

การโคลนและศึกษาลักษณะยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2



นางสาวสุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2209-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND CHARACTERIZATION OF DEXTRANASE GENE  
FROM *Arthrobacter* sp. AG-2



Miss Suttirak Tangjitpinitkarn

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2209-5



สุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ : การโคลนและศึกษาลักษณะยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2. (CLONING AND CHARACTERIZATION OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. AG-2. อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน; 95 หน้า. ISBN 974-17-2209-5.

ได้แยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ใช้ *E. coli* DH5 $\alpha$  เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยทำ Southern hybridization เพื่อติดตามยีนเดกซ์แทรนเนส และคัดเลือกโคลนโดยทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe ที่ได้จาก ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ DEXFWD2 และ DEXREV ที่ออกแบบจากบริเวณ อนุรักษ์ของยีนที่ประมวลรหัสสร้างเดกซ์แทรนเนสสามชนิด โคลนขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI ขนาด 1,977 คู่เบส โดยใช้ pGEM-7Zf(+) เป็นดีเอ็นเอพาหะ ระบุเป็น pSUDEX1 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือน ของ SUDEX1 พบว่ามีบางส่วนของปลาย 5' ของยีน *sdx* สร้างดีเอ็นเอติดตาม PB-probe จากขึ้น ดีเอ็นเอ *Pst*I-*Bam*HI ทางปลาย 3' ของ SUDEX1 ได้โคลนขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX2 ที่เป็นส่วนปลาย 3' ของยีน *sdx* จากการเปรียบเทียบความเหมือนไม่พบรหัสหยุด จึงสร้างดีเอ็นเอติดตาม BP-probe จากขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Pst*I ทางปลาย 3' ของขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX2 เพื่อใช้ติดตามขึ้นดีเอ็นเอส่วน ที่เหลือของยีน *sdx* โคลนขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 ได้ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอ ทั้งหมดที่โคลนได้พบกรอบอ่านรหัสเปิดของยีน *sdx* มีขนาด 1,899 คู่เบส ที่ประมวลรหัสสร้าง โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาด 633 หมู่ ขนาดประมาณ 70.3 กิโลดัลตัน และพบบริเวณจับ เกาะของโรโบโซมและ inverted repeat เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SDX พบว่ามีความ เหมือนกับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044, เดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 และไฮโซมอลโทโทรโอเดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 83%, 82% และ 79% ตามลำดับ และได้โคลนขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 เข้าสู่ พลาสมิด pSUDEX1 เพื่อเชื่อมต่อยีน *sdx* ให้สมบูรณ์

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4272435523 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

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

SUTTIRAK TANGJITPINITKARN : CLONING AND CHARACTERIZATION OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. AG-2. THESIS ADVISOR : Dr. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP THANEEYAWAN, Ph.D., 95 pp. ISBN 974-17-2209-5.

The gene encoding dextranase was isolated from the genomic DNA of *Arthrobacter* sp. AG-2 by using *E. coli* DH5 $\alpha$  as host. DEX-probe amplified by DEXFWD2 and DEXREV primers, designed from conserved regions of 3 dextranases, was labeled with DIG and used for detection of dextranase gene by Southern and Dot blot hybridization. The 1.9 base pairs *Bam*HI fragments was cloned into pGEM-7Zf(+) designated as pSUDEX1 and contained 5' portion of dextranase gene as indicated by homology comparison. To isolated 3' end of *sdx*, the *Pst*I-*Bam*HI fragment (PB-probe) obtained from 3' end of SUDEX1 was used as probe to clone 3' portion of gene designated as SUDEX2. SUDEX2 fragments lacked stop codon and downstream element. Similarly, BP-probe obtained from 3' end of SUDEX2 was used as probe to clone the remaining portion of the gene (SUDEX3). The complete dextranase gene contained 1,899 base pairs and encoded a protein of 633 amino acids with expected molecular weight of 70.3 kDa. A putative ribosome binding site and inverted repeat were also found. The amino acid sequence identity compared with endodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044, dextranase from *Arthrobacter* sp. CB-8 and isomalto-triodextranase from *Brevibacterium fusum* var. *dextranlyticum* were 83%, 82% and 79% respectively. The deduced amino acid sequences contained 7 conserved regions among endodextranase, isomalto-triodextranase and isopullulanase. Finally, SUDEX3 was cloned into pSUDEX1 in order to construct complete gene.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....

Field of study.....Industrial Microbiology.....Advisor's signature.....

Academic year...2002.....Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของอาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ และความปรารถนาดี แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุหทัยา จิระนนทิพร ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจ

ขอขอบคุณ คุณทิพวรรณ ล้อรัตนไชยรงค์ สำหรับความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่อบรมสั่งสอนและสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
4. ผลการทดลอง.....	34
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	52
รายการอ้างอิง.....	57
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	66
ภาคผนวก ค.....	74
ภาคผนวก ง.....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	95

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	6
3.1	22
3.2	23
3.3	24



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเกาะของแบคทีเรียกับฟืนโดยมีแคลเซียมเป็นสะพาน (จินตกร คู่วัฒนสุชาติ, 2542).....7	
2.2 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (จินตกร คู่วัฒนสุชาติ, 2542).....8	
2.3 เมแทบอลิซึมการเปลี่ยนแป้งและน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกโดยเชื้อ Streptococci (จินตกร คู่วัฒนสุชาติ, 2542).....9	
4.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส.....35	
4.2 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย DEX-probe.....37	
4.3 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ <i>Bam</i> HI ด้วย DEX-probe.....39	
4.4 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย PB-probe.....40	
4.5 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก <i>Pst</i> I จาก <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วย PB-probe.....41	
4.6 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย BP-probe.....42	
4.7 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ <i>Bam</i> HI จาก <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วย BP-probe.....43	
4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pSUDEX1, pSUDEX2 และ pSUDEX3.....48	
4.9 แสดงแผนที่เรสทริกชันของขึ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่โคลนได้ (SUDEX1 เชื่อมกับ SUDEX3) ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+) .....49	

## สารบัญญรูป (ต่อ)

- 4.10 ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D22 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริก  
ชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ.....50
- 4.11 ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pSUDEX ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิด  
ต่างๆ.....51



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคติดเชื้อหรือโรคฟันที่มีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ มักพบในชุมชนของประเทศที่มีการพัฒนาทางอุตสาหกรรม เป็นโรคที่ก่อให้เกิดการเจ็บปวดและยังทำลายเนื้อเยื่อส่วนที่แข็งของฟันซึ่งประกอบด้วยผิวเคลือบฟัน เนื้อฟัน และเคลือบรากฟัน สามารถนำไปสู่การติดเชื้อของประสาทฟันได้ การติดเชื้อจากส่วนนี้สามารถกระจายทั่วร่างกายและอาจถึงแก่ชีวิตได้ รวมทั้งการรักษาโรคก่อให้เกิดการสูญเสียเวลาในการทำงานและทำให้สิ้นเปลืองเงินจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางป้องกันโรคฟันผุจึงเป็นเรื่องจำเป็นอย่างยิ่ง

โรคฟันผุเกิดจากสาเหตุที่สำคัญสองประการ ได้แก่ จุลินทรีย์ในช่องปากสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส และเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโปรพิโอนิก เป็นต้น ซึ่งจะละลายแคลเซียมฟอสเฟตของผิวเคลือบฟันจนเกิดฟันผุขึ้น (demineralization) (Melville และ Russell, 1981; Thystrup และ Fejerkov, 1986) และอีกสาเหตุคือ พฤติกรรมการบริโภคอาหาร (Noltel, 1973; Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988) ได้แก่ ความถี่ในการรับประทานอาหารและชนิดของอาหาร เป็นต้น

แบคทีเรียในช่องปากมีหลายชนิดทั้งที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) และไม่ต้องการออกซิเจน (anarobes) แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) สไปโรชีต (spirochete) ฟิวซิฟอร์มแบซิลไล (fusiform bacilli) แอคติโนมัยซิส (actinomyces) อรราชเนียบ (arachnia) ยูแบคทีเรีย (eubacteria) แลคโตแบซิลไล (lactobacilli) และสเตรปโตคอคโค (streptococci) โดยสองชนิดหลังนี้มีบทบาทที่สำคัญต่อการก่อให้เกิดโรคฟันผุเพราะสามารถผลิตกรดได้ในระดับสูงและสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการก่อโรคฟันผุ (Burnett และ Scherp, 1962; Melville และ Russell, 1981)

แบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตคอคโคที่อาศัยในช่องปาก เช่น *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus* เป็นต้น (Curtiss, 1985; Freedman และ Guggenheim, 1983; Hamada และ Slade, 1980) สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทกัลลูแคนที่ประกอบด้วยกัลลูโคสเป็นหน่วยย่อย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ละลายน้ำ (เดกซ์แทรน) ซึ่งประกอบด้วยกัลลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 เป็นส่วนใหญ่ และกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ (มิวแทน) ประกอบด้วยกัลลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,3 เป็นส่วนใหญ่ (Ceska และคณะ 1972; Guggenheim,

1970) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะยึดเกาะกับผิวฟันและสร้างเดกซ์แทรนซูโครส หรือ กลูโคซิลทรานสเฟอไรส (GTF) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชันส่วนกลูโคสของซูโครสไปเป็นเดกซ์แทรนและปล่อยฟรักโทสอิสระออกมา (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986)

เดกซ์แทรนเป็นฮอโมพอลิเมอร์ของกลูโคสที่มีหน่วยย่อยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกและมีสายที่แตกแขนงออกจากสายหลักด้วยแอลฟา-1,3-ไกลโคซิดิก เดกซ์แทรนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีสมบัติละลายน้ำได้ยากและมีลักษณะเหนียวเหนียวช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนได้และเชื้อชนิดอื่นๆ ยึดเกาะกับผิวฟันแบบติดแน่น (adherence) จึงทำให้จุลินทรีย์ไม่ถูกกำจัดออกจากช่องปากได้ง่ายแม้จะยึดเกาะกับพื้นผิวส่วนที่ไม่มีสิ่งปกคลุม และเดกซ์แทรนยังจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารในช่องปากเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ (plaques) ซึ่งก่อให้เกิดโรคฟันผุในที่สุด (Guggenheim, 1970)

วิธีป้องกันฟันผุมีหลักการคือ การเพิ่มความต้านทานให้กับฟัน การป้องกันการเกิดกรดในคราบฟันและการควบคุมจุลินทรีย์ในคราบฟัน โดยวิธีป้องกันฟันผุได้แก่ การเคลือบร่องฟัน การใช้สารฟลูออไรด์ การใช้น้ำตาลเทียม การใช้ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ และการใช้วัคซีนป้องกันฟันผุ แต่วิธีการเหล่านี้มักเกิดผลเสียข้างเคียงต่อร่างกายและใช้ค่าใช้จ่ายสูง จากการศึกษาและมีความเข้าใจกระบวนการเกาะติดของจุลินทรีย์ที่มีต่อผิวฟันมากขึ้นและพบว่าวิธีป้องกันฟันผุที่ได้ผลดีที่สุดคือการทำให้พื้นผิวฟันไม่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย จึงเริ่มนำเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ในช่องปากซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดฟันผุมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งโรคฟันผุโดยการวิจัยทดลองกับสัตว์ทดลองและคน โดยมีการนำเดกซ์แทรนเนสมาผสมในน้ำดื่ม ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากและหมากฝรั่ง พบว่าสามารถลดอุบัติการณ์ของฟันผุได้ (Fitzgerald และคณะ, 1968; Block และคณะ, 1969)

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ที่เชื่อมหน่วยย่อยของกลูแคนในสายเดกซ์แทรนที่มีชื่อเรียกตามระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ว่า  $\alpha$ -1,6-glucan-6-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.11 พบในจุลินทรีย์หลายกลุ่ม เช่น รา และแบคทีเรีย เป็นต้น (Bailey และ Clarke, 1959; Richards และ Streamer, 1974) แต่จากการศึกษาพบว่าราสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้สูงมากเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ แต่ราส่วนใหญ่มักสร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในสภาวะที่มีการสร้างเดกซ์แทรนเนส ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการแพ้ ดังนั้น เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียจึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ลดการเกิดคราบฟันและฟันผุมากที่สุด และจากการศึกษาผลข้างเคียงจากการใช้เดกซ์แทรนเนสพบว่าไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อเยื่อเมือในช่องปากและลิ้นแต่อย่างใด (Leach, 1969)

ในปัจจุบันได้มีการแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์แล้ว ทั้งจากแบคทีเรีย ราและยีสต์ (Aoki และ Sanoko, 1977) ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ จุลินทรีย์ให้สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับสูงและลดต้นทุนในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เพื่อนำมาใช้งานในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและเปรียบเทียบความเหมือนในระดับยีนและโปรตีนกับเดกซ์แทรนเนสหลายชนิดจะช่วยให้ทราบกลไกการย่อยสลายเดกซ์แทรนของจุลินทรีย์ตัวนั้นๆ ได้ว่าเป็นชนิดย่อยสายเดกซ์แทรนจากด้านปลาย (exodextranase) หรือภายใน (endodextranase)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งแยกได้จากแหล่งดินในจังหวัดนนทบุรีโดย ญัฐินี สุวรรณสิงห์ (2540)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### จุลินทรีย์ในช่องปาก

จุลินทรีย์ที่พบในช่องปากมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส ยีสต์ แบคทีเรีย และโปรโตซัว สาเหตุที่ทำให้ในช่องปากมีจุลินทรีย์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องเพราะภายในช่องปากประกอบไปด้วยบริเวณที่เหมาะสมต่อการอาศัยของจุลินทรีย์ได้หลายแบบ ซึ่งแต่ละบริเวณก็มีปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกันไป (Marsh และ Martin, 1984) ได้แก่

1. พื้นผิวภายในช่องปากที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น เหงือก กระพุ้งแก้ม เพดาน ลิ้น และฟัน ซึ่งฟันเป็นโครงสร้างเพียงชนิดเดียวภายในปากที่มีลักษณะแข็ง และทำหน้าที่เป็นพื้นผิวให้แบคทีเรียและผลิตภัณฑ์ของเชื้อจำนวนมากมาเกาะติดและพัฒนากลายเป็นคราบจุลินทรีย์

2. อุณหภูมิ ปัจจัยที่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิได้แก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการทำงานของเอนไซม์ ภายในช่องปากของคนเรามีอุณหภูมิค่อนข้างคงที่คือจะอยู่ระหว่าง 35-36 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด

3. ออกซิเจน ภายในปากมีทั้งจุลินทรีย์พวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic microorganism) จุลินทรีย์พวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic microorganism) และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยปริมาณของออกซิเจนจะแตกต่างกันไปตามบริเวณต่างๆภายในช่องปาก

4. สภาพความเป็นกรด-ด่าง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องการสภาพความเป็นกรด-ด่างที่ค่อนข้างเป็นกลาง ความเป็นกรด-ด่างภายในช่องปากขึ้นอยู่กับน้ำลายและอาหารที่รับประทานเข้าไป ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายเท่ากับ 6.75 แต่ในขณะที่มีของหวานอยู่ในปาก ความเป็นกรด-ด่างในปากจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 5.0 ซึ่งเป็นผลมาจากการเผาผลาญอาหารของแบคทีเรียแล้วก่อให้เกิดกรดแลคติกขึ้น จากนั้นความเป็นกรด-ด่างจะกลับคืนสู่ระดับใกล้เคียงความเป็นกลางอย่างช้าๆ โดยน้ำลายจะทำหน้าที่ลดกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น แต่เนื่องจากลักษณะของคราบจุลินทรีย์เป็นการรวมตัวกันของกลุ่มจุลินทรีย์กับผลผลิตนอกตัวเซลล์จุลินทรีย์ทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำรวมตัวกันอย่างซับซ้อน ดังนั้นคราบจุลินทรีย์จึงเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างภายในปากลดต่ำลง ความเป็นกรด-ด่างในคราบจุลินทรีย์บริเวณรอยผุของฟันจะต่ำกว่าความเป็นกลาง จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ทนต่อกรดได้เท่านั้นที่มีชีวิตอยู่รอดได้ เช่น สเตรปโตคอคคัสและแลคโตแบซิลไล

5. โภชนาการ อาหารที่แบคทีเรียในช่องปากนำไปใช้ได้มาจากน้ำลายและน้ำเหลือง เหงือกซึ่งมีสารประกอบพวกไนโตรเจน และวิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ในคราบจุลินทรีย์มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งภายในเซลล์และผลิตออกมานอกตัวเซลล์จากน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ขณะที่ขาดแคลนอาหารพวกแป้ง จะเห็นว่าช่องปากมีสภาวะโภชนาการที่อุดมสมบูรณ์จึงทำให้เกิดความหลากหลายของจุลินทรีย์ขึ้น

6. การยึดเกาะติดแน่น การกลืนอาหารแต่ละครั้งเป็นการกำจัดจุลินทรีย์ออกไปจากช่องปาก เนื่องจากการเคี้ยวอาหารและการไหลเวียนของน้ำลายจะทำให้จุลินทรีย์ที่เกาะติดไม่แน่นกับพื้นผิวภายในปากถูกกำจัดออกไปจากปากได้ แต่ในบริเวณที่จุลินทรีย์ได้รับการป้องกันเป็นอย่างดี เช่น ร่องฟัน ร่องเหงือก และซอกฟัน เป็นต้น จุลินทรีย์จะถูกกำจัดออกไปยากมากกว่าบริเวณอื่น มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถตั้งถิ่นฐานบริเวณพื้นผิวภายในช่องปากที่ไม่มีอะไรป้องกัน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องมีสมบัติพิเศษในการเกาะติดคือ สามารถสร้างสารพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดไม่ละลายน้ำจากน้ำตาลซูโครสออกมานอกตัวเซลล์ได้

จากปัจจัยทางนิเวศน์วิทยาดังกล่าวทำให้พบจุลินทรีย์หลากหลายชนิดภายในช่องปาก โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในปากจะเป็นพวกแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียสกุลต่างๆที่แยกได้ตามปกติจากปากคนมีแสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก (ที่มา: จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2542)

แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Moraxsella</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Rothia</i>	<i>Centipeda</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Treponema</i>
	<i>Bacteroides</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Wolinella</i>

### คราบจุลินทรีย์

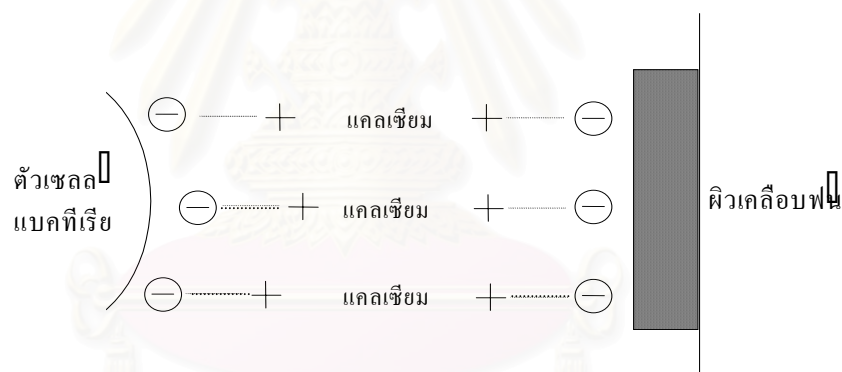
คราบจุลินทรีย์หมายถึงประชากรที่ซับซ้อนของจุลินทรีย์ที่พบอยู่บนผิวฟันที่ฝังอยู่ในพอลิเมอร์จากแบคทีเรียและน้ำลาย (Gibbons, 1980) คราบจุลินทรีย์เป็นที่อยู่อาศัยขนาดใหญ่ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยจุลินทรีย์เป็นส่วนมากที่เหลือเป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ มีลักษณะนุ่มเหนียว ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน คราบจุลินทรีย์ที่ถูกแคลซิไฟด์ (calcified) จะเปลี่ยนไปเป็นหินน้ำลาย (calculus หรือ tartar) คราบจุลินทรีย์ที่ติดบนผิวฟันสามารถแสดงให้เห็นได้โดยการบ้วนปากด้วยสารละลายที่เป็นสี เช่น erythrosin (Burnette และ Scherp, 1962) คราบจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณผิวฟันที่ได้รับการปกป้องเป็นอย่างดี เช่น ร่องฟัน ร่องเหงือกและซอกฟัน คราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญได้แก่ *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria* และ *Bacteroides* นอกจากนี้มีพวก รา โปรโตซัว และไวรัส เป็นส่วนน้อย การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในช่องปากสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา



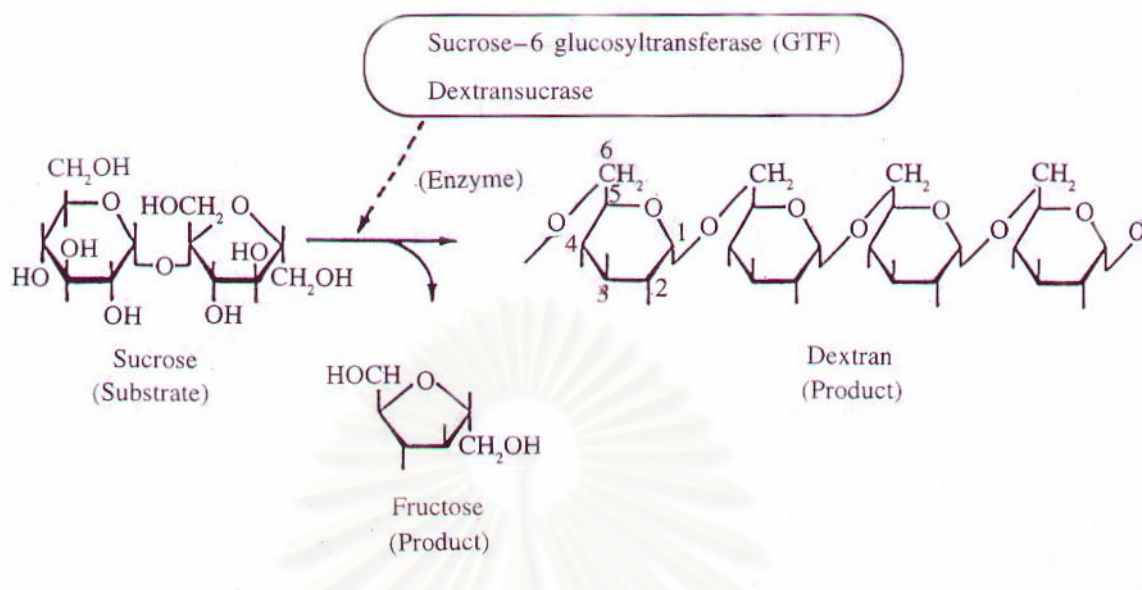
เป็นผลจากปัจจัยของสิ่งมีชีวิตที่เป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์หรือจากกิจกรรมต่างๆที่เกิดขึ้นภายในชุมชนของจุลินทรีย์

### การเกาะติดกับผิวพื้นและการเกิดคราบจุลินทรีย์

การที่จุลินทรีย์จะตั้งถิ่นฐานได้สำเร็จ สิ่งสำคัญคือจะต้องมีการยึดเกาะของตัวเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นบนพื้นผิวของพื้นพร้อมทั้งมีการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ให้มีจำนวนมากขึ้นและเกิดการรวมตัวของเยื่อหุ้มพื้น แบคทีเรีย และอาหาร ที่สำคัญคือ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จนกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ (Hamada และ Slade, 1980) การยึดเกาะในระยะเริ่มแรกอาศัยอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) โดยแบคทีเรียที่อยู่ในช่องปากหลายชนิดมีสมบัติเป็นประจุลบเนื่องจากกรดไลโปเทอิกอิก (lipoteichoic acid) ที่อยู่ในผนังเซลล์และโดยปกติพื้นผิวพื้นจะมีสมบัติเป็นประจุไฟฟ้าลบเช่นกัน การยึดจึงต้องอาศัยประจุไฟฟ้าบวกที่เป็นพวกไดวาเลนต์ (divalents) ได้แก่ แคลเซียม ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมโยง (Gibbons และ Van Houte, 1980) ตามที่แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเกาะของแบคทีเรียกับพื้นโดยมีแคลเซียมเป็นสะพาน (ที่มา: จินตกร คุ้มฉนวน สุชาติ, 2542)



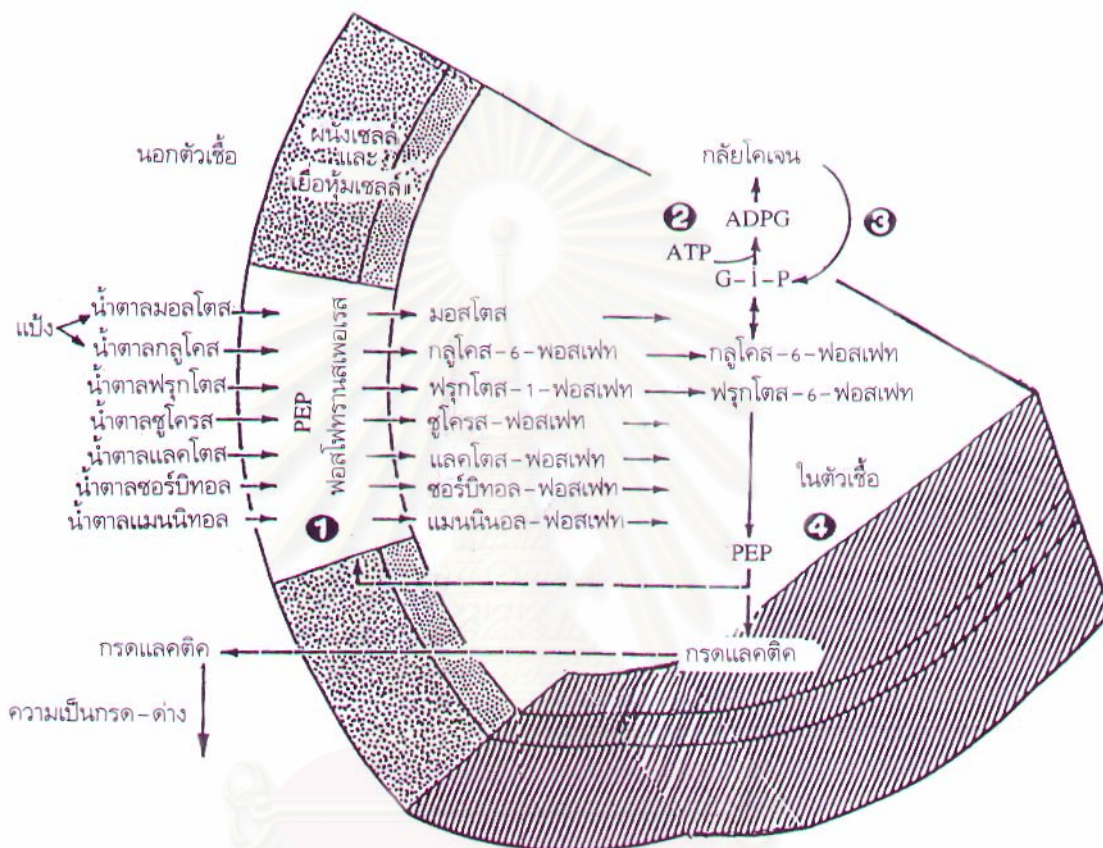
รูปที่ 2.2 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเดกซ์แทรนโดยกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (ที่มา: จินตกร คุ้มมนสุชาติ, 2542)

หลังจากเกิดการเชื่อมต่อโดยสะพานแคลเซียมแล้วจะเกิดการเกาะติดแน่น (Adherence) ของแบคทีเรียกับบริเวณที่เป็นผิวฟันทั้งที่มีและไม่มีสิ่งป้องกัน ซึ่งการยึดเกาะแบบนี้ต้องอาศัยพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยในการยึดเกาะ โดยแบคทีเรียชนิดที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในระดับสูงและมีความสำคัญต่อการก่อโรคฟันผุคือสเตรปโตคอคไค โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus mutans* แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) หรือ เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสไปเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสหรือเดกซ์แทรนพร้อมกับปลดปล่อยฟรักโทสอิสระออกมาด้วย (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เดกซ์แทรนเป็นฮอโมพอลิเมอร์ของกลูโคสที่มีหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคสิติก นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังมีสายที่แตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3-ไกลโคสิติก เดกซ์แทรนเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้ละลายน้ำได้ยากและมีลักษณะเหนียวเหนียวสามารถจับกับผิวฟันได้ดีจึงเหนียวน้ำให้แบคทีเรียชนิดต่างๆมาก่อตัวรวมกัน นอกจากนั้นเดกซ์แทรนเหล่านี้ยังจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารทำให้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ (dental plaques) และยังเป็นแหล่งอาหารและพลังงานให้กับจุลินทรีย์ในสภาวะที่ช่องปากขาดอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (Guggenheim, 1970)

## การเกิดโรคฟันผุ

ฟันผุเกิดจากคราบจุลินทรีย์ โดยเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์จะเปลี่ยนอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต คือแป้งและน้ำตาลไปเป็นผลผลิตพวกกรดอินทรีย์หลายชนิด กรดที่สำคัญคือ กรดแลคติก ออกมาละลายเคลือบฟันและเนื้อฟันทำให้เกิดฟันผุ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการเปลี่ยนแป้งและน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกโดยเชื้อ Streptococci (ที่มา: จินตกร คุ้มมนสุชาติ, 2542)

การผลิตกรดของแบคทีเรียนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดฟันผุ แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในคราบจุลินทรีย์สามารถสร้างกรดและทนกรดได้ แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดออกมาได้มากอย่างเด่นชัดเรียกว่า แอซิโดเจนิคแบคทีเรีย (acidogenic bacteria) ที่สำคัญและมีบทบาทต่อการเกิดฟันผุคือ สเตรปโตคอคคัสและแลคโตแบซิลไล โดยเฉพาะ *S. mutans* สามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วและยังสร้างเดกซ์แทรนทำให้เกิดการจับกับแบคทีเรียอื่นรวมถึงสารอาหารในช่องปากเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ขึ้นได้ (McGhee และ Michalek, 1981) และจากการศึกษากับสัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อ จุลินทรีย์พบว่า *S. mutans* สามารถก่อโรคฟันผุได้มากที่สุด (Hamada และ Slade, 1980)

ในขณะที่แลคโตแบซิลไลจะมีบทบาทกับฟันที่ผู้ไปแล้วมากกว่า โดยปกติความเป็นกรด-ด่างของคราบจุลินทรีย์จะเท่ากับ 6.75 แต่หลังจากรับประทานอาหารค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าที่ต่ำกว่า 5.5 เรียกว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างวิกฤติ (critical pH) ทำให้เคลือบฟันอ่อนตัวและสลายออกมาได้ง่ายเมื่อมีความกว้างและลึกมากขึ้นก็จะกลายเป็นฟันผุในเวลาต่อมา (Burnett และ Scherp, 1962; Schachtele, 1982) จากการศึกษาพบว่ากรดลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างขึ้นกับอาหารที่รับประทานและคราบจุลินทรีย์ คนที่ชอบรับประทานของหวานที่มีน้ำตาลสูงโครสอยู่มาก พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง วิกฤติมากกว่าคราบจุลินทรีย์ของคนที่รับประทานเฉพาะอาหารมื้อหลักเพียงอย่างเดียว ดังนั้นน้ำตาลสูงโครสจึงมีความสัมพันธ์กันมากกับการเกิดฟันผุ (Shaw และ Roussos, 1978) สำหรับน้ำตาลสูงโครสหรือน้ำตาลทรายนั้นมักนิยมมาใช้ทำอาหารมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น เนื่องจากราคาถูก หาง่าย และมีรสชาติดี นอกจากนี้น้ำตาลทรายเกือบทั้งหมดในประเทศไทยผลิตมาจากอ้อยซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจราคาถูกในประเทศด้วย ดังนั้นจึงยังพบปัญหาฟันผุในกลุ่มประชากรโดยตลอด

### วิธีการป้องกันฟันผุ

1. การใช้สารฟลูออไรด์เติมลงในน้ำดื่มและยาสีฟันเพื่อเพิ่มความต้านทานให้กับฟัน อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการใช้สารฟลูออไรด์อย่างสม่ำเสมอแต่ก็ยังพบอุบัติการณ์ของการเกิดฟันผุได้ และหากใช้สารนี้ในปริมาณมากเกินไปทำให้กระดูกและฟันเปราะได้ (Keyes, 1968; Burnette และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988)
2. การใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่สับสเตอร์ของเดกซ์แทรนซูเครส เป็นแหล่งให้ความหวาน เช่น แซคคาริน, ไซคลาเมท, ไลคาซิน, ซอร์บิทอล หรือ สารสังเคราะห์ เช่น แอสพาเทม เป็นต้น แต่น้ำตาลที่นำมาใช้ทดแทนนี้มีปัญหาเรื่องรสชาติและราคาแพง อีกทั้งยังไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Keyes, 1968; Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981)
3. การใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลิน, เตตราไซคลิน และอีริโทรมัซิน เป็นต้น และการใช้สารสำหรับฆ่าเชื้อโดยเติมลงในน้ำยาบ้วนปาก สำหรับวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเพราะอาจเกิดผลข้างเคียง เช่น การแพ้ยาหรือการดื้อยาของเชื้อ (Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981)
4. การใช้วัคซีนป้องกันฟันผุโดยผลิตวัคซีนจาก *S. mutans* แต่มักเกิดปัญหาการเกิดของแอนติบอดี-แอนติเจนคอมเพล็กซ์ ซึ่งมีผลทำลายเนื้อเยื่อหัวใจและยังก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการไหลเวียนของเลือด เช่น ไต (Michalek และ Childers, 1990)

อย่างไรก็ตามการป้องกันฟันผุด้วยวิธีดังกล่าวสามารถใช้ได้ผลในระดับหนึ่ง แต่วิธีป้องกันฟันผุที่ได้ผลเป็นอย่างดีคือการทำให้ฟันผิวในช่องปากไม่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย

จากการที่เดกซ์แทรนเป็นสาเหตุหลักของการจับเกาะของแบคทีเรีย การใช้เอนไซม์เพื่อการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเดกซ์แทรนยังผลให้ความหนืดลดลงจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันฟันผุ เนื่องจากพบว่าเดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำที่แบคทีเรียขับออกมาเป็นการลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนฟันลงได้ (Melville และ Russell, 1981; Wolinsky, 1988)

### เอนไซม์ย่อยสลายเดกซ์แทรน

สามารถแบ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะการติดบนสายเดกซ์แทรน (Mizuno และคณะ, 1999)

#### 1. เอนโดเดกซ์แทรนเนส

เอนโดเดกซ์แทรนเนสจะย่อยสลายเดกซ์แทรนตรงตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,6 ที่ตำแหน่งใดๆบนสายเดกซ์แทรนและปลดปล่อยไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์หลายๆชนิด เช่น ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรโอส และไอโซมอลโทเพนทาโอส เป็นต้น เอนโดเดกซ์แทรนเนสมีชื่อตามระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ว่า 1,6-แอลฟา-ดี-กลูแคนโนไฮโดรเลส (E.C.3.2.1.11) จุลินทรีย์ที่สร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991), *Streptococcus salivarius* สายพันธุ์ PC-1 (Lawman และ Bleiweis, 1991), *S. salivarius* สายพันธุ์ M-33 (Ohnishi และคณะ, 1995), *P. minioluteum* สายพันธุ์ HI-4 (Garcia และคณะ, 1996), *Penicillium notatum* (Pleszczynska และคณะ, 1997), *Sporothrix schenckii* สายพันธุ์ IT-29 (Arnold และคณะ, 1998) และ *Fusarium* sp. (Shimizu และคณะ, 1998) เป็นต้น

#### 2. เอกโซเดกซ์แทรนเนส

เอกโซเดกซ์แทรนเนสจะย่อยสลายเดกซ์แทรนตรงตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,6 โดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะที่เชื่อมหน่วยของกลูโคสจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่น้ำตาลรีดิวซ์และตัดเข้าไปที่ละโมเลกุลบนสายเดกซ์แทรนและปลดปล่อยกลูโคสหรือไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์ออกมา เอกโซเดกซ์แทรนเนสที่มีรายงานในปัจจุบันมีสามชนิด โดยแบ่งตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน ได้แก่

- 2.1 กลูโคเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.70) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส เชื่อที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้คือ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999), *Streptococcus mitis* (Walker และ Pulkownik, 1973) , *S. mutans* (Dewar และ Walker, 1975) และ *Thermomyces lanuginosus* (Jensen และ Olsen, 1996)

- 2.2 ไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.94) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโทส  
 เชื้อที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ คือ *Achromobacter*  
*sp.* (Sawai และคณะ, 1974)
- 2.3 ไอโซมอลโทไทรโอเดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.95) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซ  
 มอลโทไทรโอส เชื้อที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสชนิดนี้ คือ  
*Brevibacterium fuscum var. dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

นอกจากนี้พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ทั้ง 2 กลุ่ม คือ *A. globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) ซึ่งสามารถสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular endodextranase) และสร้างเอกโซเดกซ์แทรนเนสสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ (intracellular exodextranase)

เดกซ์แทรนเนสถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันฟันผุได้ เนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนโดยเดกซ์แทรนเนสมีผลทำให้โมเลกุลของสายเดกซ์แทรนเล็กลง ช่วยลดความเหนียวหนืด และทำให้เดกซ์แทรนสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงยับยั้งการเกาะติดของ Streptococci ภายในช่องปากกับผิวฟันได้ (Schachtele และคณะ, 1975; Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนโดยไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนสคือ ไอโซมอลโทสสามารถยับยั้งการผลิตกากูแคนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ (Ebisu และคณะ, 1974) นอกจากนี้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสังเคราะห์กากูแคนที่ไม่ละลายน้ำจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของเดกซ์แทรนเนส (Felgenhauer และ Trautner, 1983)

การศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันฟันผุ พบว่าเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถลดคราบฟันอย่างมีประสิทธิภาพ แต่เดกซ์แทรนเนสจากราส่วนมากจะมีส่วนของผนังเซลล์ที่ก่ออาการแพ้และบางชนิดยังสร้าง อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในภาวะเดียวกันกับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ (Leach, 1969) ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนส จึงนิยมคัดเลือกจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหานี้

ทางการแพทย์ได้มีการทดลองผสมเดกซ์แทรนเนสกับยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก พบว่าช่วยลดการเกิดคราบฟันได้แต่ต้องใช้ในความเข้มข้นสูง (Caldwell และคณะ, 1971; Keyes และคณะ, 1971; Murayama และคณะ, 1973) เพื่อการใช้งานที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เดกซ์แทรนเนสที่นำมาใช้ควรทำงานได้ดีที่ภาวะภายในช่องปาก เช่น เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter sp.* สายพันธุ์ CB-8 มีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการทำงานที่ 5.5-7.5 และเสถียรที่ 37°C จึงเป็น

แหล่งเอนไซม์ที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ลดการเกิดคราบฟัน (Okushima และคณะ, 1991) เมื่อนำเดกซ์แทรนเนสมาใช้กับสัตว์ทดลองพบว่าสามารถลดการเกิดคราบฟันและการเกิดฟันผุได้ (Block และคณะ, 1969; Fitzgerald และคณะ, 1968; Hamada และคณะ, 1976)

### การศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนส

ในปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาและทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัสการสังเคราะห์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆแล้วเป็นจำนวนมากทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci ที่อาศัยในช่องปาก เช่น *S. sobrinus* (Wanda และ Curtiss, 1994) และแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน เช่น *Arthrobacter globiformis* T6 (Iwai และคณะ, 1994) เป็นต้น การทำพันธุวิศวกรรมเริ่มจากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสเพื่อเป็นแหล่งของยีน รวมถึงการคัดเลือกดีเอ็นเอพาหะและเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมกับการคัดเลือกทรานสฟอร์มเม้นท์

Okushima และคณะ (1991) ได้โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* โดยใช้ pUC19 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ทำการคัดเลือกโคลนในอาหารที่ผสมบลูเดกซ์แทรนเนสมี 3 โคลนที่สร้างวงใส จากการทำแผนที่เรสทริกชันพบว่าโคลนทั้ง 3 มีบริเวณที่เป็นส่วนฮอมอโลกัสกันจึงสับโคลนบริเวณที่เป็นยีนเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวเข้าพลาสมิด pUC19 และให้ชื่อพลาสมิดว่า pDEX011 และพบว่าการสับโคลนดังกล่าวให้วงใสที่กว้างขึ้น เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเดกซ์แทรนเนสใน *E. coli* โดยการสกัดโปรตีนด้วยวิธี osmotic shock และการทำ Western analysis แล้วนำมาวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสมีการแสดงออกสูงสุดในส่วนเพอริพลาซิม และพบแอกติวิตีเป็นส่วนน้อยในไซโทพลาซิม และในน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสมีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1920 คู่เบส ที่แปลรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 640 หมู่ พบบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายลำดับ Shine-Dalgarno อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นคือ GAGGAA และเมื่อทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N พบว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 มีส่วนที่เป็น signal peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 49 หมู่ ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสที่สมบูรณ์จะมีกรดอะมิโน 591 หมู่ และมีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดัลตัน ผู้วิจัยได้หาบริเวณอนุรักษ์ที่เป็นบริเวณจับและย่อยสับสเตรตที่พบทั่วไปในเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เช่น เอกโซเดกซ์แทรนเนส, แอลฟา-อะไมเลส และพุลลูแลนเนส (Russell และ Ferretti, 1990) แต่ไม่พบบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวในลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 จึงสรุปว่าเดกซ์แทรนเนสที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างอาจมีสมบัติการย่อยเดกซ์แทรนที่จำเพาะ

Lawman และ Bleiweis (1991) โคลนยีนที่สร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสชนิดปลดปล่อย ออกนอกเซลล์จาก *S. salivarius* สายพันธุ์ PC-1 โดยใช้ Lambda ZAPII เป็นดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue คัดเลือกโคลนที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็งชนิด blue dextran agar พบโคลน PD1 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI* ขนาด 6.3 กิโลเบส เมื่อ วิเคราะห์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยทำ SDS-PAGE ที่ผสมด้วย blue dextran พบว่าโคลน PD1 สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสที่มีแอกติวิตีขนาด 90 และ 70 กิโลดัลตัน ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสที่ *S. salivarius* สายพันธุ์ PC-1 มีชนิดเดียวคือขนาด 110 กิโลดัลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเดกซ์แทรนเนสที่โคลน PD1 ผลิตได้ ผู้วิจัยสรุปว่าอาจเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนหลังการแปลรหัส (posttranslational processing) ของสายพันธุ์ PC-1 หรือในโคลน PD1 อาจเกิดจากการ รวมตัวกันของเดกซ์แทรนเนสกับปีตากาแลคโทซิเดสที่อยู่ในตำแหน่งโคลนทาง C-terminal ของ *lacZ* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค thin-layer chromatography พบว่าเดกซ์แทรนเนสจากโคลน PD1 สามารถย่อยเดกซ์แทรนและปลดปล่อยน้ำตาลในกลุ่มของไอโซมอลโทสจึงสรุปได้ว่าเดกซ์แทรนเนสจากสายพันธุ์ PC-1 เป็นชนิดเอนโดเดกซ์แทรนเนส แต่ไม่สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสจากสายพันธุ์ PC-1 โดยเทคนิค thin-layer chromatography อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าที่จะ ตรวจสอบโดยเทคนิคดังกล่าว และจากการทดลองใช้เดกซ์แทรนหรือไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์เป็น แหล่งคาร์บอนให้กับ PC-1 พบว่าไม่สามารถใช้พอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวได้และยับยั้งการเจริญด้วย ผู้วิจัยสรุปว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากสายพันธุ์ PC-1 มีกลไกและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ควบคุม การทำงาน

Kubo และคณะ (1993) โคลนและแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp สายพันธุ์ CB-8 เข้าสู่ *S. gordonii* โดยสร้าง shuttle vector ชื่อ pMNK-4 โดยการเชื่อมโปรโมเตอร์และ signal peptide ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (*gtfI*) ของ *S. downei* เข้ากับยีนเดกซ์แทรนเนสจากสายพันธุ์ CB-8 และตามด้วย *rnnBt<sub>2</sub>* terminator ของ *E. coli* เมื่อนำโคลนที่ได้เลี้ยงในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคฟันผุคือ *S. sobrinus* พบว่าสามารถดักการ เกาะติดของกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำกับผนังแก้วของหลอดทดลองได้ จากการวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อโดยทำ Western hybridization พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากโคลนและสายพันธุ์ CB-8 มีขนาดเท่ากันคือ 69 กิโลดัลตัน และเมื่อวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสภายในเซลล์ของโคลนพบว่ามีขนาดใหญ่กว่าคือ 74 กิโลดัลตัน ผู้วิจัยได้ให้เหตุผลว่าเดกซ์แทรนเนสในเซลล์มีส่วน signal peptide ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสอยู่ที่บริเวณ N-terminal และซิกนัลเพปไทด์ของ *S. gordonii* สามารถตัดส่วน signal peptide ออกได้เมื่อมีการปลดปล่อยเดกซ์แทรนเนสออกนอกเซลล์จึงทำให้เดกซ์แทรนเนสในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กกว่าภายในเซลล์ เมื่อเลี้ยงโคลนที่



ได้ร่วมกับ *S. sobrinus* ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสพบว่าสามารถลดการเกาะติดของกลูแคนที่ *S. sobrinus* สร้างขึ้นได้ดังนั้นการนำโคลนที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้อย่างต่อเนื่องไปปลูกถ่ายภายในช่องปากจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันฟันผุ

Iwai และคณะ (1994) ได้โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนส จาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T6 โดยใช้เฝ้าจำ  $\lambda$ EMBL3 เป็นดีเอ็นเอพาหะและใช้ *E. coli* สายพันธุ์ NM539 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของเอนไซม์มา สร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามโดยติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี  $^{32}\text{P}$  พบว่าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่โคลนเข้าไปมีขนาด 12 กิโลเบส โดยชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจาก โคลนที่ได้มีแผนที่เรสทริกชันเหมือนกันทุกประการ เมื่อสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUC119 และคัดเลือกโคลนโดยเทคนิคโคลนไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของไอโซมอลโทเดกซ์แทรนเนสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว พบโคลนที่ต้องการซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I ขนาด 3.5 กิโลเบส เรียกกริคมบีแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pIMD1 จากนั้นทำการหาแผนที่เรสทริกชัน และสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I-*Bam*HI ขนาด 2.2 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUC119 เรียกพลาสมิดนี้ว่า pIMD-A เมื่อทำการวิเคราะห์โคลนนี้พบว่าบริเวณ periplasm มีแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสูงสุด 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคือส่วนไซโทพลาสซึม 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถแสดงออกได้ในสภาวะไม่มี IPTG แสดงว่ายีนที่โคลนได้มีโปรโมเตอร์เป็นของตัวเองซึ่งสอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,926 คู่เบส และพบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์ลำดับ Shine-Dalgarno และสามารถวิเคราะห์ได้ว่ากรอบอ่านรหัสเปิดสร้าง signal peptide ที่มีกรดอะมิโน 39 หมู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N ด้วย

Igarashi และคณะ (1995) ได้ศึกษายีนเดกซ์แทรนเนสของ *S. mutans* โดยโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  และใช้ charomid 9-36 เป็นดีเอ็นเอพาหะ อาหารที่ใช้คัดเลือกโคลนที่สร้างเดกซ์แทรนเนสมีบูเดกซ์แทรน 2000 ผสมอยู่ 0.5% โดยโคลนที่ได้มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 8 กิโลเบส นำพลาสมิดจากโคลนที่ได้มาสร้างแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังกล่าวแล้วสับโคลนเฉพาะบริเวณที่ทำหน้าที่สร้างเดกซ์แทรนเนสเข้าพลาสมิด pUC18 และ pUC19 พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสสามารถแสดงออกได้ใน พลาสมิดทั้งสองชนิด และ IPTG ไม่มีผลต่อการแสดงออกแต่อย่างใด แสดงว่ายีนที่โคลนได้มีโปรโมเตอร์ติดมาด้วย และสามารถแสดงออกได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 2550 คู่เบสมีรหัสเริ่มต้นคือ ATG และรหัสหยุดคือ TGA บริเวณจับเกาะของไรโบโซมอยู่ก่อนรหัสเริ่มต้น 2 คู่เบส คือ GAGG บริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์คือ -10 และ -35 อยู่ห่างกัน 21 คู่เบส คือ GATGAT และ TTTACA หลังรหัสหยุดพบบริเวณ inverted repeat จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากกรอบอ่านรหัสเปิดพบว่ามีการดัดแปลง 850 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดัลตัน จาก

ลำดับกรดอะมิโนไม่พบกรดอะมิโนซิสทีนเช่นเดียวกับโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ชนิดอื่นของ *S. mutans* เมื่อวิเคราะห์บริเวณที่สำคัญของเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจาก *dexA* พบบริเวณที่เป็น cell-wall anchoring region ที่มีอยู่ทั่วไปในโปรตีนกลุ่มที่สามารถจับกับกลูแคนบริเวณผนังเซลล์ได้เช่น ฟรุกโตซิเดสของ *S. mutans* สายพันธุ์ GS5 และเดกซ์แทรนเนสของ *S. mutans* สายพันธุ์ UAB66 โดยลักษณะดังกล่าวคือ มีเพพไทด์ที่มีกรดอะมิโน 6 หมู่ คือ LPQTDG ที่อยู่ห่างจาก C-terminal ของโปรตีน DexA 35-40 หมู่กรดอะมิโน และบริเวณปลายสุดทาง C-terminal มีกรดอะมิโน 6 หมู่ คือ KGRKND ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก การเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน DexA กับเดกซ์แทรนเนสและเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ชนิดอื่นของเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปากดังนี้คือ มีความเหมือนในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับเดกซ์แทรนเนสของ *S. sobrinus* สายพันธุ์ UAB เท่ากับ 57.8 และ 47.0% ตามลำดับแต่ไม่พบความเหมือนใดๆกับเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 ทั้งลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์

Ohnishi และคณะ (1995) ได้โคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *S. salivarius* M-33 โดยใช้ pUC18 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และใช้ *Escherichia coli* XL1-Blue คัดเลือกโคลนที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้อาหารที่ผสมบลูเดกซ์แทรนได้หนึ่งโคลน พบว่าโคลนที่ได้มีชิ้นดีเอ็นเอของ *S. salivarius* M-33 ขนาด 4.3 กิโลเบส ซึ่งมีกรอบอ่านรหัสขนาด 2478 คู่เบส แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 826 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 87.9 กิโลดาลตัน มี signal sequence ประกอบด้วยกรดอะมิโน 38 หมู่แรกจากรหัสเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *S. salivarius* M-33 กับแบคทีเรียอื่นหรือเอนไซม์ชนิดอื่นที่คล้ายกัน เช่น เดกซ์แทรนกลูโคซิเดส (Russell และ Ferretti, 1990) และเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. (Okushima และคณะ, 1991) พบว่าไม่มีความเหมือนระหว่างโปรตีนดังกล่าว

Colby และคณะ (1995) ได้สร้างสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *S. mutans* โดยใช้เทคนิค insertion inactivation ด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ single recombination จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Sau3AI* ของจีโนมิกดีเอ็นเอเข้าสู่ตำแหน่ง *BamHI* ของ integration vector ชนิด pVA891 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *E. coli* แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคไคได้และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *S. mutans* สายพันธุ์ LT11 พบสองโคลนของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ ตรวจสอบการสอดแทรกของพลาสมิดเข้าสู่จีโนมิกดีเอ็นเอโดยทำ Southern hybridization จากนั้นแยกส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดโดยเทคนิค marker rescue แล้วจึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับโปรตีนอื่นโดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือน 56% กับเดกซ์แทรนเนสจาก *S. sobrinus* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคลนที่ได้

เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ LT11 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Todd-Hewitt agar ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครส พบว่าโคลนที่ได้สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณมากกว่าในสายพันธุ์ LT11 และยังสามารถเกาะติดกับผนังแก้วของหลอดทดลองได้ดีกว่าด้วย ทำให้ทราบว่าเดกซ์แทรนเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณของกลูแคนที่ถูกสร้างออกมาภายนอกเซลล์และการเกาะติดของเซลล์ต่อพื้นผิวพื้นด้วย

Serhir และคณะ (1997) โคลน IgG-binding protein จาก *S. suis* โดยใช้  $\lambda$ ZAPII เป็นพาหะ คัดเลือกโคลนพาหะที่ต้องการด้วยการติดตามแอกติวิตีการจับกับ IgG พบโคลนที่ต้องการ 1 โคลนคือ  $\lambda$ Rlg1 ที่มีขึ้นดีเอ็นเอ *Xba*I-*Xho*I ขนาด 6.3 กิโลเบส และที่มีแอกติวิตีของการจับกับ IgG เมื่อทำแผนที่เรสทริกชันพบว่าขึ้นดีเอ็นเอ *Xba*I-*Xho*I ประกอบด้วยขึ้นดีเอ็นเอ *Xba*I-*Sac*I ขนาด 3.5 กิโลเบส และ ขึ้นดีเอ็นเอ *Sac*I-*Xho*I ขนาด 2.8 กิโลเบส ทำการโคลนขึ้นดีเอ็นเอ *Sac*I-*Xho*I เข้าพลาสมิดพาหะ pBluescript KS(+) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,629 คู่เบส ที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 542 หมู่ มีรหัสเริ่มต้นคือ ATG และก่อน ATG 23 คู่เบส พบบริเวณจับเกาะของไรโบโซมคือ AGAAGGA มีบริเวณโปรโมเตอร์ -10 และ -35 คือ ATTAAT และ AAGTATT ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีนที่ได้จากกรอบอ่านรหัสเปิด พบว่ามีความเหมือน 34% และความคล้าย 74% กับเดกซ์แทรนกลูโคซิเดส (DexS) ของ *S. mutans* ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน DexB ได้เท่ากับ 62 กิโลดัลตัน และเมื่อทำ SDS-PAGE พบว่าเดกซ์แทรนเนสมีขนาดประมาณ 62 กิโลดัลตันเช่นกัน

Oguma และคณะ (1999) ใช้เทคนิค Shot-gun cloning ในการโคลนยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนส (*dex*) จาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC118 และใช้ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ได้ทราบสฟอว์แมนท์ 8 โคลนที่เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งบลูเดกซ์แทรน ตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pDX1-pDX8 ซึ่งมีขึ้นดีเอ็นเอ *Sau*3AI ขนาด 3-5 กิโลเบส จากโคลนที่ได้ทั้ง 8 ชนิด สามารถแบ่งยีน *dex* ออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของแผนที่เรสทริกชัน คือ *dex1* และ *dex2* ที่มีตำแหน่งตัดของ *Hind*III และไม่มีตำแหน่งตัดของ *Hind*III ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *dex1* และ *dex2* (DXase1 และ DXase2) กับเอนโดเดกซ์แทรนเนส (DXase) ของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) พบว่ามีความเหมือน 93 และ 65% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของเอนโดเดกซ์แทรนเนสที่บริสุทธิ์จากสายพันธุ์ T-3044 พบว่า signal peptide ของ DXase1 มีกรดอะมิโน 33 หมู่ ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนในส่วนนี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับ DXase2 เลย อาจเป็นเพราะยีน *dex2* ไม่สามารถแสดงออกในสภาวะการเลี้ยงเชื้อในงานวิจัยนี้

ณัฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) ได้แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนส โดยแยกจากดินในจังหวัดนนทบุรี จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสแอกติวิตี 4.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ทำการปรับปรุงแล้ว โดยณัฐินี สุวรรณสิงห์ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 6.5 และ 40<sup>0</sup>ซ ตามลำดับ และมีความเสถียรที่ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ 4.0-7.0 และ 30-37<sup>0</sup>ซ ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ได้ถูกจัดจำแนกเป็น *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA โดย Chareonpornwattana และคณะ (2001)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศึกษาขึ้นที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันพืช และประยุกต์ใช้เดกซ์แทรนเนสเป็นสารตัวกลางในการป้องกันพืช เพื่อบรรลุมรรควัตถุประสงค์ดังกล่าวจึงโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนส ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 เพื่อนำข้อมูลทางพันธุศาสตร์ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์และผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในระดับขยายส่วนต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  ของบริษัท Forma Scientific, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
  - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.

15. ไมโครปิเปต (micropipette) ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab<sup>TM</sup> Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
18. กระจกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
19. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
20. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
21. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
23. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
  - กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ ของบริษัท Polaroid, USA.
  - แผ่นกรองแสงสีแดง
  - ฟิล์มโพลาไรซ์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. พอลิเปปโตน (polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
6. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
8. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
9. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ของบริษัท E Merck, Germany.
10. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
11. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.
12.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ของบริษัท E Merck, Germany.
13. Lysozyme ของบริษัท Sigma, USA.

14. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ( $C_4H_{11}NO_3$ ) ของบริษัท Sigma, USA.
15. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Sigma, USA.
16. SDS (sodium dodecyl sulfate), ( $C_{12}H_{25}OSO_3$ ) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
17.  $K_2HPO_4$  ของบริษัท E Merck, Germany.
18.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ของบริษัท E Merck, Germany.
19. สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
20. เวกทริกซ์เอ็นไซม์ *Bam*HI , *Bgl*II , *Eco*RI , *Hind*III , *Nar*I , *Pst*I , *Sal*I , *Sac*I , *Sma*I , *Xba*I และ *Xho*I ของบริษัท Promega, USA.
21. lambda DNA/*Hind*III marker ของบริษัท Promega, USA.
22. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
23. KOD DNA polymerase ของบริษัท TOYOBO, Japan.
24. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท TOYOBO, Japan.
25. ไลเกส (ligase) ของบริษัท Promega, USA.
26. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
27. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
28. เดกซ์แทรน (industrial grade) ของบริษัท Sigma, USA.
29. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
30. IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
31. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
32. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit ของบริษัท BIO101, USA.
33. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนมไทป์/ ฟีนোটายป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherchia coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$	$\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA</i> 1, <i>recA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> -1, <i>hsdR</i> 17, <i>relA</i> 1, <i>supE</i> 44, <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> (pDEX)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDEX	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> (pSUDEX)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> (pSUDEX1)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX1	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> (pSUDEX2)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX2	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> (pSUDEX3)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX3	สร้างในการทดลองนี้
<i>Arthrobacter sp.</i> สายพันธุ์ AG-2	สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรน	ณัฐินี สุวรรณสิงห์, 2540



### 3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

#### ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนมไทป์/ ฟีนোটายป์	เอกสารอ้างอิง
pGEM-7Zf(+)	Ap <sup>r</sup> , αlac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-5Zf(+)	Ap <sup>r</sup> , αlac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-3Zf(+)	Ap <sup>r</sup> , αlac/MCS	บริษัท Promega, USA
pDEX	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ DEXFWD2 และ DEXREV ขนาดประมาณ 1.2 kb ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+)	สร้างในการทดลองนี้
pSUDEX	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วน <i>Bam</i> HI ขนาด 3.661 คู่เบส จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งมีกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนเดกซ์แทรนเนสอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอ	สร้างในการทดลองนี้
pSUDEX1	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วน <i>Bam</i> HI ขนาด 1.977 คู่เบส จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีนเดกซ์แทรนเนส	สร้างในการทดลองนี้
pSUDEX2	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วน <i>Pst</i> I ขนาด 680 คู่เบส จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีนเดกซ์แทรนเนส	สร้างในการทดลองนี้
pSUDEX3	Ap <sup>r</sup> , มีชิ้นส่วน <i>Bam</i> HI ขนาด 1684 คู่เบส จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีนเดกซ์แทรนเนส	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( $T_m$ )	เอกสารอ้างอิง
DEXFWD1	5'-ATGAGCATTCCCCGCAGCGG-3' (66 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEXFWD2	5'-TGAGCTGGTCCAGCTTCGAG-3' (64 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEXREV	5'-TACATGCGGTTGTGGATGAC-3' (60 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX1	5'-TGACGAGAGGAACTATCATG-3' (58 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX2	5'-ACGATGAGTGGCAGTTGGAC-3' (62 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX3	5'-AAAAACAGCTCGTGGACGCG-3' (62 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX4	5'-CATCTCAAGCGCTACACCAA-3' (60 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX5	5'-TATCATCCAGAACGGCATCG-3' (56 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้
DEX6	5'-GTCCGGATCCCGGAGCACCG-3' (65 <sup>o</sup> ซ)	ออกแบบในการ ทดลองนี้

### 3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ กรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้แอมพิซิลลิน(Am) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ นาน 16-18 ชั่วโมง

3.5.2 เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก5) เมื่อต้องการกระตุ้นการสร้างเดกซ์แทรนเนสหรือเพื่อการเก็บรักษาเชื้อ โดยเลี้ยงนาน 2-3 วัน และเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารแข็ง LB เมื่อต้องการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงนาน 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30<sup>o</sup>ซ

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ และ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 โดยปริมาตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ นาน 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>ซ นาน 1 ปี

### 3.6 เตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอและชิ้นดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

#### 3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ตามวิธีของ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536) โดยเชื้อโคลนเดี่ยวที่เลี้ยงในอาหารแข็ง LB ลงในอาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตรนาน 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนทริฟิวซ์ของบริษัท Nalgene, USA นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ตั้งส่วนใส่ให้หมด กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) 5 มิลลิลิตร ที่มีไลโซไซม์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37<sup>o</sup>ซ นาน 1 ชั่วโมง เติม SDS 10% (ภาคผนวก ข5) 250 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% กิ้งหลอดเบาๆ เพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน เซลล์จะแตกโดยสังเกตได้จากความใสของผสมในหลอด สกัดโปรตีนออกโดยเติมสารละลายฟีนอลอิมิตัว (ภาคผนวก ข17) ปริมาณเท่าตัวผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาหลายๆครั้ง และปั่นในเซนทริฟิวซ์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและฟีนอล ดูดส่วนใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่มา สกัดซ้ำด้วยฟีนอลอิมิตัวจนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นฟีนอล (ชั้นล่าง) กับชั้นบัฟเฟอร์ (ชั้นบน) ดูดส่วนใสชั้นบน (ประมาณ 4 มิลลิลิตร) มาเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 3 ไมลาร์ 400 ไมโครลิตร และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทานอล 2 เท่าโดยปริมาตร (8.8 มิลลิลิตร) เก็บที่ -20<sup>o</sup>ซ นาน 30 นาที ปั่นเก็บดีเอ็นเอที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ทำให้แห้งและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 มิลลิลิตร เติม RNaseA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37<sup>o</sup>ซ นาน 30 นาที สกัดโปรตีนออกด้วยฟีนอลอิมิตัว ตามด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์มแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข18) และคลอโรฟอร์ม/ไอ

ไซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) และตกตะกอนด้วยเอทานอลล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยเอทานอล 70% ทำให้แห้งและละลายในบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตร

### 3.6.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

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

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

## 3.7 เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

### 3.7.1 สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 5 มิลลิกรัม นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อ 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์นาน 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข20) 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข20) ที่เตรียมใหม่ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข20) ที่เย็น 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทานอล 95 % ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนของเอทานอล 95 % ทิ้ง บั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการบั่นล้างเก็บตะกอนนาน 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปประเหยให้แห้งสนิท

แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

3.7.2 สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3)

สกัดพลาสมิดตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการและปั่นเก็บเซลล์ตามวิธีในข้อที่ 3.7.1 แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งของผสมเริ่มเหนียวและใส่ขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพจีใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.7.3 วิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดที่สกัดได้

วิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.6.2

## 3.8 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

### 3.8.1 ตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดจีโนมดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ โดยใช้บัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเรสทริกชันเอนไซม์ตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

### 3.8.2 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยมีวิธีการดังนี้คือ ผสมพลาสมิดปริมาณที่เหมาะสมกับสปีดิตตาม (Promega, USA) หยดสารละลายลงไปในลงในช่องและใช้  $\lambda$ DNA/HindIII หรือ 1 kb DNA ladder (Promega, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งเจลประกอบไปด้วย อะกาโรสเจล 0.7% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข16) จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสด้วยชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT หรือชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 50-100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมไฟนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข21) นาน 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-light Transilluminator (model, USA) ถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ (Polaroid, USA)

### 3.8.3 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ตามขนาด ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV-light Transilluminator ตัดเจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดและนำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit (BIO101, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมสารละลายโซเดียมไอโอดด์ 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 45-55<sup>o</sup>ซ นาน 5 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติมสารแขวนลอยที่เข้ากันของ glass milk 5-10 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายดีเอ็นเอเข้ากันกับ glass milk แล้วทำการบ่มนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างบ่มให้กลับหลอดเบาๆ เพื่อป้องกัน glass milk ตกตะกอนทุก 1-2 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash 500-700 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ครั้งที่ล้างให้กระจายตะกอนออกให้หมดแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนแล้วชะดีเอ็นเอออกจากตะกอน glass milk ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 20 ไมโครลิตร โดยกระจายตะกอนออกให้เข้ากันดีในน้ำ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่มีชิ้นดีเอ็นเอละลายอยู่ไปยังหลอดไมโครพิวจ์ใหม่ เก็บรักษาชิ้นดีเอ็นเอไว้ที่ -20<sup>o</sup>ซ

### 3.8.4 เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่เข้ากันได้ที่เหมาะสม โดยใช้ T4 DNA ligase (Promega, USA) อัตราส่วนโมลาร์ของชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อโดยทั่วไปคือ 5:1 หรือ 3:1 ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารผสมปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดลองนี้ให้เป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ นำของผสมชิ้นดีเอ็นเอ พลาสมิดเวกเตอร์และน้ำไปให้ความร้อนที่ 65<sup>o</sup> นาน 10 นาที ปล่องยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ และ T4 DNA ligase บ่มของผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16<sup>o</sup> นานข้ามคืนก่อนที่จะนำไป ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

## 3.9 การทรานส์ฟอร์มริคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

### 3.9.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์

เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5 $\alpha$  ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) 5 มิลลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup> นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT 70 มิลลิตร ที่บรรจุใน armed flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup> จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.3-0.5 ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้ทำการเตรียมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/ CaCl<sub>2</sub> (เตรียมก่อนใช้และสารละลายทุกชนิดที่ใช้เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ต้องแช่ในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็น 40 มิลลิตร เข้ากับสารละลาย CaCl<sub>2</sub> 1 โมลาร์ที่ปลอดเชื้อและเย็น 3.5 มิลลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4<sup>o</sup> จากนั้นเติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub> 1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อและเย็น 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้

เมื่อได้ค่า OD<sub>600</sub> ตามที่ต้องการแล้วให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ 35 มิลลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup> ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup> ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/ CaCl<sub>2</sub> ที่เย็น 10.5 มิลลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/ CaCl<sub>2</sub> (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย

MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30-45 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> ที่เย็น 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> แซะในอ่างน้ำแข็งนาน 45 นาที ขึ้นไป แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 875 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันเบาๆ สุดท้ายทำการแบ่งใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นประมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บคอมพีเทนท์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>ซ

### 3.9.2 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ยกเว้นช่วงทำ heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70<sup>o</sup>ซ มาซะในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดลงในคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นในอ่างน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup>ซ นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย 50 ไมโครลิตร ของ X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข24) และ 7 ไมโครลิตร ของ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข25) (ทำการเตรียมเกลี่ยสารดังกล่าวก่อนใช้ทุกครั้ง) บ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>ซ นานข้ามคืน

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

สำหรับการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพรมเมอร์ DEXFWD1 , DEXFWD2 และ DEXREV ได้ถูกออกแบบจากการหาลำดับอนุกรมของยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้โปรแกรม CLUSTALX จากแบคทีเรียที่สร้างเดกซ์แทรนเนส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044(accession no. D88361) (Oguma และคณะ, 1999), *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8(accession no. D00834) (Okushima และคณะ, 1991) และ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (accession no. AB052295) (Mizuno และคณะ, 1999) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.3



ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมีความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละส่วนประกอบเป็นดังนี้ สารละลาย  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละตัว) สารละลายไพรเมอร์ DEXFWD1, DEXFWD2 และ DEXREV 0.2 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ 1X *KOD* polymerase *KOD* DNA polymerase (Toyobo, Japan) ปริมาณ 2.5 หน่วย ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 1 ไมโครกรัม ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันนี้ ได้ทดลองใช้ annealing temperature ทั้งหมด 3 ค่าคือ 68, 65 และ 60°C และใช้ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา 2 คู่คือ DEXFWD1 กับ DEXREV และ DEXFWD2 กับ DEXREV ปริมาตรรวมที่ใช้คือ 50 ไมโครลิตร โดยสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 98°C	นาน 1 นาที	} 25 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 98°C	นาน 15 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 68, 65 หรือ 60°C	นาน 2 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	นาน 30 วินาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72°C	นาน 5 นาที	

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

### 3.11 ตัดฉลากชิ้นดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin (DIG)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาตัดฉลากด้วยชุดตัดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ คูตสารละลายดีเอ็นเอ 16 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ไมโครกรัม) ใส่ในหลอดไมโครพิพจ นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

### 3.12 Southern hybridization

#### 3.12.1 Southern transfer

ตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม แล้วนำไปทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟเรซิส (อะกาโรสเจล 1.0%) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV-light Transilluminator และ

ถ่ายรูปแบบไว้ แล้วทำการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนใช้ระบบบัฟเฟอร์ ฟอสเฟต alkaline transfer buffer (Sambrook และ Russell, 2001) มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมเจลก่อนการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอโดยแช่เจลในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 นอร์แมล นาน 10 นาที ล้างเจลหลายๆ ครั้งด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นเติม alkaline transfer buffer (ภาคผนวก ข6) พอท่วมเจล เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทบัฟเฟอร์เก่าทิ้ง แล้วเติม alkaline transfer buffer ใหม่ๆ เข้าไปแล้วเขย่าต่ออีก 20 นาที หลังจากนั้นเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Pall Bio Support, USA) โดยใช้ alkaline transfer buffer เป็นสารละลายตัวกลางในการเคลื่อนย้ายและใช้กระดาษดูดซับความหนา 5 เซนติเมตร เป็นวัสดุดูดซับ ปล่อยให้แห้งในตู้เย็นแช่เย็น ล้างไนลอนเมมเบรนด้วย neutralization buffer II (ภาคผนวก ข7) โดยการเขย่านาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อล้างเอาเศษอะกาโรสเจลที่ติดบนไนลอนเมมเบรนออกและปรับภาวะความเป็นกรดต่างให้เหมาะสม จากนั้นนำไปซับให้แห้ง และทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตประมาณ 3 นาที นำไนลอนเมมเบรนไปใช้ในขั้นตอนไฮบริดเซชันได้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

### 3.12.2 ฟรีไฮบริดเซชันและไฮบริดเซชัน

นำเมมเบรนไปฟรีไฮบริดด้วยสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข12) (Roche, Germany) 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup> นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วนำเมมเบรนไป ไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตามที่ผ่านการต้มซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย DIG Easy Hyb ที่อุณหภูมิ 42<sup>o</sup> นานข้ามคืน

หลังขั้นตอนไฮบริดเซชันนำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข10) 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข11) ที่อุณหภูมิ 68<sup>o</sup> นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไฮบริดได้กับดีเอ็นเอติดตาม โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข12) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ นาน 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข12) 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นาน

30 นาที เทปฟเฟอรัทิง แล้วเติมสารละลายแอนติบอดี (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข12) 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที เทปฟเฟอรัทิง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที เทปฟเฟอรัทิง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer (ภาคผนวก ข12) 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นาน 5 นาที เทปฟเฟอรัทิง จากนั้นเตรียมสับสเตรต NBT/BCIP (ภาคผนวก ข12) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายในลอนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดฉลากด้านข้างเช่นเดียวกับชั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทสับสเตรตที่เตรียมไว้ลงในถุง ใส่ฟองอากาศออกแล้วฉีกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง - 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับสับสเตรตแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ นาน 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

### 3.13 Dot blot hybridization

เตรียมในลอนเมมเบรนโดยนำเมมเบรนมาแช่ในน้ำเพื่อไล่อากาศแล้วซับให้แห้ง ใช้ดินสอขีดแบ่งตารางให้มีจำนวนช่องเหมาะสมกับจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างที่จะหยด ต้มดีเอ็นเอตัวอย่าง นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที เพื่อแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว หยดดีเอ็นเอควบคุมผลบวก และผลลบทุกครั้งเพื่อใช้ในการอ้างอิง หลังจากการหยดดีเอ็นเอตามต้องการแล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนเมมเบรน จากนั้นทำพรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชันตามขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับการทำ Southern hybridization ทุกประการ

### 3.14 การสังเคราะห์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สังเคราะห์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วยบริการชีวภาพของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

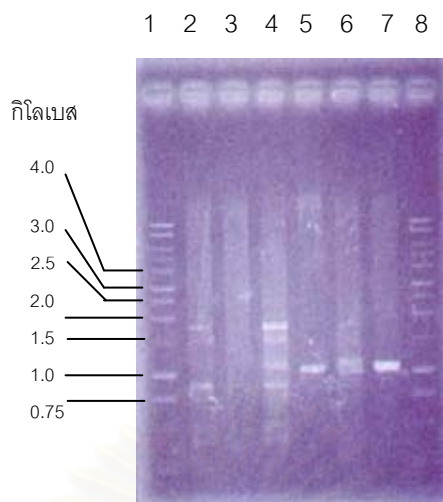
วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS, BlastX และ CLUSTALX

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนเด็กซ์แทรนเนสโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ DEXFWD1, DEXFWD2 และ DEXREV ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ประมวลรหัสการสร้างเด็กซ์แทรนเนสสามชนิดตามที่ได้ระบุในข้อที่ 3.10 โดยวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของยีนด้วยโปรแกรม CLUSTALX ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค1 ขนาดของผลิตภัณฑ์โดยประมาณจากการใช้ไพรเมอร์ DEXFWD1 กับ DEXREV คือ 1.1 กิโลเบส และจากการใช้ไพรเมอร์ DEXFWD2 กับ DEXREV คือ 1.0 กิโลเบส ทดลองใช้อุณหภูมิช่วง annealing 3 สภาวะ ได้แก่ 68, 65 และ 60<sup>o</sup>ซ โดยใช้สารผสมปฏิกิริยาชนิดอื่นๆด้วยความเข้มข้นดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.10 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังที่แสดงในรูปที่ 4.1 จากรูปพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ DEXFWD2 กับ DEXREV และอุณหภูมิช่วง annealing 65 (ช่องที่ 5) และ 60<sup>o</sup>ซ (ช่องที่ 7) จะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส โดยกรณีใช้อุณหภูมิช่วง annealing 60<sup>o</sup>ซ จะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณมากกว่า แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ DEXFWD1 กับ DEXREV ที่อุณหภูมิช่วง annealing ทั้ง 3 สภาวะดังกล่าวไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะ



รูปที่ 4.1 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ช่องที่ 1 และ 8	1 kb DNA ladder
ช่องที่ 2, 4 และ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ไพรเมอร์ DEXFWD1 กับ DEXREV ที่อุณหภูมิช่วง annealing เท่ากับ 68, 65 และ 60 <sup>o</sup> ซ ตามลำดับ
ช่องที่ 3, 5 และ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ไพรเมอร์ DEXFWD2 กับ DEXREV ที่อุณหภูมิช่วง annealing เท่ากับ 68, 65 และ 60 <sup>o</sup> ซ ตามลำดับ

ทำการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังกล่าว โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิด pGEM-7Zf(+) ที่ตัดด้วย *Sma*I และทรานสฟอร์มเข้ายัง *E. coli* DH5 $\alpha$  สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส ดังกล่าวได้และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pDEX จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDEX โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ที่จำเพาะกับบริเวณตำแหน่งโคลนของพลาสมิด pGEM-7Zf(+) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 มีความเหมือนกับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) 86.9% และ 80.2% ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ค2 และ ค3

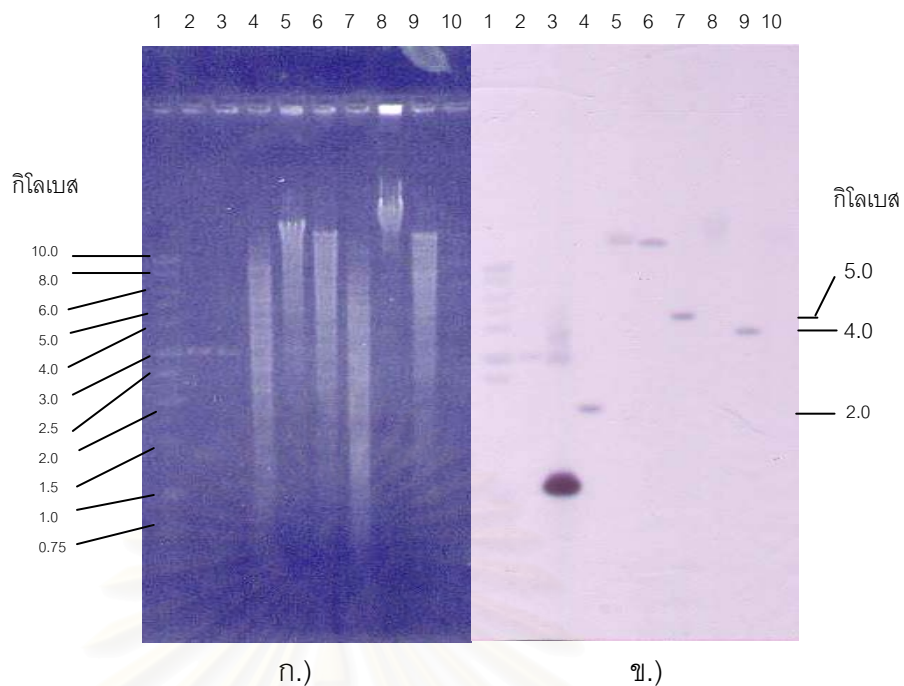
นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสโดยการติดฉลากด้วย DIG ให้ชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า DEX-probe และนำไปใช้ในการติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีไฮบริดเซชันในขั้นตอนต่อไป

#### 4.2 ติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสด้วยเทคนิค Southern hybridization

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 6 ชนิด ได้แก่ *Bam*HI, *Bgl*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I และ *Xho*I และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วจึงทำ Southern hybridization ตามวิธีการในข้อ 3.12 โดยใช้ DEX-probe เป็นดีเอ็นเอติดตาม ผลการติดตามดังแสดงในรูปที่ 4.2 จากรูปพบว่าเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ให้สัญญาณจากการไฮบริดซ์ขนาดต่างกัน ซึ่งในที่นี้สัญญาณที่ได้จากการตัดด้วย *Bam*HI (ช่องที่ 4), *Sma*I (ช่องที่ 7) และ *Xho*I (ช่องที่ 9) มีขนาดประมาณ 1.9, 5 และ 4 กิโลเบสตามลำดับ ซึ่งเหมาะสมในการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสซึ่งจะกล่าวในลำดับต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย DEX-probe

- ช่องที่ 1 และ 10      1 kb DNA ladder และ  $\lambda$ /HindIII marker ตามลำดับ
- ช่องที่ 2              pGEM-7Zf(+) ตัดด้วย *EcoRI* (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 3              pDEX ตัดด้วย *BamHI* และ *EcoRI* (ตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องที่ 4-9            จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *BamHI*, *BglII*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI* และ *XhoI* ตามลำดับ

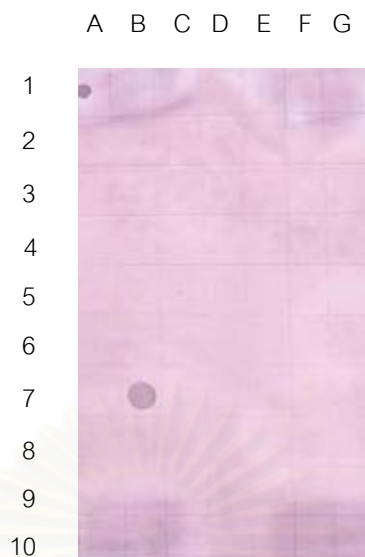
#### 4.3 โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจากซันดีเอ็นเอที่ติดตามได้จาก Southern hybridization

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI, *Sma*I และ *Xho*I ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกซันดีเอ็นเอออกจากกันตามขนาด และคัดแยกเฉพาะซันดีเอ็นเอในบริเวณที่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์มาโคลนเข้าตำแหน่ง *Bam*HI, *Sma*I และ *Xho*I ของพลาสมิดพาหะ pGEM-7Zf(+) ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  การคัดเลือกโคลนที่มียีนเดกซ์แทรนเนสโดยนำมาสกัดพลาสมิดและทำ Dot blot hybridization ด้วย DEX-probe ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากผลที่ได้พบว่าโคลน B7 ซึ่งเป็นโคลนของซันดีเอ็นเอ *Bam*HI มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ จึงนำโคลน B7 นี้มาแยกสกัดพลาสมิดและตรวจสอบขนาดซันดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยตัดด้วย *Bam*HI แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าโคลน B7 มีซันดีเอ็นเอสอดแทรก *Bam*HI ขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pSUDEX1



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.3 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Bam*HI ด้วย DEX-probe

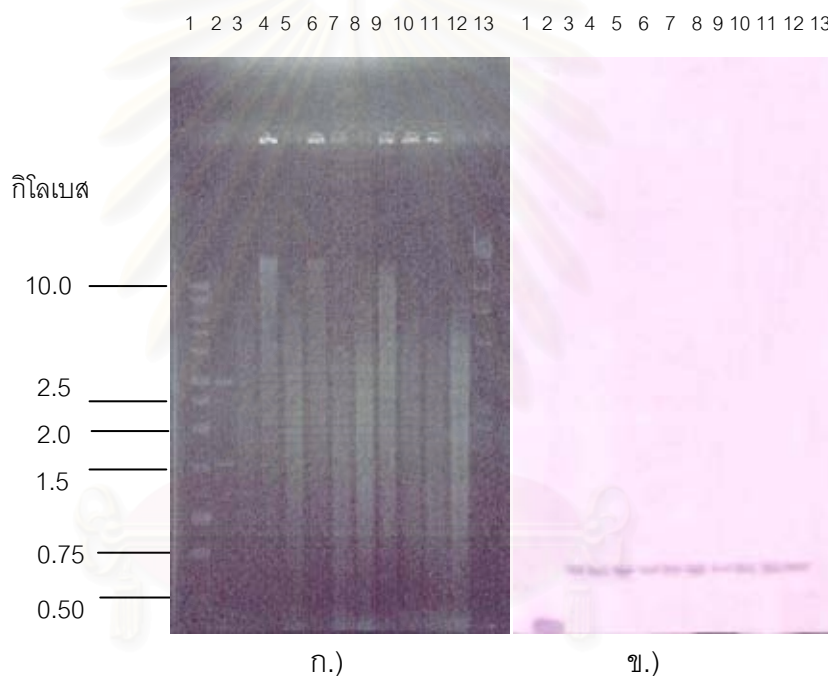
- ช่องที่ A1                      พลาสมิด pDEX (ตัวควบคุมผลบวก)  
 ช่องที่ A2                      พลาสมิด pGEM-7Zf(+) (ตัวควบคุมผลลบ)  
 ช่องที่ C1 ถึง G10      รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ใช้ *Bam*HI

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX1 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยไพรมเมอร์ T7, SP6, DEX1, DEX2 และ DEX3 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI ที่โคลนได้ และนำไปเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 มีความเหมือน 74.9, 74.3 และ 68.9% กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991), ยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) และยีนไฮโซมอลโท-ไทรโอเดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* สายพันธุ์ 0407 (Mizuno และคณะ, 1999) ตามลำดับ แต่ชิ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 ที่ได้ยังไม่ครบกรอบอ่านรหัสเปิดและไม่พบรหัสหยุด (stop codon) จึงต้องสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือและโคลนยีนเดกซ์แทรนให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดต่อไป

#### 4.4 โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิด

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 4.3 มาหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ทั้งหมดในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอมีตำแหน่งจดจำของ *Pst*I ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จึงนำพลาสมิด pSUDEX1 มาตัดด้วย *Pst*I และ *Bam*HI ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390 คู่เบส นำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนส่วนที่เหลือโดยนำมาติดฉลากด้วย DIG และตั้งชื่อว่า PB-probe

ติดตามยีนส่วนที่เหลือด้วยวิธี Southern hybridization ด้วยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย PB-probe

ช่องที่ 1 และ 13 1 kb DNA ladder และ  $\lambda$ /HindIII marker ตามลำดับ

ช่องที่ 2 pSUDEX1 ตัดด้วย *Pst*I-BamHI (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ 3-12 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *Pst*I, *Pst*I-BglII, *Pst*I-EcoRI, *Pst*I-HindIII, *Pst*I-NarI, *Pst*I-NcoI, *Pst*I-SacI, *Pst*I-SalI, *Pst*I-SmaI และ *Pst*I-XhoI ตามลำดับ

จากผลการทำ Southern hybridization พบว่าไม่ว่าจะทำการตัดด้วย *Pst*I เพียงชนิดเดียว หรือการตัด *Pst*I ร่วมกับเรสทริกชันเอนไซม์อื่น จะให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ขนาดเดียวกัน ประมาณ 0.6 กิโลเบส แสดงว่าดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในบริเวณถัดจาก ซันดีเอ็นเอ *Bam*HI ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX1 นี้มีตำแหน่งตัดของ *Pst*I ก่อนตำแหน่ง ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์อื่นๆที่เลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นในขั้นตอนการโคลนยีนส่วนที่เหลือ จึงเลือกโคลนซันดีเอ็นเอ *Pst*I โดยติดตามยีนเดคซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือด้วย PB-probe

โคลนยีนเดคซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือโดยการตัดจีโนมดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วย *Pst*I สกัดดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์และ โคลนเข้าตำแหน่ง *Pst*I ของ pGEM-5Zf(+) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้ายัง *E. coli* DH5 $\alpha$  ทำการ คัดเลือกโคลนที่มียีนเดคซ์แทรนเนสโดยนำมาสกัดพลาสมิดและทำ Dot blot hybridization ด้วย PB-probe ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากผลที่ได้พบว่าโคลน C5, E4 และ F8 มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่ต้องการ แต่กลุ่ม C5 เกิดสัญญาณเข้มที่สุดจึงนำโคลน C5 นี้มาแยกสกัดพลาสมิดและตรวจสอบ ขนาดซันดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยตัดด้วย *Pst*I แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าโคลน C5 มี pGEM-5Zf(+) ที่มีซันดีเอ็นเอสอดแทรก *Pst*I ขนาด ประมาณ 0.6 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pSUDEX2



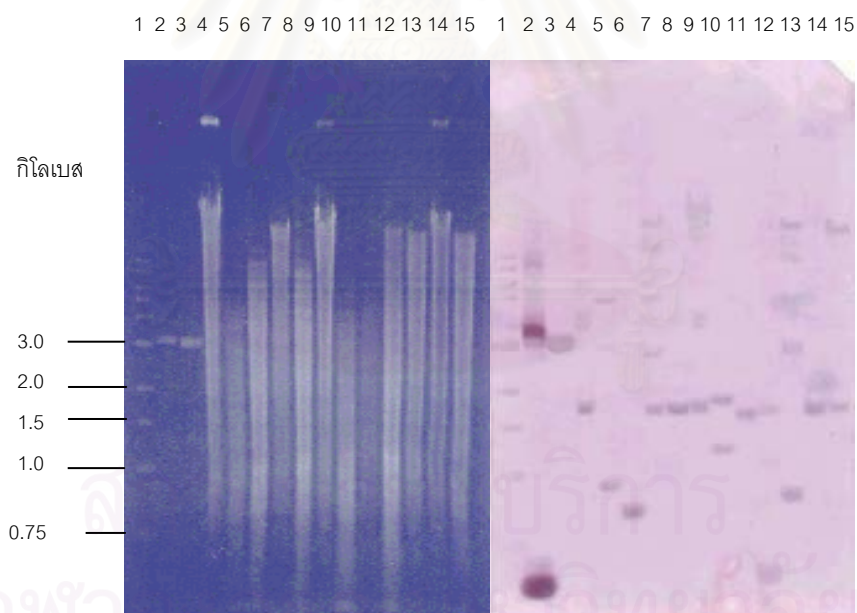
รูปที่ 4.5 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลน ที่มีซันดีเอ็นเอสอดแทรก *Pst*I จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วย PB-probe

ช่องที่ A1 และ F9	พลาสมิด pSUDEX1 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 และ E9	พลาสมิด pGEM-5Zf(+) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ C1 ถึง D9	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนโดยใช้ <i>Pst</i> I

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX2 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ SUDEX2 ไปเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าซันดีเอ็นเอ SUDEX2 มีความต่อเนื่องกับซันดีเอ็นเอ SUDEX1 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าซันดีเอ็นเอ SUDEX1 ที่โคลนได้ยังไม่ครบกรอบอ่านรหัสเปิดและไม่พบรหัสหยุด (stop codon) จึงต้องสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือและโคลนยีนเดกซ์แทรนให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิดต่อไป

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอ *Pst*I ใน pSUDEX2 มาหาตำแหน่งตัดเรสทริกชันเอนไซม์ทั้งหมดในซันดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าในส่วนท้ายของซันดีเอ็นเอมีตำแหน่งจดจำของ *Bam*HI จึงนำพลาสมิด pSUDEX2 มาตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*I ได้ซันดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส นำซันดีเอ็นเอนี้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนส่วนที่เหลือโดยนำมาติดฉลากด้วย DIG และตั้งชื่อว่า BP-probe

ติดตามยีนส่วนที่เหลือด้วยวิธี Southern hybridization ด้วยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



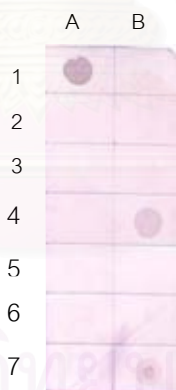
รูปที่ 4.6 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วย BP-probe

ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder และ  $\lambda$ /*Hind*III marker ตามลำดับ

ช่องที่ 2 pSUDEX2 ตัดด้วย *Bam*HI –*Pst*I (ตัวควบคุมผลบวก)

- ช่องที่ 3 pGEM-5Zf(+) ตัดด้วย *Pst*I (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ 4-15 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI, *Bam*HI-SmaI, *Bam*HI-XhoI, *Bam*HI-BglII, *Bam*HI-EcoRI, *Bam*HI-HindIII, *Bam*HI-NarI, *Bam*HI-NcoI, *Bam*HI-PstI, *Bam*HI-SalI, *Bam*HI-XbaI และ *Bam*HI-SacI ตามลำดับ

จากผลการทำ Southern hybridization พบว่าการตัดด้วย *Bam*HI ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือโดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 อย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI สกัดดีเอ็นเอจากเจลบริเวณที่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์และโคลนเข้า pGEM-3Zf(+) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้ายัง *E. coli* DH5 $\alpha$  ทำการคัดเลือกโคลนที่มียีนเดกซ์แทรนเนสโดยนำมาสกัดพลาสมิดและทำ Dot blot hybridization ด้วย BP-probe ดังแสดงในรูปที่ 4.7 จากผลที่ได้พบว่าโคลน B4 มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ จึงนำโคลน B4 นี้มาแยกสกัดพลาสมิดและตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่โคลนได้โดยตัดด้วย *Bam*HI แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าโคลน B4 มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Bam*HI ขนาด ประมาณ 1.6 กิโลเบสอยู่ในบริเวณโคลน ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pSUDEX3



รูปที่ 4.7 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วย BP-probe

- ช่องที่ A1 และ B7 พลาสมิด pSUDEX2 (ตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องที่ A2 พลาสมิด pGEM-3Zf(+) (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องที่ A3 ถึง B6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนโดยใช้ *Bam*HI

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSUDEX3 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 โดยการใช้โปรแกรม T7, SP6, DEX4, DEX5 และ DEX6 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่โคลนได้มาเชื่อมให้ต่อเนื่องกันเพื่อนำไปวิเคราะห์กรอบอ่านรหัสเปิดด้วยโปรแกรม DNASIS พบกรอบอ่านรหัสเปิดที่สมบูรณ์ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องของยีนดีเอ็นเอที่โคลนได้ทั้งหมดมาหากรอบอ่านรหัสเปิดด้วยโปรแกรม DNASIS ดังแสดงในรูปที่ 4.8 จากรูปพบว่าตำแหน่งที่ถอดรหัสเป็นยีนเดกซ์แทรนเนสคือลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 468-2366 คิดเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1899 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 633 หมู่ (SDX) มีน้ำหนักโมเลกุลโดยคาดประมาณ 70.3 กิโลดัลตัน และพบบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณจับเกาะของไรโบโซม (RBS) อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้น 5 คู่เบสและพบบริเวณ inverted repeat อยู่หลังรหัสหยุด 26 คู่เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนส (sdx) ที่ได้ในงานวิจัยนี้กับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือน 83.2% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) , 82.3% กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) และ 65.2% กับยีนไอโซมอลโทโทรโอ-เดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999) ดังแสดงในภาคผนวก ค4, ค5 และ ค6 ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน sdx กับเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่ามีความเหมือน 83% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) 82% กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) และ 79% กับยีนไอโซมอลโทโทรโอ-เดกซ์แทรนเนส ของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999) ดังแสดงในภาคผนวก ค7, ค8 และ ค9 ตามลำดับ จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของยีนดีเอ็นเอ SUDEX โดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.9

เมื่อวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยโปรแกรม CLUSTAL X ร่วมกับกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ที่ถูกจัดไว้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน 5 ชนิด โดย Aoki และ Sakano (1997) ได้แก่เอนโดเดกซ์แทรนเนส 3 ชนิด จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 5' GGATCCCGGTAAACCCCAACCACACCTGGCTCAACGCCGAAGCGCAGAGGACCGACCCCG  
 61 GCTCCGTGTTTCGCCTGGTACCGCCGGCTGGTCCGGTTCGGCATGAAGAGACTGTCCCTCA  
 121 TCGACGGGGCGCTTCACCCCTGCTGTACCCGGAGGACCCGCAACTGTTTCGCCTACACTCGCA  
 181 CCAACGAAGACACCAGTCTGCTGGTCCCTGGCCAACCTGCTCCGCCGAATCTGTTCCCTCTGG  
 241 GCGCGGAAATCGAAACCCGGATGGGGCGCATGCGGACGTTCTCCTGAATAACCAGCCTGACG  
 301 CTAACCTCGCCAGCAATTGCGGCCCTGGGAGGTGATCGTCCCTCCGTAAACGCCTCAGCT  
 361 GAAGTAACCCATGGCCGGAAAAACCCGGTACCCGCACAACGGAGTGTGCTGCTACTCAA

**SD**

421 GGAGCAGTCTCCATGGGCACAACGCCCGATTGACGA**GAGGAA**CTAT**CATG**CCCGGATCAG  
 1 **M P G S G**

481 GGCTGACGCTACTAGCCAAAACCATCACCATCGCCGCAGCCACCGTGTGGTGGGCAGCG  
 6 **L T L L A K T I T I A A A T V L V G S G**

541 GCGCTGCCATCCCGGCACAGGCCACCGGCAGCACGCCAGCTGACCCGAAGAAAGCCGCCG  
 26 **A A I P A Q A T G S T P A D P K K A A E**

601 AAGTCAGCACCGTGGACAACGGCAACCTGCACACCTGGTGGCATGACAACGGGGTCTTCA  
 46 **V S T V D N G N L H T W W H D N G V F N**

661 ACACCGAAGGCCCCACCGGGGACAACGAGGTCCGCCGGTCTCCTTCTACGACGTCCAGG  
 66 **T E G P T G D N E V R R S S F Y D V Q V**

721 TTGCGCAGGCAACGCAGCCTGACAAGGCGTACGACGCGTTCACGTACATGAGCATCCCCA  
 86 **A Q A T Q P D K A Y D A F T Y M S I P R**

781 GGAGCGGGAAGGGCAAGATCGGCTACACCAAGGAGGACGGCGCCGAGTTCCTCCTCCAGG  
 106 **S G K G K I G Y T K E D G A E F S S Q A**

841 CGGGCCTGTCCATGAGCTGGGCCAGCTTCGAATATGCCAAGGACGTCTGGGTGGACGTCA  
 126 **G L S M S W A S F E Y A K D V W V D V N**

901 ATCTCAAGACCGGCCAGACCATCACATCGGCCGACCAGGTCCAGATCCGGCCCAGCAGCT  
 146 **L K T G Q T I T S A D Q V Q I R P S S Y**

961 ACAACTTCGAAAAACAGCTCGTGGACGCGGACACCGTAAAGATCAAGGTGCCATACTCTG  
 166 **N F E K Q L V D A D T V K I K V P Y S D**

1021 ACGCCGGATAACCGTTCTCGGTGGAGTTCGAGCCGCAGCTGTACACGGCGTACAACGACA  
 186 **A G Y R F S V E F E P Q L Y T A Y N D M**

1081 TGAGCGGCGACAGCGGCAAGCTCACCACCGAAGCCGAGGGCAACCGCGCCATCCACACTG  
 206 **S G D S G K L T T E A E G N R A I H T E**

1141 AGCCTCGCAACTCGATGATGATCTTCGCCGAGCCCAAGCTCCGGGGCGAGCAGAAGGAGC  
 226 **P R N S M M I F A E P K L R G E Q K E R**

1201 GGCTGATTCCCACGGAGGAGTCAGGCAGCATCCACTACCCGGCCGAAGGTGAGGTAACCA  
 246 **L I P T E E S G S I H Y P A E G E V T N**

1261 ACCTCAACACCGTTACCGAAGACATCATCTACTTCAAGCCCGGCACCTACAGCATGGGCT  
 266 **L N T V T E D I I Y F K P G T Y S M G S**

1321 CGGACTACCATGCCGTCCCTGCCGCCAACGTCAAGTGGGTGTATCTGGCCCCAGGCGCCT  
 286 **D Y H A V L P P N V K W V Y L A P G A Y**

1381 ACGTGAAGGGAGCCTTCCGGTTCCTTCCACGACAACCAAAGCCAGTACAAGGTCACCGGCT  
 306 **V K G A F R F F H D N Q S Q Y K V T G Y**

1441 ATGGCGTCCCTCCTCCGGCGAGCAATACGTATACGAGGCGGACACGAACAACGATTACAACC  
 326 **G V L S G E Q Y V Y E A D T N N D Y N H**



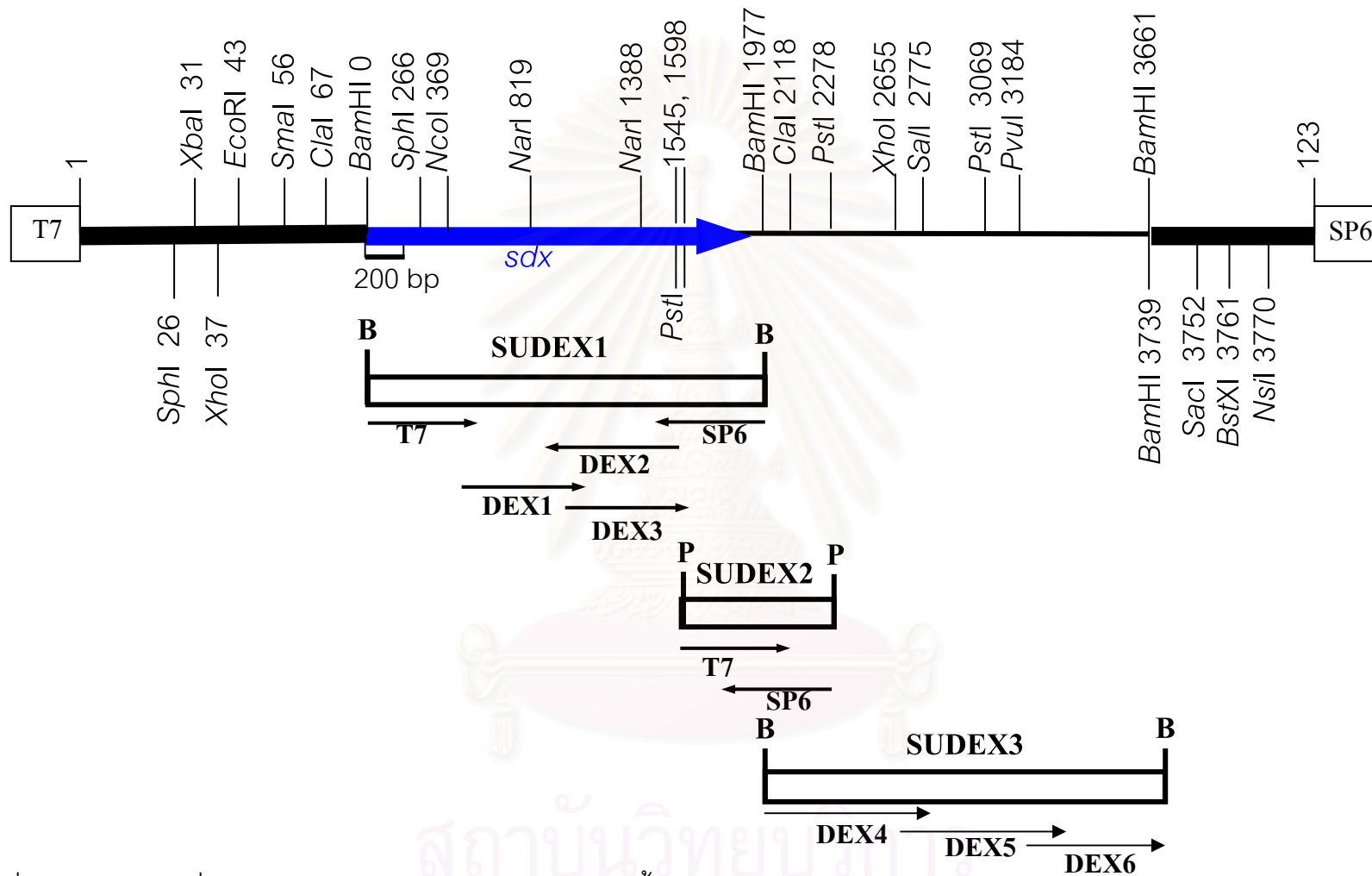
1501 ATCTCAGCGGGGCGTCCAACCTGCCACTCATCGTGCGTGAAGATGCTGCAGTTCGCGTCAG  
 346 L S G A S N C H S S C V K M L Q F A S A  
 1561 CCGACGCCGAGCAGAAGCTGGACCTGCAGGGCGTCACCATCAATGAACCGCCCTACCACT  
 366 D A E Q K L D L Q G V T I N E P P Y H S  
 1621 CGTTTGTGGTCTACGGGAACGAGCAGACCTTCCACATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGG  
 386 A V V Y G N E Q T F H M N V E N Y K Q V  
 1681 TGGGCAGCTGGTACTGGCAAACGAGCGGCATCGAGCTGTACAAGGGCAGCAGCATGAAGA  
 406 G S W Y W Q T D G I E L Y K G S S M K N  
 1741 ACACGTTCTTCAACTCCAACGACGACGCTACTGAAGATGTACCACAGCGACGTCCACATTG  
 426 T F F N S N D D V L K M Y H S D V T I D  
 1801 ATAACACCGTGATCTGGAAAAACGAGAACGGACCCGTGGTCCAGTGGGGCTGGACGCCAC  
 446 N T V I W K N E N G P V V Q W G W T P R  
 1861 GGAACATCGACAACGTGAACGTCACCAACACCTCGGTTCATCCACAACCGGATGTACTGGA  
 466 N I D N V N V T N T S V I H N R M Y W K  
 1921 AGGACGTCAAGTACAACACTTGCATCTTCAATTCCCTCCTCTCACTGGGAGGACATGGGAT  
 486 D V K Y N T C I F N S S S H W E D M G S  
 1981 CCACCATCAAGGCGGACCCACCACCACGGTCAAGAACATGTCGTTTCGAAAACCTTACCGG  
 506 T I K A D P T T T V K N M S F E N F T V  
 2041 TTGAGGGCATGGCCAACCTGCGCCATCCGCGTCTACGCCCTGTCCAACACCGAGAACATCA  
 526 E G M A N C A I R V Y A L S N T E N I N  
 2101 ACATCAAGAATCTCAAGATCGATAGCTGGAACGGACTCGACTGGACCTCCAGGTCAGCC  
 546 I K N L K I D S W N G L D W T S Q V S H  
 2161 ATCTCAAGCGCTACACCAACCCCGCGGTGAAAAGGTGACCATCGGCAACGAGGTTCCCTG  
 566 L K R Y T N P A G E K V T I G N E V P A  
 2221 CCGGCAACGGCCTTGCCCTGGAGAACTACTCGATAGGCGGCGAAGTAATCGAGAAATCTG  
 586 G N G L A L E N Y S I G G E V I E K S A  
 2281 CAGGCAACTGGGCCGACTACCGGCTGGGCCGGCTTGGCTTCGACGGCGAGAACTGGGACA  
 606 G N W A D Y R L G R L G F D G E N W D S  
 2341 GCTGGAACGCGTTTAAGTCCACGCCCT**TAAC**GGACTGGGTTCCAACAGCGTCTCGGGGGG  
 626 W N A A K S T P \*  
 2401 CGGAAAGCCGAACAAAACGGCTGACCGCCCCCTTTGATCTCCGCTCAAGCGTCCCTACGG  
 2461 AAAGGACCACCATGACCGTCAAGCCCCGCGACGGCCAGCCATCTCATTTGGCATCGACGTAG  
 2521 GCGGAACCGGCATCAAAGGCGGCATTGTCAACGTCGCCCTCCGGCACCCCTTGCTGGACCTT  
 2581 CAATCCGGATGGAGACACCCAGGCCCGGACCCCTCCGCTGTGGCCGCCGTGGTGTCCA  
 2641 TCCTTGTTGCCCACTCGAGGACATGCCTGGCTGTCCCCACAGCAGCCAGCCGGTGGGAA  
 2701 TTACCTTCCCCGGTATCATCCAGAACGGCATCGCCCGCTCGGCCGCAACATGGACAACCT  
 2761 CATGGATCGGAGTCGACCGGCTGCGATCTTTTCCGCCGGACTCCAGCGGGACGTCGTGG  
 2821 TGTTAAACGATGCCGATGCCGAGGACTCGCCGAAGCCACGTGCGGTGCGGGCCGGGGAA  
 2881 TCCCGGGAACAGTGCTGGTTCATCACCTTGGGACGGGGATCGGCTCCGCCCTGGTGTTCG  
 2941 ACGGCAAACCTGGTGCCGAACCGGAATTTGGGCCACCTTGCCATTGACGGCTTCGCGGCGG  
 3001 AAATTGCTGCCTCGGCCGTGGCCCCGCGAGCGGACGGCATCACATGGGCGGAGTACAGCG  
 3061 TCAGGCTGCAGCGCTACTTCTCCACCTGGAGTTCATCTTCTCCCTGAACTGTTTCGTGG  
 3121 TGGGCGGCGGGATATCGGCCTGCACAGACCTGTACCTCCCGTTGCTAAACCTGCGGAGTC  
 3181 CGATCGTGGCCCGCCGCTTGCAGAAATGAGGCAGGAATTAATTGGCGCCGCACTCGCAGCCG  
 3241 GGGAAACCCGACCCGGCTCCGCTACTGCCGCCATCCCTGCTGCCTACGTAGCGTCAGCCCC

3301 GGTTCAGGTACCGCAGCAGGACCACCCCGTTGCCGAAACGGCGGCTTTCCGCCAGGTCCA  
 3361 GGTCCGCGGTGAAATCGGACGACTGGAACACCCCGCCGCTGGCCCACCACCACCGGAT  
 3421 TGACGTAGATCCGGAACTCGTCCACCAGGCCGTGGCGCATGAACGTTCCGGCAAGGTCCG  
 3481 CGCCGCTCATGATGAGGTCGCCGCCGGCTTCGCCCTTCAGTGCCCGGATCTCTTCGGGAA  
 3541 CGACGCCCGGCAAAACACCTTCGCGTTCGGGCCCGCCGTGGTGAGGGTGCGGGAGAAGACGA  
 3601 ACTTGGGCAGGCGGCGCCAGATGCCCGGAAACTCGGCCATGGCCGGGGTGCTGTCCGGA  
 3661 TCC

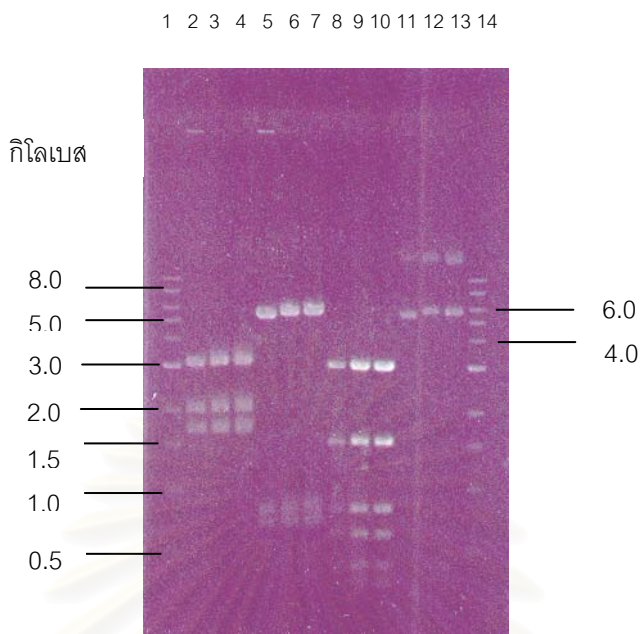
รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ซันดีเอ็นเอ* เอสอดแทรกในพลาสมิด pSUDEX1, pSUDEX2 และ pSUDEX3 ด้วยตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบแสดงบริเวณที่เป็น Shine-Dalgarno sequence (SD) ลำดับกรดอะมิโนที่แสดงด้วยตัวอักษรหนา 32 หมู่ คือบริเวณที่คาดว่าเป็น signal peptide และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้หลังรหัสสิ้นสุดการถอดรหัสแสดงบริเวณที่เป็น inverted repeat

#### 4.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ SUDEX3 เข้าสู่พลาสมิด pSUDEX1

จากรูปที่ 4.9 จะเห็นว่าซันดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 เป็นซันดีเอ็นเอที่มีความต่อเนื่องกัน โดยมีจุดเชื่อมต่อปลายซันดีเอ็นเอเป็นตำแหน่ง *Bam*HI (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1977 ของดีเอ็นเอที่โคลนได้ทั้งหมด) การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 จะได้ซันดีเอ็นเอที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดของยีน *sdx* ที่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงตัดพลาสมิด pSUDEX1 แบบบางส่วนด้วย *Bam*HI โดยการแปรผันเวลา และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดเจลในบริเวณที่มีซันดีเอ็นเอ pSUDEX1 ปลายเปิดขนาดประมาณ 4.9 กิโลเบส มาทำบริสุทธิ์ และนำมาเชื่อมต่อกับซันดีเอ็นเอ SUDEX3 โดยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA) แล้วทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่ผสมเบลูเดกซ์แทน 0.5% พบทั้งหมด 3 โคลนคือ B36, D1 และ D22 ที่เกิดวงใสขนาดเล็กบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ตรวจสอบแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดจากโคลนแต่ละชนิด โดยสกัดพลาสมิดมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีตำแหน่งตัดทั้งในซันดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 เช่น *Pst*I เป็นต้น แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของซันดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.10



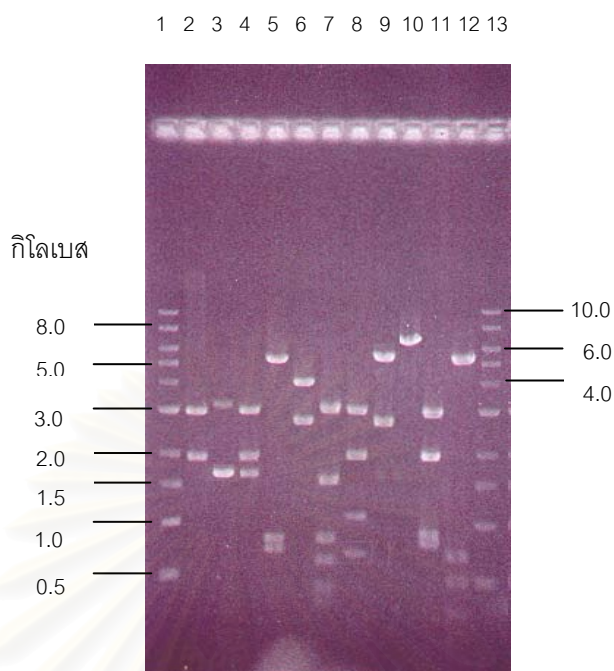
รูปที่ 4.9 แสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pSUDEX รวมทั้งตำแหน่งตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ใน multiple cloning site ของ pGEM-7Zf(+) และแสดงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยไพรเมอร์ต่างๆ B คือ BamHI, P คือ PstI, □ คือชิ้นดีเอ็นเอ, → คือทิศทางของไพรเมอร์, **➡** คือกรอบอ่านรหัสเปิดและทิศทางของยีน sdx และ **■** คือบริเวณ multiple cloning site ของ pGEM-7Zf(+)



รูปที่ 4.10 ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D2 ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

- ช่องที่ 1 และ 14 1 kb DNA ladder และ  $\lambda$ HindIII marker ตามลำดับ
- ช่องที่ 2-4 พลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D2 ตัดด้วย *Bam*HI ตามลำดับ
- ช่องที่ 5-7 พลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D2 ตัดด้วย *Pst*I ตามลำดับ
- ช่องที่ 8-10 พลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D2 ตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*I ตามลำดับ
- ช่องที่ 11-13 พลาสมิดของโคลน B36, D1 และ D2 (intact plasmids) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาขนาดขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดของโคลน B22, D1 และ D22 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 4.10 พบว่าพลาสมิดของโคลนทั้ง 3 มีขนาดและจำนวนขึ้นดีเอ็นเอเท่ากัน จึงเป็นไปได้ว่าโคลนทั้ง 3 มีพลาสมิดชนิดเดียวกันคือพลาสมิด pSUDEX1 ที่เชื่อมต่อกับขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 ในทิศทางเดียวกัน จึงสุ่มเลือกโคลน B36 (*E. coli* SUDEX) ที่มีพลาสมิด pSUDEX มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีตำแหน่งตัดในขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX และนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบทิศทางและการเรียงตัวของขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pSUDEX1 ดังรูปที่ 4.11 เมื่อพิจารณารูปที่ 4.11 พบว่าพลาสมิด pSUDEX ประกอบด้วย pSUDEX1 และขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX3 ที่มีการเรียงตัวของขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 ที่ถูกต้องได้กรอบอ่านรหัสเปิดของยีน *sdx* ครบถ้วนดังรูปที่ 4.9 เพราะมีขนาดและจำนวนขึ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้องตามแผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้



รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pSUDEX ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ชนิดต่างๆ

- |                  |   |
|------------------|---|
| ช่องที่ 1 และ 13 | 1 kb DNA ladder                               |
| ช่องที่ 2        | pSUDEX1 ตัดด้วย <i>Bam</i> HI                 |
| ช่องที่ 3        | pSUDEX3 ตัดด้วย <i>Bam</i> HI                 |
| ช่องที่ 4        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Bam</i> HI                  |
| ช่องที่ 5        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Pst</i> I                   |
| ช่องที่ 6        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Xho</i> I                   |
| ช่องที่ 7        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> I |
| ช่องที่ 8        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Xho</i> I |
| ช่องที่ 9        | pSUDEX ตัดด้วย <i>Pst</i> I และ <i>Xho</i> I  |
| ช่องที่ 10       | pSUDEX ตัดด้วย <i>Sal</i> I                   |
| ช่องที่ 11       | pSUDEX ตัดด้วย <i>Sal</i> I และ <i>Bam</i> HI |
| ช่องที่ 12       | pSUDEX ตัดด้วย <i>Sal</i> I และ <i>Pst</i> I  |

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยยับยั้งการผลิตเดกซ์แทรนและสามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ของเดกซ์แทรน จึงช่วยลดการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียต่อผิวฟันและใช้ในการป้องกันฟันผุได้ (Fitzgerald และคณะ, 1968) งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษายีนที่ประมวลรหัสสร้างเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 การแยกยีนเดกซ์แทรนเนสจากจีโนมิกดีเอ็นเอเริ่มจากทำ Southern hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยการหาบริเวณอนุรักษ์ของยีนทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ ยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 และ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 และยีนไอโซมอลโทโทรโอเดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* สายพันธุ์ 0407 พบว่าเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DEXFWD2 กับ DEXREV และอุณหภูมิช่วง annealing 60<sup>o</sup>ซ เป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส และผลการวิเคราะห์ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้พบว่ามีค่าเหมือนสูงกับเดกซ์แทรนเนสทั้งสามชนิดที่นำมาใช้วิเคราะห์หาบริเวณอนุรักษ์เพื่อสร้างดีเอ็นเอติดตามโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและสามารถใช้ติดตามยีนที่ประมวลรหัสสร้างเดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทำ Southern hybridization เพื่อติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสมีจำนวนชุดของยีนเพียงหนึ่งชุด (single copy) ขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI, *Sma*I และ *Xho*I เกิดสัญญาณบวกกับดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe ที่ตำแหน่งมาถน 1.9, 5 และ 4 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดที่มีความเหมาะสมในการโคลนเข้าพลาสมิดพาหะ แต่ขึ้นดีเอ็นเอ *Sma*I มีปลายที่ไม่เหมาะสมในการทำห้องสมุดจีโนม (genomic library) เพราะให้จำนวนทรานสเฟอร์แมนที่ต่ำ จึงเลือกโคลนขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI และ *Xho*I เท่านั้น โดยใช้พลาสมิดพาหะชนิด pGEM-7Zf(+) จากการคัดเลือกทรานสเฟอร์แมนของ *E. coli* ด้วยวิธี Dot blot hybridization พบโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI ที่เกิดสัญญาณบวกกับดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ได้ว่า pSUDEX1 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 พบว่ามีขนาด 1,977 คู่เบสและปลาย 3' ของขึ้นดีเอ็นเอมีความเหมือนสูงกับยีนเดกซ์แทรนเนส, เอนโดเดกซ์แทรนเนส และยีนไอโซมอลโทโทรโอเดกซ์แทรนเนส ที่นำมาใช้เป็นกลุ่มยีนตัวแทนในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อสร้างดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe ในขั้นต้น 82.3%, 83.2% และ 65.2% ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ค4 ,ค5 และ ค6 ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าขึ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 จะมีส่วนหนึ่งที่เป็นยีนเดกซ์

แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 แต่เมื่อทำการวิเคราะห์กรอบอ่านรหัสเปิดโดยใช้โปรแกรม DNASIS ไม่พบรหัสหยุดของยีน *sdx* จึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอส่วนที่เหลือของยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม PB-probe ที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอในส่วนปลายทาง 3'-terminal ของชิ้นดีเอ็นเอ SUDEX1 และติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสส่วนที่เหลือถัดมา โดยทำ Southern hybridization และใช้ PB-probe เป็นดีเอ็นเอติดตาม เมื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I ขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส โดยใช้พลาสมิดพาหะชนิด pGEM-5Zf(+) ซึ่งมีตำแหน่งโคลน *Pst*I อยู่ใน multiple cloning site ได้โคลนที่ให้สัญญาณบวกกับ PB-probe และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pSUDEX2 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ SUDEX2 พบว่ามีขนาดเท่ากับ 680 คู่เบส เมื่อนำมาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SUDEX1 มาเชื่อมต่อกับ SUDEX2 พบว่าสามารถติดตามยีนเดกซ์แทรนเนสเพิ่มจากเดิม 302 คู่เบส แต่ยังไม่พบรหัสหยุดครบกรอบอ่านรหัสเปิด จึงสร้างดีเอ็นเอติดตาม BP-probe ที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอในส่วนปลาย 3' ของ SUDEX2 เพื่อใช้ติดตามยีน *sdx* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิด และโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI ขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส ที่ให้สัญญาณบวกกับ BP-probe โดยใช้พลาสมิดพาหะชนิด pGEM-3Zf(+) ให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pSUDEX3 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SUDEX3 พบว่ามีขนาด 1,684 คู่เบส เมื่อเชื่อมต่อข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ SUDEX1 กับ SUDEX3 และวิเคราะห์กรอบอ่านรหัสเปิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่โคลนได้พบกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,899 คู่เบส (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 468-2366) โดยมีรหัสเริ่มต้นและรหัสหยุดของการแปลรหัสเป็น ATG และ TAA ในขณะที่ยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) มีรหัสเริ่มต้นและรหัสหยุดเป็น ATG และ TAG และยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) มีรหัสเริ่มต้นและรหัสหยุดเป็น ATG และ TTA ประมวลรหัสสร้างโปรตีน SDX ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 633 หมู่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70.3 กิโลดัลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์จากการทำ SDS-PAGE คือ 76.3 กิโลดัลตัน (Chareonpornwattana และคณะ, 2001) จากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสจากยีน *sdx* กับเดกซ์แทรนเนสทั้งสามชนิดที่ใช้ในการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์เพื่อสร้างดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe พบบริเวณที่คาดเป็น signal peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 32 หมู่ เช่นเดียวกับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) และไอโซมอลโท-โทรโอเดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 (Mizuno และคณะ, 1999) มี signal peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 49 และ 37 หมู่ตามลำดับ พบบริเวณที่เป็น Shine-Dalgarno sequence อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้น 5 คู่เบส ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 6 คู่เบสคือ GAGGAA เช่นเดียวกับยีนเดกซ์แทรนเนสและยีนเอนโด

เดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 และ *Arthrobacter globiformis* T-3044 และพบบริเวณที่เป็น inverted repeat อยู่หลังรหัสหยุด 26 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้กับยีนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่ามีความเหมือน 82.3% กับยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) 87% กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) และ 83.2% กับยีนไอโซมอลโทไทรโอ-เดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999) และผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีนที่แปลรหัสได้จากยีน *sudex* กับเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ชนิดอื่นจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่ามีความเหมือน 83.2% กับเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) 82.3% กับเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) และ 79% กับไอโซมอลโทไทรโอ-เดกซ์แทรนเนสของ *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999) จากผลการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีน SDX พบว่ามีความเหมือนสูงที่สุดกับเอนโดเดกซ์แทรนเนส จึงมีความเป็นไปได้สูงว่ายีน *sdx* จะประมวลรหัสสร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดเอนโดเดกซ์แทรนเนส ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากโคลนที่สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ โดยการทำให้ thin-layer chromatography และใช้น้ำตาลชนิดเช่น กลูโคสและไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆเป็นสารมาตรฐาน ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลเพียงชนิดเดียวสามารถสรุปได้ว่าเป็นเอกโซเดกซ์แทรนเนส แต่ถ้าได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลหลายๆชนิดจะสรุปได้ว่าเป็นเอนโดเดกซ์แทรนเนส ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Mizuno และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดย thin-layer chromatography และใช้น้ำตาลกลูโคส, มอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอส, ไอโซมอลโทเททราโอส, ไอโซมอลโทเพนทาโอส, ไอโซมอลโทเฮกซาโอส และไอโซมอลโทเฮปทาโอส เป็นสารมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้คือน้ำตาลไอโซมอลโทไทรโอสเพียงชนิดเดียวจึงสรุปได้ว่า *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 สร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดไอโซมอลโท-ไทรโอเดกซ์แทรนเนส

โดยทั่วไปแล้วยีนที่ประมวลรหัสสร้างเอนไซม์ที่อยู่ในวิถีการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกันจะมีการเรียงตัวอยู่ในบริเวณข้างเคียงกัน (operon) บนโครโมโซมดีเอ็นเอ (Ausubel และคณะ, 1987) เช่นในรายงานวิจัยของ Oguma และคณะ (1999) ได้โคลนยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสโดยใช้วิธี shotgun cloning เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ก่อนกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนที่ประมวลรหัสสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสพบว่ามีกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนเอกโซเดกซ์แทรนเนส



การวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X ได้วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SUDEX ร่วมกับเอนไซม์ที่มีการจัดกลุ่มโดยใช้หลักการความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม tfasta ที่พบว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (แฟมิลีที่ 1) โดย Aoki และ Sakano (1997) ซึ่งมีทั้งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ 4 ชนิด และอีก 1 ชนิดไม่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ ได้แก่ เดกซ์แทรนเนส 3 ชนิด จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991) *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999) และ *Penicillium minioluteum* (Garcia และคณะ, 1996) ไอโซมอลโตโทรโอ-เดกซ์แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999) ไอโซพุลลูแลนเนสที่สามารถย่อยพุลลูแลนซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอลโทโทรโอสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคสิติก จาก *Aspergillus niger* (Aoki และ Sakano, 1997) พบบริเวณอนุรักษ์ทั้งสิ้น 7 ที่บริเวณดังกล่าวแสดงในภาคผนวก ค ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์กล่าวคืออาจจะเป็น active site, substrate binding site หรือเป็นบริเวณที่มีความสำคัญกับการม้วนพับตัวของโปรตีนให้เกิดโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ (Mizuno และคณะ, 1999) โดยบริเวณอนุรักษ์ที่ 3 คือ WVYLAPGAYVKGAFRF ซึ่งมีความเหมือนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอนุรักษ์อื่นๆ 6 บริเวณ พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเป็นส่วนมากและจากการวิเคราะห์โดย Mizuno และคณะ (1999) ได้สรุปว่าบริเวณดังกล่าวเป็น hydrophobic core ของโครงสร้างโปรตีนที่พบได้ทั่วไปในเดกซ์แทรนเนส

ในงานวิจัยนี้ได้โคลนยีน *sdx* ให้ครบกรอบอ่านรหัสเปิด โดยการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pSUDEX1 และ ซีนดีเอ็นเอ SUDEX3 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคลนที่สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด LB ที่ผสมด้วยบลูเดกซ์แทรน 0.5% พบโคลนทั้งหมด 3 โคลนที่สามารถสร้างวงใสขนาดเล็กบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวคือ B36, D1 และ D22 จากการวิเคราะห์ความถูกต้องของตำแหน่งตัดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในโคลนทั้งสามเปรียบเทียบกับแผนที่เรสทริกชันที่สร้างได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีนดีเอ็นเอ SUDEX1, SUDEX2 และ SUDEX3 ในรูปที่ 4.9 โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ที่มีตำแหน่งตัดทั้งในซีนดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 คือ *Pst*I พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนทั้งสามมีรูปแบบของซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย *Pst*I เหมือนกันทุกประการ ดังนั้นสรุปได้ว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนทั้งสามเป็นพลาสมิดชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะโคลน B36 มาวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดเรียงตัวของซีนดีเอ็นเอ SUDEX1 และ SUDEX3 เพิ่มเติม โดยสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลน B36 แล้วนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์หลายๆชนิดที่ได้วิเคราะห์แล้วจากข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ไว้ดังรูปที่ 4.9 ผลการตัดแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลน B36 มีตำแหน่งตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆถูกต้องสอดคล้องกับ

แผนที่เรสทริกชันในรูปแบบที่ 4.9 จึงสามารถสรุปได้ว่าโคลน B36 มีการมียีน *sdx* ที่ครบรอบอ่านรหัสเปิด และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวว่า pSUDEX จากการวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อของโคลน B36 โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) ที่ได้จากการบ่มส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อกับเดกซ์แทรน 0.5% ใน 50 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟตพีเพอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 พบว่าในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อของโคลนดังกล่าวไม่มีแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เนื่องจากโคลน B36 เป็นทรานส์ฟอร์มেন্টของ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปแล้วเมื่อโคลนยีนของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีการประมวลรหัสสร้างโปรตีนและสะสมไว้ในส่วนของ periplasm เป็นส่วนใหญ่ดังเช่นรายงานของ Okushima และคณะ (1991) ที่โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. CB-8 เข้าสู่ *E. coli* HB101 และได้วิเคราะห์บริเวณที่มีการสะสมของเดกซ์แทรนเนส โดยการสกัดโปรตีนที่อยู่ในส่วน periplasm และ cytoplasm ด้วยวิธี osmotic shock (Chan และคณะ, 1981) พบว่า *E. coli* จะมีการสะสมเดกซ์แทรนเนสในบริเวณ periplasm เป็นส่วนใหญ่ จึงมีความเป็นไปได้ที่โคลน B36 จะสะสมเดกซ์แทรนเนสไว้ในเซลล์เช่นกัน ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนต่อไปจึงควรสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของโคลน B36 แยกส่วนภายใน periplasm และ cytoplasm และนำมาวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพื่อระบุตำแหน่งที่มีการสะสมเดกซ์แทรนเนสภายในโคลน B36 และเปรียบเทียบแอกติวิตีที่ B36 สร้างได้กับแอกติวิตีที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในระดับสูงโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- จินตกร คุ้มมนสุชาติ. 2542. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณัฐินี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. การแยกโครโมโซมจากแบคทีเรีย. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เล่มที่1. หน้า 11.15-11.17. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

### ภาษาอังกฤษ

- Aoki, H., and Sakano, Y. 1977(a). Molecular cloning and heterologous expression of the isopullulanase gene from *Aspergillus niger* ATCC. 9642. Biochem. J. 323:757-764
- Aoki, H., and Sakano, Y. 1977(b). A classification of dextran-hydrolysing enzymes based on amino acid-sequence similarities. Biochem. J. 323: 859-861
- Arnold, W. N., Nguyen, T. B. P., and Mann, L. C. 1998. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix Schenckii*. Arch. Microbiol. 170(2): 91-98.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley, New York.
- Bailey, R. W., and Clarke, R. T. J. 1959. A bacterial dextranase. Biochem. J. 72: 49-54.
- Barrett, J. F., Barrett, T. A., and Curtiss III, R. 1987. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sobrinus* and cloning of the dextranase gene. Infection and immunity. 55(3):792-802

- Block, P. L., Dooney, C. L., and Howe, E. E. 1969. The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodont. 40: 105-110.
- Burnette, G. W., and Scherp, K. W. 1962. Oral Microbiology and Infectious Disease. pp. 386-401. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Burnette, G. W., and Schuster, G. S. 1978. In Student (ed.). Oral Microbiology and Infectious Disease. pp. 204-209. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Caldwell, R. C., Snadham, H. J., Mann, W. V., Jr., Finn, B., and Formicola, A. J. 1971. The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque young adults and children. J. Am. Dent. Assoc. 82: 124-134.
- Ceska, M., Granath, K., Norrman, B., and Guggenheim, B. 1972. Structural and enzymatic studies on glucan synthesized with glucosyltransferase of some strains of oral streptococci. Acta. Chem. Scand. 26: 2223-2230.
- Chan, S.J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S. D., Marks D. and Steiner, D. F. 1981 Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5401-5405.
- Chareonpornwattana, S., Jiranuntipon, S., Tangjitpinitkarn, S., Thaniyavarn, J., and Thaniyavarn, S. 2001. Dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 and characterization thereof. Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics. 15: 405-410
- Colby, S. M., Whiting, G. C., Tao, L., and Russell, R. R. B. 1995. Insertion inactivation of the *Streptococcus mutans dexA* (dextranase) gene results in altered adherence and dextran catabolism. Microbiology. 141:2929-2936.
- Cole, J. A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochemical Society Transaction. 5(4): 1232-1239.
- Curtiss, R., III. 1985. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 118: 253-277.
- Dewar, M., and Walker, G. J. 1975. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. Caries Research. 9: 21-35

- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K., and Kotani, S. 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38: 374-381.
- Felgenhauer, B., and Trautner, K. 1983. The reciprocal action of extracellular *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and glucanhydrolase. J. Dent. Res. 62: 459.
- Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H., Stoudt, T. H., and Spinell, D. M. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. JADA. 76: 301-304.
- Freedman, M. L., and Guggenheim, B. 1983. Dextran-induced aggregation in a mutant of *Streptococcus sobrinus* 6715-13. Infect. Immun. 41: 264-274.
- Galvez-Mariscal, A., and Lopes-Munguia, A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paccilomyces lilacinus* strain. Applied. Microbiol. Biotechnol. 36: 327-331.
- Garcia, B., Margolles, E., Roca, H., Mateu, D., Raices, M., Gonzales, M. E., Herrera, L., and Delgado, J. 1996. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. FEMS Microbiol. Lett. 143: 175-183.
- Gibbons, R. J., and Van Houte, J. 1980. Receptors and recognition, Series B. vol. 6. In Beachey, E.H. (ed.), Bacterial Adherence. pp. 66-103. London: Chapman and Hall.
- Guggenheim, B. 1970. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int. Dent. J. 20(4): 657-678.
- Hamada, S., Ooshima, T., Masuda, N., Mizuno, J., and Sobue, S. 1976. Inhibition of rat dental caries by dextranase from a strain of *Spicaria violacea*. Jpn. J. Microbiol. 20: 321-330.
- Hamada, S., and Slade, H. D. 1980. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44: 371-444.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hattori, A., and Ishibashi, K. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45(10): 2347-2349.

- Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1995. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* ingbritt *dexA* gene encoding extracellular dextranase. Microbiol. Immunol. 39(11): 853-860.
- Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Okada, G., and Chiba, S. 1994. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. J. Bacteriol. 176(24): 7730-7734.
- Jensen, B., and Olsen, J. 1996. Extracellular alpha-glucosidase with dextran-hydrolyzing activity from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. Curr. Microbiol. 33(3): 152-155.
- Keyes, P. H. 1968. Research in dental caries. JADA. 76: 1357-1373.
- Keyes, P. H., Hichs, M. A., Goldman, B. M., McCabe, R. M., and Fitzgerald, R. J. 1971. Dispersion of dextranase bacterial plaques on human teeth with dextranase. J. Am. Dent. Assoc. 82: 136-141.
- Kubo, S., Kubota, H., Ohnishi, Y., Morita, T., Matsuya, T., and Matsushiro, A. 1993. Infection and immunity. 61(10): 4375-4381
- Lawman, P., and Bleiweis, A. S. 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 173(23): 7423-7428.
- Leach, S. A. 1969. Dextranase and dental caries. British. Dental. J. : 325-330.
- Marsh, P. D. and Martin, M. V. 1984. Aspects of Microbiology 1. Oral Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 11-25. United of Kingdom: Van Nostrand Reinhold.
- McGhee, J. R., and Michalek, S. M. 1981. Immunology of dental caries: Microbial aspects and local immunity. Ann. Rev. Microbiol. 35: 595-638.
- Melville, T. H., and Russell, C. 1981. Microbiology for Dental Students. 3<sup>rd</sup> ed. pp. 323-338. London: William Medical Book.
- Michalek, S. M., and Childers, N. K. 1990. Development and outlook for a caries vaccine. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1: 37-54.
- Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Kimura, A., and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(9): 1582-1588.

- Murayama, Y. H., Wada, H., Hayashi, T., Uchida, I., Yokomizo, I., and Hamada, S., 1973. Effect of dextranase from *Spicaria violacea* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and human dental plaque. J. Dent. Res. 52: 658-667.
- Noltel, W. A. 1973. Oral Microbiology. pp. 251-270. Saint Louis: The C.V. Mosby Company.
- Oguma, T., Kurokawa, T., Tobe, K., Kitao, S., and Kobayashi, M. 1999. Cloning and sequence analysis of the gene for glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044 and expression in *Escherichia coli* cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(12): 2174-2182.
- Ohnishi, Y., Kubo, S., Ono, Y., Nozaki, M., Gonda, Y., Okano, H., Matsuya, T., Matsushiro, A., and Morita, T. 1995. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. Gene. 156: 93-96.
- Okushima, M., Sugino, D., Kouno, Y., Nakano, S., Miyahara, J., Toda, H., Kubo, S., and Matsushiro, A. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Jpn. J. Genet. 66: 173-187.
- Pleszczynska, M., Szczodrak, J., Rogalski, J. and Fiedurek, J. 1997. Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion products. Mycol. Res. 101(1): 69-72.
- Richards, G. N., and M. Streamer. 1974. Studies on dextranases. Part IV. Mode of action of dextranase *D<sub>7</sub>* on oligosaccharides. Carbohydr. Res. 32: 251-260.
- Russell, R. R. B., and Ferretti, J. J. 1990. Nucleotide sequence of the dextran glucosidase (*dexB*) gene of *Streptococcus mutans*. J. Gen. Microbiol. 136: 803-810.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawai, T., Toriyama, K., and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. J. Biochem. 75: 105-112.

- Schachtele, C. F., Staat, R. H., and Harlander, S. K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-soluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12(2): 309-317.
- Schachtele, C. F. 1982. Postgraduate dental handbook series. vol. 13. In Orland, F.J. (ed.). Microbiology in Clinical Dentistry. pp. 153-168. Massachusetts: John Wright PSG.
- Serhir, B., Dugourd, D., Jacques, M., Higgins, R., and Harel, J. 1997. Cloning and characterization of a dextranase gene (*dexS*) from *Streptococcus suis*. Gene. 190: 257-261
- Shaw, J. H., and Roussos, G. G. 1978. Sweeteners and dental caries. Washington D.C.: Information Retrieval.
- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., and Okada, G. 1998. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(1): 117-122.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23
- Thystrup, A., and Fejerkov, O. 1986. Textbook of Cariology. 1<sup>st</sup> ed. pp. 117-123. Vojens: P.J. Schmidts Bogtrykker.
- Van Houte, J., and Russo, J. 1986. In Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., and McGhee, J. R. (eds.). Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans. pp. 157-167. Netherland: Elsevier Science Publishers.
- Walker, G. J., and Pulkownik, A. 1973. Degradation of dextran by an  $\alpha$ -1,6-glucan glucohydrolase from *Streptococcus mitis*. Carbohydr. Res. 29: 1-14
- Wanda, S. Y., and Curtiss, R., III. 1994. Purification and characterization of *Streptococcus sobrinus* dextranase produced in recombinant *Escherichia coli* and sequence analysis of the dextranase gene. J. Bacteriol. 176(13): 3839-3850.
- Wolinsky, L. E. 1988. Caries and Cariology. In Newman, M. G. and Nisingarrd, R. (eds.). Oral Microbiology and Immunology. pp. 389-409. Jonanovich: W.B. Saunder Company.





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

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

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (2YT broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	16.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ณัฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

เดกซ์แทรน (ความบริสุทธิ์ระดับอุตสาหกรรม)	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน (polypeptone)	10.0	กรัม
$K_2HPO_4$	2.0	กรัม
$KH_2PO_4$	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 จากนั้นใส่เดกซ์แทรนแล้วนำไปละลายโดยการอุ่นด้วยความร้อนและปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 20 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi (ณัฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}C$  เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมาหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำชาม่าเชื่อมซ้ำอีกรอบหนึ่ง

#### 2. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มก./น้ำ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

#### 3. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

RNase A

Collection tube

QIAprep Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

#### 4. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit

ประกอบด้วย

Nal solution

Glassmilk

New wash

ทำการสกัดพลาสמידตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

#### 5. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. . นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

#### 6. Alkaline transfer buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.4 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.0 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 7. Neutralization buffer II

Trismabase	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.0 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 8. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	0.3 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 9. สารละลาย 2XSSC

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 10. สารละลาย 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

#### 11. สารละลาย 0.5XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

## 12. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I

### ประกอบด้วย

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

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

### Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

### Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

## Detection buffer

Trismabase	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 13. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่างเป็น 8.0

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

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 14. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่างเป็น 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที



### 15. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

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

Tris base	242 กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1 มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100 มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

### 17. สารละลายฟีนอล (phenol) อิมัตัว

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 °C จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline .ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครึ่ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ที่ผสม β-mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่นได้ประมาณ 1 เดือน

## 18. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม 1 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

## 19. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C

## 20. สารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด

### สารละลาย I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	25	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

### สารละลาย II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.2 มล. เข้ากับน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 8.8 มล. แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 1.0 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

### สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตตเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. กับกรดอะซีติก เข้มข้นปริมาตร 11.50 มล. นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

## 21. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

## 22. สารละลายโซเดียมอะซีเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

## 23. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

## 24. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ในหลอดปิดสนิทและมีมืด

## 25. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

## ภาคผนวก ค

### การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและโปรตีนโดยโปรแกรม DNASIS, BlastX และการหาบริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสโดยโปรแกรม CLUSTAL X

1. การหาบริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสด้วยโปรแกรม CLUSTAL X เพื่อการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe

Okushima คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991)

Oguma คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

Mizuno คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไอโซมอลโท-โทรโอเดกซ์แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

DEXFWD1, DEXFWD2 และ DEXREV ที่ระบุไว้บนลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงบริเวณที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์

Okushima	1	-----GAATTCCTGGGTCGTCCGGGCGAACTTC
Oguma	933	ACGCCAGGACCCCG--AGTCCGTTTACGGGTGCTACAAACGGCTCATCCAACCTCCGCCAC
Mizuno	5204	GTACCCCGCACCTCACCGTAACACTGTTGACCGTGCCTCGAAGCCCA--CCAGATCGTCACC
Okushima	29	GACGAGCGGACGA----GGTGGATCGTGCG--CACATCTCTCCGAA---TGGT---GA
Oguma	991	GAGGAAACCGGTGATTGTGGACGGAGGTTCAACCTCATACTTGCCGA---CGATCCCCAA
Mizuno	5263	ATGTGCGCCAAGACCGCACTCGGTAACTTGAACCTGCCTCGGCGCAAGCTCGCTGTGGCG
Okushima	75	TTGCTCGCCCA----GTGTGCAGCCTCATGACGATCGCGTTGCTTCTGCTCACGGCCT-
Oguma	1048	ATCTTCGCCCTATACCCGACGATAGTGACACCGAACTCTTCATCGCCGCCAAGCTGCTCA
Mizuno	5323	ATGTTCCGTTACGCCGAGTCAGGTGAAGGCGTCGGCAACGTTCCGGCCCGTCTATGACGGC
Okushima	128	--GGGCCTGTGAC--CGTGGCCCGGA-ATACTCATGGCCTTCGGCTTCGCCCTGCCG--
Oguma	1108	GCGGACCCAGCTGC--GCTACCTGGCG-ACGTTACCGAGGAATGGACGACGACAGCTC
Mizuno	5383	GCCTACTGGGCTGCCGCGACCCGTCGTGGATCAAAGAGTGGCGCTTCGGCGGGGTGCC
Okushima	182	CTGTTGCCACCGTTATCGTCC--TCTACTCATTCCGGTCG--GTTTC--CGGGAATG--G
Oguma	1165	CTGCTCGCTAACCATCCAGGCG--TCCGTGAGCTCCGAG--AACCTCCTGCGCTG--G
Mizuno	5443	GCGTGTTCGACGGTGGCATCGCTCCGGGACACGGACACCAGCGATCCGAACGCACTG
Okushima	234	ACGTAGATGATCAG--GCGCGCCAAATGGAGCTACGGCCTTGGGGGGTG---GTTCTC-
Oguma	1219	GAGGTGATCGTTCT--ACG-ACGCGGCCTCGCGTAAGGCCCTAACAGCCG---GGCCCT
Mizuno	5503	GACGTGATTGTCGGTGAACGCCAAAGCCAGGCAACGGTTCTTGACTGGCACACAGCCTCG
Okushima	287	----CGCTGCACC-----GCATAGCGA-----CTCCGCA---AGCACCAGT
Oguma	1273	CC--CGGCGCACCC-----ACACAAGGAAGTGTGCGGCCCAACCCA---CGGAGCCGT
Mizuno	5563	CCCCGGTGATTCCGATGGTCGGACTGAAACCCCTAACCTCAACCCCAAGGCGGGGCCG
Okushima	322	CCATTG----ACGAGAGGAAACCATC-ATGCCCGGAACAGGGCTAGCCGGCTGGCCAAAC
Oguma	1321	CTCACGCAACGAGAGAGGAAACCATC-ATGCCCACTACAGGCTGAGGCAACTTGCACGAA
Mizuno	5623	AACCTCCGGCCCCGCCTTTCATCATGCCCCGATTGGAACC-AGAAAAAGACCCAA

Okushima 377 GCATGACAGCGGCAGCCGCAGTTTTCTTTATCAGCACACGCGCCGTGCTCCCGGCACAGG  
Oguma 1380 CCATCACCATCCCGTCCCGGCCACGCTGATTTGGTACCAGGTGCCCAATACCGGCACAAG  
Mizuno 5682 CAGTTACAACCCGCAATC-ATTTAGAACAGGGGAAAGCAATGAACATTACCTCCGTTTA

Okushima 437 CTGCCACC-GCACCGGCAGCCGCCCAACAGGGGTACCTGCAGCTCTCAAGGCAGAACGC  
Oguma 1440 CCGGCCCC-G-ACCGGAAA-ATCCACCAA----ACCTGTTG-----AAGAC  
Mizuno 5741 TTGGCTCAGCGTTTTCGCTGCTGCTCCTGCTGCCGGCCCGGGCAGGAACCAGCAGCC

Okushima 496 GCCATCA-----CAACCGTCGACAATGGCAAACCTGCACAGTGGTGGCAGCAGC  
Oguma 1481 GCCCCGG-----TCACCGCGACGTTGGAAACCTGCACACCTGGTGGCAGCAGC  
Mizuno 5801 GCAACAGAACAGACCAGGCTTACCCCTCAGGACCCGACCTGCGGACCTGGTGGCACAAC

Okushima 544 AATGGCGTTTTTCAGCCAGCCACTCCAACACAAAGCAGCGAGGTTCCCGGTCGCTCCTTC  
Oguma 1529 AACGCTGTTTACAACACTGACTCCGCCACCGAGAACGGTGAAGTCCGCCGTCCTCCTTC  
Mizuno 5861 AACTATGAGTACAACGCACCTCACCCACCCAGAACGGCAACGTCGCCGGTCACTCTTC

Okushima 604 TACGATGTGCAGGTTGC-CCAGGCTAATCAGCCGCAGAGCTATAACGACGCTTCAGCTA  
Oguma 1589 TACGACGTGCAGGTCGC-GCAGGCGCACCAACCGGACAAGTTCTTCGACTCAATTCGCCTA  
Mizuno 5921 TACGAGGTGCAGGTTGCCACAGCTGCCGGC-GCTGAAAACAGCTACGACTCCTTCGCGTA

**DEXFWD1**

Okushima 663 CATGAGCATTCCCGCAGCGGAAAGGGCAAGATCCGGCTACACAGAGGAAACGCGCGCTGA  
Oguma 1648 CATGAGCATTCCCGCAGCGGCAAAGGAAAGTCCGGCTACACCAAGGAGGACGCGCGAGA  
Mizuno 5980 TATGAGCATTCCCGCAGCGGAAAGGGGAAGATTGGTTACACAGAACCGGACGCGCGAGA

**DEXFWD2**

Okushima 723 ATTCTCCTCTGACGCCCGCTTACGATGAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACGCCAAGGACGT  
Oguma 1708 GTTCTCCTCCGAAGCAAACTCTCGATGAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACGCCAAGGACGT  
Mizuno 6040 ATTTCTTCTCAGCGAACCTCTCGATGAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACTCCACTGCCGT

Okushima 783 CTGGGTGGAAGTGTAGCCTCCGCACTGGACAGACCATCTCCTCAGCCGACCCAGGTCCAGAT  
Oguma 1768 GTGGGTGACCTCAGCCTGAAGACAGGGCAGACCATCAGCTCAGCCGATGAGGTTTCAGAT  
Mizuno 6100 TTGGGTGGAAGTGAAGCTGACAACCGCCAGACGATTACATCGGTGGAACCCAGGTGTGAT

Okushima 843 CCGCCCGAGCAGCTACAACCTTTGAAAGCAGCTCGTGGATGCAGACACTGTCAAGATCAA  
Oguma 1828 CCGTCCAGCAGTTATGACTTCGAGAAAGACTCGTTCGATGAGGACACCATCAGGATCAA  
Mizuno 6160 CCGTCCAGCAATAACACTTCGAGAAACACTTGTGGACCGGACACGGTCCGATCAA

Okushima 903 GGTCCCTACTCTGACGCGGGCTACAGGTTTTCGGTTCGAATTTGACCCGAGCTTTACAC  
Oguma 1888 GGTCCCTACTCGGACGCGGATACCGTTTCTCCGTCGAATTCGACCCCGAGCTGTATAC  
Mizuno 6220 GGTCCCTAATCGCTATCGGGCTACCGTTCTCAGTTCGAATTCGACCCGCAAAATTTAC

Okushima 963 CGCTACAACGACATGAGCGGCAGCAGCGGCAAACTGACG---ACCAGGCGCCGGCAA  
Oguma 1948 GTCTACAACGATATGTCGGTAACAGCGGAAACTACC---ACTGTCTGCTGAGGGGAA  
Mizuno 6280 CGCTACAACGACATGTCAGGAACTGCCGGGGTGTGACTGAAACCGCGCGCGGGACCA

Okushima 1020 CCGGCCATCCACACCGAGCCACGCAATTCATGATGTTCTTCGCCGAACCGAAGCTTCG  
Oguma 2005 CCGGCCATTCACACCGAGCCGATGAACTCGATGATGATCTTCGCCGAGCCGAGCTCCA  
Mizuno 6340 CCGTGCATCCATACCGAAACCCCGAATCTCATGATGATCTTCGCCGAGCCAACTGGG

Okushima 1080 GGGCGAGCAGAAAGAACGACTGGTCCCGACAGAAGAGTCGGCAGCATCCACTATCCGGA  
Oguma 2065 GGGCGAAGAGGAGAAGCCCTGATCCGAAACCCCTCGTCAGGCAGCATCCACTACCCCGA  
Mizuno 6400 CGGCGGAGGCGGACCGATTGATTTCCACCTCCGATCCGGAACCATCAACTACCCGCA

Okushima 1140 GCCCGGCGAGGTGCGGAACCTGAACTCGGTCAGCGAGGAAATCATCTACTTCGCCCCGG  
Oguma 2125 AGAAGGGGAAGTGAAGACCTCAAACCGTCAACCGAAGAGATCATTTACTTCAAGCCCCG  
Mizuno 6460 GGAAGGCTGTGACAACTGGGTCGGTCAACCGAGGAGGTTCATCTACTTCAGCCCCGG

Okushima 1200 CACCTACAGCATGGGCCCAGACTACCATGAGTCCCTGCCAGCCAACGTCGAAATGGGTCTA  
Oguma 2185 CACCTACCACATGGGCTCGGACTATCATGCGTACTTCCGCCAACGTCGAAATGGGTCTA  
Mizuno 6520 GACCTACTACATGGGATCGGGCCACCGTGCCTCCATGCCGCCAACGTCGAAATGGGTCTA

Okushima 1260 TCTGGACCAAGGGCCCTACGTGAAGGGAGCCTTCGGTTCTTCCAGACACCCAAAGCCA  
Oguma 2245 CCTTGGCCCTGGCGCTACGTGAAGGGCGCTTCGGTTCTTCCAGACACCAGGCACA  
Mizuno 6580 CCTGGCCCCGGGCACTACGTCAAAGGTGCCCTTCTATTTCGCCAGTCCGACGAGGGCGT

Okushima 1320 GTACAAGGTACCCGGATACGGCGTCTCTCCGGCGAGCACTACGTCTACGAGGCGGATAC  
Oguma 2305 GTACAAGGTACCCGGCTACGGGCTCTCTCCGGCGAGCACTACGTCTACGAGGCGGACAC  
Mizuno 6640 CTACAAGGTACCCGGGCGGGGCTCTCTCCGGCGAACAATACGTCTATGAGGCGGACAC

Okushima 1380 GAA**CAACAGTTACCACC**ACTGAGCGGGCGT**CAAACTGCCACTCGT**CCTGT**CTAAAGAT**  
Oguma 2365 CGC**CAACAATTATAATGCC**CTCAGCGGAG**CCCTCAAACTGCCACGT**CACCTGC**GTGAAAAT**  
Mizuno 6700 CAC**CACAGCGGGTATCCG**CACTCAACCG**GTGCAAACTGCCACAATA**CCTGC**GTGAAGAT**

Okushima 1440 GCT**GCAGTTCGC---**TTCCG**CCGACGCGGAGCAGAAGCT**GGAC**CTGCAGGGCGTTACAGT**  
Oguma 2425 GCT**TCAGTTCGA---**ATCCT**CTAAGATCGGACAGCAGCT**GGAC**CTGCAAGGCGTACCCAT**  
Mizuno 6760 GCT**CGAGTTCAGTTCGTCT**CCAC**ATGCAGCAGTACT**GGAC**CTGCAGGGAAATCACCAT**

Okushima 1497 CGC**CGAGCCACCGTACC**ACTCCTTC**GTGGTCTACGGGAACGA--**GC**AAACA-----**  
Oguma 2482 CA**ACGAAACCGCTACC**ACTCCTTC**GTGGTCTACGGCCACGAAGG**CGAAAA**AGAGATAGG**  
Mizuno 6820 CAG**CGAGCCGCTACC**ACTCCTTC**GTGGTCTATGGGCCCGAGAA**GCCT**ATGA-----**

Okushima 1545 -----TT**CCACATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGGT**GGC**AGCTGGTACTGGCA**  
Oguma 2542 CGT**GGAGAACTTCCG**CATGAAC**GTGGAGAACTACAAGCAGGT**CGC**AGCTGGTACTGGCA**  
Mizuno 6873 -----CAT**GGAAATGCGG**GTGG**AACTACAAGCAGGT**CGC**AGITGGTACTGGCA**

Okushima 1596 GAC**AGACGGCATCGAG**CT**GTACAAAAGGCAGCACC**ATGA**AGAACACCTTCTTCAAT**GGCAA  
Oguma 2602 GAC**AGACGGCATCGAG**CT**GTACAAAAGGCAGCACC**ATGA**AGAACACCTTCTTCAAC**GGCAA  
Mizuno 6925 GAC**CGACGGCATGGA**CT**GTACAAAAGGCAGGCGGATGA**CA**ATACTTTTTC**CACT**CCAA**

Okushima 1656 CG**ACGACGTGCTGA**AGAT**GTATCACAGTGAT**GT**CACCATCGATAACACGGT**GT**CTGGAA**  
Oguma 2662 CG**ACGATGTGCTGA**AGAT**GTACCACAGCGAGCTCACCA**TC**GATAACACGGT**AT**TGGAA**  
Mizuno 6985 TG**ACGACGTCTGA**AGCT**GTACCACAGCAAGT**GAC**GGTGGATAACACGGT**GT**CTGGAA**

Okushima 1716 GA**ACGAGAACGGCC**CGT**GATCCAATGGGGCTGGAC**CG**CAAGGAACAT**GC**AACTGTGA**  
Oguma 2722 AA**ACGAGAACGGCC**CGT**GATCCAATGGGGATGGAC**CG**CGGAACAT**GC**AACTGTGA**  
Mizuno 7045 GA**ACGAGAACGGCC**CGT**GATCCAATGGGGCTGGG**CG**CGCAACAT**GC**AACTGTGT**

## DEXREV

Okushima 1776 CGT**CGCAACAGCACGG**T**CATCCACAACCG**AT**GTATTGGAAGGA**CGT**CAAGTACAACAC**  
Oguma 2782 CGT**CACCGACACAACCG**T**CATCCACAACCG**AT**GTACTGGAAGAGACCC**CA**AGTACAACAC**  
Mizuno 7105 CGT**AACCAACACTGAC**GT**CATCCACAACCG**AT**GTATTGGAAGGAC**GT**CAAA**T**ACAACAC**

Okushima 1836 CT**GCATCTCAATTC**CT**CTCGCACTGGGAG**GACAT**GGGTCCCA**CC**CAAGCGGATCC**  
Oguma 2842 CT**GCATCTCAATTC**CT**CTCGCACTGGGAG**GACAT**GGGTCCCA**CT**GCCAAGCGGACCC**  
Mizuno 7165 CT**GCATCATCAATTC**CT**CTCCCACTACGCG**GACAT**GGGTCCAG**CAC**CACAGGACAC**

Okushima 1896 CA**ACACCACGGTGA**AGAA**CATGCGGTT**CGAA**AAACCCGCGT**CGAA**AGGCATGAC**GA**ACTG**  
Oguma 2902 GA**ACACAACGTGA**AGAA**CATGCGGTT**CGAA**AAACATCACTGT**CGAA**AGGCATGAC**CA**ACTG**  
Mizuno 7225 CGC**CAAAACATCAG**CA**ACTTCCG**CT**GGASACATCA**CGT**GAGGGCATGAC**CA**ACTG**

Okushima 1956 CG**CTATCCGCTCTAT**GC**CTGTCCGACACT**GAA**AAACATCCACAT**CA**AGAATTTCAACAT**  
Oguma 2962 CG**CAATGCGGATCTAT**GC**CTGTCCAACTGAGA**AA**ATTCACGT**CA**AGAACCTCAGCAT**  
Mizuno 7285 CG**CGTGAGGATCTAT**GC**CTTCCAAACCGAGA**AA**ATCCACAT**CA**AGAACCTGAA**CA**T**

Okushima 2016 CG**GTGCCTGGAACGGG**CT**GGAATGGACTTCA**AGGT**CAGCCACCTAAG**CG**CTACACCAA**  
Oguma 3022 CG**ACAGCTGGAATGG**CT**GGAATGGACTTCA**AGGT**CAGCCACCTAAG**CG**CTACACCAA**  
Mizuno 7345 TG**GCGGCTGGAACGGG**CT**GGAATGGACTTCA**AGGT**CAGCCACCTAAG**CG**CTATT**CG**GA**

Okushima 2076 CT**CCGCGGGTGA**AG**GTCACTATCGG**CA**AGGTTCCCGACGGCAACGG**ACT**CGCCCT**  
Oguma 3082 CT**CCGAGGGCAAAA**AG**TCAACATCGG**CA**ATGAGATCCCGACGGTAA**CC**GGCTCGCCCT**  
Mizuno 7405 C**ACCGCAACAACA**AG**TTTGGCTGG**CA**AGAAACGATTGAC**AG**CCGCGGCATCAAGCT**

Okushima 2136 TG**AAAACTACTCAG**T**GGCGGCCAAGT**CAT**CGAGAAGA**CG**GGCGGAAACT**CT**GCAGACTA**  
Oguma 3142 CG**AAAACTACTCGG**T**CGAGGGCAAA**T**ATCGAGAAT**CG**GGCGCAACT**GG**AACGACTA**  
Mizuno 7465 CG**GAACTACACCG**T**CGCGGGGTCAAG**AT**CGACAAGA**CC**ACAATAACT**GG**AATGACAC**

Okushima 2196 CC**AGCTCGGCGGCT**T**GGCTTCGACGG**CGAA**AACTGGGAAA**ACT**GGAACGCCTG**GA**AGTC**  
Oguma 3202 CA**AGCTCGGACGCCT**CG**ATTTCGACGG**CGAA**AACTGGGACAG**CT**GGAACGCCTG**GA**AAATC**  
Mizuno 7525 GC**AGTTGGGCGTCT**CG**CTTCGACCGG**AA**AACTGGGATA**CT**GGAACGCCTG**GT**GACT**

Okushima 2256 AG**CTC-CCTAGCAGG**CT**CTCACCGA**CT**CAATCCGG**C**GGTGAAGTGGCAGAGGCA**-**A**  
Oguma 3262 C**ACAC-CCTAGGTAAC**-**CGGA**ACT**CG--TCAGC**-**GGCGTG**-**CTGGGCAGAGGCACA**  
Mizuno 7585 C**TGGGTCTTCGTGAC**CG**AGCGGAT**C**CATAATCGGC**CG**GGGAGCCCCGTCTA**AG**GCTCC**

Okushima 2313 G**AGTAATTC**CC**ACTTCCT-----**CC**AAACAATGCAG**CC**--AGTCA**AC**CGGCCCT**  
Oguma 3312 C**AGCCTCTGCCA**CG**GCTTATGCACTACGA**AAA**ATCTCAA**CC**TGAACCA**CG**GAATCTT**  
Mizuno 7645 C**CGCCGGCCGGG**CG**GGAAGCTGACG**CT**CCAGG**ACT**TACA**CC**CGGGCAGTGTGCCGT**

```

Okushima 2362 GGT---GCAACTG-AGCACA-AAT-----
Oguma      3372 GCC---ACATCAGGAGCAC- GATTGATGTACCCTCATGTTTCGAGCTCGATGACCTCCC
Mizuno     7705 GCACAAACGCCTGGATGGCCAGGACAGCAGCGCCACGGCACCAATCAACGTTGTTCTTGG
    
```

2. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe โดยใช้ไพรเมอร์ T7 กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

DNASIS \*\*\*\*\* HOMOLOGY SEARCH LIST \*\*\*\*\* DATE 03-18-03

\*\*\* INPUT INFORMATION \*\*\*

FILE NAME : DEXPROBE.SEQ

SEQUENCE : 1062 BP; 275 A; 332 C; 291 G; 164 T.

