ประกาศศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

เรื่อง ประกาศโฆษณาคำขอขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จุลชีพ และเซลล์เพาะเลี้ยง

ตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145/2564

ด้วยศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ได้รับคำขอขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จุลชีพ และเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ยื่นโดยนักวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามประกาศมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 145/2564 เพื่อขอรับหนังสือแสดงการขึ้นทะเบียนดังกล่าว ได้แก่ **แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo***

ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ได้พิจารณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว เห็นว่ามีรายละเอียดถูกต้อง ดังนั้น ศูนย์ฯ จึงให้มีการประกาศโฆษณาคำขอขึ้นทะเบียนดังกล่าว โดยมีรายละเอียดคำขอตามที่แนบมาท้ายประกาศนี้

หากผู้ใดมีสิทธิในส่วนได้เสีย หรือเห็นว่าคำขอขึ้นทะเบียนฯ ดังกล่าวไม่ถูกต้อง สามารถยื่นคัดค้านต่อเจ้าหน้าที่ ณ ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์ 043-202733 หรือ 086-4514455 ภายในกำหนดหกสิบวัน นับตั้งแต่วันเริ่มประกาศโฆษณานี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 4 ธันวาคม 2566 พ.ศ. 2566

นางจิราภรณ์ เหลืองไพรินทร์

รักษาการแทนผู้อำนวยการศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

แบคทีเรีย

(1) เลขที่คำขอ : 8/2566

(2) ชื่อพันธุ์ : BL21(DE3)-*Zmgfo*

(3) ชื่อผู้ขอ : นายพรเทพ ถนนแก้ว

(4) ชื่อผู้ร่วมวิจัย/ปรับปรุงสายพันธุ์ : นางสาวปรีย์กมล กลั่นฤทธิ์ และ นางนงลักษณ์ บุญโชติ

(5) รายละเอียดที่มาของพันธุ์ :

แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo* เป็นแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการปรับปรุง *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมหรือเทคโนโลยีดีเอ็นเอสาย ผสม (Recombinant DNA technology) โดยโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส (glucose-fructose oxidoreductase; *gfo* gene) จากแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* สายพันธุ์ TISTR548 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสไปเป็นซอร์บิ ทอลได้ ดังนั้น *E.* coli สายพันธุ์ BL21(DE3)-Zmgfo ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจึงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทสได้ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์จาก เอนไซม์ลูกผสม (Recombinant enzyme) ในการผลิตซอร์บิทอลจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ได้

วิธีการคัดเลือกพันธุ์/พัฒนาสายพันธุ์

1. การเพิ่มปริมาณ *gfo* gene จาก *Zymomonas mobilis* TISTR548 และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ สำหรับการโคลน (cloning vector)

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (Genomic DNA) จาก *Z. mobilis* TISTR548 ด้วยชุด GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis) จากนั้นใช้ดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้นี้ เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *gfo* gene อ้างอิงจากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นเพิ่มปริมาณ *gfo* gene ด้วยเทคนิค PCR โดยเตรียมสารละลายผสมในหลอด PCR ให้ได้ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งมีการเติมสารต่าง ๆ ดังนี้ *1)* น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส ปริมาตร 16.25 ไมโครลิตร 2) 10X Easy-A reaction buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 3) forward และ reverse primer (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร 4) dNTPs mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 5) Easy-A high-fidelity PCR cloning enzyme (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 6) DNA template ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันกัน จากนั้น นำหลอดปฏิกิริยา เข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่หนึ่ง initial

denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่สอง denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่สาม annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอนที่สี่ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ห้า final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และขั้นตอนที่หก final hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำหลอดออกจากเครื่อง โดยขั้นตอนที่สอง สาม และสี่ ทำซ้ำ 34 รอบ

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (*gfo* gene) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis) และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของ gfo gene กับ cloning vector ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ใช้ pTG19-T vector (Vivantis) โดยเตรียมปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (tigation reactions) ให้มีปริมาตร สุดท้าย 15 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 1) 10X tigation buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 2) pTG19-T vector ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 3) ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 4) T4 DNA tigase (Fermentas) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ 5) น้ำปราศจากนิวคลีเอส ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อ (ligation products) จากนั้นส่งถ่าย tigation products เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธี Chemical transformation ตามด้วยการให้ความร้อน (Heat shock) และคัดเลือกโคโลนี ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม (Recombinant plasmid) ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pTG19-T-Zmgfo จากนั้นส่งพลาสมิดลูกผสมที่มี *gfo* gene เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

2. การเพิ่มปริมาณ *gfo* gene และเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ (expression vector)

หลังจากการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *gfo* gene ที่โคลนได้จาก *Z. mobilis* TISTR548 เรียบร้อยแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณ *gfo* gene อีกครั้งด้วยเทคนิค PCR โดยใช้พลาสมิดลูกผสมเป็นต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบเฉพาะสำหรับการโคลนแบบ Directional cloning เตรียมสารละลายผสมใน หลอด PCR ให้ได้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยมีองค์ประกอบดังนี้ 1) 4X UltraRun LongRange PCR Master Mix (Qiagen) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 2) forward primer และ reverse primer (10 ไมโครโม ลาร์) ปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตร 3) น้ำปราศจากนิวคลีเอส ปริมาตร 25.2 ไมโครลิตร และ 4) ดีเอ็นเอ ต้นแบบ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่หนึ่ง initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนที่สอง denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่สาม annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่สี่ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ห้า final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

10 นาที และขั้นตอนที่หก final hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำหลอดออกจากเครื่อง โดยขั้นตอนที่สอง สาม และสี่ ทำซ้ำ 34 รอบ

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR *(gfo* gene) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้บริสุทธิ์ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis) และเชื่อมต่อ *gfo* gene กับเวกเตอร์ที่ใช้ใน การแสดงออกของยีน (expression vector) คือ pET-22b (Novagen) โดยเตรียมปฏิกิริยาการเชื่อมต่อให้มี ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร โดยมีองค์ประกอบดังนี้ 1) 2X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 2) pET22b vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 3) purified PCR product (*gfo* gene) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 4) T4 DNA tigase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 5) น้ำปราศจากนิวคลีเอส ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อ จากนั้นส่งถ่ายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วย วิธี Chemical transformation ตามด้วยการให้ความร้อน (Heat shock) และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pET-22b-Zmgfo จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การดัดแปลงพันธุกรรม *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ให้สามารถผลิตเอนไซม์ลูกผสม

ดัดแปลงพันธุกรรม *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ให้สามารถสังเคราะห์เอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส โดยส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากข้อ 2 (pET-22b-*Zmgfo)* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้สำหรับการส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี Chemical transformation ตามด้วยการให้ความร้อน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม ซึ่งแบคทีเรียโคโลนีที่ได้รับการยืนยันว่าได้รับพลาสมิดลูกผสมใช้ชื่อเรียกว่า *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo* โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LB พบว่าโคโลนีมีสีขาวเหลือง กลม นูน และ มีขอบเรียบ

4. การเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส

นำ E. *coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pET-22b-*Zmgfo* มาจาก glycerol stock 1 ลูปโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ และย้ายลงในอาหารเหลว LB จากนั้นบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB อีกครั้ง เพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย เลี้ยงแบคทีเรียจนกระทั่งค่า OD_{600} มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นเติมเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือมีค่า OD_{600} ประมาณ 0.5-0.8 ก่อนการเหนี่ยวนำ แบ่งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ออกเป็น 2 ฟลาสก์ โดยปริมาตรของแต่ละฟลาสก์เท่ากับ 50 มิลลิลิตร ใช้สาร Isopropyl β-D-1-thiogalacto pyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นสารเหนี่ยวนำ (inducer) ให้ผลิตเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส โดยฟลาสก์ที่ 1 เติม IPTG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (induced) ส่วนฟลาสก์ที่ 2 ไม่เติม IPTG (non- induced control) เก็บตัวอย่างเซลล์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วย

ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสและล้างด้วยซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate phosphate buffer) pH 6.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วกระจายตะกอนเซลล์ด้วยซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างโปรตีนที่ละลายด้วยซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ผสมกับ 2X SDS sample buffer ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่มีความเข้มข้นของเจลชั้นล่าง (separating gel) และชั้นบน (stacking gel) เท่ากับ 12% และ 5% ตามลำดับ โดยพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมซึ่งคาดว่ามีน้ำหนัก โมเลกุลประมาณ 47 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่าสภาวะในการชักนำการแสดงออกของโปรตีนมี ความเหมาะสม ซึ่งขนาดของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

5. การผลิตซอร์บิทอลโดยใช้เอนไซม์ลูกผสม

เตรียมสารละลายกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.3 M และสารละลายฟรักโทส ที่ความเข้มข้น 0.3 M ใน ซิเตรทฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดัก เทสที่ผลิตจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo* บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์การผลิตซอร์บิทอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทสสามารถ เร่งปฏิกิริยาการผลิตซอร์บิทอลจากกลูโคสและฟรักโทสได้ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์ กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลตั้งต้นให้เป็นซอร์บิทอลได้

(6) ลักษณะประจำพันธุ์ :

จุดเด่นที่สำคัญของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-*Zmgfo* คือมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคส-ฟรักโทส ออกซิโดรีดักเทส ในระดับสูง โดยที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสไปเป็นสารซอร์บิทอลได้ โดยสามารถประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบทางการเกษตรได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะ วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลซูโครส กลูโคสหรือฟรักโตสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งวิธีการนี้จัดเป็นวิธีการทาง ชีวภาพที่มีความปลอดภัยทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค โดยสามารถนำวิธีการผลิตทางชีวภาพนี้ไปประยุกต์ใช้ ทดแทนการผลิตซอร์บิทอลโดยวิธีการผลิตทางเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจะช่วยปัญหาต้นทุนการผลิต รวมทั้ง อันตรายและความเป็นพิษของสารเคมีที่อาจส่งผลเสียต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม