



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จาก
สเตรปโตคอคคัสและแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล

The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene
and its expression in *Escherichia coli*

โดย ผศ. ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ

กันยายน 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัส
และแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล

**The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene
and its expression in *Escherichia coli***

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผ.ศ. ดร.บุญศรี จงเสรีจิตต์

ผ.ศ. ดร.ชนิต ผิวคุ้ม

ศ.ดร. อมเรศ ภูมิรัตน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การที่จะประสบความสำเร็จในการวิจัยนั้น ประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่าง ทั้งความฉลาด ความรอบคอบในการวางแผนการทดลองและความเอาใจใส่ในการทดลอง รวมทั้งการแก้ปัญหาที่ไม่สามารถคาดการณ์ล่วงหน้าได้ ตลอดจนปัจจัยแวดล้อมต่างๆจากภายนอก เช่น สภาพของภาระงานหลักที่ทำอยู่ เวลา ความพร้อมของห้องปฏิบัติการ และความสนับสนุนทางด้านต่างๆ ทั้งด้านการเงินและด้านกำลังใจ งานวิจัยเรื่อง “การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัสและแสดงผลในเอชเซอรีเซีย คอไล” เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำในเมืองไทยหลังจากที่ผู้วิจัยสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกจากต่างประเทศ งานวิจัยชิ้นนี้เกิดขึ้นได้ด้วยความสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งต้องขอขอบคุณอย่างยิ่งสำหรับนโยบายการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยหลังปริญญาเอกในลักษณะเช่นนี้ที่ทำให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสเปิดช่องทางการทำวิจัยในที่ทำงานตนเอง ซึ่งต้องต่อสู้กับอุปสรรคและปัญหาหลายประการในการก่อสร้างห้องปฏิบัติการทางอณูพันธุศาสตร์ขึ้นมาในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จนเป็นผลสำเร็จพร้อมๆกับการทำงานวิจัยนี้ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีส่วนสำคัญยิ่งในการเริ่มต้นพัฒนางานวิจัยด้านนี้ของภาควิชาฯ นอกจากนั้นต้องกราบขอบพระคุณ ศ.ดร. อมเรศ ภูมิรัตน์ ที่กรุณาให้ความสนับสนุนตั้งแต่เริ่มแรกในการเขียนขอรับทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในงานวิจัยชิ้นนี้ด้วยดีเสมอมา อีกท่านหนึ่งที่ต้องมองเห็นความสำคัญของงานวิจัยนี้และยินดีให้ความสนับสนุนแก่ผู้วิจัยคือ ผศ.ดร.ชนิด ฝัวนิม รวมทั้งขอขอบคุณ Prof. Shiginori Kanaya และ Assoc. Prof. Masaaki Morikawa ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำในเรื่องเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ดีเอ็นเอพาหะ และเซลล์เจ้าบ้านหลายสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ และที่จะขาดเสียมิได้คือขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้ความสนับสนุนและเป็นสถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

บุญศรี จงเสรีจิตต์

Project Code : PDF/30/2542

(รหัสโครงการ)

Project Title : การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัส

(ชื่อโครงการ) และแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอลิ

The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene
and its expression in *Escherichia coli*

Investigator : ผ.ศ. ดร.บุญศรี จงเสรีจิตต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

(ชื่อนักวิจัย) ผ.ศ. ดร.ชนิด ฝูนิ่ม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ศ. ดร.อมเรศ ภูมิรัตน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : boonsri@su.ac.th

Project Period : 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

ในโครงการวิจัยนี้ได้เริ่มจากออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากนั้นนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์นี้มาใช้ในการทำ PCR โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Streptococcus zooepidemicus* เป็นแม่แบบ แยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป จากการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนของไฮยาลูโรแนน ซินเทส (*hasA*) ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น และได้ทำการวิเคราะห์โดย gene walking จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *hasA* ซึ่งมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 1.25 กิโลเบส สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส ซึ่งให้ชื่อว่า sz HAS โดยเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว (มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คำนวณได้คือ 47.77 kDa) โปรตีนนี้มี 2 putative transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล จากนั้นนำท่อนดีเอ็นเอของ *Streptococcus* ซึ่งมียีน *hasA* มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำท่อนดีเอ็นเอที่ได้นี้มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกคือ pET 28a (Invitrogen, USA) ได้เป็นพลาสมิด pHAS แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ *E. coli* BL 21 DE3, *E. coli* BL 21 (codon+) และ *E. coli* HMS 174 (DE3) pLysS ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนได้ใน *E. coli* BL 21 (codon+) แต่มีระดับต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายกลุ่มอะมิโนของเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) เป็นรหัสที่ไม่ค่อย

พบใน *E. coli* ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโน อย่างไรก็ตามพบว่า *E. coli* นี้ถึงแม้จะมีพลาสมิด pHAS ที่ดัดแปลงรหัสแล้วและสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส แต่ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังนั้นน่าจะต้องมีการโคลนยีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกไปด้วย

Abstract

The cloning of hyaluronan synthase (HAS) gene of *Streptococcus zooepidemicus* (group C Streptococcus, GCS) was performed by the strategy of the polymerase chain reaction (PCR), using the design of degenerate oligonucleotides based upon conserved sequences from other organisms. The PCR product was isolated, and then characterized by DNA sequencing. The nucleotide sequence was determined and the deduced amino acid sequence was then compared with known HAS sequences. The amino acid sequence showed high similarity to other known HAS. In order to obtain the entire *hasA* sequence, gene walking was performed. Sequence analysis indicated that *hasA* encode a protein; hyaluronan synthase, designated szHAS, 417-amino acids protein (calculated molecular mass, 47.77 kDa). The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 transmembrane domains at the carboxyl end. Streptococcus DNA fragment containing *hasA* was amplified using PCR. The amplified fragment was incorporated into expression vector pET-28a (Invitrogen, USA). The pHAS, bearing the *hasA* has been transformed into *E. coli* BL21 DE 3, *E. coli* BL 21 (codon+) and *E. coli* HMS 174 (DE3) plysS. The result showed that the *hasA* could only express in *E. coli* BL 21 (codon+). However, the expression level was made in disappointingly small amounts. One factor influencing expression level might be the result of rare codon usage of some codons near the N-terminus of *hasA* which could have severe effects on protein yield. Therefore, the rare codon modifications near the N-terminus of *hasA* were performed. However, the *E. coli* host could not produce HA even if they contain the pHAS plasmid with the rare codon modifications and could produce hyaluronan synthase.

Keywords: Hyaluronic acid, Hyaluronan synthase, *Streptococcus* sp., Polysaccharide engineering, Gene cloning

บทนำ

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นโพลีแซคคาไรด์(Polysaccharide)ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มีการนำมาใช้ทางการแพทย์หลายอย่างเช่น ใช้เป็นสารหล่อเลี้ยงในการผ่าตัดตา ผ่าตัดเส้นโลหิต ผ่าตัดอวัยวะ และใช้ในการรักษาอาการอักเสบของข้อต่อ ใช้ในการรักษาแผล ตลอดจนใช้สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ใช้กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมทาหน้า กรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาใช้ในวงการแพทย์และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีมาตรฐานความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน ทางวงการแพทย์มีความต้องการความบริสุทธิ์ของกรดที่สูง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสามารถผลิตได้หลายวิธีคือ การผลิตโดยการแยกจากสิ่งมีชีวิต การผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ขึ้นจากโมเลกุลของน้ำตาลโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ และการผลิตจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* โดยวิธีการแยกสกัดจากสิ่งมีชีวิตทั้งจากเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ เป็นวิธีการที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในปัจจุบัน ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกจำหน่ายคือ HYLARTILE ของบริษัท Pharmacia, Inc. ซึ่งผลิตจากเหงือกของไก่ตัวผู้ แต่เป็นวิธีที่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาสูง นอกจากนั้นยังมีข้อเสียในเรื่องการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น และการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส ตลอดจนการปนเปื้อนจาก bacteriophage หรือไวรัสที่มีในเนื้อเยื่อสัตว์ ภายหลังได้ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ของสัตว์ เพื่อนำมาทำการสกัด ซึ่งทำให้วิธีการผลิตง่ายขึ้นและราคาถูกลง แต่พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากวิธีนี้จะปนเปื้อนด้วย proteoglycan ชนิดอื่นอยู่เสมอ เช่น chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate หรือ keratan sulfate สารเหล่านี้มีโครงสร้างและสมบัติใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิก จึงมีผลต่อวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของกรดกระทำได้ยาก

สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยกระบวนการหมักจากแบคทีเรียนั้นนับว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้อย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนของ proteoglycan และ glycosaminoglycan ชนิดอื่นๆ และที่สำคัญกว่านี้คือสามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามที่ต้องการได้ จัดเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตสูง ใช้เวลาในการหมักสั้น ต้นทุนต่ำเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้สามารถหาได้ง่าย อีกทั้งสามารถที่จะทำการปรับปรุงและควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย โดยการปรับปรุงสูตรอาหาร คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ และควบคุมสภาวะในการหมักให้เหมาะสม แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสีย คือเชื้อที่ใช้ในการผลิตและให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงนั้นอยู่ในกลุ่ม β -haemolytic *Streptococci* group A,C ซึ่งส่วนมากมักก่อให้เกิดโรค และยังสามารถผลิตสเตรปโตไลซินซึ่งเป็นสารที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่หากปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกจะมีผลทำให้เกิดการ

ระคายเคือง และหากปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทางการแพทย์ก็จะเป็นอันตรายมากขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ไฮยาลูโรเนตส่วนใหญ่ที่ใช้ในทางการแพทย์จึงเป็นไฮยาลูโรเนตที่สกัดมาจากสิ่งมีชีวิต อันได้แก่หางอนไก่และสายสะดือ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะแหล่งที่มาประกันความปลอดภัยได้ดีกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว(stationary phase) โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิคแบบจำเพาะเจาะจงได้หน่วยย่อยของ N-acetylglucosamine ทำให้กรดดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดลดลง

ดังนั้นในการนำเชื้อเหล่านี้มาใช้งานจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ตลอดจนในด้านความปลอดภัยของผู้ใช้ จึงควรคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติดังนี้

1. ไม่สร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส
2. สร้างกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณสูง
3. ปลอดภัยพิษ
4. ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง

การที่จะได้เชื้อที่มีคุณสมบัติทั้งสี่ข้อครบถ้วนจากเชื้อตามธรรมชาตินั้นอาจหายาก จึงอาจใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ (mutation) เพื่อให้ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติตามต้องการ อย่างไรก็ตามแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพทำได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาถึงยีนที่ควบคุมการสร้าง hyaluronan synthase จาก *Streptococcus* sp. โดยการโคลนยีน hyaluronan synthase (*hasA*) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide อันจะเป็นพื้นฐานความรู้สำคัญในการปรับปรุงโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่อไป รวมทั้งได้ทำ overexpression ของยีน *hasA* จาก *Streptococcus* sp. ใน *E. coli* ซึ่งจะทำให้ได้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติที่ดีทั้งสี่ข้อที่กล่าวมาในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเมื่อทำสำเร็จ จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตไฮยาลูโรเนตได้เป็นอย่างมาก ในปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์นี้ทั้งหมดจากต่างประเทศ พิจารณาเพียงการใช้สารนี้จำนวน 0.05 มิลลิกรัม ในการผ่าตัดเปลี่ยนเลนส์เทียม 1 ครั้ง ก็เป็นค่าไฮยาลูโรเนตมากกว่า 5,000 บาทแล้ว งานวิจัยนี้อาจมีผลในระยะยาวในการช่วยบรรเทาสภาวะขาดแคลนทางเศรษฐกิจได้ทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. สามารถทำการโคลนยีน hyaluronan synthase จากเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* โดยใช้เทคนิคทาง PCR
2. สามารถทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide ของ hyaluronan synthase gene (*hasA*) จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษาทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ของ hyaluronan synthase (HAS) ต่อไป รวมทั้งการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้
3. สามารถสอดใส่ (transform) ยีน hyaluronan synthase (*hasA*) ของเชื้อ *S. zooepidemicus* นี้เข้าไปใน *E. coli* เพื่อให้มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) ได้ในปริมาณสูงขึ้น
4. วิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้

วิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาคือ *Streptococcus Zooepidemicus* ส่วนจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TOP 10 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pCR[®]-Blunt และ pBAD-TOPO[®] vector (Invitrogen, USA) และ *E.coli* JM 109 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pUC18/19, PCR 2.1 cloning vector (original TA cloning vector kit) (Invitrogen, USA) และ pCR[®] Blunt cloning vector. นอกจากนั้น *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3, สายพันธุ์ BL21 (codon+) และสายพันธุ์ HMS 174 (DE3) pLysS ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pET-28a expression vector (Invitrogen, USA). อาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* ได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ *E.coli* คือ LB medium
2. การโคลนยีน hyaluronan synthase (*hasA*) จาก *S. zooepidemicus*
 - 2.1 แยก genomic DNA จาก *S. zooepidemicus* ด้วยวิธีของ Caparon และ Scott (1991)
 - 2.2 สังเคราะห์ PCR primer โดยอาศัย conserved sequence ของลำดับกรดอะมิโนของ HAS จาก *Streptococcus pyogenes* และ DG42 จาก *Xenopus laevis* (DeAngelis and Achyuthan, 1996) รวมทั้ง nod C ซึ่งเป็น *Rhizobium meliloti* modulation factor (Nagahashi et al., 1995). จากนั้นนำ PCR primer นี้มาใช้สำหรับทำ PCR โดยใช้ genomic DNA เป็น template ทำ PCR โดยใช้เครื่อง thermocycler (Geneamp PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster, CA) ด้วยโปรแกรมดังนี้: i)

1 รอบที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 min, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที; ii) 30 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

2.3 หลังจาก PCR amplification แล้ว นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product มาแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gene clean kit (BIO 101. Inc.) แล้วนำมาทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ homology ระหว่าง PCR product ที่ได้ กับ *hasA* ของสิ่งมีชีวิตอื่น เมื่อมีความน่าจะเป็นว่าเป็นท่อน DNA ที่เราต้องการ และยังไม่ครอบคลุม *hasA* gene ก็ให้นำท่อน DNA ดังกล่าวมาดำเนินการตามวิธีข้อ 2.4

2.4 Southern hybridization และ Colony hybridization: นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product จากข้อ 2.3 มาใช้เป็น probe โดยติดฉลากด้วย digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) เพื่อนำมาตรวจหาชิ้น DNA ที่มี *hasA* อยู่ โดยวิธี Southern hybridization จากนั้นตัดชิ้นชิ้น (agarose gel) ที่มีท่อนดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากชิ้นชิ้น และนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC 19 จากนั้นสอดใส่เข้าไปใน *E. coli* JM 109 เพื่อสร้างเป็นธนาคารยีน แล้วทำการคัดเลือกหาโคลนที่มียีนที่ต้องการโดยวิธี Colony hybridization ซึ่งติดฉลากท่อนดีเอ็นเอที่ใช้เป็น probe ด้วย digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลนที่ให้ผลบวกมาตรวจสอบอีกครั้งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทำ Southern hybridization เพื่อให้แน่ใจว่าดีเอ็นเอดังกล่าวมาจาก *S. zooepidemicus* หลังจากหาลำดับ DNA และทำ homology search แล้ว หากท่อน DNA ชิ้นใหม่ที่ได้ยังไม่ครอบคลุมยีนที่ต้องการ ให้ดำเนินการติดตามหาชิ้นส่วน DNA ที่ขาดหายไปโดยการทำ gene walking กล่าวคือ ออกแบบว่าจะใช้ชิ้นส่วนจาก DNA ที่มีอยู่ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใด เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้เป็น probe ตัวที่ 2 ในการทำ Southern และ Colony hybridization ครั้งที่ 2 ต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide ทำการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide บนท่อน DNA ซึ่งเป็นที่ตั้งของ *hasA* homologue ด้วยวิธี dideoxynucleotide chain-termination method ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sanger และคณะ (1977) โดยใช้ fluorescent primers (Auto Read Sequencing kit, Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Sweden) และใช้เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (a automated DNA sequencing system, ALF express, Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Sweden). จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของลำดับ nucleotide

และ deduced amino acid โดยใช้ DNASIS™ software (Hitachi softwares Co. Ltd., Tokyo, Japan)

4. Expression cloning ของยีน *hasA* ใน *E. coli*

4.1 ทำการเพิ่มจำนวนท่อน DNA ซึ่งมียีน *hasA* homologue โดยหลังจากหาลำดับ nucleotide ของทั้ง open reading frame (ORF) ของยีน HAS homologue แล้ว ทำการสังเคราะห์ oligonucleotide เพื่อใช้เป็น primer โดยต้องมี restriction site คือ *NdeI* และ *BamHI* ที่เหมาะสมกับการโคลนยีนต่อไปเพื่อขยายจำนวนยีน (amplify) โดย PCR

