

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุม การสังเคราะห์ เอนไซม์ NADP⁺-
Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger*

โดย รศ.ดร. สมศักดิ์ สร้างสิน

กรกฎาคม พ.ศ. 2542

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุม การสังเคราะห์ เอนไซม์ NADP⁺-
Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger*

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.ดร. สมศักดิ์ สร้างปิ่น

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มข.

ศ.ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ และ
เทคโนโลยี ม.มหิดล
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำโครงการฯ นี้ จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดียิ่งในการให้คำปรึกษา ความรู้และเทคนิคต่างๆ รวมทั้งการทำหน้าที่ที่สมบูรณ์แบบที่สูงสุดในฐานะนักวิจัยที่ปรึกษา (Mentor) ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Shoji Usami แห่งมหาวิทยาลัย Waseda กรุงโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น ในการอนุเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อรา การใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อโครงการฯ ตลอดจนให้คำปรึกษา ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการฯ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกคน

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หายที่สุดนี้ ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำงานวิจัยโครงการฯ นี้ จนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

รศ.ดร. สมศักดิ์ สว่างบิน

Project Code: PDF39/2540

Project Title: Cloning and Sequencing of the NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase Gene from *Aspergillus niger*

Investigators: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, THAILAND.

E-mail Address: -

Project Period: August 1, 1997 - July 31, 1999

Objectives:

1. Cloning and sequencing of the NADP⁺-Specific isocitrate dehydrogenase gene from *Aspergillus niger* Yang no.2
2. Study the effects of NADP⁺-Specific isocitrate dehydrogenase for citric acid production from *Aspergillus niger* Yang no.2

ABSTRACT:

NADP⁺-Specific isocitrate dehydrogenase (*icdh*) is an important enzyme of the intermediary metabolism, as it controls the carbon flux within the citric acid cycle and it catalyzes the oxidative decarboxylation of D-isocitrate to form α -ketoglutarate, CO₂ and NADPH for biosynthetic purposes. In this research, we report the cloning and partially sequencing of the *Aspergillus niger* Yang no.2, hyper-producer of citric acid in semi-solid culture, gene encoding *icdh*. In order to obtain the *icdh*-encoding gene, consensus sequence for *icdh*-gene of Alfalfa, Pig, Yeast, Bovine and *A. niger* WU-2223L was used as a probe to identified PCR products of *icdh*-encoding gene. Using some synthesized oligonucleotide primers from the NADP⁺-Specific isocitrate dehydrogenase from *A. niger* WU-2223L, hyper-producer of citric acid in shake culture, the polymerase chain reaction was performed. Then each PCR product was ligated into pGEM-T Easy vector and sequenced. It is interesting that PCR product size of the *icdh*-encoding gene of *A. niger* Yang no.2 (3.0 Kb) is different from that of *A. niger* WU-2223L (2.4 Kb). The partial sequence of the *icdh*-encoding gene of *A. niger* Yang no.2 was obtained.

Key word: NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase, Citric acid production, *Aspergillus niger* Yang no.2

สัญญาเลขที่: PDF39/2540

ชื่อโครงการ: การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุม การสังเคราะห์ เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger*

หน่วยงาน: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

E-mail Address: -

ระยะเวลาโครงการ: 1 สิงหาคม 2540 – 31 กรกฎาคม 2542

วัตถุประสงค์: 1. เพื่อทำการโคลนและหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2

2. เพื่อศึกษาถึงบทบาทและอิทธิพลของเอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวใน *Aspergillus niger* Yang no.2

บทคัดย่อ:

เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) เป็นเอนไซม์ที่พบใน TCA Cycle โดยใช้เร่งปฏิกิริยา Oxidative Decarboxylation ของ Isocitrate ได้ผลิตภัณฑ์คือ α -Ketoglutarate และ CO₂ ซึ่งมีบทบาททั้งในการสร้างพลังงานและสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆของสิ่งมีชีวิต จากการพยายามที่จะหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ พบว่าจากการนำลำดับเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ของ Soybean, Alfalfa, Pig และ *A. niger* WU-2223L ในส่วนที่เป็น Consensus sequence เพื่อใช้ในการตรวจสอบ PCR products ที่มีส่วนของยีนที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคทาง PCR แล้วติดฉลากด้วย Digoxigenin-dUTP พบว่า PCR product ที่ใช้ทำเป็น Probe นี้จะมีขนาด 955 bp และเมื่อใช้ Primer ที่ได้จากการสังเคราะห์ในการหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ของ *A. niger* Yang no.2 พบว่า ขนาดของยีนที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้จะมีขนาดที่แตกต่างออกไปจากขนาดที่พบใน *A. niger* WU-2223L โดยมีขนาดประมาณ 3.0 kb ในขณะที่ *A. niger* WU-2223L จะมีขนาด 2.4 bp เท่านั้น และสามารถหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้บางส่วนได้

Key word: เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase, Citric acid production, *Aspergillus niger* Yang no.2

Executive Summary

1. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) เป็นเอนไซม์ที่พบใน TCA Cycle โดยใช้แรงปฏิกิริยา Oxidative Decarboxylation ของ Isocitrate ได้ผลิตภัณฑ์คือ α -Ketoglutarate และ CO₂ ซึ่งมีบทบาททั้งในการสร้างพลังงานและสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ใน *Aspergillus niger* ซึ่งเป็น Filamentous fungi นั้นเอนไซม์นี้จะมีบทบาทต่อการผลิตและการสะสมกรดมะนาว โดยพบว่า ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าสูงในช่วงต้นของการหมัก แต่จะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อมีการสะสมกรดมะนาวมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นเนื่องจากการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ดังกล่าวนี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาในระดับอนุชีววิทยาของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์นี้เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมหรือการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อทำการโคลนและหาลำดับเบสของยีนที่ควบคุม การสังเคราะห์ เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2
- 2.2 เพื่อศึกษาถึงบทบาทและอิทธิพลของเอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวใน *Aspergillus niger* Yang no.2

3. ระเบียบวิธีวิจัย

- 3.1 สกัด Genomic DNA จากเส้นใยไมซีเลียมของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2
- 3.2 เตรียม Oligonucleotide probe โดยการใช้เทคนิคทาง PCR เพื่อให้ได้ Probe ที่มีคุณสมบัติเป็น Consensus sequence ของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase จากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น Soybean, Alfalfa, Pig และ *A. niger*
- 3.3 หาลำดับของเบส NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2 โดย Synthetic primers แล้วตรวจสอบด้วย Probe ที่ได้จากข้อ 3.2

4. ผลการทดลอง

จากการนำลำดับเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ของ Soybean, Alfalfa, Pig และ *A. niger* WU-2223L ในส่วนที่เป็น Consensus sequence เพื่อใช้ในการตรวจสอบ PCR products ที่มีส่วนของยีนที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคทาง PCR แล้วติดฉลากด้วย Digoxigenin-dUTP พบว่า PCR product ที่ใช้ทำเป็น Probe นี้จะมีขนาด 955 bp และเมื่อใช้ Primer ที่ได้จากการสังเคราะห์ในการหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ของ *A. niger* Yang no.2 พบว่า ขนาดของยีนที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้จะมีขนาดที่แตกต่างออกไปจากขนาดที่พบใน *A. niger* WU-2223L โดยมีขนาดประมาณ 3.0 kb ในขณะที่ *A. niger* WU-2223L จะมีขนาด 2.4 kb เท่านั้น และสามารถหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมเอนไซม์นี้บางส่วนได้

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

กรดมะนาว (Citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้ตามธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ โดยจากพืชจะเป็นผลไม้ประเภทที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว ส้ม เป็นต้น ส่วนจากสัตว์จะอยู่ในรูปขององค์ประกอบของเนื้อเยื่อและของไหล เนื่องจากกรดมะนาวเป็นสารที่ละลายได้ง่าย มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายง่าย ราคาถูกและหาซื้อง่าย จึงพบว่าสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การผลิตยา เครื่องสำอาง ผสมน้ำยาขัดโลหะ เป็นต้น การผลิตกรดนี้ในระดับอุตสาหกรรมระยะแรกๆ ได้จากการสกัดกรดจากผลไม้พวกส้มและมะนาว ต่อมาได้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการผลิตมาเป็นการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้มีหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเชื้อยีสต์และแบคทีเรียบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ *A. niger* เพราะทำให้เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ใช้ในขบวนการหมัก นอกจากนั้นยังเป็นเชื้อราที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม เพราะจะทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูง และเนื่องจากความต้องการกรดมะนาวเพื่อป้อนเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ มีมาก ดังนั้น กระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น วัสดุที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จึงถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งศักยภาพในการหมัก เพื่อผลิตกรดมะนาวในปัจจุบันนี้ ได้ทำให้ผลผลิตของกรดมะนาวสูงกว่า 350,000 ตันต่อปี จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ตัวแปรที่มีความสำคัญในการผลิตกรดมะนาวให้มีราคาถูกคือ ขั้นตอนและกระบวนการผลิต สายพันธุ์ของรา และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมาก ซึ่งมีสารเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย จึงน่าจะเป็นการเหมาะแก่การนำมาพัฒนาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดมะนาวได้ แต่ยังไม่มียางานการผลิตกรดมะนาวจากเซลลูโลสได้โดยตรง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ดังนั้นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตจึงยังคงเป็นแป้งและน้ำตาล

ด้วยเหตุที่ชานอ้อยมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีกลูโคสเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพยายามศึกษาถึงกระบวนการปรับแต่งชานอ้อย ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนเข้าสู่ขบวนการหมัก เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบที่ได้จากการ

ปรับแต่งแล้ว รวมทั้งรูปแบบการนำกลูโคสไปใช้เพื่อผลิตกรดมะนาว และเนื่องจากสารตั้งต้นต่อที่คาดว่า จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาวอยู่ในสภาวะที่เป็นของแข็ง จึงต้องใช้สายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีความสามารถผลิตกรดมะนาวใน สภาวะแบบ Semi-solid culture

เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) เป็นเอนไซม์ที่พบใน TCA Cycle โดยใช้เร่งปฏิกิริยา Oxidative Decarboxylation ของ Isocitrate ได้ผลิตภัณฑ์คือ α -Ketoglutarate และ CO₂ ซึ่งมีบทบาททั้งในการสร้างพลังงานและสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิสมต่างๆของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ใน *Aspergillus niger* ซึ่งเป็น Filamentous Fungi นั้นเอนไซม์นี้จะมีบทบาทต่อการผลิตและการสะสมกรดมะนาว โดยพบว่า ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าสูงในช่วงต้นของการหมัก แต่จะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อมีการสะสมกรดมะนาวมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ใน *Aspergillus niger* จะพบเอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase อยู่ทั้งที่ไมโทคอนเดรีย และที่ไซโตพลาสซึม โดยเอนไซม์ที่พบในไมโทคอนเดรียจะถูกยับยั้งโดยซิเตรทในขณะที่เอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมจะถูกยับยั้งด้วย pH และ Mn²⁺ อย่างไรก็ตาม กลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด

ดังนั้นเนื่องจากการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ดังกล่าวนี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาในระดับอนุชีววิทยาของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์นี้เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมหรือการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

2. วิธีการทดลอง

- 2.1 เจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสูตรอาหารแบบกึ่งแข็งเมื่อใช้กลูโคส 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งต้นต่อของคาร์บอน ที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน
- 2.2 เก็บเส้นใย แล้วนำไปสกัด Genomic DNA โดยใช้วิธีทำให้เซลล์แตกด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัด DNA ด้วยเทคนิค Phenol-chloroform Extraction จากนั้นละลาย DNA ที่ได้ใน TE buffer
- 2.3 ทำการเตรียม Oligonucleotide probe โดยการใช้เทคนิค PCR ซึ่งมีลำดับของเบสที่มีคุณสมบัติเป็น Consensus sequence ของยีนที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น Soybean,

Alfalfa, Pig และ *A. niger* WU-2223L เป็นต้น ในการเตรียม Primers ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Probe I :

Sense 5' AAG TGC GCC ACC ATC ACT CCC GAT GAG GC 3'

Antisense 5' GAT GGG TTC ACG GAA GAC GGT ACC GCC 3'

2.4 นำ Probes ที่ได้จากข้อ 2.3 มาติดฉลากโดยใช้ DIG DNA labeling mix (Boehringer Mannheim)

2.5 ใช้เทคนิคทาง PCR ในการหาลำดับเบสของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้ Synthetic oligonucleotide primers ที่ได้จากลำดับเบสของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* WU-2223L เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ PCR Products ที่ได้ต่อ Probe ที่ได้จากข้อ 2.3 โดยมีลำดับของ Primers ที่สอดคล้องกับลำดับของเบสที่ได้จาก NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* WU-2223L ดังนี้

a:

Sense 1 5' ACC GAT GAG TCG ATC CGT GGC TTC GCC 3'

Antisense 1 5' TAA AGG CGG GAC TTG AGG TTG GCC 3'

b:

Sense 2 5' GAA TTC TAC TTT AAG CCT TTA ACG TT 3'

Antisense 1 5' TAA AGG CGG GAC TTG AGG TTG GCC 3'

c:

Sense 3 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 1 5' TAA AGG CGG GAC TTG AGG TTG GCC 3'

d:

Sense 4 5' CCA GAG TGA ACA GAA ACG ATT TTC CGG GTT CTC CG 3'

Antisense 1 5' TAA AGG CGG GAC TTG AGG TTG GCC 3'

e:

Sense 5 5' CAA GTG CGC CAC CAT CAC TCC CGA TGA GGC 3'

Antisense 1 5' TAA AGG CGG GAC TTG AGG TTG GCC 3'

f:

Sense 2 5' GAA TTC TAC TTT AAG CCT TTA ACG TT 3'

Antisense 2 5' ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC 3'

g:

Sense 3 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 2 5' ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC 3'

h:

Sense 4 5' CCA GAG TGA ACA GAA ACG ATT TTC CGG GTT CTC CG 3'

Antisense 2 5' ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC 3'

i:

Sense 5 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 2 5' ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC 3'

j:

Sense 2 5' GAA TTC TAC TTT AAG CCT TTA ACG TT 3'

Antisense 3 5' GAT GGG TTC ACG GAA GAC GGT ACC GCC 3'

k:

Sense 3 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 3 5' GAT GGG TTC ACG GAA GAC GGT ACC GCC 3'

l:

Sense 4 5' CCA GAG TGA ACA GAA ACG ATT TTC CGG GTT CTC CG 3'

Antisense 3 5' GAT GGG TTC ACG GAA GAC GGT ACC GCC 3'

m:

Sense 5 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 3 5' GAT GGG TTC ACG GAA GAC GGT ACC GCC 3'

n:

Sense 2 5' GAA TTC TAC TTT AAG CCT TTA ACG TT 3'

Antisense 4 5' CCT CAT CAC CGT CGA GCT CAA CGA CGG 3'

o:

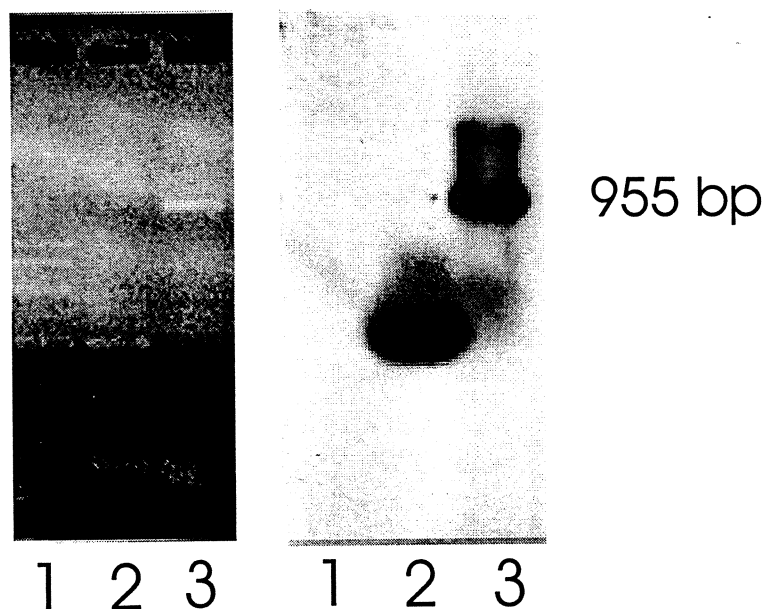
Sense 3 5' GGA CTG CAG CTT GAC CGG ACC CAT TAG 3'

Antisense 4 5' CCT CAT CAC CGT CGA GCT CAA CGA CGG 3'

- 2.6 ตรวจสอบผลของการทำ PCR โดยนำชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้ไปตรวจสอบบน Agarose gel ที่มีความเข้มข้นของเจลเท่ากับ 1.5%
- 2.7 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบขนาดและความจำเพาะต่อเอนไซม์ NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase โดยการ Hybridize กับ Probe ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3
- 2.8 นำผลิตภัณฑ์ได้จากข้อ 2.6 ไปเชื่อมเข้ากับ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วทำการทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* DH 5- α
- 2.9 คัดเลือกทรานสฟอร์มเม้นบน LB agar ที่มี 25 mg/ml ของ Ampicillin sodium salt, 4% X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) และ 0.1% IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) [LB(AXI)] โดยเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาว
- 2.10 นำโคโลนีเลือกได้จาก ข้อ 2.9 มาเขียนบนจานเลี้ยงเชื้อที่เป็น LB(AXI) โดยเก็บหนึ่งจานไว้เป็น Master plate
- 2.11 สกัด Plasmid DNA จากโคโลนีที่ได้จากข้อ 2.10 โดยทำให้เซลล์แตกด้วย Lysozyme และ Alkaline-SDS solution จากนั้นใช้เทคนิค Phenol-chloroform Extraction ในการสกัด Plasmid DNA แล้วละลาย Plasmid DNA ที่ได้ใน TE buffer
- 2.12 ดัด Plasmid DNA ที่ได้จากข้อ 2.10 ด้วยเอนไซม์ดัดจำเพาะที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้
- 2.13 ขณะเดียวกันนำทำการสกัด Plasmid DNA จากโคโลนีที่ได้จากข้อ 2.10 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับเบสของชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้
- 2.14 หาลำดับของเบสโดยเทคนิค Automated DNA Sequencing System

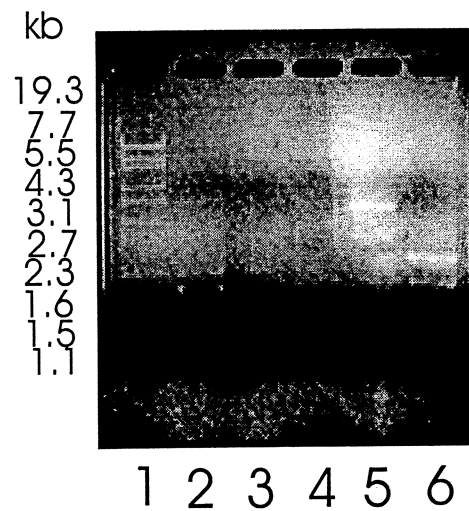
3. ผลการทดลอง

3.1 ผลจากการเตรียม Oligonucleotide probe โดยใช้ Consensus sequence ของยีนที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น Soybean, Alfalfa, Yeast, Pig และ *Aspergillus niger* WU-2223L ในการเตรียมเป็น Primers หลังจากที่ได้ผลผลิตออกมา ทำการนำ PCR product ที่ให้มาติดแท็กด้วย DIG DNA labeling mix เพื่อใช้เป็น Probe ในการติดตามต่อไป โดยได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1

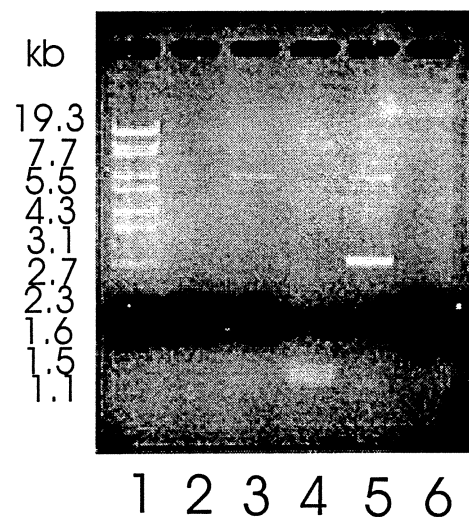


รูปที่ 1 Ethidium-bromide-stained 1.0 % agarose gel (a) showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* WU-2223L using various primers and the corresponding Southern blot (b). Lane 1, Molecular weight marker; lane 2, primer I and lane 3, primer II

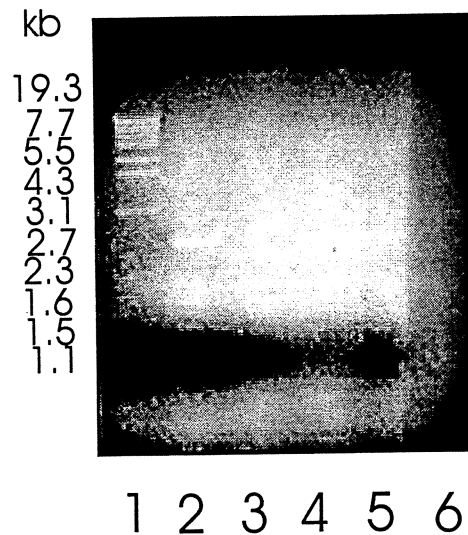
3.2 จากการทดลองหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2 ด้วยเทคนิคทาง PCR โดยใช้ Synthetic oligonucleotide primers ต่างๆ (Primer a-Primer o) ได้ผลิตผลดังแสดงในรูปที่ 2 - 5



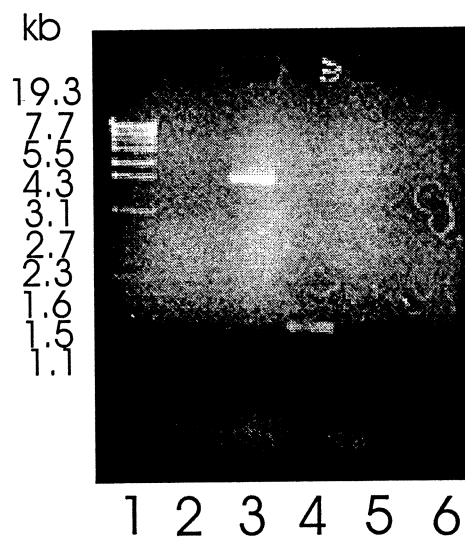
រូបភាព ២ Ethidium-bromide-stained gel showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* Yang no.2 using various primers. Lane 1, Molecular weight marker IV (Boehringer); lane 2, primer a; lane 3, primer b; lane 4, primer c; lane 5, primer d and lane 6, primer e.



រូបភាព ៣ Ethidium-bromide-stained gel showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* Yang no.2 using various primers. Lane 1, Molecular weight marker IV (Boehringer); lane 2, primer t; lane 3, primer g; lane 4, primer h; lane 5, primer i and lane 6, primer j.

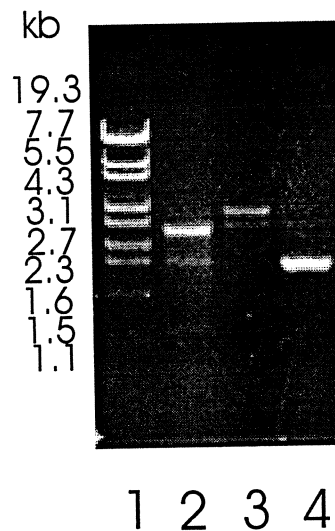


รูปที่ 4 Ethidium-bromide-stained gel showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* Yang no.2 using various primers. Lane 1, Molecular weight marker IV (Boehringer); lane 2, primer k; lane 3, primer l; lane 4, primer m; lane 5, primer n and lane 6, primer o.



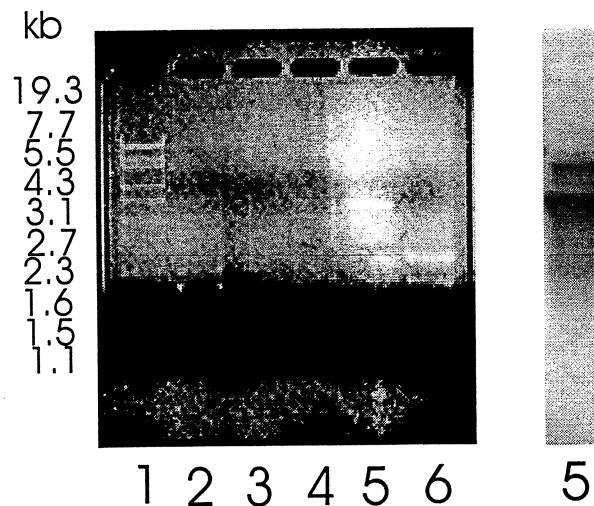
รูปที่ 5 Ethidium-bromide-stained gel showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* Yang no.2 using various primers. Lane 1, Molecular weight marker IV (Boehringer); lane 2, primer p; lane 3, primer q; lane 4, primer r and lane 5, primer s.

และจากการศึกษาขนาดของชิ้น PCR product ที่ได้จาก การใช้ Synthetic oligonucleotide primer d, g และ I พบว่า Primer d จะให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 3.0 kb Primer g จะให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 4.1 kb และ Primer I จะให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 2.3 kb และมีเพียงชิ้นเดียวเท่านั้น (รูปที่ 6)



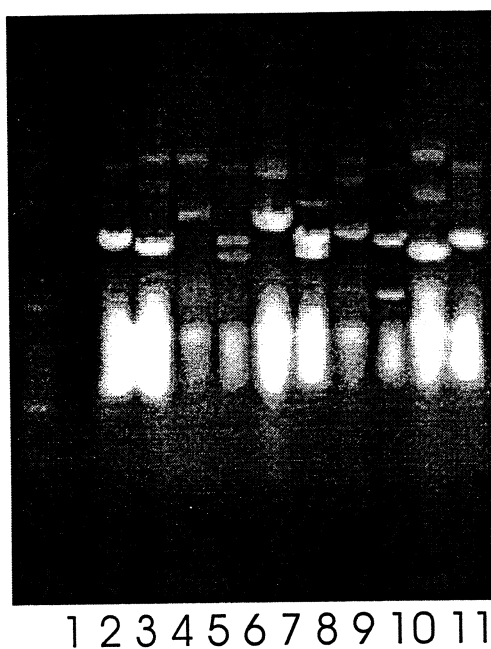
รูปที่ 6 Ethidium-bromide-stained gel showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* Yang no.2 using various primers. Lane 1, Molecular weight marker IV ; lane 2, primer d; lane 3, primer g and lane 4, primer I

3.3 ผลการศึกษาการถึงความจำเพาะของ PCR product ที่ได้จากการใช้ Synthetic oligonucleotide primer ต่อความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้วิธีการทำ Hybridization ด้วย Probe ที่มีความจำเพาะในการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase พบว่า เมื่อใช้ PCR product ที่ได้จากการใช้ Primer d ซึ่งเป็น Primer ที่ได้จากลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase ใน *Aspergillus niger* WU-2223L ซึ่งมีขนาด 2446 Base pair แต่อย่างไรก็ตาม PCR product ที่ได้จากการใช้ Primer d ในการทำ PCR โดยใช้ Genomic DNA ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 จะได้ชิ้นของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 3.0 kb และภายหลังจากการทำ Southern hybridization analysis จะให้ผลดังแสดงใน รูปที่ 7

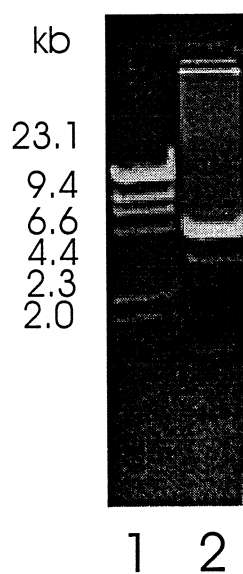


รูปที่ 7 Ethidium-bromide-stained 1.0 % agarose gel (a) showing PCR amplification products obtained with genomic DNA extracted from *A. niger* wU-2223L using various primers and the corresponding Southern blot (b). Lane 1, Molecular weight marker IV (Boehringer); lane 2, primer a; lane 3, primer b; lane 4, primer c; lane 5, primer d and lane 6, primer e.

3.4 การหาลำดับเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 นั้นจะใช้ PCR product ที่ได้จากการใช้ Primer d มาเชื่อมเข้ากับ pGEM-T Easy vector แล้วทำการ Transform เข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* DH 5- α แล้วทำการคัดเลือกบน LB agar ที่มี 25 mg/ml ของ Ampicillin sodium salt, 4% X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) และ 0.1% IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) [LB (AXI)] โดยเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาว จากนั้นทำการสกัด Plasmid DNA แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (EcoRI) เพื่อใช้ในการตรวจสอบ Insert fragment ดังแสดงในรูปที่ 8 จากนั้นพบว่า Plasmid DNA ที่ได้จาก Transformant no.8 เป็น Positive transformant (รูปที่ 9) จึงนำไปใช้หาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ต่อไปด้วยเทคนิค Automated DNA Sequencing System



รูปที่ 8 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from transformants digested with EcoRI. Lane 1, Molecular weight marker II (Boehringer); lane 2-10, plasmid DNA digested with EcoRI.



รูปที่ 9 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from transformant no.8 digested with EcoRI. Lane 1, Molecular weight marker II (Boehringer); lane 2, plasmid DNA digested with EcoRI

3.5 จากการทำ Automated DNA Sequencing System ของ Transformant no.8 พบว่า ได้ลำดับของเบสดังต่อไปนี้

T7

CATTGGGCaGACGTCGCATGCTCCNGGCCGCCATGGCGGCGCGGGAATTCGATTAAGGC
GGGACTTGAGGTTGGCCAACTACGTGACTCTCTTCGTCTCAATGCCGCCGGACTCGCCT
TGACCCTCGTGAATGTCTTCCAATGCCGTCCCGTCAGCGCGGCCGTTTCCTATCCCTTTCC
CGAGGGTGCCAAGTGCATCGACATCCTGACCCTATACCTATCCTCGTCGCCCCTCAACATT
GTGACCGACTTGCCATTCTCTTCCTGCCCAATCCCATCCTGACGCAAATGCGACTGCCG
CGCAAGCAAAAGATCATCCTCGTCATCACCTTCAGTTTTGGTTTTCTTTGTCGCCGTCTCG
ATGTCATCCGCATTGCCTACATCCAGGATGCGGCCACCTCCCGTCAGATCGCGTTGAGAG
AGGTCCATCTGCAGGATACCCCGGGTGATGACCTCAGCTGTACGTCCCTGTCCTTTCTTTC
TCCCTATCTTCCTGCTGATCGCCCCAGGGTACGGGGCGTTTTTCATTTATGTGGTCCGTCA
TCGAATCACGTTTCCGTCTCTGTGCCTGTGTGCCAGTCTCAAGCCGCTTGTCGCGCGACT
CATCCCGAACTGATCCGTGACCTGACGGACTCCAGGCCACGACTTCCCTGCCGCTCCGAT
CACCTGAAATCgACGTCaCGGGCTCTATGCCGCGCCTCCCTACAAATCGCaCCAGAATAA
CgTCCATCGAAACAAGATCTCGCTCGCCGTgACCCAATT

SP6

NCCATGCTaTGCTCCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGGCCGCG
AATTCAGTAGTGATTAAGGCGGGACTTGAGGTTGGCCAGTTCCTCCAGATCCTCGTCCGAT
GCCTCGGGGATAGGCAGATAATAGAAAGCGAGAGCGAGGAGTACGTGAACAGTGCGAT
GCCCAAATATGTCCACTGCACATCGACCAGAGTACTCACATCGGTCACAGATTTGAACAGC
ACCTTCTTGGCCAGTAGCTGCGAGACGACGCTGCCAATTGCCTGCACGCCCTGCGAGATG
TTCAGCCGAATCTCCGAGTTTTTCGAGTGGTCCGCATAGCGCAATGAACGGATTGGCGGCC
GTCTCCAGCACCGCCAGTCCACTGCCCAATGAAATTGGACACGATGAAACCAGGGTAC
GAAGTCAGCACGGCTGACGGCCAGAAGACCAGAGTGCCGCAGGCATAAATGCACAGCCC
AGTGATAAAGGTGCACTTGAACCCCCAGCGCTTCAGCACGACGCCCCCACAACGCTGG
CGCCACCAGATACCCCCAAAgTACACGCATGCAGACAAATGACTGCCAGACGTCCAGGCC
CAgGATATCCTGAATCTGCTCGTTCAAGATAGCCAGCAAGCCGTATGCaAAGCCCCAgAAG
AAGAAcAAGATGGTGGTCAGCGCGATAGGGCATGGACTCTTATGCTCACTTCACATGTGGC

