การโคลน และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลสจากหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) ในประเทศไทย

Cloning and nucleotide sequencing of cellulase gene from golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in Thailand

จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก[1] ปิติ อ่ำพายัพ[2] และ ศิริพร สิทธิประณีต[3]

Chanprapa Imjongjirak[1], Piti Amparyup[2], and Siriporn Sittipraneed[3]

บทคัดย่อ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำย่อยในกระเพาะของสิ่งมีชีวิตพวกหอยหลายชนิด ต่อมามีการแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ รวมถึงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์กลุ่มนี้ ในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะแยกยีนของเอนไซม์เซลลูเลสจากหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) โดยการโคลน cDNA ของยีนเซลลูเลสจากส่วนกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ด้วยเทคนิค Reverse transcription-PCR (RT-PCR) จากการทำ RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1250 คู่เบส โดยให้ชื่อว่ายีน EGX ซึ่งเมื่อโคลนเข้า pGEM®-T easy vector และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบ open reading frame (ORF) ขนาด 1188 คู่เบส ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 395 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 44 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ EGX พบว่ามีความคล้ายกับยีนเซลลูเลสในหอย *Ampullaria crossean* 98 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยในขั้นต่อไปจะศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนและทำการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

ABSTRACT

Cellulase is an enzyme that catalyzes the degradation of cellulose. Recently, the cellulose hydrolytic enzyme was isolated from the stomach juice of several mollusca. The three-dimensional structure of the enzyme has been determined by X-ray crystallography. In this research, the full length cDNA of a cellulase designated as EGX was isolated from stomach tissue of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) by Reverse transcription-PCR (RT-PCR). The 1250 bp DNA fragment was cloned into pGEM®-T easy vector and sequenced. Nucleotide sequencing analysis revealed a single open reading frame (ORF) of 1188 bp encoding 395 amino acid residues with molecular weight 44 kDa. The deduced amino acid sequence of EGX cDNA showed 98% similarity to that of *Ampullaria crossean* EGX. The further study is to determine the genomic organization and recombinant expression of this gene.

Key Words: cellulase, β-1,4-glucanase, *Pomacea canaliculata*

C. Imjongjirak: chanprapa@yahoo.com

คำนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์สายตรงของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ที่ตำแหน่ง β-D-(1-4) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ทนต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ กรด และด่างที่เจือจาง ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เซลลูโลสจัดเป็นโพลีเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ (Nathan *et al*., 2003) เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โดยรวมตัวอยู่กับพวกไซแลน (xylan) และลิกนิน (lignin) ร่างกายคนและสัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสในระบบย่อยอาหารทำให้ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสจากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนสัตว์พวกที่กินพืชเป็นอาหาร (herbivorous animal) เช่น โค และกระบือ สามารถย่อยเซลลูโลสได้ เนื่องจากในกระเพาะมีจุลินทรีย์ (rumen microflora) ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสช่วยย่อยเซลลูโลสได้

ในการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลลูโลส ต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ เซลลูเลส (cellullase) ซึ่งประกอบด้วย exo-β-1,4-glucanase (E.C.3.2.9.11), endo-β-1,4-glucanase (E.C.3.2.1.4), β-glucosidase (E.C.3.2.1.21) และไซแลนเนสซึ่งประกอบด้วย endo-β-1,4-xylanase (E.C.3.2.1.8) และ β-xylosidase (E.C.3.2.1.37) เป็นต้น

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสโดยส่วนใหญ่จะศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่เป็นจุลชีพจำพวก รา และแบคทีเรีย แต่เมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด (Watanabe and Tokuda, 2001), crayfish (Byrne *et al.,* 1999), beetle (Girard and Jouanin 1999) และในหอย (Xu *et al.,* 2001) นอกจากนั้นได้มีการแยก และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ endo-β-1-4 glucanase จาก blue mussel, *Mytilus edulis* (Xu *et al*., 2000) และศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน นอกจากนั้นได้มีการตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำย่อยในกระเพาะของสิ่งมีชีวิตพวกหอยสองฝา (Purchon, 1977) และยังมีรายงานการค้นพบและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด (Yamaura and Matsumoto, 1993, Yamaura *et al*., 1997) และในปี 2003 Wang และคณะได้ทำการโคลนยีนเซลลูเลสจากหอย *Ampullaria crossean* และทำการแสดงออก (expression) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในยีสต์ และศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว

หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ และถูกนำเข้ามาเลี้ยงและขยายพันธุ์ในประเทศไทย หอยเชอรี่กินพืชหลายชนิดเป็นอาหาร เช่น สาหร่าย แหนแดง ผักตบชวา และต้นข้าว ต่อมาพบว่ามีการแพร่ระบาดของหอยเชอรี่ในนาข้าว โดยได้เข้าไปกัดกินและทำลายต้นข้าวซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก ดังนั้นในการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และศึกษาลักษณะสมบัติของยีนเซลลูเลสจากหอยเชอรี่ในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสในหอยเชอรี่ ซึ่งจะนำมาใช้ในการศึกษาถึงความสามารถของเอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยเซลลูโลสจากพืชได้ต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*)

เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ตัวเต็มวัย และตัดส่วนของกระเพาะอาหาร แช่ลงในถังไนโตรเจนเหลว และเก็บไว้ที่ –80 °C

2. โคลนยีนเซลลูเลส โดยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.1 สกัด total RNA **และ** mRNA **จากกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่**

สกัด total RNA จากส่วนกระเพาะของหอยเชอรี่ด้วย Trizol Reagent (Gibco-BRL, USA) และกำจัด DNA ที่อาจปนเปื้อนมาโดยการย่อย DNA ด้วย RNase-free DNase I และสกัดแยก mRNA จาก total RNA โดยใช้ QuickPrep mRNA purification kit (Amersham Biosciences, USA) และวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ mRNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry

2.2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation Medison, Wisconsin, USA) ซึ่งจะประกอบด้วย 2 μg mRNA, oligo$(dT)_{12-16}$ primer และเอนไซม์ reverse transcriptase เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลสชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้แล้วในธนาคารยีนมาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W เลือกบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ในการออกแบบไพรเมอร์ (รูปที่ 2)

Forward primer (EGX-F) : 5′- CGA CGC TTC AGT CAA GCG CAT G- 3′

Reverse primer (EGX-R) : 5′- GCC CTC TGA GTG TCG CTC TA- 3′

วิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator

2.3 เชื่อมต่อชิ้นยีนเซลลูเลสกับพลาสมิด pGEM®-T easy

คัดเลือกแถบ DNA และตัดแถบ DNA ของยีนเซลลูเลสที่ได้จากการทำ RT-PCR ออกจากอะกาโรสเจล แยกชิ้น DNA จากเจล โดยใช้ Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, USA) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy แล้วชักนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี electroporation

2.4 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

หาขนาดของชิ้น DNA insert โดยวิธี colony PCR และการตัดด้วย restriction enzyme วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลน แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer (ABI377, PE Applied Biosystems, USA) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อนำไปใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ full length ของยีนเซลลูเลส

3. **ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนเซลลูเลส**

ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนเซลลูเลสจากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม GENETYX software (Software Development) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม *BLASTX* และ *BLASTN* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal W

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การสังเคราะห์ full length cDNA ของยีนเซลลูเลส

สังเคราะห์ full length cDNA ของยีนเซลลูเลสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EGX-F และ EGX-R ค้นหายีนเซลลูเลสใน mRNA ที่สกัดมาจากกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ และนำ RT-PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 1250 คู่เบส (รูปที่ 1)

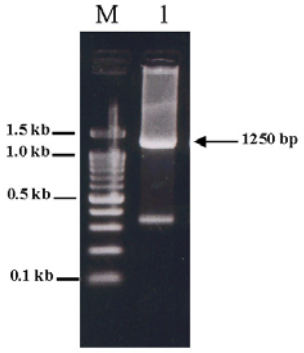

Figure 1. RT-PCR product of full-length cellulase cDNA homologue using first strand cDNA from stomach of *Pomacea canaliculata*. Lanes M are a 100 bp DNA ladder. Arrow indicates the expected PCR product.

การโคลน และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length cDNA ของยีนเซลลูเลส

แยกแถบดีเอ็นเอขนาด 1250 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้จาก RT-PCR ออกจาก agarose gel และนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM®-T easy แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5∝ โดยวิธี electroporation นำ recombinant clone มาสกัด plasmid หลังจากตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA insert แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1250 bp พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1224 bp เป็นส่วน open reading frame ขนาด 1188 bp ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 395 residues ให้โปรตีนขนาดประมาณ 44 kDa เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้โดยการถอดรหัสจาก cDNA พบว่ายีนเซลลูเลสที่ได้จากหอยเชอรี่ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic 48%, neutral 24% และ hydrophilic 28% (รูปที่ 2)

10 20 30 40 50 60

CGACGCTTCAGTCAAGCGCATGCCCTCTGGTGCTGCTGGTGCTGGGGTGACCAGCGACAT

M P S G A A G A G V T S D I

70 80 90 100 110 120

CGACAGACTGAGAAGAAGCGACATAACGGTTCACGTGAATGTTGGTGGTAACATCAACCA

D R L R R S D I T V H V N V G G N I N H

130 140 150 160 170 180

CGGTCAAGTGAGCATTCGTGTGTCACAAAAGAAAAAGGCATTCCCGTTCGGGACATGTGT

G Q V S I R V S Q K K K A F P F G T C V

190 200 210 220 230 240

GGCCGCCTGGGCCTACAACGATGGGTCCAAAGGAGCATACCGGGATTTCATCCACCAGCA

A A W A Y N D G S K G A Y R D F I H Q H

250 260 270 280 290 300

CTACAACTGGGCCGTGCCAGAAAACTCACTCAAGTGGGCTAGCATCGAACCTAACAGGGG

Y N W A V P E N S L K W A S I E P N R G

310 320 330 340 350 360

ACAAAAGAACTATCAGCCTGGCCTAAACATGCTTCACGGACTGAGAAATCACGGGATTAA

Q K N Y Q P G L N M L H G L R N H G I K

370 380 390 400 410 420

GGTGAGAGGTCACAACCTGGTGTGGTCTGTCGACAATACGGTGCAGAACTGGGTCAAAGC

V R G H N L V W S V D N T V Q N W V K A

430 440 450 460 470 480

TCTGCATGGGGATGAGCTGCGAAAGGTTGTCCATGACCACATTGTGGAAACCATCAACAC

L H G D E L R K V V H D H I V E T I N T

490 500 510 520 530 540

GTTTAAGGGATTAGTGGAGCACTGGGATGTGAACAACGAGAACCTGCATGGCCAGTGGTA

F K G L V E H W D V N N E N L H G Q W Y

550 560 570 580 590 600

CCAGCATCAACTGAATGACAATGGCTACAACCTGGAACTGTTCCGTATCGCACACGCCGC

Q H Q L N D N G Y N L E L F R I A H A A

610 620 630 640 650 660

CGACCCCAACGTCAAACTCTTCCTCAACGACTACAACGTTGTGTCCAACAGTTTTTCAAC

D P N V K L F L N D Y N V V S N S F S T

670 680 690 700 710 720

AAACGACTATCTTCGACAAGGTCAACAGTTTAAGGCCGCTAATGTGGGTCTTTACGGTTT

N D Y L R Q G Q Q F K A A N V G L Y G L

730 740 750 760 770 780

GGGTGCTCAGTGCCACTTTGGCGACGAAAGCGACCCAGAACCCGGTACTAAGCAACGTCT

G A Q C H F G D E S D P E P G T K Q R L

790 800 810 820 830 840

GGATACTTTAGCTCAAGTGGGCGTGCCCATCTGGGCCACTGAGTTGGATGTGGTAGCTTC

D T L A Q V G V P I W A T E L D V V A S

850 860 870 880 890 900

GGATGAGAACAGACGAGCGGACTTCTATGAGCACGCGCTGACAGTCCTGTACGGCCATCA

D E N R R A D F Y E H A L T V L Y G H H

910 920 930 940 950 960

TGCCGTGGAGGGTATCCTCATGTGGGGCTTCTGGGACAAGGCCCACTGGCGTGGTGCCAG

A V E G I L M W G F W D K A H W R G A R

970 980 990 1000 1010 1020

AGCTGCTCTTGTTGTCGGAGACAACCTGCAGCTGACGGCGGCCGGACGTCGCGTGCTGGA

A A L V V G D N L Q L T A A G R R V L E

1030 1040 1050 1060 1070 1080

GCTCTTTGAGCACAGGTGGATGACAGACGAGACGCACAACCTGGCAGCGGGCACTCAGTT

L F E H R W M T D E T H N L A A G T Q F

1090 1100 1110 1120 1130 1140

CACAGTACGCGGTTTCCATGGCGACTACGAGGTGCAAGTCATCGTCCAGGGTCAAGAGCA

T V R G F H G D Y E V Q V I V Q G Q E H

1150 1160 1170 1180 1190 1200

CACCAACCTGAGGCAGACGTTCTCGTTGGGCAACGGTCCCCACACCGTCAACATTAATGT

T N L R Q T F S L G N G P H T V N I N V

1210 1220

TAGC*TAG*AGCGACACTCAGAGGGC

S *

Figure 2. The full length of nucleotide and deduced amino acid sequences of cellulase gene of *Pomacea canaliculata*. The primer sequences are bold-underlined.

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลลูเลสที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนเซลลูเลสชนิดอื่น ๆ พบว่ายีนเซลลูเลสที่ได้มีความคล้ายกับเซลลูเลสในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 10 (GHF10) โดยมีกรดอะมิโนที่น่าจะเป็น conserve catalytic nucleophile และ proton donor คือ Glu268 ซึ่งอยู่ในบริเวณอนุรักษ์ Thr-Glu-Leu-Asp และ Glu167 ซึ่งอยู่ในบริเวณอนุรักษ์ Asn-Asp-Tyr-Asn (รูปที่ 3) เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีรายงานไว้ใน GenBank พบว่ายีนเซลลูเลสที่ได้มีความเหมือน 98% กับยีนเซลลูเลสจากหอย *Ampullaria crossean* (GenBank Accession No. AAP31839)

```
Pomacea         M---------------------------------PSGAAGAGVTSDIDRLRRSDITVHV
Ampullaria      M---------------------------------PSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHV
Triticum        MGAFRLRTEPRTAVYVHGAPAGVDVKVMDVRVFPVDHKARFRQLKDKTDKARKRDVILKL
Bacillus        M----------------DKERSFLHHSFNRGENGQENLMWKKEADDRISEHRQRDLVINV
                *                                          .  .. *: *: :::

Pomacea         NVGGNINHGQVSIRVSQKKKAFPFGTCVAAWAYNDGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKW
Ampullaria      NVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTCVAAWAYNDGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKW
Triticum        GAG-----AAASVRVVQLDNAFPFGTCINTSVIQKP---AFLDFFTNHFDWAVFENELKW
Bacillus        TNGEKKPIAGIEVEIKQIRHEFAFGSAMNDQVLFNQ---QYADFFVKHFNWAVFENEAKW
                  *     .  .:.: *  : *.**:.:   .  .     : **: :*::*** **. **

Pomacea         ASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGIKVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGDELRKVVHD
Ampullaria      ASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGIKVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGDELRKVVHD
Triticum        YHTEAQQGQLNYADADALLAFCDRLGKHVRGHCVFWSVDGDVQQWVKNLNKDQLRSAMQS
Bacillus        YANEPERGKITYEKADAMLNFADRHQLPVRGHALFWEVEDANPSWLRSLPNHEVYEAMKK
                   *.::*: .*  .  :*    .    **** :.*.*:.   .*:: *  .:: ..::.

Pomacea         HIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYN
Ampullaria      HIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYN
Triticum        RLEGLVSRYAGRFRHYDVNNEMLHGRFFRDRLGDEDIPAYMFKEVARLDPEPALFVNDYN
Bacillus        RLEHAGNHFKGRFRHWDVNNEMMHGSFFKDRFGKN-IWKWMYEETKKIDPQALLFVNDYN
                ::    . : * ..*:***** :** :::.::..:     ::. .   **:  **:****

Pomacea         VVSN---SFSTNDYLRQGQQFKAANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVGVP
Ampullaria      VVSN---SYSTNDYLRQGQQFKAANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVGVP
Triticum        VERANDPNATPEKYAEQVAWLQRCGAVVGGIGLQGHVQNPVG--EVICAAIDRLAKTGVP
Bacillus        VISYG----EHHAYKAHINELRQLGAPIEAIGVQGHFEERVDP-VIVKERLDVLAELGLP
                *          . *  :   ::  .. : .:* * *. :  .        :* **: *:*

Pomacea         IWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWRGARAALVVGDNL
Ampullaria      IWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWRGARAALVVGDNL
Triticum        IWFTELDVPEYNVSLRAKDLEVVLREAYAHPAVEGIVFWGFLQGTMWR--ENSWLVDADG
Bacillus        IWVTEYDSVHPDPNRRADNLEALYRVAFSHPAVKGVLMWGFWAGAHWRG-EHAAIVNYDW
                ** ** *    : . **.  *      :.* **:*:::***   : **  . : :*. :

Pomacea         QLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSL
Ampullaria      QLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSL
Triticum        TVNEAG-QMFLNLQREWKTDARGNVDGDGNFKFRGFYGRYIVEVTTATGKHMLKTFTVEK
Bacillus        SLNEAG-RRYEKLLNEWTTQRVEKTDANGHVKCPAFHGTYEIRIGKENKMLKQQTIELD-
                 :. ** :    : ..* *:   :  .. :..  .*:* * :.:             ..

Pomacea         GNGPHTVNINVS-----
Ampullaria      GNGPHTVNINVS-----
Triticum        GDTDTPLLVDLSDA---
Bacillus        SNEQTPFQLDVILPQEG
                .:   .. :::
```

Figure 3. Multiple alignments of deduced amino acid sequence of cellulase gene of *Pomacea canaliculata* (this study), *Ampullaria crossean* (AAP31839), *Triticum aestivum* (AF156977), and *Bacillus pumilus* (AF466829). Asterisks indicated conserved amino acid across compared species. The conserve catalytic nucleophile and proton donor of Glu268, which is in the consensus sequence (WDVNNE), and the Glu167, which is in the consensus sequence (TELD), were boldfaced and underlined. The consensus region of glycosyl hydrolase family 10 (GHF10) (NDYN) were italicized and underlined.

สรุป

1. จากการโคลน cDNA ของยีนเซลลูเลส (EGX) จากส่วนกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ด้วยเทคนิค Reverse transcription-PCR (RT-PCR) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1250 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ open reading frame (ORF) ขนาด 1188 คู่เบส ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 395 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44 กิโลดาลตัน

2. จากการนำลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากยีน EGX ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank พบว่ามีความคล้ายกับยีนเซลลูเลสในหอย *Ampullaria crossean* 98 เปอร์เซ็นต์

คำนิยม

ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ รัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Byrne, K. A., Lehnert, S. A., Johnson, S. E. and Moore, S. S. 1999. Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gene 239: 317-324.

Girard, C. and Jouanin, L. 1999. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 29: 1129-1142.

Nathan, L., Watanabe, H. and Sugimura, M. 2003. Evidence for the presence of a cellulase gene in the last common ancestor of bilaterian animals. Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.) 270: S69-S72.

Purchon, R.D. 1977. In The Biology of the Mollusca, 2nd edn, pp. 24-243. Pergamon Press, Oxford.

Wang, J., Ding, M., Li, Y.H., Chen, Q.X., Xu, G.J. and Zhao, F.K. 2003. Isolation of a multi-functional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crossean*. Acta Biochima et Biophysica Sinica 35: 941-946.

Watanabe, H. and Tokuda, G. 2001. Animal cellulases. Cell. Mol. Life Sci. 58: 1167-1178.

Xu, B., Ersson, B., Hellman, U. and Janson, J.C. 2000. Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-β-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. Eur. J. Biochem. 267: 4970-4977.

Xu, B., Janson, J. C. and Sellos, D. 2001. Cloning and sequencing of a molluscan endo-β-1,4-glucanase gene from the blue mussel, *Mytilus edulis*. Eur. J. Biochem. 268: 3718-3727.

Yamaura, I. and Matsumoto, T. 1993. Purification and some properties of endo-1,4-β-D-mannanase from a mud snail, *Pomacea insularus*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1316-1319.

Yamaura, I., Koga, T., Matsumoto, T. and Kato, T. 1997. Purification and some properties of endo-1,4-β-D-xylanase from a fresh-water mollusc, *Pomacea insularus*. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 615-620.

---

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2]หน่วยปฏิบัติการวิจัยอณูชีววิทยาและยีโนมกุ้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Shrimp Molecular Biology and Genomics Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[3]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330