4.2 ทำ PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้จากข้อ 4.1 และใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Promega, USA) ซึ่งจะได้ท่อนดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส นำท่อนดีเอ็นเอที่ได้นี้มาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด PCR 2.1 และสอดใส่เข้าไปใน *E. coli* จากนั้นสกัดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ แล้วนำมาตัดด้วย *NdeI* และ *BamHI* และนำเข้าเชื่อมต่อกับ expression vector คือ pET-28a® (Invitrogen, USA) จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ซึ่งให้ชื่อว่า pHAS สอดใส่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM 109 และ *E. coli* BL 21 DE 3 ตามลำดับ นอกจากนั้นได้ทำการสอดใส่เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งได้แก่ *E. coli* BL 21 (codon+) และ *E. coli* HMS 174 (DE3) pLysS เพื่อหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของยีน โดยทำการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pHAS ด้วยวิธี colony PCR

5. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hasA* ในเซลล์เจ้าบ้านตัวใหม่ โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3, สายพันธุ์ BL21 (codon+) หรือ สายพันธุ์ HMS 174 (DE3) pLysS ซึ่งมีพลาสมิด pHAS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งมี kanamycin (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดความขุ่นของเชื้อที่ 660 นาโนเมตรได้ 0.4 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยการใส่ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 มิลลิโมลาร์ และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นที่ 8,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonication). จากนั้นนำมาปั่นที่ 120,000 x g เป็นเวลา 60 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับบัฟเฟอร์ นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้มาเติม UDP-N-acetylglucosamine 1 มิลลิโมลาร์ และ UDP-glucuronic acid 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกโดยการปั่นที่ความเร็วสูง (ultracentrifuge) 120,000 g เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ซึ่งมี Triton

X-114 ลงในเยื่อหุ้มเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นที่ความเร็วสูงเพื่อแยกส่วนสารละลายไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

- 5.1 ทำการวิเคราะห์โดยดูจากแถบโปรตีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทสบน sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)
- 5.2 วิเคราะห์หาปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซลด้วยการวัด uronic acid (ดัดแปลงจาก Dische, 1947; Bernfeld 1955; Miller 1958) โดยการปั่นแยกเชื้อที่เลี้ยงไว้ที่ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาเติมเอทานอลเป็นปริมาตร 2 เท่า แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อดกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก จากนั้นเก็บเกี่ยวตะกอนที่ได้แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

ผลการทดลอง

1. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ *S. zooepidemicus* ที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสำหรับการทดลองต่อไป
2. สามารถโคลนยีน hyaluronan synthase (*hasA*) จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ที่คัดเลือกไว้โดยขั้นตอนดังนี้
 - 2.1 แยก genomic DNA จาก *S. zooepidemicus*
 - 2.2 สังเคราะห์ PCR โดยอาศัย conserved sequence ของ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น
 - 2.3 ทำ PCR amplification ด้วยการนำ primer ที่สังเคราะห์ได้มาทำ PCR โดยใช้ genomic DNA จาก *S. zooepidemicus* เป็นแม่แบบ หลังจาก PCR amplification แล้ว นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product มาทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์ homology ระหว่าง PCR product ที่ได้ กับ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น และจากการวิเคราะห์พบว่า PCR product ที่ได้มี homology กับ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น จากนั้นทำการโคลนยีน *hasA* จาก *S. zooepidemicus* แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
3. ผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของ *hasA* จากเชื้อที่นำมาศึกษา พบว่ามีความยาว 1.25 กิโลเบส จากข้อมูลดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ว่ามี homology กับเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างโพลีเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน

417 ตัว มีค่ามวลโมเลกุลจากการคำนวณเป็น 47.77 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เป็น 9.01 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งได้ส่งข้อมูลเข้า GenBank โดยมีหมายเลขคือ BankIt 419336 AF 414053 สิ่งที่น่าสนใจคือลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *S. zooepidemicus* มีความเหมือนกับ *S. equisimilis* ถึง 99.7 % และมีความเหมือนกับ *S. pyogenes* ถึง 70.4 % ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 นอกจากนั้นยังพบว่า szHAS มี topology (ดังแสดงในภาพที่ 4) เหมือนกับ seHAS (จาก *S. equisimilis*) และ spHAS (จาก *S. pyogenes*) รวมทั้ง HAS ที่พบในยูคาริโอต โดยมี 2 putative transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 membrane-associated หรือ transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล รวมทั้ง hydropathy plot สำหรับเอนไซม์นี้จากเชื้อ *Streptococcus* ทั้งสามเหมือนกันด้วย

4. ผลการแสดงออกของ *hasA* จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ใน *E. coli* แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการตัดต่อยีน *hasA* เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pET-28a (Invitrogen, USA) ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนนั้น เมื่อ transform เข้าในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 (codon⁺) และ *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS พบการแสดงออกของยีน *hasA* ได้เฉพาะใน *E. coli* BL21 (codon⁺) อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีนหรือการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนอาจเป็นผลมาจากการหีสของกรดอะมิโนของ szHAS ซึ่งมีรายงานว่าเป็รหีสที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* โดยเฉพาะอย่างยิ่งรหีส arginine ที่อยู่ใกล้กับปลายด้านกลุ่มอะมิโนของสายโปรตีน (N-terminus) ของ szHAS ซึ่งพบว่าจะมีผลอย่างยิ่งกับผลผลิตโปรตีนที่ได้ (Zhang et al., 1991; Sorensen et al., 1989; Brinkmann et.al., 1989; Chen and Inouye, 1990) ฉะนั้นจึงได้ทำการทดลองเปลี่ยนรหีสกรดอะมิโนที่เป็นรหีสซึ่งไม่ค่อยพบใน *E. coli* บางรหีสที่อยู่ใกล้ปลายด้านกลุ่มอะมิโนของสายโปรตีนคือเปลี่ยนรหีส Arg จาก AGA เป็น CGT และ Thr จาก ACA เป็น ACC รวมทั้งเปลี่ยน Ile จาก ATA เป็น ATC (Komine et. al., 1990) จากนั้น เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pET-28a ตั้งชื่อเป็น pET-*hasA* (rare) แล้วtransform เข้าในเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ต่างๆคือ *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 (codon⁺) และ *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS จากการทดลองพบว่า pET-*hasA*(rare) มีการแสดงออกของยีน *hasA* โดยพบแถบโปรตีนของเอนไซม์ hyaluronan synthase ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เฉพาะใน *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS ดังแสดงในภาพที่ 5

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในดีเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 4. ไม่พบว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโคลนยีน *hasA* เพียงตัวเดียว ถึงแม้จะมีการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทสได้ แต่ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก กล่าวคือในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกนั้นอาจต้องการสับสเตรทบางตัวซึ่งไม่มีในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาอินที่เกียวข้องและจำเป็นต่อการสร้าง

กรดชนิดนี้ใน *E. coli* ซึ่งจากข้อมูลที่มีอยู่พบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามธรรมชาติของ *S. pyogenes* จำเป็นต้องอาศัยความช่วยเหลือของเอนไซม์อีก 2 ตัวคือ UDP-glucose dehydrogenase และ UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *hasB* และ *hasC* ตามลำดับ (Cameron และคณะ, 1998) อีกวิธีหนึ่งคือ ทำการเลือกเฟ้นหา *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *hasA* จาก *S. zooepidemicus* ซึ่งเป็น Group C Streptococcus ได้ ด้วยวิธี PCR โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อนุกรมที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนของไฮยาลูโรแนน ซินเทส ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 1.25 กิโลเบส ยีน *hasA* สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (ชื่อย่อว่า sz HAS) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คำนวณได้คือ 47.77 kDa โปรตีนนี้มี 2 transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล เมื่อนำท่อนดีเอ็นเอของ Streptococcus ซึ่งมียีน *hasA* มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำท่อนดีเอ็นเอที่ได้ขึ้นมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกคือ pET 28a (Invitrogen, USA) จากนั้นทดลองนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านหลายสายพันธุ์ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนนี้ได้ใน *E. coli* BL 21 (codon+) เท่านั้น แต่มีระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากรหัสของกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโนของ HAS เป็นรหัสที่ไม่ค่อยใช้ใน *E. coli* ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโน อย่างไรก็ตามพบว่า *E. coli* นี้ถึงแม้จะมีพลาสมิด pHAS ที่ดัดแปลงรหัสแล้วและสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนนซินเทส แต่ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังนั้นน่าจะต้องการโคลนยีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกร่วมด้วย ซึ่งจากข้อมูลพบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามธรรมชาติใน *S. pyogenes* ซึ่งเป็น Group A Streptococcus จำเป็นต้องอาศัยความช่วยเหลือของเอนไซม์อีก 2 ตัวคือ UDP-glucose dehydrogenase และ UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *hasB* และ *hasC* ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปน่าจะทำการโคลนยีนทั้งสองนี้ด้วย

1	ATGAGAACATTAATAAAACCTCATACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTG	60
1	M R T L K N L I T V V A F S I F W V L L	20
61	ATTACGTCATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTTTGG	120
21	I Y V N V Y L F G A K G S L S I Y G F L	40
121	CTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTACAAGCCATTAAAGGA	180
41	L I A Y L L V K M S L S F F Y K P F K G	60
181	AGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCA	240
61	R A G Q Y K V A A I I P S Y N E D A E S	80
241	TTGCTAGAGACCTTAATAAGTGTTCAGCAGCAACCTATCCCTAGCAGAAATTTATGTT	300
81	L L E T L K S V Q Q Q T Y P L A E I Y V	100
301	GTTGACGATGGAAGTGTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGAC	360
101	V D D G S A D E T G I K R I E D Y V R N	120
361	ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTCCCGGTGAGAAAAAATCAAGGAAAGCGT	420
121	T G D L S S N V I V H R S E K N Q G K R	140
421	CATGCACAGGCTGGGCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCA	480
141	H A Q A W A F E R S D A D V F L T V D S	160
481	GATACTTATCTACCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACT	540
161	D T Y I Y P D A L E E L L K T F N D P T	180
541	GTTTTGCTGCGACGGGTACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGC	600
181	V F A A T G H L N V R N R Q T N L L T R	200
601	TTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCCAATCCGTTACA	660
201	L T D I R Y D N A F G V E R A A Q S V T	220
661	GGTAATATTCTCGTTTGTCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCT	720
221	G N I L V C S G P L S V Y R R E V V V P	240
721	AACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGAC	780
241	N I D R Y I N Q T F L G I P V S I G D D	260
781	AGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAA	840
261	R C L T N Y A T D L G K T V Y Q S T A K	280
841	TGTATTACAGATGTTCTGACAAGATGTCTACTTACTGAAGCAGCAAAACCGCTGGAAC	900
281	C I T D V P D K M S T Y L K Q Q N R W N	300
901	AAGTCCTTTCTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGT	960
301	K S F F R E S I I S V K K I M N N P F V	320
961	GCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTATTCTGTGGTGGAT	1020
321	A L W T I L E V S M F M M L V Y S V V D	340
1021	TTCTTTGTAGGCAATGTGAGAGATTTGATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTTCTGGTGATT	1080
341	F F V G N V R E F D W L R V L A F L V I	360
1081	ATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCTGTAATATTCATATATGCTTAAGCACCCGCTGCTCTTC	1140
361	I F I V A L C R N I H Y M L K H P L S F	380
1141	TTGTTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCAATTTGTTTGTCTACAGCCCTTGAAATTGTAT	1200
381	L L S P F Y G V L H L F V L Q P L K L Y	400
1201	TCTCTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAATTATTATAA	1254
401	S L F T I R N A D W G T R K K L L *	418

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. zooepidemicus* HAS ORF. The DNA sequence (top row) of the ORF encoding szHAS was cloned from genomic DNA of *S. zooepidemicus*. The encoded amino acid sequence is shown on the bottom row.

			← MD 1 →			← MD 2 →	
<i>S. zooepidemicus</i>	1	MRTLKNLITV	VAFSIFWVLL	FVNVYLFGA	KGSLSTYGEF	LIAYLLVKMS	50
<i>S. equisimilis</i>	1	MRTLKNLITV	VAFSIFWVLL	FVNVYLFGA	KGSLSTYGEF	LIAYLLVKMS	50
<i>S. pyogenes</i>	1	M-----	-----	-----YLRGT	-STVGIYGV	LETYLVIKLG	50
			*	*	**	* *	
<i>S. zooepidemicus</i>	51	LSFFYKPFKG	RAGQYKVAAT	IPSYNEDAES	LLETLKSVQQ	QTYPLAEIYV	100
<i>S. equisimilis</i>	51	LSFFYKPFKG	RAGQYKVAAT	IPSYNEDAES	LLETLKSVQQ	QTYPLAEIYV	100
<i>S. pyogenes</i>	51	LSFLYEPPFG	NPHDYKVAAT	IPSYNEDAES	LLETLKSVLA	QTYPLSEIYI	100
			**	* * *	* * *	*	
<i>S. zooepidemicus</i>	101	VDDGSADETG	IKRIEDYVRD	TGDLSSNVIV	HRSEKNQGKR	HAQAWAFERS	150
<i>S. equisimilis</i>	101	VDDGSADETG	IKRIEDYVRD	TGDLSSNVIV	HRSEKNQGKR	HAQAWAFERS	150
<i>S. pyogenes</i>	101	VDDGSSNTDA	IQLIEEYVNR	EVDICRNVIV	HRSLVNKGKR	HAQAWAFERS	150
		*				* ***	
<i>S. zooepidemicus</i>	151	DADVFLTVDS	DTYIYPPDALE	ELLKTFNDPT	VFAATGHLNV	RNRQTNLLTR	200
<i>S. equisimilis</i>	151	DADVFLTVDS	DTYIYPPDALE	ELLKTFNDPT	VFAATGHLNV	RNRQTNLLTR	200
<i>S. pyogenes</i>	151	DADVFLTVDS	DMTYFNDALE	ELLKSFNDPT	VFAATGHLNV	RNRQTNLLTR	200
		*	*** **	*	*	*	
<i>S. zooepidemicus</i>	201	LTDIRYDNAF	GVERAAQSVT	GNILVCSGPL	SVYRREVVP	NIDRYINQTF	250
<i>S. equisimilis</i>	201	LTDIRYDNAF	GVERAAQSVT	GNILVCSGPL	SVYRREVVP	NIDRYINQTF	250
<i>S. pyogenes</i>	201	LTDIRYDNAF	GVERAAQSLT	GNILVCSGPL	SVYRREVVP	NIDRYINQTF	250
		** **	*** **	*****	**	* * *	
<i>S. zooepidemicus</i>	251	LGIPVSIQDD	RCLTNYATDL	GKTVYQSTAK	CITDVPDKMS	TYLKQONRWV	300
<i>S. equisimilis</i>	251	LGIPVSIQDD	RCLTNYATDL	GKTVYQSTAK	CITDVPDKMS	TYLKQONRWV	300
<i>S. pyogenes</i>	251	LGLPVSIGDD	RCLTNYAIDL	GRTVYQSTAR	CDTDVPFQK	SYLKQONRWV	300
		*	***	* * *		* * * *	
				← MD 3 →			
<i>S. zooepidemicus</i>	301	KSFFRESIIS	VKKIMNPFV	ALWTFLEVSM	FMMLVYSVD	FFVGNVREFD	350
<i>S. equisimilis</i>	301	KSFFRESIIS	VKKIMNPFV	ALWTFLEVSM	FMMLVYSVD	FFVGNVREFD	350
<i>S. pyogenes</i>	301	KSFFRESIIS	VKKILSNPIV	ALWTFEVM	FMMLIVAIGN	LLFNQAIQLD	350
		** ***		* *	*		
			← MD 4 →		← MD 5 →		
<i>S. zooepidemicus</i>	351	WLRVLAFLVI	IFIVALCRNI	HYMLKHPLSF	LLSPFYGVH	LFVLQPLKLY	400
<i>S. equisimilis</i>	351	WLRVLAFLVI	IFIVALCRNI	HYMLKHPLSF	LLSPFYGVH	LFVLQPLKLY	400
<i>S. pyogenes</i>	351	LIKLFALSI	IFIVALCRNV	HYMKHPLSF	LLSPFYGIH	LFVLQPLKLY	400
		*			* *	* * *	
<i>S. zooepidemicus</i>	401	SLFTIRNADW	GTRKKLL*--	-----	-----	-----	450
<i>S. equisimilis</i>	401	SLFTIRNADW	GTRKKLL*--	-----	-----	-----	450
<i>S. pyogenes</i>	401	SLCTIKNTEW	GTRKKVTIFK	*-----	-----	-----	450
		*	* ****				

Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of HAS from *S. zooepidemicus* with *S. equisimilis* and *S. pyogenes*. The alignment was adjusted to the degree of overall sequence similarity with *S. zooepidemicus* using the DNASIS software (Hitachi Software, Yokohama, Japan). Identical amino acids are shown on a black background. Residues in szHAS that are identical in all other HAS family members (including human HAS1, HAS2 and HAS3, which are not shown) are denoted by asterisks. The amino acids indicated by dots are conserved in all members of the larger β -glycosyltransferase family (Nagahashi et.al.,1995). The approximate midpoints of predicted membrane domains (MD) 1 though 5 are indicated.