

1. นิสิตสนใจการผลิตเอทานอลจากสาหร่ายทะเล จึงศึกษาหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยยูนจากสาหร่ายให้เป็นน้ำตาล เพื่อเป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล์

จากการศึกษา พบแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยยูนได้ จึงโคลนยีนออกมาและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้  
ดาวน์โหลดไฟล์ได้ที่ [goo.gl/g3ZD2b](https://goo.gl/g3ZD2b)

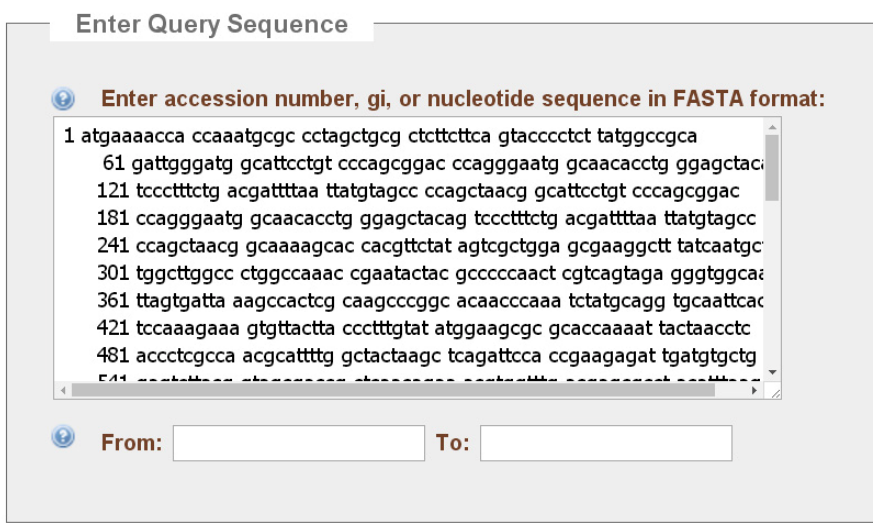
```
1 atgaaaacca ccaaatgctg cctagctgct ctcttcttca gtaccocctct tatggccgca
61 gattgggatg gcattoctgt cccagcggac ccagggaatg gcaacacctg ggagctacag
121 tcccttctg acgattttaa ttatgtagcc ccagctaacg gcattcctgt cccagcggac
181 ccagggaatg gcaacacctg ggagctacag tcccttctg acgattttaa ttatgtagcc
241 ccagctaacg gcaaaagcac cacgttctat agtcgctgga gcgaaggctt tatcaatgct
301 tggcttgccc ctggccaaac cgaatactac gcccccaact cgtcagtaga gggtyggca:
361 ttatgtatta aagccactcg caagcccggc acaacccaaa tctatgcagg tgcaattcac
421 tccaaagaaa gtgttactta ccctttgtat atggaagcgc gcacccaaat tactaacctc
481 accctcgcca acgcattttg gctactaagc tcagattcca ccgaagagat tgatgtgctg
541 gagtcttacg gttagcagcg ctcaacagaa acgtgggttg acgagcgcct acatttaagc
601 caccacgttt ttatccgcca gccttttcaa gactacccaa caaaagatgc aggtagctgg
661 taaccooaaoc ccgattggcg caacttgccg caacttgccg gaocaaattt tccgtatagg tgtttattgg
721 atagaccatc ggacattgga gtattacgtg aatggcgaat tagtacgcac cgttaagcggc
781 ccagaaatga ttgaccgcta cggttacacc aacggcacag gcctaagtaa acccatgcag
841 gttatttttg atgcagagca tcagccttgg cgcgagagag aaggtactgc cccaccacc
901 gacgctgagc tagccgactc gagtcgcaat caattcttag ttgactgggt acgattctac
961 aaaccctggt caaacaacaa tggttggcggc gaccctggca acggtggtaa tccagataat
1021 ggcaatggcg gcaaccctga taatggcagc agtggcgata cagtagtggt agaaatggcc
1081 aacttctctt ccaacaggtaa agaaggctct gcagttgagc gcgacacttt cacaggcttc
1141 aaccccagcg gcgccaacaa catcaactac aacccctag gggattgggc agactacacg
1201 gtgaaacttc ccgctgcggg taattacacc gtaaacctaa ttgctgcctc gccggttaca
1261 tctgggctgg gtgcagatat tttggtagac agcagttacg taggcaccat acctgttagc
1321 agcaccggag cttgggggat atacaacacc tttagtttgc ccagctcgat ttatatcgca
1381 agcgcaggca atcatactat tcgctgtaaa agctccggcg gcagcgcctg gcagtggaac
1441 ggcgacgaac ttgccttac ccaaacagat gcggatacag gcaccaatcc acccagctca
1501 accagcataa cggttgaagc agaaagcttt aacgcggctg gcggcacctt tagcgtgat
1561 caagctcaac ctgctagcgt ttacaccgtt agcggcaaca ctgccattaa ctacgtaaac
1621 caaggcgatt atgocgacta caccattacg gttgcccagg tgggtaccta caccattagc
1681 tatcaagctg gcagtgccgt aacaggtggc agcattgagt ttttagtaaa tgaaaacggc
1741 agctggagca gcaaaacagt taaccgctga ccaaaccaag gttgggataa cttccaaacc
1801 ctaaacggag gcagcgttta cctaagcgcga ggcaccacc aagttcgttt acacggcgcg
1861 ggcaagtaaa actggcagtg gaacctagat aagttcacgc ttagcaacta a
```

2. ใช้โปรแกรม ORF Finder เพื่อค้นหา open reading frame (คือบริเวณนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ Start codon ATG ถึง Stop codon ที่สามารถ translate เป็นโปรตีนได้)

2.1 พิมพ์ว่า ORF Finder ในช่อง URL ของ web browser เพื่อเข้าโปรแกรม ซึ่งอยู่ที่

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

2.2 copy ลำดับนิวคลีโอไทด์มาวางในช่อง Enter Query Sequence แล้วกด SUBMIT



- 2.3 ได้ ORF ทั้งหมด ..... ORF โดย ORF ที่มีจำนวนกรดอะมิโนมากที่สุด (ได้โปรตีนยาวที่สุด) มีจำนวนกรดอะมิโน =  
..... aa
- 2.4 กดปุ่ม SmartBLAST ที่มุมล่างซ้าย เพื่อนำ ORF ที่แปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วไปค้นหาในฐานข้อมูล GenBank
- 2.5 ผลการสืบค้น ดูที่แถบสีส้ม ยืนยันที่นิตศึกษา ตรงกันกับยีน .....
- 2.6 คลิกที่แถบสีส้มขวามือ เพื่อนำไปสู่รายละเอียดของยีนนี้ โดยกดที่ Sequence
- 2.7 กลับมาหน้าเดิม คลิกที่ [See full multiple alignment](#) เพื่อดูความคล้ายคลึงกับยีนอื่น ๆ ในฐานข้อมูล
- 2.8 กลับมาหน้าเดิม นำเมาส์ไปจ่อที่แถบสีส้มขวามือ copy ชื่อยีนมาได้ดังนี้

## beta-agarase II [*Saccharophagus* sp. AG21]

ความหมายคือ เอนไซม์ beta-agarase II จากสิ่งมีชีวิตชื่อ *Saccharophagus* sp. สายพันธุ์ AG21

### 3. ศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับ beta-agarase II

3.1 นำข้อความ beta-agarase II [*Saccharophagus* sp. AG21] ไปค้นใน Google

3.2 เข้าลิงก์แรกที่พบ

3.3 เนื่องจากใน PubMed มีแต่ Abstract จึงต้องคลิก FullText ลิงก์ขวามือ

3.4 पेเปอร์นี้ อยู่ในวารสารชื่อ .....

3.5 หน่วยงานใดเป็นเจ้าของวารสารนี้ .....

3.6 กดปุ่ม FullText ในรูป PDF

3.7 ศึกษาการลง Alignment ของโปรตีนใน Fig. 1

3.8 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ใน Fig.4

3.9 ศึกษา TLC ใน Fig. 5

3.10 อ่านย่อหน้าสุดท้ายของ Discussion สรุปประโยชน์ของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นภาษาไทยลงในที่ว่างข้างล่างนี้

In conclusion, an agarolytic bacterium was isolated from red seaweed, *G. amansii*, collected from Jeju Island and designated as *Saccharophagus* sp. AG21. The *Saccharophagus* sp. AG21 genome was found to encode a putative agarase, *agy1*. Subsequent cloning, sequencing, and TLC analysis of the overexpressed recombinant enzyme revealed that *Agy1* could degrade agarose mainly into neoagarohexaose and neoagarotetraose. Thus, *Agy1* was characterized as a  $\beta$ - agarase type I. Additionally, the biochemical activities of *rAgy1* suggested several inherent features that may benefit the cosmetic, health, food, bioethanol, and chemical industries.

### 4. การทำ restriction mapping (การวิเคราะห์แผนที่จุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ)

4.1 ค้นวิกิพีเดียภาษาอังกฤษ ดูว่า restriction enzyme ต่อไปนี้ ตัด DNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างไร

*EcoRI* (อี-โค-อาร์-วัน) ตัดที่ G|AATTC                      *BamHI* (แบม-เอช-วัน) ตัดที่ .....

*HindIII* (ฮิน-ดี-ทรี) ตัดที่ .....

*NotI* (น็อท-วัน) ตัดที่ .....

*Sau3AI* (ซอ-ทรี-เอ-วัน) ตัดที่ .....

*EcoRV* (อี-โค-อาร์-ไฟว์) ตัดที่ .....

4.2 จงเขียนลำดับนิวคลีโอไทด์สมมติ ให้มี 40 เบส และสามารถตัดด้วย *HindIII* กับ *EcoRV* ได้ และได้ชิ้นส่วน DNA 3 ชิ้น .....

4.3 เข้าโปรแกรม NEB Cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>) นำลำดับดีเอ็นเอข้างบนพิมพ์เข้าไป แล้ว Submit

4.4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ agarase จากข้อ 1. ใส่ลงในโปรแกรม แล้ว Submit ถามว่า *HindIII* ตัดยีนนี้ได้หรือไม่ ถ้าตัดได้ ตัดที่ตำแหน่งใด ตัดกี่แห่ง .....