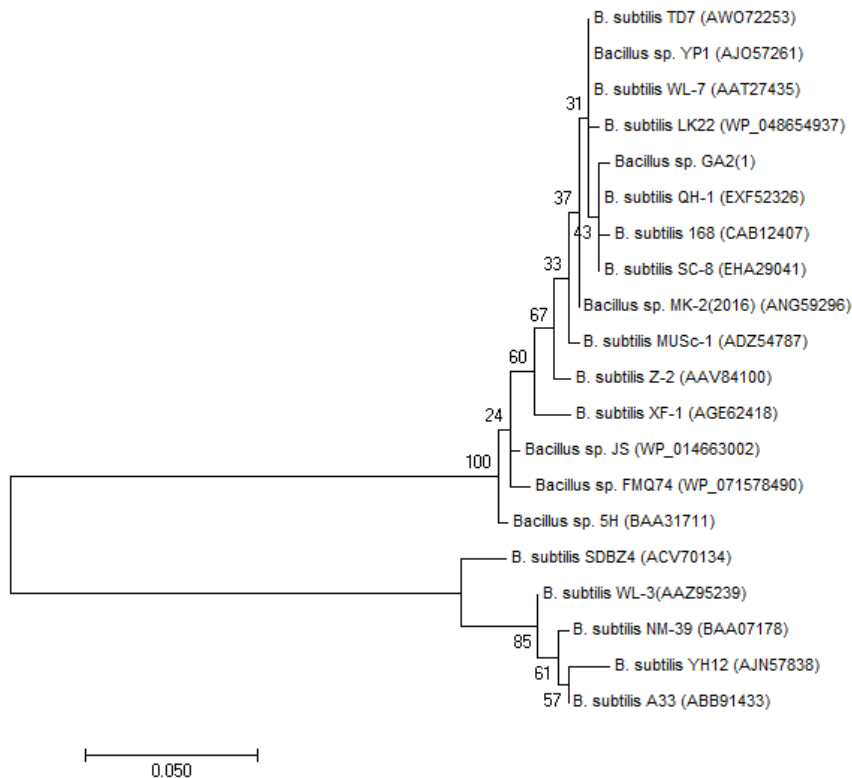
SRCM101392      GGGAGAAATATGGAAT      1036
GA2 (1)         GGGAGAAATATGGAAT      1036
WB800N         GGGAGAAATATGGAAT      1036
NCIB3610       GGGAGAAATATGGAAT      1036
*****

```

**รูปที่ 4** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1), *B. subtilis* SRCM101392, *B. subtilis* NCIB 3610 และ *B. subtilis* WB800N ด้วยโปรแกรม Clustal Omega โดยตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ออก โดย '\*' หมายถึง นิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และ ช่องว่างหมายถึง นิวคลีโอไทด์ต่างชนิดกัน

### การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนส

เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) มีความยาว 363 กรดอะมิโน เมื่อรวมกับแท็กฮิสทีดีนจะมีความยาวเท่ากับ 371 กรดอะมิโน เมื่อตัดลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ออกแล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุดกับลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *B. subtilis* SC-8 (EHA29041), *B. subtilis* QH-1 (EXF52326), *Bacillus* sp. YP1 (CP010014), *B. subtilis* TD7 (AWO72253), *B. subtilis* 168 (CAB12407) และ *Bacillus* sp. MK-2(2016) (ANG59296) เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังแผนภูมิความสัมพันธ์ รูปที่ 5 จากการนำลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสมาคำนวณค่า pI และมวลโมเลกุลด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่า แมนนาเนสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 41.02 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.80 เมื่อรวมแท็กฮิสทีดีนจะมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 42.08 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.04 จากการวิเคราะห์โครงสร้างของแมนนาเนสด้วยโปรแกรม PROSITE และ InterPro พบว่าบริเวณลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 39-350 คือ โดเมน GH26 (glycosyl hydrolases family 26) ซึ่งมีสมบัติเป็น mannan endo-1,4-beta-mannosidase สามารถไฮโดรไลซ์(1→4)-beta-D-mannosidic linkages ในแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนได้ โดยภายในโดเมนดังกล่าวมีกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งที่ทำหน้าที่เป็น active site ของเอนไซม์ ได้แก่กรดอะมิโนกลูตาเมตตำแหน่งที่ 194 ซึ่งทำหน้าที่เป็น proton donor และกรดอะมิโนกลูตาเมตตำแหน่งที่ 293 ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม SignalP 4.1 พบว่าลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-22 คือ บริเวณเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณในการหลั่งแมนนาเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ และคาดว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณนี้จะถูกตัดต่อระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 22 และ 23 หลังจากทำหน้าที่ในการขนส่งเอนไซม์เสร็จสิ้น

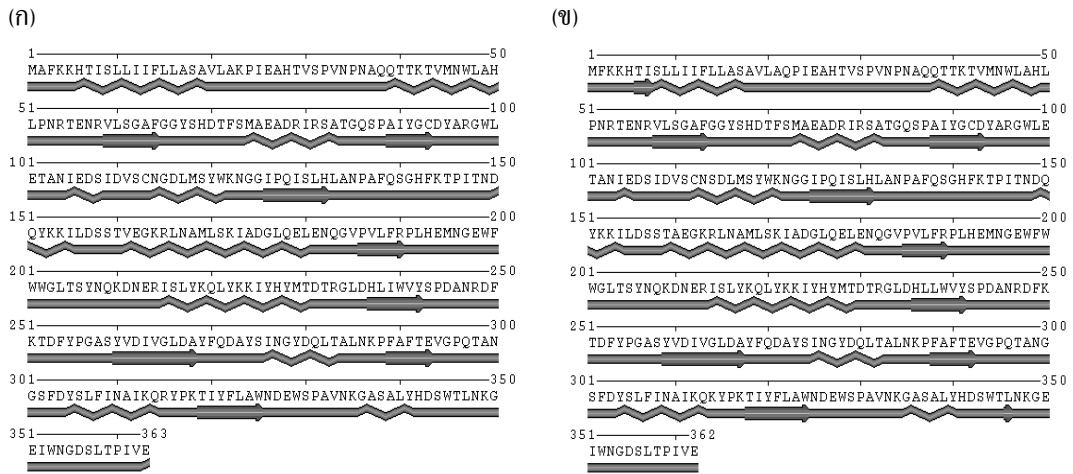


**รูปที่ 5** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการซึ่งวิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสด้วยวิธี Maximum Likelihood และกำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ โดยใช้โปรแกรม MEGA 7

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTp โดยรวมกรดอะมิโนบริเวณไพรเมอร์ด้วย พบว่ามีความเหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 อยู่ 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) กับ *B. subtilis* MUSc-1 ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 6 พบว่าแมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์มีกรดอะมิโนแตกต่างกันทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2, 23, 115, 161, 239 และ 315 โดยใน *Bacillus* sp. GA2(1) เป็นกรดอะมิโนอะลานีน โลซีน ไกลซีน วาลีน ไอโซลิวซีน และอาร์จินีนตามลำดับ ส่วนใน *B. subtilis* MUSc-1 เป็น Gap กลูตามีน เซอรีน อะลานีน ลิวซีน และ โลซีน ตามลำดับ จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) และ *B. subtilis* MUSc-1 ด้วยโปรแกรม MINNOU ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 7 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน โดยโครงสร้างทุติยภูมิของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) ประกอบด้วย Random coil 52.89 เปอร์เซ็นต์ beta-strand หรือ beta-bridge 13.77 เปอร์เซ็นต์ และ alpha helix 33.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 ประกอบด้วย Random coil 53.31 เปอร์เซ็นต์ Beta-strand หรือ Beta-bridge 14.64 เปอร์เซ็นต์ และ Alpha helix 32.04 เปอร์เซ็นต์

	2	23
GA2 (1)	MAFKKHTISLLII FLLASAVLAKPI EAHTVSPVNPNAQQTTKTVMNWLAHLPNRTEENRVL	
MUSc-1	M-FKKHTISLLII FLLASAVLAQPI EAHTVSPVNPNAQQTTKTVMNWLAHLPNRTEENRVL	
	* ****;*****	
	115	
GA2 (1)	SGAFGGYSHDTFSMAEADRIRSATGQSPAIYGCDYARGWLETANI EDSIDVSCNGLMSY	
MUSc-1	SGAFGGYSHDTFSMAEADRIRSATGQSPAIYGCDYARGWLETANI EDSIDVSCNGLMSY	
	*****	
	161	
GA2 (1)	WKNNGI PQISLHLANPAFQSGHFKTPITNDQYKKILDSSTVEGKRLNMLSK IADGLQEL	
MUSc-1	WKNNGI PQISLHLANPAFQSGHFKTPITNDQYKKILDSSTAEKGKRLNMLSK IADGLQEL	
	*****	
	239	
GA2 (1)	ENQGVVPLFRPLHEMNGEWFVWGLTSYNQKDNERISLYKQLYKKIYHYMTDTRGLDHLIW	
MUSc-1	ENQGVVPLFRPLHEMNGEWFVWGLTSYNQKDNERISLYKQLYKKIYHYMTDTRGLDHLIW	
	*****	
	315	
GA2 (1)	GSFDYSLFINAIKQRYPKTIYFLAWNDEWSPAVNKGASALYHDSWTLNKG EIWNGLSLTP	
MUSc-1	GSFDYSLFINAIKQRYPKTIYFLAWNDEWSPAVNKGASALYHDSWTLNKG EIWNGLSLTP	
	*****	
GA2 (1)	IVE	
MUSc-1	IVE	
	***	

**รูปที่ 6** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) และ *B. subtilis* MUSc-1 ด้วยโปรแกรม Clustal Omega โดย “\*” หมายถึง กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์, “:” หมายถึง กรดอะมิโนต่างชนิดกันแต่มีสมบัติที่คล้ายคลึงกันมาก และ “.” หมายถึง กรดอะมิโนต่างชนิดกันแต่มีสมบัติที่คล้ายคลึงกันเล็กน้อย และ ช่องว่างหมายถึงกรดอะมิโนต่างชนิดซึ่งมีสมบัติแตกต่างกัน



**รูปที่ 7** การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของแมนนาเนสจาก (ก) *Bacillus* sp. GA2(1) และ (ข) *B. subtilis* MUSc-1 ด้วยโปรแกรม MINNOU โดย แสดง Random coil แสดง Beta-strand หรือ Beta-bridge และ แสดง Alpha helix

## สรุปและวิจารณ์ผลการลอง

งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) เข้าสู่ pET28a โดยปลาย 3' ของยีนแมนนาเนสเชื่อมอยู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดิน ซึ่งแท็กฮิสทีดินนี้จะเป็นประโยชน์ในการทำรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟิไนตีโครมาโทกราฟีในอนาคต จากนั้นส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนส และพบว่ายีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) มีขนาด 1089 คู่เบส จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันได้แก่ *B. subtilis* SRCM101392 (CP021921), *B. subtilis* WB800N (CP032310) และ *B. subtilis* NCIB 3610 (CP020102) พบว่ายีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาเปรียบเทียบทั้งหมด 13 ตำแหน่ง เมื่อพิจารณาที่ระดับโปรตีนพบว่าแมนนาเนสชนิดนี้มีขนาด 363 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศพบว่าแมนนาเนสนี้จัดอยู่ในสกุล GH26 เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถไฮโดรไลซ์ (1→4)-beta-D-mannosidic linkages ที่พบในแมนแนนได้ และคาดการณ์ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 41.02 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.80 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์แมนนาเนสส่วนใหญ่จาก *Bacillus* เช่น *B. subtilis* MUSc-1 (ADZ54787) [16], *B. subtilis* Z-2 (ABB91433) [17], *B. subtilis* WL-3 (AAZ95239) [18] ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40.92, 40.95 และ 40.27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และมีค่า pI เท่ากับ 5.68, 5.80 และ 5.36 ตามลำดับ และใกล้เคียงกับแมนนาเนสในราบางชนิด เช่น *Aspergillus aculeatus* (AAA67426) [19] ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 41.08 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 4.88 เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีแมนนาเนสจากแบคทีเรียและราหลายชนิดที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า *Bacillus* sp. GA2(1) เช่น *B. stearothermophilus* CH-4 [20] และ *A. niger* BK01 [21] ซึ่งมีมวลโมเลกุล 74 และ 53 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแมนนาเนสกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) มีความเหมือนกันกับแมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 อยู่ 98 เปอร์เซ็นต์ จากลำดับกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์สูงนี้อาจส่งผลให้แมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) มีสมบัติที่คล้ายคลึงกับแมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 แต่อย่างไรก็ตามแมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ยังมีกรดอะมิโนต่างชนิดกันอยู่บางตำแหน่งซึ่งส่งผลต่อความต่างกันเล็กน้อยของโครงสร้างระดับทุติยภูมิ และหากบริเวณที่ต่างกันนั้นมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ ก็อาจทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีจุดเด่นที่ต่างกัน มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าแมนนาเนสจาก *B. subtilis* MUSc-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง มีความชอบน้ำ (hydrophilic) สูง สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 5-11.5 ที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที จึงเหมาะกับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ และยังมีการงานว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสที่ได้จากการโคลนยีนและผลิตเอนไซม์ใน *E. coli* มีปริมาณมากกว่าแมนนาเนสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MUSc-1 ถึง 33 เท่า [16] ซึ่งหากแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) ที่กำลังจะนำไปผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* นี้ มีสมบัติที่โดดเด่น หรือมีความเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภทก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน (เลขที่สัญญา12/2560) ตามปีงบประมาณ 2560 และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

## เอกสารอ้างอิง

1. Stoll, D., Stalbrand, H., & Warren, R. A. J. (1999). Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Applied Environmental Microbiology*, *65*, 2598-2605.
2. Cann, I. K., Kocherginskaya, S., King, M. R., White, B. A., & Mackie, R. I. (1999). Molecular cloning, sequencing and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. *Journal of Bacteriology*, *181*, 1643-1651.
3. Chantorn, S., & Piyapittayanun, C. (2012). Production and application of microbial mannanases. *Thai Journal of Science and Technology*, *20*(4), 365-377. (in Thai)
4. McCleary, B. V. (1979). Modes of action of  $\beta$ -mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans. *Phytochemistry*, *18*, 757-763.
5. Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial Mannanases: An Overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *27*, 197-216.
6. Chantorn, S., Natrchalayuth, S., Phannachet, K., & Apiraksakorn, J. (2015). Identification of suitable condition for mannanase production by *Bacillus* sp.GA2(1). *British Biotechnology Journal*, *5*(2), 92-97.
7. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*, 403-410.
8. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*, 3389-3402.
9. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870-1874.
10. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker, J. M. (Ed.) *The proteomics protocols handbook*, p. 571-607.
11. De Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., & Hulo, N. (2006). ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, *34*, W362-W365.



12. Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., Finn, R. D. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*, *34*, D213-D221.
13. Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with SignalP. In: Kihara, D. (Ed) Protein function prediction. *Methods in Molecular Biology*, *1611*, 59-73.
14. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D. G., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., Higgins, D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega. *Molecular Systems Biology*, *539*, 1-6.
15. Cao, B., Porollo, A., Adamczak, R., Jarrell, M., & Meller, J. (2006). Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics*, *22*, 303-9. Supplementary materials.
16. Summpunn, P., Chaijan, S., Isarangkul, D., Wiyakrutta, S., & Meevootisom, V. (2010). Characterization, gene cloning, and heterologous expression of  $\beta$ -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology*, *49*(1), 86-93.
17. Zhang, Q., Yan, X., Zhang, L., & Tang, W. (2006). Cloning, Sequence analysis, and heterologous expression of a  $\beta$ -mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. *Molekuliarnaia Biologiia*, *40*(3), 418-24.
18. Yoon, K.H., Chung, S., & Lim, B.L. (2008). Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, *46*(3), 344-349.
19. Christgau, S., Kauppinen, S., Vind, J., Kofod, L.V., & Dalbøge, H. (1994). Expression cloning, purification and characterization of a beta-1,4-Mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *33*(5), 917-925.
20. Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (1994). Purification and characterization of thermostable Beta-N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothersophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(8), 2911-2915.
21. Do, B. C., Dang, T. T., Berrin, J. G., Haltrich, D., To, K. A., Sigoillot, J. C., & Yamabha, M. (2009). Cloning, expression in *Pichia pastoris* and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microbial Cell Factories*, *8*, 59.