CGGTTCTCATTGACAATcCAAAAAGTATgCTGGGCGATCAcTTGTTGTGTACGGTCTCGGT
CCACTCGAGGN

ซึ่งจากการทำ Alignment ในส่วนของลำดับเบสที่เป็น T7 พบว่า จะปรากฏส่วนของ Vector ของ pGEM-T vector ที่ตำแหน่ง 10-54 และ 781-840 นอกจากนั้นยังพบ Primer ที่ตำแหน่ง 55-76 แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถที่จะทำการหาลำดับของเบสของยีนที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ได้ทั้งหมด เนื่องจากเป็น Fragment ที่ใหญ่ (ประมาณ 2.6 kb) จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะต้องทำการหาลำดับของเบสทีละส่วน

4. บทวิจารณ์

ในการหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ซึ่งคาดว่าจะมีลำดับของเบสแตกต่างไปจาก ยีนที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* WU-2223L ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* WU-2223L จะมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ดีในสภาวะการเจริญแบบเขย่า (Shaking culture) จึงอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าความแตกต่างกันในการผลิตกรดมะนาวที่มีสภาวะการเจริญที่ต่างกัน ซึ่งเป็นอีกหนทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตกรดมะนาวได้อีกทางหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวทั้งในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็งและแบบเขย่าจะมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของพลังงานและแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

อย่างไรก็ตามในการวิจัยในครั้งนี้ไม่สามารถที่จะหาลำดับของเบสที่ใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ตลอดทั้งหมดได้ (Complete sequence) เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยไม่เพียงพอ ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Eikmanns, B. J., Rittmann, D. and Sahm, H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme, *Journal of Bacteriology*, 177, 774-782.
2. Fukuda, S., Kirimura, K., Sarangbin, S., Kanayama, S. and Usami, S. (1992) Cloning and Restriction Mapping of the Mitochondrial DNA from *Aspergillus niger*, *Bulletin of Science and Engineering Research Laboratory, Waseda University*, 138, 10-15.
3. Galvez, S., Hodges, M., Decottignies, P., Bismuth, E., Lancien, M., Sangwan, R. S., Dubois, F., LeMarechal, P., Cretin, C. and Gadai, P. (1996) Identification of a tobacco cDNA encoding a cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase, *Plant Molecular Biology*, 30, 307-320.
4. Haselbeck, R. J. and McAlister-Henn, L. (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP (H) – specific isocitrate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 2339-2345.
5. Huh, T., Ryu, J., Huh, J., Sung, H., OH, I., Song, B. J. and Veech, R. L. (1993) Cloning of a cDNA encoding bovine mitochondrial NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase and structural comparison with its isozymes from different species, *Biochem. J.*, 292, 705-710.
6. Hurley, J. H., Chen, R. and Dean, A. M. (1996) Determinants of cofactor specificity in isocitrate dehydrogenase: Structure of an engineered NADP⁺ → NAD⁺ specificity-reversal mutant, *Biochemistry*, 35, 5670-5678.
7. Kirimura, K., Sarangbin, S., Rugsaseel, S. and Usami, S. (1992) Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 573-577.
8. Loftus, T. M., Hall, L. V., Anderson, S. L. and McAlister-Henn, L. (1994) Isolation, characterization, and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP (H) –specific isocitrate dehydrogenase, *Biochemistry*, 33, 9661-9667.

9. McDermott, T. R. and Kahn, M. L. (1992) Cloning and mutagenesis of the *Rhizabium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene, *Journal of Bacteriology*, 174, 4790-4797.
10. Sarangbin, S. and Watanapokasin, Y. (1999) Yam bean starch: a novel substrate for citric acid production by the protease-negative mutant strain of *Aspergillus niger*, *Carbohydrate Polymers*, 38, 219-224.
11. Shorosh, B. S. and Dixon, R. A. (1992) Molecular characterization and expression of an isocitrate dehydrogenase from alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Molecular Biology*, 20, 801-807.
12. Suzuki, M., Sahara, T., Tsuruha, J., Takada, Y. and Fukunaga, N. (1995) Differential expression in *Escherichia coli* of the *Vibrio* sp. Strain ABE-1 *icdI* and *icd II* genes encoding structurally different isocitrate dehydrogenase isozymes, *Journal of Bacteriology*, 177, 2138-2142.
13. Suzuki, A., Sarangbin, S., Kirimura, K. and Usami, S. (1996) Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*, *J. Ferment. Bioeng.*, 81(4), 320-323.
14. Udvardi, M. K., McDermott, T. R. and Kahn, M. L. (1993) Isolation and characterization of a cDNA encoding NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from soybean (*Glycine max*), *Plant Molecular Biology*, 21, 739-752.
15. Zhao, W. and McAlister-Henn, L. (1996) Expression and gene disruption analysis of the isocitrate dehydrogenase family in yeast, *Biochemistry*, 35, 7873-7878.

output

คาดว่าจะสามารถนำไปเสนอในการประชุมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาวรวมทั้งการสร้างสายพันธุ์ใหม่ในการผลิตกรดมะนาว และหากทำการวิจัยต่อก็คาดว่าจะได้รับการพิจารณาให้ลงตีพิมพ์ในวารสาร Gene หรือ Molecular genetics ได้

ภาคผนวก

(ใบแนบ)

A. niger ICDH = *Aspergillus niger*
Yeast ICDH = *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial
Pig ICDH = pig heart mitochondrial
Bovine ICDH = bovine kidney mitochondrial

A. niger ICDH 1:MSSVRFSSALARRSFAVASPPLSAPLSSSARRFLSSSSSTISSSSSVSTRSPRSLTSASSLLSSRTASARWTGLSSLNL
 Yeast ICDH 1:-----
 Pig ICDH 1:-----A-----R-----A-----
 Soybean ICDH 1:-----MTMI.N.A.AAIHTGLCF.LLISH---LTFY.SQS
 Alfalfa ICDH 1:-----
 Bovine ICDH 1:-----MAGYL.VV...CR..GSG.AWAPR.--LTAPN.QE

A. niger ICDH 81:TQSRMTATEIPKIKVKNPVVELDGDGMTRIIWQEIREKLILPYLDVDLKYYDLGLERYDQTDQDQTVVEAAEAIAKKYGVGV
 Yeast ICDH 81:FST SRL.A-FS....Q.....DK.KK.....SV.S.A.S.KI.QD.....I
 Pig ICDH 81:---HYAD-QR...AK...M.....F.K.....HV.Q...F...PN...N...IDS.L.TQ..S.A.
 Soybean ICDH 81:QIRTLAMAAFQ...A.I..M.....V.KS.KD...F.EL.I.....P..E...K.I.S..TL..N.AI
 Alfalfa ICDH 81:---M-GFQ...A.I..M.....KY.KD...F.FVEL.I..F...P..E.N.K...S..TL..N.AI
 Bovine ICDH 81:QPR..-HYAD-KR...AK...M.....F.K.....HV..Q...F...PN...N...IDS.L.TQ..S.A.
 **** * ** ***** ** * *** * ** ** * ** * ** * ** * ** *

A. niger ICDH 161:KCATITPDEARVEEFKIKMWSLSPNGTIRNLGGTVFREPIIIPRLVPGWNKPIIIGRHAFGDQYRATDRVIPGPGK
 Yeast ICDH 161:.....K.N.H...K.....V..R.....R.E.....H...K...TL.....S
 Pig ICDH 161:.....K.N.H...K.....CKN.....T...T...H...K...F.VDRA.T
 Soybean ICDH 161:.....K.G.S.K.....N.....LCKN.....T.A.C.....T..K.A..
 Alfalfa ICDH 161:.....K.G.S.R.....N.....CKN...I...T...C.....S..K..
 Bovine ICDH 161:.....K.....K.....CKN.....T...T...H...K...F.VDRA.T
 ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

A. niger ICDH 241:LELVY--T-PVNGEPETVKVYDFQGGGIAQYNTDESIRGFAHASFQMA LLKGLPLYMSTKNTILKRYDGRFKDIFQEI
 Yeast ICDH 241:.....KPSD.TTAQ.Q.L...YK.S.V.MAM.....E....S..KL.ID.K.N.FL.....K.....V
 Pig ICDH 241:FKI.FTPKDGSSAKQWE.YNFPA--VGMGM.....S...SC.Y.IQ.KW.....A.....V
 Soybean ICDH 241:K..FVPEGQGEETEFE.FNFTGE.-VSLAM.....S.E.MAT..E.KW..L.....K.....V
 Alfalfa ICDH 241:K..FVPEGQGETTDLE.YNFTGE.-V.LAM.....S.E.MAV..E.KW..L.....K.....V
 Bovine ICDH 241:FKV.FTPKDGSGPKWE.YNFPA--VGMGM.....S...SC..Y.IQ.KW.....A.....A..
 ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

A. niger ICDH 321: YESTYQKDFEAKNLWYEHRLIDDWAQMIKSEGGFVMALKNYDGDVQSDIVAQGFGLGLMTSTLVTPTGEAFESAAGH
Yeast ICDH 321: ..AQ.KSK..QLGIH.....K..I.....I.....D.KT.....
Pig ICDH 321: F.KH.KT..DKYKI.....VL..S...W.C.....L.....V..C.D.KTI.A.....
Soybean ICDH 321: ..ASWKS...AGI.....YAL...Y.W.C.....FL.....V..C.D.KTI.A.....
Alfalfa ICDH 321: ..AGWKS...AGI.....YAL...Y.W.C.....FL.....V..C.D.KTI.A.....
Bovine ICDH 321: F.KH.KTE.DKHKI.....VL..S...W.C.....L.....V..C.D.KTI.A.....
* **** * *** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** *
A. niger ICDH 401: TVTRHYREHQGRETSNPIASIFAWTRGLIQRGKLDETPDVVTFAEEELERACIEVNVNDEGIMTKDLALAC-GRKEREAW
Yeast ICDH 401: .....KY...E.....S...LK..E..N..ALCK..NI..S..TLNT.QQD.....-..NN..S..Y
Pig ICDH 401: .....P.....EH.....GNQ.LIR..QT..KV.V.T.-ES.A.....GCIH.LSNVKLN
Soybean ICDH 401: .....F.V....G....S.....AH.A...DNAKLLD.T.K..A...G...-EA.K.....ILH.-SKLS-R
Alfalfa ICDH 401: L...F.V....G....S.....VAHSENWMTMLHSWI.T.K..A...G...-ES.K.....ILH.-SKLS-R
Bovine ICDH 401: .....P.....EH.....GNQ.LIR..QT..KV.V.T.-ES.A.....GCIH.LSNVKLN
* **** * *** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** *
A. niger ICDH 481: VTTREYMAAVERRLKANLKSRL--
Yeast ICDH 481: ...E.FLD...K..QKEI..IE--
Pig ICDH 481: EHFLNTSDFLDTIKSNLDRALGRQ
Soybean ICDH 481: EHYLNTEEFIDAVAAELSA-
Alfalfa ICDH 481: EHYLNTEEFIDAVAAELTKISA-
Bovine ICDH 481: EHFLNTSDFLDTIKSNLDRALGQQ

```

Fig. Amino acid sequence alignment of several NADP-specific ICDHs.