\*\*\* HOMOLOGY REGIONS REFERENCE \*\*\* ( 1- 1062 NORMAL )

NO.	TARGET FILE	DEFINITION	INIT	OPT
1	OKUSHIMA.SEQ		3414	3414

86.9% identity in 1062 bp overlap

	10	20	30	40	50	60
DEXPROBE	GAGCTGGGCCAGCTTCGAATATGCCAAGGACGTCTGGGTGGACGTCAATCTCAAGACCGG					
OKUSHIMA	GAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACGCCAAGGACGTCTGGGTGGAAGTGAGCCTGCGCACTGG					
	750	760	770	780	790	800
DEXPROBE	70	80	90	100	110	120
OKUSHIMA	CCAGACCATCACATCGGCCGACCAGGTCCAGATCCGGCCCAGCAGCTACAACTTCGAAAA					
	810	820	830	840	850	860
DEXPROBE	130	140	150	160	170	180
OKUSHIMA	ACAGACCATCTCCTCAGCCGACCAGGTCCAGATCCGGCCGAGCAGCTACAACTTTGAAAA					
	870	880	890	900	910	920
DEXPROBE	190	200	210	220	230	240
OKUSHIMA	GTTCTCGGTGGAGTTCGAGCCGAGCTGTACACGGCGTACAACGACATGAGCGGGCAG					
	930	940	950	960	970	980
DEXPROBE	250	260	270	280	290	300
OKUSHIMA	CGGCAAGCTCACCACCGAAGCCGAGGGCAACCGCGCCATCCACACTGAGCCTCGCAACTC					
	990	1000	1010	1020	1030	1040
DEXPROBE	310	320	330	340	350	360
OKUSHIMA	GATGATGATCTTCGCCGAGCCCAAGCTCCGGGGCGAGCAGAAGGAGCGGCTGATCCCAC					
	1050	1060	1070	1080	1090	1100
DEXPROBE	370	380	390	400	410	420
OKUSHIMA	GGAGGAGTCAGGCAGCATCCACTACCCGGCCGAAGGTGAGGTAACCAACCTCAACCCGT					
	1110	1120	1130	1140	1150	1160
DEXPROBE	430	440	450	460	470	480
OKUSHIMA	AGAAGAGTCGGGCAGCATCCACTATCCGGAGCCCGCGAGGTGCGGAACCTGAACCTCGGT					

```

DEXPROBE      TACCGAAGACATCATCTACTTCAAGCCCGGCACCTACAGCATGGGCTCGGACTACCATGC
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CAGCGAGGAAATCATCTACTTCCGGCCCGGCACCTACAGCATGGGCCCCGACTACCATGC
1170      1180      1190      1200      1210      1220
           490      500      510      520      530      540
DEXPROBE      CGTCCTGCCGCCAACGTCAAGTGGGTGTATCTGGCCCCAGGCGCCTACGTGAAGGGAGC
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      AGTCCTGCCAGCCAACGTGAAATGGGTCTATCTGGCACCAGGGGCCTACGTGAAGGGAGC
1230      1240      1250      1260      1270      1280
           550      560      570      580      590      600
DEXPROBE .SEQ CTTCCGGTTCTTCCACGACAACCAAGCCAGTACAAGGTCACCGGTATGGCGTCTCTCTC
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CTTCCGGTTCTTCCACGACACCCAAAGCCAGTACAAGGTCACCGGATACGGCGTCTCTCTC
1290      1300      1310      1320      1330      1340
           610      620      630      640      650      660
DEXPROBE      CGGCGAGCAATACGTATACGAGGCGGACACGAACAACGATTACAACCATCTCAGCGGGGC
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CGGCGAGCAGTACGTCTACGAGGCGGATACGAACAACAGTTACCACCACCTGAGCGGGGC
1350      1360      1370      1380      1390      1400
           670      680      690      700      710      720
DEXPROBE      GTCCAACCTGCCACTCATCGTGCCTGAAGATGCTGCAGTTCGCGTCAGCCGACGCCGAGCA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      GTCCAACCTGCCACTCGTCTGTGTAAGATGCTGCAGTTCGCTTCCGCCGACGCCGAGCA
1410      1420      1430      1440      1450      1460
           730      740      750      760      770      780
DEXPROBE      GAAGCTGGACCTGCAGGGCGTCACCATCAATGAACCGCCCTACCCTCGTTTGTGGTCTA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      GAAGCTGGACCTGCAGGGCGTTACAGTCGCCGAGCCACCGTACCCTCTCTCGTGGTCTA
1470      1480      1490      1500      1510      1520
           790      800      810      820      830      840
DEXPROBE      CGGGAACGAGCAGACCTTCCACATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGGTGGGCAGCTGGTA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CGGGAACGAGCAAACATTCCACATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGGTGGGCAGCTGGTA
1530      1540      1550      1560      1570      1580
           850      860      870      880      890      900
DEXPROBE      CTGGCAAACGGACGGCATCGAGCTGTACAAGGGCAGCAGCATGAAGAACACGTTCTTCAA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CTGGCAGACAGACGGCATCGAGCTGTACAAGGGCAGCACCATGAAGAACACGTTCTTCAA
1590      1600      1610      1620      1630      1640
           910      920      930      940      950      960
DEXPROBE      CTCCAACGACGACGTACTGAAGATGTACCACAGCGACGTACCATTGATAACACCGTGAT
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      TGCCAACGACGACGTGCTGAAGATGTATCACAGTGATGTACCATCGATAACACCGTGAT
1650      1660      1670      1680      1690      1700
           970      980      990      1000      1010      1020
DEXPROBE      CTGGAAAAACGAGAACGGACCCGTTGGTCCAGTGGGGCTGGACGCCACGGAACATCGACAA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CTGGAAGAACGAGAACGGCCCCGTGATCCAGTGGGGCTGGACGCCACGGAACATTGACAA
1710      1720      1730      1740      1750      1760
           1030      1040      1050      1060
DEXPROBE      CGTGAACGTCACCAACACCTCGGTATCCACAACCGGATGTA
:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
OKUSHIMA      CGTGAACGTCGCCAACACCACGGTATCCACAACCGGATGTA
1770      1780      1790      1800      1810

```

3. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอติดตาม DEX-probe โดยใช้โปรแกรม SP6 กับยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

DNASIS \*\*\*\*\* HOMOLOGY SEARCH LIST \*\*\*\*\* DATE 03-18-03

\*\*\* INPUT INFORMATION \*\*\*



FILE NAME : PDEX\_SP6.SEQ

SEQUENCE : 771 BP; 198 A; 219 C; 198 G; 129 T.

\*\*\* HOMOLOGY REGIONS REFERENCE \*\*\* ( 1- 771 NORMAL )

NO. TARGET FILE DEFINITION INIT OPT

1 OGUMA.SEQ 1880 2194

80.2% identity in 768 bp overlap

```

      10      20      30      40      50      60
PDEX_SP6  ATTCCCACGGAGGAGTCAGGCAGCATCCACTACCCGGCCGAAGGTGAGGTAACCAACCTC
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     GTTCCCACCCAGGAATCAGGCAGCATCCACTATCCGGAGCCCGGCAGGTGCGGAACCTG
          1830    1840    1850    1860    1870    1880
          70      80      90      100     110
PDEX_SP6  AACNCNGTTACCGAAGACATCATTTACTTCAAG-CCGGCACCTACAGCATGGGCTGGNAC
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     AACTCGGTCAGCGCGGAAATCATCTACTTCCGGCCCGGCACCTACAGCATGGGCTCGGAC
          1890    1900    1910    1920    1930    1940
310      120    130    140    150    160    170
PDEX_SP6  TACCATGCNGTCTCTGCCGCCAAACGTCCAAGTGGTGNATCTGGCCCCAGGCGCCTACGT
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     TACCACGCAGTCTTCCCGGCC-AACGTGAAATGGGTCTATCTGGCACCAGGAGCGTATGT
          1950    1960    1970    1980    1990    2000
180      180    190    200    210    220    230
PDEX_SP6  -AAGGGAGCCTTCCGGTTCCTTCCACGACAACCAAAGCCAGTACAAGGTCACCGGCTATGG
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     GAAGGGGGCCTTCCGGTTCCTTCCACGACACGCAAAGCCAGTACAAGGTCACCGGTTACGG
          2010    2020    2030    2040    2050    2060
240      240    250    260    270    280    290
PDEX_SP6  NGTCCTCTCCGGCGAGCAATACGTATACGAGGCGGACACGAACAACGATTACAACCATCT
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     CGTCCTTTCCGGCGAGCAGTACGTTTACGAGGCGGATACGAATAACAGCTACAACCACCT
          2070    2080    2090    2100    2110    2120
300      300    310    320    330    340    350
PDEX_SP6  CAGCGGGGCGTCCAACCTGCCACTCATCGTGCCTGAAGATGCTGCAGTTTCGCGTCAGCCGA
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     CAGCGGGGCATCCAACCTGTCACTCGTCTCGTAAAGATGCTGCAGTTTCGCTTCCGCCGA
          2130    2140    2150    2160    2170    2180
360      360    370    380    390    400    410
PDEX_SP6  CGCCGAGCAGAAGCTGGACCTGCAGGGCGTCACCATCAATGANCCGCCCTACCACTCGTT
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     CGCGGAGCAGAAGCTGGACCTGCAGGGCGTTACAGTCGCCGAGCCGCCGTACCACTCCTT
          2190    2200    2210    2220    2230    2240
420      420    430    440    450    460    470
PDEX_SP6  TGTGGTNTACGGGAACGAGCAGACCTTCCACATGAACNTGNANAACCTACAAGCAGGTGGG
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     TGTGGTCTACGGGAACGAGCAAACGTTCCATATGAACGTGGAGAATTACAAGCAGGTGGG
          2250    2260    2270    2280    2290    2300
480      480    490    500    510    520    530
PDEX_SP6  CANTTGGTAGTGGCAAACGNACGGCATCGAGCTGTACAAGGGCAGCAGCATGAAGANCNC
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     CAGCTGGTACTGGCAGACGGACGGCATCGAGCTGTACCAGGGCAGCACCATGAAGAACAC
          2310    2320    2330    2340    2350    2360
540      540    550    560    570    580    590
PDEX_SP6  GTTCTTCAANTCCAACGAGNACGTANTGAAGATGTACCACAGCGNCGTCACCNTTNATAA
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA     GTTCTTCAACGCGAACGACGACGTGCTGAAGATGTACCACAGCGATGTCAGCATCGATAA
          2370    2380    2390    2400    2410    2420
600      600    610    620    630    640    650
PDEX_SP6  CACNGTGATNTGGAAAANNGANAACGGACCCGTTCCAGTGGGGNTGGACGCCACGGAA
          :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

OGUMA          CACCGTGGTGTGGAAGAACGAGAACGGACCCGTCGTCCAGTGGGGCTGGACCCCGCGGAA
                2430      2440      2450      2460      2470      2480
PDEX_SP6       660      670      680      690      700      710
CATCGACAACGTGAACGTACCAACACCTCGGTCATCCACAACCGCATGTA-GGGTTCGA
:: ::::::::::::::::::::::::::::::: : :::::::::::::::::::: :X :: ::
OGUMA          CATTGACAACGTGAACGTACCAACACCACCGTCATCCACAACCGGATGTACTGGAAGGA
                2490      2500      2510      2520      2530      2540
PDEX_SP6       720      730      740      750      760      770
AATC--GATAA-GCTTGGATCCGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAAGCTTGAGA
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA          CGTCAAGTACAACACCTGCATCTTCAACTCTTCC-TCGCACTGGGAGGACATGGGTTC
                2550      2560      2570      2580      2590
    
```

4. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน *sdx* และยีนเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

DNASIS \*\*\*\*\* HOMOLOGY SEARCH LIST \*\*\*\*\* DATE 03-10-03

\*\*\* INPUT INFORMATION \*\*\*

FILE NAME : SDX.SEQ

SEQUENCE : 1902 BP; 479 A; 609 C; 525 G; 289 T.

\*\*\* HOMOLOGY REGIONS REFERENCE \*\*\* ( 1- 1902 NORMAL )

NO. TARGET FILE DEFINITION INIT OPT

Oguma.SEQ 5518 5562

83.2% identity in 1879 bp overlap

```

SDX          10      20      30      40      50      60
ATGCCCGGATCAGGGCTGACGCTACTAGCCAAAACCATCACCATCGCCGAGCCACCGTG
                :: : : : : X:::
OGUMA        CGACTGGCCAAACACGTAACAGCGGCAGCTGCAGTTTTCTTATCAGCACTGGCGCCGTG
                1090      1100      1110      1120      1130      1140
SDX          70      80      90      100      110
CTTGTGGGCAGCGGCGCTGCCATCCCGGCACAGGCCA--CCGGCAGCA-CGCCAGCTG-A
: : :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA        C-TCCCGGCACAGGC--AGAAACCGCGCCGGGTCCACCCCTCTGCAGCGCCGGCTGCA
                1150      1160      1170      1180      1190      1200
SDX          120      130      140      150      160      170
CCCGAAGAAAGCCGCCGAAGTCAGCACCGTGGACAACGGCAACCTGCACACCTGGTGGCA
: : :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA        TCTGTGGAAAAACACCCCA-TTACCACTGCGAACAACGGCAACCTCCACACCTGGTGGCA
                1210      1220      1230      1240      1250      1260
SDX          180      190      200      210      220      230
TGACAACGGGGTCTTCAACACCGAAGGCCCCACCGGGGACAACGAGGTCCGCCGGTCGTC
::::::::: : : :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA        CGACAACGGCGTTTTTCAGCCAGCCGCCCAACGCAAAGCGACGAGGTTCCGCCGTCGTC
                1270      1280      1290      1300      1310      1320
SDX          240      250      260      270      280      290
CTTCTACGACGTCCAGGTTGCGCAGGCAACGCAGCCTGACAAGGCGTACGACGCGTTCAC
:: ::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA        CTTATACGATGTGCGGGTGGCCAGGCCAATCAGCCACAGAAGGCGTATGACGCTTTCAC
                1330      1340      1350      1360      1370      1380
SDX          300      310      320      330      340      350
GTACATGAGCATCCCAGGAGCGGGAAGGGCAAGATCGGCTACACCAAGGAGGACGGCGC
::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OGUMA        TTACATGAGCATTCCCGCAGCGGAAAGGGGAAGATCGGCTACACGAGGAAGACGGTGC
                1390      1400      1410      1420      1430      1440
    
```





5. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน *sdx* และยีนเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991)

DNASIS \*\*\*\*\* HOMOLOGY SEARCH LIST \*\*\*\*\* DATE 03-06-03

\*\*\* INPUT INFORMATION \*\*\*

FILE NAME : SDX.SEQ

SEQUENCE : 1902 BP; 479 A; 609 C; 525 G; 289 T.

\*\*\* HOMOLOGY REGIONS REFERENCE \*\*\* ( 1- 1902 NORMAL )

NO. TARGET FILE DEFINITION INIT OPT

OKUSHIMA.SEQ 5438 5540

82.3% identity in 1891 bp overlap

	10	20	30	40	50	60
SDX	ATGCCCGGATCAGGGCTGACGCTACTAGCCAAAACCATCACCATCGCCGAGCCACCGTG					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CGGCTGGCCAAACGCATGACAGCGGCAGCCGAGTTTCTTTATCAGCACCAGCGCCGTG					
	370	380	390	400	410	420
	70	80	90	100	110	
SDX	CTTGTGGGCAGCGGC-GCTGCCATCCCGGCACAGGCCACCGGCAGCACGCCAGCTGACCC					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	C-TCCCGGCACAGGCTGCCACCACCGGCAGCCGCCACCAGGGTACCTGCAGCTCT					
	430	440	450	460	470	480
	120	130	140	150	160	170
SDX	GAAGAAAGCCGCCGAAGTCAGCACCGTGGACAACGGCAACCTGCACACCTGGTGGCATGA					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CAAGGCAGAACGCCCATCACAAACCGTCGACAATGGCAACCTGCACACGTGGTGGCACGA					
	490	500	510	520	530	540
	180	190	200	210	220	230
SDX	CAACGGGGTCTTCAACACCGAAGGCCACCGGGGACAACGAGGTCCGCCGGTTCGTCCTT					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CAATGGCGTTTTTCAGCCAGCCACTCCAACACAAAGCAGCGAGGTTCCGCCGGTTCGTCCTT					
	550	560	570	580	590	600
	240	250	260	270	280	290
SDX	CTACGACGTCCAGGTTGCGCAGGCAACGCAGCCTGACAAGGCGTACGACGCGTTCACGTA					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CTACGATGTGCAGGTTGCCAGGCTAATCAGCCGAGGCTATACGACGCCTTCAGCTA					
	610	620	630	640	650	660
	300	310	320	330	340	350
SDX	CATGAGCATCCCAGGAGCGGGAAGGGCAAGATCGGCTACACCAAGGAGGACGGCGCCGA					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CATGAGCATTCCCAGCGGAAAGGGCAAGATCGGCTACACAGAGGAAGACGGCGCTGA					
	670	680	690	700	710	720
	360	370	380	390	400	410
SDX	GTTCTCCTCCCAGGCGGGCCTGTCCATGAGCTGGGCCAGCTTCGAATATGCCAAGGACGT					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	ATTCTCCTCTGACGCCGGCTTACGATGAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACGCCAAGGACGT					
	730	740	750	760	770	780
	420	430	440	450	460	470
SDX	CTGGGTGGACGTCAATCTCAAGACCGGCCAGACCATCACATCGGCCGACCAGGTCCAGAT					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CTGGGTGGAAGTGACCTGCGCACTGGACAGACCATCTCCTCAGCCGACCAGGTCCAGAT					
	790	800	810	820	830	840
	480	490	500	510	520	530
SDX	CCGGCCAGCAGCTACAACCTCGAAAAACAGCTCGTGGACGCGGACACCGTAAAGATCAA					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	CCGGCCGAGCAGCTACAACCTTGAAGAGCAGCTCGTGGATGCAGACACTGTGAGAATCAA					
	850	860	870	880	890	900
	540	550	560	570	580	590
SDX	GGTGCCATACTCTGACGCCGATACCGGTTCTCGGTGGAGTTCGAGCCGAGCTGTACAC					
	:	:	:	:	:	:
OKUSHIMA	GGTGCCCTACTCTGACCGGCTACAGGTTTTTCGGTTCGAATTTGAGCCGAGCTTTACAC					
	910	920	930	940	950	960



```

      :::::::::::::: :::::::::: :: :::::: :::: :::::::::: :::::::::: ::::
OKUSHIMA      GGAGGACATGGGTTCCACCACCAAGCGGATCCCAACACCACGGTGAAGAACATGCGGTT
                1870    1880    1890    1900    1910    1920
SDX           1560    1570    1580    1590    1600    1610
      CGAAAACCTTACGGTTGAGGGCATGGCCAACCTGCGCCATCCGCGTCTACGCCCTGTCCAA
      :::::::::: : : : : :::::::::: : :::::::::: :::::::::: :::::::::: :
OKUSHIMA      CGAAAACACCGCGTCGAAGGCATGACGAACCTGCGCTATCCGCGTCTATGCCCTGTCCGA
                1930    1940    1950    1960    1970    1980
SDX           1620    1630    1640    1650    1660    1670
      CACCGAGAACATCAACATCAAGAATCTCAAGATCGATAGCTGGAACGGACTCGACTGGAC
      :: : : :::::::::: :::::::::::::: :::: : : : : : : :::::::::: : : : : :
OKUSHIMA      CACTGAAAACATCCACATCAAGAATTTCAACATCGGTGCCTGGAACGGGCTGGAATGGAC
                1990    2000    2010    2020    2030    2040
SDX           1680    1690    1700    1710    1720    1730
      CTCCCAGGTGAGCCATCTCAAGCGCTACACCAACCCCGCGGTGAAAAGGTGACCATCGG
      :: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: : : : : :
OKUSHIMA      TTCACAGGTGAGCCACCTCAAGCGCTACACCAACTCCGCGGTGAGAAAGGTCACTATCGG
                2050    2060    2070    2080    2090    2100
SDX           1740    1750    1760    1770    1780    1790
      CAACGAGGTTCCCTGCCGCAACGGCCTTGCCCTGGAGAATACTCGATAGGCGGCGAAGT
      :::::::::::::: : :::::::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OKUSHIMA      CAACGAGGTTCCCGACGGCAACGGACTCGCCCTTGAAAATACTCAGTGGGCGGCCAAGT
                2110    2120    2130    2140    2150    2160
SDX           1800    1810    1820    1830    1840    1850
      AATCGAGAAATCTGCAGGCAACTGGCCGACTACCGGCTGGGCCGGCTTGGCTTCGACGG
      :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OKUSHIMA      CATCGAGAAGACCGCGGAAACTCGTCAGACTACCAGCTCGGCCGGCTTGGCTTCGACGG
                2170    2180    2190    2200    2210    2220
SDX           1860    1870    1880    1890    1900
      CGAGAACTGGGACAGCTGGAACGCGTTTAAGTCCACGCCCTAA
      :: :::::::::: : : :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
OKUSHIMA      CGAAAACCTGGGAAAACCTGGAACGCCTGGAAGTCAGCTCCCTAG
                2230    2240    2250    2260

```

6. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน *sdx* และยีนไอโซมอลโตโทรโอ-เดกซ์  
 แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

DNASIS \*\*\*\*\* HOMOLOGY SEARCH LIST \*\*\*\*\* DATE 03-06-03

\*\*\* INPUT INFORMATION \*\*\*

FILE NAME : SDXHOM.SEQ

SEQUENCE : 1902 BP; 479 A; 609 C; 525 G; 289 T.

\*\*\* HOMOLOGY REGIONS REFERENCE \*\*\* ( 1- 1902 NORMAL )

NO. TARGET FILE DEFINITION INIT OPT

MIZUNO.SEQ 2956 3404

65.2% identity in 1921 bp overlap

```

      10      20      30      40      50      60
SDX      ATGCCCGGATCAGGGCTGACGCTACTAGCCTAAAACCATCACCATCGCCGCGAGCCACCGTG
      :::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
MIZUNO   ATGCCCACTACAGGGCTGAGGCAACTTGCACGAACCATCACCATCGCCGTCGCGGCCACG
      1350    1360    1370    1380    1390    1400
SDX      CTTGTGGGCAGCGGCTGCCATCCCGGCAC---AGGCCAC---CGGCAGCACGCCAGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
MIZUNO   CTGATTGGTACCGGTGCCGCAATACCGGCACAAGCCGGCCCGACCGGAAAAATCCCACC
      1410    1420    1430    1440    1450    1460
SDX      TGACCCGAAGAAAGCCGCGAAGTCAGCACCGTGGACAACGGCAACCTGCACACCTGGTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```









8. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SDX และเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991)

>gi|729316|sp|P39652|DEXT\_ARTSP DEXTRANASE PRECURSOR (ALPHA-1,6-GLUCAN-6-GLUCANOHYDROLASE)

(ENDODEXTRANASE)

gi|98703|pir|JQ0878 dextranase (EC 3.2.1.11) precursor - *Arthrobacter* sp

gi|216215|dbj|BAA00708.1| dextranase precursor [*Arthrobacter* sp.]

Length = 640

Score = 1110 bits (2870), Expect = 0.0

Identities = 527/640 (82%), Positives = 568/640 (88%), Gaps = 7/640 (1%)

Frame = +2

```

SDX:   482  MPGSGXXXXXXXXXXXXXXXXXGSGAAIPAQATGSTPADP-----KKAEEVSTVDNGN 640
        MPG+G                + A +PAQA + A P          K      ++TVDNGN
OKUSH:  1  MPGTGLGRLAKRMTAAAVFFISTSAVLPAAQAATAPAAAPPVPAALKAERAITTVDNGN 60

SDX:   641  LHTWWHDNGVFNTEGPTGDNEVRRSSFYDVQVAQATQPKAYDAFTYMSIPRSGKKGKIGY 820
        LHTWWHDNGVF+  PT  +EVRRSSFYDVQVAQA QP K YDAF+YMSIPRSGKKGKIGY
OKUSH:  61  LHTWWHDNGVFSPATPTQSSEVRRSSFYDVQVAQANQPQKLYDAFSYMSIPRSGKKGKIGY 120

SDX:   821  TKEDGAEFSSQAGLSMSWASFYAKDVWVDVNLKTGQTTISADQVQIRPSSYNFEKQLVD
        1000
        T+EDGAEFSS A L+MSW+SFEYAKDVWV+V+L+TGQTI+SADQVQIRPSSYNFEKQLVD
OKUSH: 121  TEEDGAEFSSDARLMSWSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQIRPSSYNFEKQLVD 180

SDX:  1001  ADTVKIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEAEGNRAIHTEPRNSMMIF 1180
        ADTV+IKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEA GNR IHTEPRNSMM+F
OKUSH: 181  ADTVRIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEAAGNRPIHTEPRNSMMVF 240

SDX:  1181  AEPKLRGEQKERLIPTEESGSIHYPAEGEVTNLNTVTEDIIYFKPGTYSMGSDYHAVLPP1360
        AEPKLRGEQKERL+PTEESGSIHYP  GEV NLN+V+E+IIYF+PGTYSMG DYHAVLP
OKUSH: 241  AEPKLRGEQKERLVPTEESGSIHYPEPGEVRNLNSVSEIIYFRPGTYSMGPDYHAVLPA 300

SDX:  1361  NVKWWYLAPGAYVKGAFRFFHDNQSQYKVTGYGVLSGEQVVEADTNNYNHLSGASNCH1540
        NVKWWYLAPGAYVKGAFRF HD  QSQYKVTGYGVLSGEQVVEADTNN Y+HLSGASNCH
OKUSH: 301  NVKWWYLAPGAYVKGAFRFLHDTQSQYKVTGYGVLSGEQVVEADTNNSYHLSGASNCH 360

SDX:  1541  SSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTTINEPPYHSFVYVYGNEQTFHNMVENYKQVGSWYWQTD1720
        SSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTT+  EPPYHSFVYVYGNEQTFHNMVENYKQVGSWYWQTD
OKUSH: 361  SSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTTVAEPPYHSFVYVYGNEQTFHNMVENYKQVGSWYWQTD 420

SDX:  1721  GIELYKGSMSKNTFFNSNDDVLMKYHSDVTIDNTVIWKNENGPVQWGWTPRNIDNVNVT1900
        GIELYKGS+MKNTFFN+NDDVLMKYHSDVTIDNTVIWKNENGPV+QWGWTPRNIDNVN
OKUSH: 421  GIELYKGSMTMKNTFFNANDDVLKMYHSDVTIDNTVIWKNENGPVIQWGWTPRNIDNVNVA 480

SDX:  1901  NTSVIHNRMYWKDVKYNTCIFNSSSHWEDMGSTIKADPNTTVKNMSFENFTVEGMANCAI2080
        NT+VIHNRMYWKDVKYNTCIFNSSSHWEDMGST KADP TTVKNM FEN  VEGM NCAI
OKUSH: 481  NTTVIHNRMYWKDVKYNTCIFNSSSHWEDMGSTTKADPNTTVKNMRFENTAVEGMTNCAI 540

SDX:  2081  RVYALSNTENINIKNLKIDSWNGLDWTSQVSHLKRYTNPAGEKVTIGNEVPAGNGLALEN2260
        RVYALS+TENI+IKN  I +WNGL+WTSQVSHLKRYTN AGEKVTIGNEVP GNGLALEN
OKUSH: 541  RVYALSDTENIHIKNFNIGAWNGLEWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEVPDGNGLALEN 600

SDX:  2261  YSIGGEVIEKSAGNWADYRLGRLGFDGENWDSWNAFKSTP 2380
        YS+GG+VIEK+ GN +DY+LGRGFDGENW++WNA+KS P
OKUSH: 601  YSVGGQVIEKTGGNSSDYQLGRLGFDGENWENWNAWKSAP 640
    
```

9. ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SDX และไอโซมอลโตไตรโอเดกซ์ แท  
รณเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

>gi|11282023|pir|JC7142 dextranase (EC 3.2.1.11) - *Brevibacterium fuscum* var.

dextranlyticum

gi|4586452|dbj|BAA76382.1| isomaltotrio-dextranase precursor [*Brevibacterium fuscum*  
var. *dextranlyticum*] Length = 641

Score = 1078 bits (2788), Expect = 0.0

Identities = 512/642 (79%), Positives = 563/642 (87%), Gaps = 9/642 (1%)

Frame = +2

```

SDX:   482  MPGSGXXXXXXXXXXXXXXXXXGSGAAIPAQATGSTPADPKKAAEVS--TVDNGNLHTWW 655
      MP +G                               G+GAAIPAQA G   +P K E + T D GNLHTWW
MIZUN:   1  MPTTGLRQLARTITIAVAATLIGTGAAIPAQA-GPDRKNPTKPVEDAPVTADVGNLHTWW 59

SDX:   656  HDNGVFNTEGPTGDNEVRRSSFYDVQVAQATQPKAYDAFTYMSIPRSGKGIKIGYTKEDG 835
      HDN V+NT+ PT + EVRRSSFYDVQVAQA QPDK +D+F YMSIPRSGKGIKIGYTKEDG
MIZUN:   60  HDNAVYNTDSPTENGEVRRSSFYDVQVAQAQHPDKFFDSFAYMSIPRSGKGIKIGYTKEDG 119

SDX:   836  AEFSSQAGLSMSWASFEYAKDVWVDVNLKTGQTITSADQVQIRPSSYNFEKQLVDADTVK1015
      AEFSS+A LSMSW+SFEYAKDVWVDV+LKTGQTI+SAD+VQIRPSSY+FEK+LVD DT++
MIZUN:  120  AEFSSSEANLSMSWSSFEYAKDVWVDVSLKTGQTISSADEVQIRPSSYDFEKKLVDEDTIR 179

SDX:  1016  IKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNDMSGD SGKLTTEAEGNRAIHTEPRNSMMIFAEPKL1195
      IKVPYSDAGYRFSVEF+PQLYT+YNDMSG+SGKLT AEGNR IHTEP NSMMIFAEPKL
MIZUN:  180  IKVPYSDAGYRFSVEFDPQLYTSYNDMSGNSGKLTVAEGNRIHTEPMNSMMIFAEPKL 239

SDX:  1196  RGEQKERLIPTEESGSIHYPAEGEVTNLNTVTEDIIYFKPGTYSMGSDYHAVLPPNVKVV1375
      +GE+++RLIP  SGSIHYP EGEV +LNTVTE+IIYFKPGTY MGSDYHAVLPPNVKVV
MIZUN:  240  QGEEEEKRLIPNPSSGSIHYPEEGEVKDLNTVTEDIIYFKPGTYHMGSDYHAVLPPNVKVV 299

SDX:  1376  YLAPGAYVKGAFRFFHDNQSQYKVTGYVLSGSEQYVVEADTNNNDYNHLSGASNCHSSCVK1555
      YLAPGAYVKGAFRFFHDNQ+QYKVTGYVLSGSEQYVVEADT N+YN LSGASNCH +CVK
MIZUN:  300  YLAPGAYVKGAFRFFHDNQSQYKVTGYVLSGSEQYVVEADTANNYNALSGASNCHVTCVK 359

SDX:  1556  MLQFASADAEQKLDLQGVINEPPYHSFVVYGN-----QTFHMNVENYKQVGSWYWQ1714
      MLQF S++ Q+LDLQGVINEPPYHSFVVY +E           + F MNVENYKQVGSWYWQ
MIZUN:  360  MLQFESSNIGQQLDLQGVINEPPYHSFVVYAHEGEKEIGVENFRMNVENYKQVGSWYWQ 419

SDX:  1715  TDGIELYKGSMMKNTFFNSNDVLMYHSDVTIDNTVIWKNENGPVQWGWTNPRNIDNVN1894
      TDGIELY+G +MKNTFFN+NDDVLMYHSDVTIDNTVIWKNENGPV+QWGWTNPRNIDNVN
MIZUN:  420  TDGIELYQGGTMKNTFFNANDVLMYHSDVTIDNTVIWKNENGPVIQWGWTNPRNIDNVN 479

SDX:  1895  VTNTSVIHRMYWKDVYNTCIFNSSSHWEDMGSTIKADPTTTVKNMFSFENFTVEGMANC2074
      VT+T+VIHRMYWKD KYNTCI NSSSHWEDMGST KADP TTVKNM FEN TVEGM NC
MIZUN:  480  VTDTTVIHRMYWKDPKYNTCILNSSSHWEDMGSTAKADPNTTVKNMRFENITVEGMTNC 539

SDX:  2075  AIRVYALSNTENINIKNLKIDSWNGLDWTSQVSHLKRYTNPAGEKVTIGNEVPAGNGLAL2254
      A+R+YALSNTENI++KNL IDSWNGLDWTSQVSHLKRYTN AGEKVTIGNE+P GNGLAL
MIZUN:  540  AMRIYALSNTENIHVKNLSIDSWNGLDWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEIPDGNGLAL 599

SDX:  2255  ENYSIGGEVIEKSAGNWADYRLGRLGFDGENWDSWNAFKSTP 2380
      ENYS+GGE+IEKS NW DY+LGRGFDGENWDSWNA+KSTP
MIZUN:  600  ENYSVGGEEIEKSGDNWYDKLGRGFDGENWDSWNAWKSTP 641

```

## 10. การหาบริเวณอนุรักษ์ของเดกซ์แทรนเนสด้วยโปรแกรม CLUSTAL X

Arthro-1 คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 (Okushima และคณะ, 1991)

Arthro-2 คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ T-3044 (Oguma และคณะ, 1999)

SDX คือ ลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 (ผลจากงานวิจัยนี้)

IMTD คือ ลำดับกรดอะมิโนของไฮโซมอลโตโทรโอ-เดกซ์แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* (Mizuno และคณะ, 1999)

Penicillium คือ ลำดับกรดอะมิโนของเอนโดเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium minioluteum* (Garcia และคณะ, 1996)

IPUA คือ ลำดับกรดอะมิโนของไฮโซพุลลูแลนเนสจาก *Aspergillus niger* (Aoki และ Sakano, 1997)

I-VII คือ บริเวณอนุรักษ์ 7 บริเวณของโปรตีนทั้ง 6 ชนิด

Arthro-1	1	MPGTGLGRLAKRMTAAAAVFFIISTSAVLPAQAATAPAAAAPPVPAALKAERAITTVDNNGN
Arthro-2	1	MPGTGLGRLAKHVTAATAAVFLISTGAVLPAQAETAPGSTPSAAPAASVEKHPITANNNGN
SDX	1	MPGSGTLTLLAKTITIAAATVLVGSAAI PAQATGS -----TPADPKKAAEVSTVDNNGN
IMTD	1	MPTTGLRQLARTITIAVAATLIGTGAAI PAQAGPD -----RKNPTKPVEDAPVT-ADVGN
Penicillium	1	-----MATMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGNSHP-----GTHMGTTNNTHCGAD
IPUA	1	-----MRSTGYLLTLSAAFOVAQAAVTAN---NSQ-----
		: : : * ...

### I

Arthro-1	61	LHTWWHDNGVFPATPTQSSEVRRSSFYDVQVAQANQPQ-KLYDAFSYMSIPRSGKGIKIG
Arthro-2	61	LHTWWHDNGVFPSPAPTQSDEVRRSSLYDVRVAQANQPQ-KAYDAFTYMSIPRSGKGIKIG
SDX	54	LHTWWHDNGVFNTEGPTGDNEVRRSSFYDVQVAQATQPD-KAYDAFTYMSIPRSGKGIKIG
IMTD	55	LHTWWHDNAVNTDSPTENGEVRRSSFYDVQVAQAHQPD-KFFDSFAYMSIPRSGKGIKIG
Penicillium	47	FCTWWHDSGEINTQTPVQPGNVRQSHKYSVQVS--LAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIY
IPUA	28	LLTWWHNTGEINTQTPVADGNVRQSGLYSVKVTTPASSSLYSFVYLAI PGNG-----
		: ****... .. * . : ** * * . * : * . * * * . * . * . *

Arthro-1	119	-----YTEEDGAEFSSDARLTMSWSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQI
Arthro-2	119	-----YTEEDGAEFSSSEAGLTMSWSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQI
SDX	112	-----YTKEDGAEFSSQAGLSMSWASFYAKDVWVDVNLKTGQTITSADQVQI
IMTD	113	-----YTKEDGAEFSSSEANLSMSWSSFYAKDVWVDVSLKTGQTISSADEVQI
Penicillium	105	APTDPNPNSTLDSSVDDGISIEPSIGLNMAWSQFEYSHDQVVKILATDGSGLGSPSDVVI
IPUA	82	-----MSDQLQYTPQGYNQTAWTSFLYSHDATVKILSRN-GSSAN--SNVVI
		. * . . : * : * * * . * : * : * : * . * . *

### II

Arthro-1	168	RPSSYNFEKQLVDADTVRIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEAAGNR
Arthro-2	168	RPSSYNFEKQLVDADTVRIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEAEGNR
SDX	161	RPSSYNFEKQLVDADTVKIKVPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAYNMDSGDSGKLTTEAEGNR
IMTD	162	RPSSYDFEKKLVDEDTIRIKVPYSDAGYRFSVEFDPQLYTSYNDMSGNSGKLTVAEGNR
Penicillium	165	RPVSI SYAISQSDGGIVIRVPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGN-----EYVTSGGS
IPUA	126	RPTSLNFPVR-YDNQSVYITVPYSPYRFSVEFDDDLISLAPSG-----
		** * . : * : * * * . * : ***** . * : .

Arthro-1 228 PIHTEPRNSMMVFAEPKLRGEQKERLVPTTEESGSIHYPEPEGEVRNLNSVSEEIIFYFRPGT  
 Arthro-2 228 PIHTEPRNSMMVFAEPKLRGEQKERLVPTQESGSIHYPEPEGEVRNLNSVSAEIIIFYFRPGT  
 SDX 221 AIHTEPRNSMMIFAEPKLRGEQKERLIPTEESGSIHYPAEGEVNTLNTVTEDEIIFYFKPGT  
 IMTD 222 PIHTEPMNSMMIFAEPKLRGEQKERLIPNPSSGSIHYPEEGEVKDLNLTVEEIIIFYFKPGT  
 Penicillium 219 VVGVEPTNALVIFASPFPLSG---MIPHMTPDNTQTMTPGPINNGDWGAKSILYFPFPGV  
 IPUA 169 --ARQPENALLIFASPFENSS---TKPQPGSPNSIAPAPGRVLGLNNTSASTVVFNPGV  
 : \* \* : : : \* \* . \* . \* : : : : \* \* \*

III

IV

Arthro-1 288 YSMG-----PDYHAVLPANVKWVYLAPGAYVKGAFRFLHDTQSQYKVTGYGVLSG  
 Arthro-2 288 YSMG-----SDYHAVLPANVKWVYLAPGAYVKGAFRFLHDTQSQYKVTGYGVLSG  
 SDX 281 YSMG-----SDYHAVLPPNVKVVYLAPGAYVKGAFRFFHDNQSQYKVTGYGVLSG  
 IMTD 282 YHMG-----SDYHAVLPPNVKVVYLAPGAYVKGAFRFFHDNQAQYKVTGYGVLSG  
 Penicillium 275 YWMNQDQSGNSGKLSNHIRLNSNTYVWVYLAPGAYVKGAI EYF--TKQNFYATGHGILSG  
 IPUA 224 YYFT-----GHDHMLVSSVTTWVYFAPGAYVKGAVEFLS-TASEVKASGHGVLSG  
 \* : \* \* . . . \* \* : : : \* \* : : : \* \* \*

Arthro-1 338 EQYVVEADTNNSYHHLGSGANCSHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTVAEPPYHSFVVYG  
 Arthro-2 338 EQYVVEADTNNSYNHLGSGANCSHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTVAEPPYHSFVVYG  
 SDX 331 EQYVVEADTNNNDYNHLGSGANCSHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGVTVINEPPYHSAVVYG  
 IMTD 332 EQYVVEADTANNYNLGSANCSHSSCVKMLQFESSNIGQQLDLQGVTVINEPPYHSFVVYA  
 Penicillium 333 ENYVYQANAGDNYIAVK-SDSTS---LRMWWHNNLGGGQTYWYCVGPTINAPPFNTMDFNG  
 IPUA 273 EQYVWYADPDEGYQKASGANNG---LRMWRGTLGNSSQTFVLNGVTVSAPPFNMSMDWSG  
 \* : \* \* : \* . . . \* \* : : : \* \* : : : \* \* \*

V

VI

Arthro-1 398 NE-----QTFHMNVENYKQVGSWYWQTDGIELYKGMTMKNFTFNANDDVLKMYHSDVT  
 Arthro-2 398 NE-----QTFHMNVENYKQVGSWYWQTDGIELYQGMTMKNFTFNANDDVLKMYHSDVS  
 SDX 391 NE-----QTFHMNVENYKQVGSWYWQTDGIELYKGSMTMKNFTFNANDDVLKMYHSDVT  
 IMTD 392 HEGEKEIGVENFRMNVENYKQVGSWYWQTDGIELYQGGTMKNFTFNANDDVLKMYHSDVT  
 Penicillium 389 NSG-----ISSQISDYKQVGAFFQTDGPEIYPNVSVHVDVFWHVNDDAIKIYYSGAS  
 IPUA 330 NSLD-----LITCRVDDYKQVGFYGGQTDGLEMYPGTILQDVFYHTDDDGKMYSNVT  
 : . : : : \* \* : : : \* \* \* \* \* . : : : \* \* : \* \* : \* \* . . .

VII

Arthro-1 451 IDNTVIWKNENGPVIQGWTPRNIIDNVNVTNTTVIHNRMYWKDVK---YNTCIFNSSSHW  
 Arthro-2 451 IDNTVVWKNENGPVQGWTPRNIIDNVNVTNTTVIHNRMYWKDVK---YNTCIFNSSSHW  
 SDX 444 IDNTVIWKNENGPVQGWTPRNIIDNVNVTNTSVIHNRMYWKDVK---YNTCIFNSSSHW  
 IMTD 452 IDNTVIWKNENGPVIQGWTPRNIIDNVNVTDTTVIHNRMYWKDPK---YNTCILNSSSHW  
 Penicillium 441 VSRATIWKCHNDPIIQMGWTSRDISGVTIDTLNVIHTRYIKSET-----VVPSAIGAS  
 IPUA 384 ARNIVMWKESVAPVVEFGWTPRNTENVLFDNVDVIHQAYANAGNPNPFI GAVNNYLYAPD  
 . . : \* \* \* : : \* \* \* . . . \* \* \* . . .

Arthro-1 508 EDMGSTTKADPNTTVKNMRFENTAVEGTMNCAIRVYALSNTENIHIKFNFI GAWNGLEWT  
 Arthro-2 508 EDMGSTTKADPNTTVKNMRFENTVEGTMNCAIRVYALSNTENIHIKFNFI GSWNGLDWT  
 SDX 501 EDMGSTIKADPTTVKNMRFENTVEGTMNCAIRVYALSNTENIHIKFNFI GSWNGLDWT  
 IMTD 509 EDMGSTAKADPNTTVKNMRFENITVEGTMNCAIRVYALSNTENIHIKFNFI GSWNGLDWT  
 Penicillium 495 PFYASGMS PDSRKSIS-MTVSNVVCGLCPSLFRITPLQNYKNFVVKNVAFPDG----LQ  
 IPUA 444 GLSSNHSTGNSNMTVRNITWSNFRAEGSSSALFRINPIQNLDNISIKNVSIES-----FE  
 . . . : : : \* \* \* . . . \* \* \* . . .

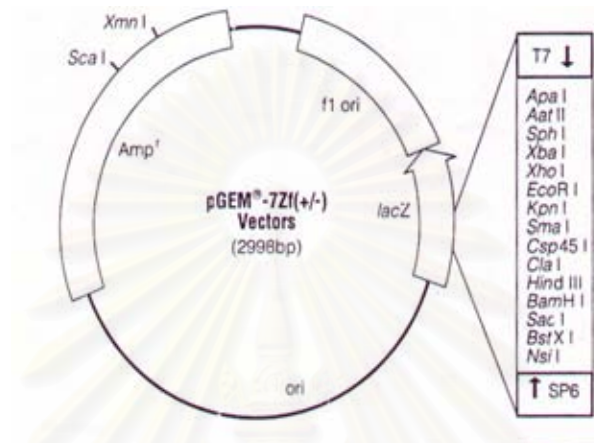
Arthro-1 568 SQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEVPDGNGLALENYSVGGQVIEKTTGGNSSDYQLGRLG-FD  
 Arthro-2 568 SQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNELPDGNGLALENYSVGGQVIEKSSGGNWSDYQLGRLG-FD  
 SDX 561 SQVSHLKRYTNPAGEKVTIGNEVPAGNGLALENYSIGGEVIEKSAGNWADYRLGRLG-FD  
 IMTD 569 SQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNEIPDGNGLALENYSVGGQVIEKSGDNWVNDYKLGRLG-FD  
 Penicillium 550 TNSIGTGESIIPAASGLTMG-----LNISNWTVGGQKVT--MENFQANSLGQFN-ID  
 IPUA 499 PLSINTTESWMPVWYDLNNGKQITVTD-FSIEGFTVGNNTTIT--ASN--AASVGRIDGVD  
 . . . : \* \* : : : \* \* : : : \* \* : : : \* \* . . .

Arthro-1 627 GENWENWNAWKSAP  
 Arthro-2 627 GENWDSWNAWKSAP  
 SDX 620 GENWDSWNAWKSAP  
 IMTD 628 GENWDSWNAWKSAP  
 Penicillium 599 GSYWGEWQIS----  
 IPUA 554 PAYAGSVHYID---  
 . .

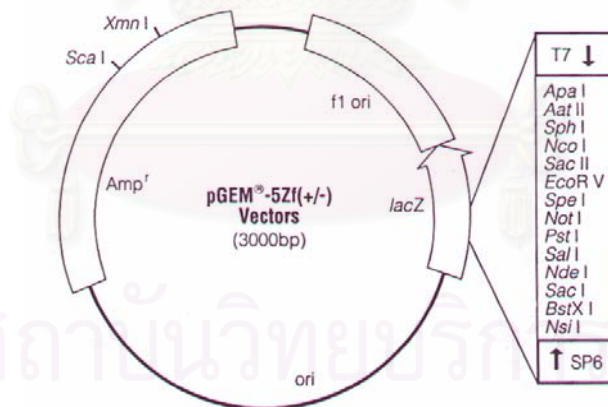
## ภาคผนวก ง

### พลาสมิดพาหะ

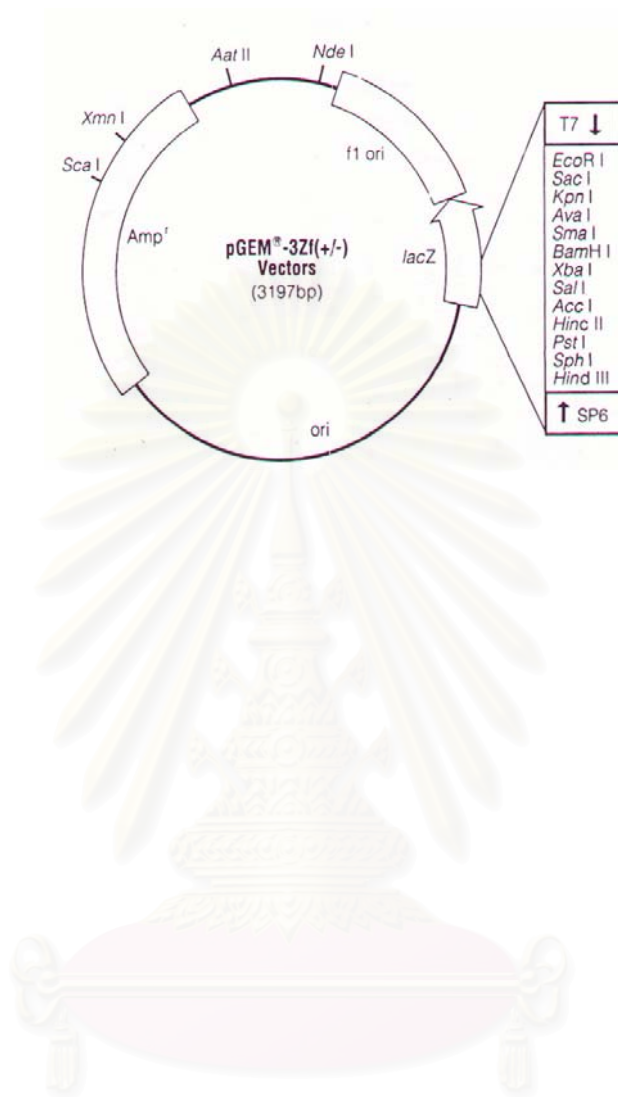
#### 1. พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-)



#### 2. พลาสมิด pGEM-5Zf(+/-)



### 3. พลาสมิด pGEM-5Zf(+/-)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุทธิรักษ์ ตั้งจิตพิณิจการ เกิดเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย