



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ใน
แบคทีเรีย *Escherichia coli*

Production of recombinant DNA ligase of *Synechocystis* sp. PCC 6803
in *Escherichia coli*

นายเชตศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

12810642

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเอสของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ใน
 แบคทีเรีย *Escherichia coli* แหล่งเงินทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้
 ประจำปีงบประมาณ.....2558..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน.....200,000.....บาท
 ระยะเวลาทำการวิจัย.....1.....ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558
 ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัยพร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
 ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ สังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
 ทหารลาดกระบัง และ ดร.ปณิตดา ยอดแสง สังกัด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ราชบุรี

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอไลเอสที่ใช้ NAD^+ (EC 6.5.1.2) จากสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 (sll1209) ได้ถูกศึกษาแสดงลักษณะของโปรตีนผ่านเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatic tools) ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนทำนายจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 669 หน่วย พร้อมกับมีค่าทำนายขนาดเป็น 74.62 กิโลดาลตัน ค่า pI ที่คำนวณคือ 5.59 ลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอไลเอสได้ถูกเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอไลเอสด้วยตัวเองแต่มาจากหลายกลุ่มสิ่งมีชีวิตได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรีย และกลุ่มสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต ผลการศึกษา Bootstrap neighbor joining phylogenetic tree พบว่าดีเอ็นเอไลเอสของ *Synechocystis* sp. PCC6803 ถูกจัดกลุ่มเข้าไปอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตไซยาโนแบคทีเรีย การศึกษาทางด้านโปรตีนโดเมนยังพบอีกว่าดีเอ็นเอไลเอสที่ศึกษานี้ประกอบด้วย 5 โดเมน ได้แก่โดเมน adenylation OB DN HHH และ BRCT ลักษณะของโดเมน adenylation ยังคงตรวจพบลำดับกรดอะมิโนเป็น K-X-D-G ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเอนไซม์ไลเอส เอนไซม์นี้ยังได้ถูกทำนายโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) ผลการทำนายพบว่าดีเอ็นเอไลเอสที่ศึกษาจะมีความคล้ายกับโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอไลเอสของแบคทีเรีย *E. coli* (รหัส PDB 2OWO) ด้วยค่า p -value $1.25e-22$ ภาพทับซ้อนกันของทั้งสองโครงสร้าง แสดงให้เห็นถึงบริเวณ K-X-D-G ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญสำหรับใช้เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน จากนั้นยีน sll1209 ได้ถูกโคลนเข้าสู่ระบบแสดงออก pET22b(+) เพื่อผลิตโปรตีน โดยพบว่าการใช้ auto induction medium (AIM) ให้โอกาสที่จะได้โปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ (soluble fraction) ได้ดีที่สุด ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัย Ni-NTA column พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนได้โดยการชะด้วยอิมมิดาโซล 100 มิลลิโมลาร์ การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเอส อาศัยการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรงเพื่อทำให้กลับเป็นวงปิดอีกรอบ (recircularization ligation) จากนั้นทำการส่ง (transform) ดีเอ็นเอวงปิดที่เชื่อมต่อได้เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* JM109 เพื่อนับโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอวงปิดเหล่านั้นเพื่อเป็นการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ ผลการทดสอบพบว่า ดีเอ็นเอไลเอสจาก *Synechocystis* sp. PCC6803 ทำงานได้ดีที่สุดที่ 20 °C ค่า pH 7.5 เอนไซม์สามารถใช้ ATP FAD หรือ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ และแมกนีเซียมไดวาเลนัวไอออน (Mg^{2+}) ช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับไดวาเลนัวอื่นๆ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อแสดงลักษณะของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเอสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 เพื่อการผลิตเอนไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Production of recombinant DNA ligase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *Escherichia coli*

Researcher:Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj **Faculty:** Science.....**Department:** Chemistry

CO-researcher:Dr. Panutda Yodsang. King Mongkut's University of Technology Thonburi (Ratchaburi Campus)

ABSTRACT

NAD⁺-dependent ligase (EC 6.5.1.2) from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (sll 1209) was characterized through bioinformatic study. The prediction results show that ligase composes of 669 amino residues with the size of 74.62 KDa. The predicted pI was 5.59. Amino acid sequence of this enzyme was aligned against those from different groups: cyanobacteria bacteria and eukaryote. Bootstrap neighbor joining phylogenetic tree results in 3 different group's classification. DNA ligase from *Synechocystis* sp. PCC6803 was group into cyanobacterial group. Protein domain study reveals that 5 domains contained in this enzyme: adenylation, OB, DN, HHH, and BRCT domains. K-X-D-G amino acid sequence was observed in the adenylation domain which is the predominant characteristic for the ligation catalysis. The enzyme was further predicted the 3 dimensional structure through the online tool Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>). the result showed the high similarity to *E. coli* DNA ligase (PDB 2OWO) with the p-value of 1.25e-22. Superimposition view showed the K-X-D-G sequence which is important sequence for ligating the adjacent DNA fragments. Moreover, the gene sll1209 was successfully cloned in-frame to pET22b(+) expression vector to produce the recombinant protein. We found that the use of auto induction medium (AIM) was suitable for soluble-fraction protein expression. The protein was further purified through the use of Ni-NTA affinity column. The recombinant enzyme was successfully eluted from the column using 100 mM imidazol buffer. The enzyme activity was monitored by using recircularization ligation followed by DNA transformation to count the colony obtaining the ligated plasmid. Our results show that enzyme has the optimum temperature of 20 oC with the pH of 7.5. The enzyme can also use ATP, FAD, or NAD⁺ as a coenzyme. Magnesium divalent ion show the highest enzyme activity compared to other divalent ions. Our result shows the characterization of NAD⁺-dependent DNA ligase from Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and procedure for pilot scale production.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม	6
2.1 หลักการของการแสดงออกของโปรตีน.....	6
2.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	7
2.3 กิจกรรมของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส.....	8
2.4 การทบทวนวรรณกรรม.....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	12
3.1.1 เครื่องมือ.....	12
3.1.2 อุปกรณ์.....	13
3.2 สารเคมี.....	14
3.3 วิธีการทดลอง.....	16
3.3.1 การทำนายลักษณะของโปรตีนดีเอ็นเอไลเกส.....	16
3.3.2 การแสดงออกโปรตีนสูงผสม.....	17
3.3.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	18
3.3.4 การตรวจหากิจกรรมของเอ็นไซม์.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	23
4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอในเวกเตอร์.....	22
4.2 การแสดงลักษณะทำนายของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากยีน sll1209.....	25
4.3 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากยีน sll1209.....	31
4.4 การติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์.....	36
4.5 การแสดงลักษณะกิจกรรมของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจาก <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	42
3.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์.....	43
3.3.2 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ผลของโคเอ็นไซม์ต่อการทำงานของเอ็นไซม์.....	45
3.3.4 ผลของโคแฟกเตอร์ต่อการทำงานของเอ็นไซม์.....	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	49
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	49
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง.....	52
ภาคผนวก.....	54
สรุปค่าใช้จ่ายเงิน.....	55
ประวัตินักวิจัย.....	56



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดง pET22b(+) expression vector วงรีแสดงถึงตำแหน่งที่ <i>NdeI</i> และ <i>XhoI</i> ที่ใช้ในการตัดต่อตำแหน่งที่จะแทรกยีนลงในดีเอ็นเอเวกเตอร์.....	6
รูปที่ 2.2 การเข้าจับกันระหว่างฮิสทีดินบนโปรตีนกับ Ni ²⁺ ที่อยู่บน Agarose bead.....	7
รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเกสในการซ่อมแซมบริเวณที่ขาด (Nick) ของดีเอ็นเอคู่สม.....	9
รูปที่ 4.1 แผนที่ยีนของ p22Lig6803 เพื่อแสดงตำแหน่งและทิศทางของชิ้นยีนที่วางตัวอยู่ในดีเอ็นเอของระบบแสดงออก.....	22
รูปที่ 4.2 ตัวอย่างแผนภาพสัญญาณการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ในพลาสมิด p22Lig6803 เป็นไปอย่างถูกต้อง.....	24
รูปที่ 4.3 ลำดับกรดอะมิโนทั้ง 669 เรซิดิวของยีนดีเอ็นเอไลเกสจาก <i>sll1209</i> ลำดับกรดอะมิโน KXDG (สีเทา) อยู่ในตำแหน่งที่ 114 – 117 ซึ่งเป็นลักษณะลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญในกลุ่มเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส.....	25
รูปที่ 4.4 การแสดงลักษณะแต่ละโดเมนที่ตรวจพบบนโปรตีนดีเอ็นเอไลเกสจากยีน <i>sll1209</i>	26
รูปที่ 4.5 แผนภูมิ Phylogenetic tree จากการจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากสามกลุ่มสิ่งมีชีวิต ได้แก่ กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (กลุ่ม 1) กลุ่มแบคทีเรีย (กลุ่ม 2) และกลุ่มยูคาริโอต (กลุ่ม 3).....	28
รูปที่ 4.6 โครงสร้างสามมิติของ 2OWO (สีเหลือง) พร้อมด้วยดีเอ็นเอ (สีส้ม) และ AMP (สีชมพู) พร้อมกับโครงสร้างทำนายสามมิติของดีเอ็นเอไลเกสจากสาหร่าย <i>Synechocystis</i> sp. (สีฟ้า) ในมุมมองที่ซ้อนโครงสร้างทั้งสองเข้าด้วยกัน (Superimposition).....	29
รูปที่ 4.7 แสดง K-X-D-G ของดีเอ็นเอไลเกสจากทั้ง <i>E. coli</i> (เหลือง) และ <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (ฟ้าอ่อน) ในมุมมองที่ซ้อนโครงสร้างทั้งสองเข้าด้วยกัน (Superimposition).....	30
รูปที่ 4.8 ผลการแยกโปรตีนใน Acrylamide gel (Lane 1 : 0 mM IPTG, LB, 37 °C; Lane 2: 1 mM IPTG, LB, 37 °C; Lane 3: 0 mM IPTG, LB + 1% Glucose , 16 °C; Lane 4: 1 mM IPTG, LB + 1% Glucose , 16 °C; Lane 5: 0 mM IPTG, AIM, 16 °C).....	32
รูปที่ 4.9 ผลการแยกโปรตีนใน Acrylamide gel เพื่อแสดงว่าโปรตีนที่ผลิตอยู่ในส่วนละลายได้ (soluble) หรือส่วนที่จับตัวกันเป็นก้อน (pellet).....	33
รูปที่ 4.10 Western blot analysis ของโปรตีนที่แยกได้จากรูปที่ 4.9 ช่อง +VE คือ positive control	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้โปรตีนชนิดอื่นที่มีการศึกษามาก่อนแล้วว่ามี (His) ₆ tag อยู่จริงเพื่อเปรียบเทียบให้เห็น แถบสีม่วงเข้มที่เกิดขึ้น.....	34
รูปที่ 4.11 แสดงแผนที่ดีเอ็นเอของพลาสมิด pGEM [®] -T Easy Vector เมื่อจะทำการตัดด้วย BsaAI (Blunt end) และ Sall (Sticky end).....	36
รูปที่ 4.12 อีอาร์เอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับการตรวจติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase ทั้งจาก ผลิตภัณฑ์ทางการค้า (ซ้าย) และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ขวา) สามเหลี่ยม แสดงถึงเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 3 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที.....	37
รูปที่ 4.13 อีอาร์เอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจติดตามกิจกรรม ของเอ็นไซม์ ligase ทั้งจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า (ซ้าย) และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษา ครั้งนี้ (ขวา) สามเหลี่ยมแสดงถึงเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 2 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที.....	38
รูปที่ 4.14 อีอาร์เอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจทำซ้ำในการติดตาม กิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase จากเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามเหลี่ยมแสดงถึง เวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 2 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที.....	39
รูปที่ 4.15 อีอาร์เอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจติดตามกิจกรรมของ เอ็นไซม์ ligase จากเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่การเจือจางเอ็นไซม์ หนึ่งเท่า สองเท่า และสามเท่า ตามลำดับ ตัวเลขแสดงเวลาในหน่วยนาทีของการบ่มปฏิกิริยา.....	40
รูปที่ 4.16 การปรับสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของดีเอ็นเอไลเอสที่ผลิตมาจาก <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	43
รูปที่ 4.17 การปรับสภาวะ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของดีเอ็นเอไลเอสที่ผลิตมาจาก <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	44
รูปที่ 4.17 โครงสร้างของ ATP (บนซ้าย) NAD ⁺ (บนขวา) และ FAD (ล่าง).....	45
รูปที่ 4.19 โคเอ็นไซม์ต่อการทำงานของดีเอ็นเอไลเอสที่ผลิตมาจาก <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	46
รูปที่ 4.20 โคแฟกเตอร์ต่อการทำงานของดีเอ็นเอไลเอสที่ผลิตมาจาก <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

งานนี้จะเป็นงานต่อยอดให้กับโครงการ “การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอ็นเอของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สู่อุปกรณ์แสดงออก” ภายใต้สัญญาเลขที่ 2557-01-014 ในส่วนงานที่ได้ทำมานั้นต้องการใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลยีนของสิ่งมีชีวิตสีเขียวในกลุ่ม Cyanobacteria ได้มีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งทำให้ได้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกยีนที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ หนึ่งในยีนที่สนใจและมีประโยชน์ต่องานวิจัยคือยีนสำหรับแปลรหัสให้เป็นเอนไซม์เชื่อมสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ดังกล่าวถือว่าเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้อย่างสากล นั่นคือ เอนไซม์จะสามารถเชื่อมเส้นดีเอ็นเอใดๆอย่างไม่เจาะจงต่อระบบสิ่งมีชีวิต กล่าวอีกทางหนึ่งคือ เส้นดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตใดๆ ที่มีลำดับคู่สม (Complementary sequence) ที่เข้ากันได้ ก็จะสามารถถูกเชื่อมเข้าเป็นเส้นเดียวกันได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จะส่งผลที่ดีต่องานวิจัยต่อยอดทางด้านอื่นๆของงานทางชีวเคมีและอนุชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งจะมีการตัดและเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ที่ใช้เชื่อมต่อดีเอ็นเอสามารถหาซื้อได้จากบริษัทต่างๆ แต่หากเราสามารถผลิตขึ้นมาใช้เองได้ ก็จะสามารถลดค่าใช้จ่าย ลดต้นทุน ในการวิจัย อีกทั้งยังมีศักยภาพในการผลิตเป็นสินค้าเพื่อจำหน่ายต่อไปได้อีกทางหนึ่งด้วย

โครงการวิจัยก่อนหน้านี ได้มีการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 โดยได้ใช้ข้อมูลจีโนมในฐานข้อมูลเป็นจุดเริ่มต้นของงานวิจัย เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนได้แล้วก็ได้มีการอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการเชื่อมต่อชิ้นยีนดังกล่าวนี้เข้ากับระบบการแสดงออกเพื่อให้พร้อมต่อการแสดงออก เพื่อผลิตเป็นเอนไซม์เชื่อมสายดีเอ็นเอต่อไป

งานวิจัยในโครงการนี้ต้องการที่จะต่อยอดจากงานวิจัยในปีแรก โดยต้องการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว เพื่อผลิตขึ้นมาใช้งานได้จริงสำหรับงานวิจัย ในส่วนของการแสดงออกนั้น ได้มีการพัฒนาระบบการแสดงผลออกมาเป็นระยะเวลาหนึ่งจนได้ระบบการแสดงผลที่เสถียรและง่ายต่อการผลิตโปรตีน อย่างไรก็ตามก็ตีภาวะของการแสดงออกซึ่งโปรตีนนั้นจะแตกต่างกันบ้างขึ้นกับชนิดของโปรตีนที่เรา กำลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษา ดังนั้นในการแสดงออกของเอนไซม์ครั้งนี้จึงต้องมีการหาภาวะที่เหมาะสม นั่นคืออุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวเหนียวนำที่จะใช้เปิดการแสดงออก หากภาวะของการแสดงออกไม่เหมาะสม สิ่งที่เกิดขึ้นจะเป็นไปได้สองกรณีคือ ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเลย หรือโปรตีนแสดงออกอย่างรวดเร็วเกินไปจนโมเลกุลไม่ละลายอยู่ในชั้นน้ำ (Water insoluble fraction) แต่กลับจะเกิดการเกาะรวมตัวกัน (Aggregate) ซึ่งจะทำให้โปรตีนไม่สามารถละลายน้ำได้และจะเกิดการจับรวมกันเป็นก้อนออกมาแทนหรือที่เรียกในทางเทคนิคว่า Inclusion body โปรตีนที่จับกันเป็นก้อนนี้จะไม่สามารถทำงานได้ แม้ว่าจะมีเทคนิคต่างๆที่จะพยายามละลายเอา Inclusion body กลับมาใช้งานให้ได้ อย่างไรก็ตามการวิจัยขั้นนี้ต้องการศึกษาดูภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนชนิดที่เป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้แล้วจะได้ทำการแสดงลักษณะของโปรตีนที่ผลิตได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้เชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอ (DNA ligase)
2. ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในระดับที่สามารถนำไปใช้งานต่อได้
3. ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเกสเพื่อหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมแก่การทำงาน
4. ผลิตเอนไซม์เพื่อใช้งานห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

นำดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA) ที่ได้จากการศึกษาในปีแรกมาแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจะมีการเหนียวนำการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้สาร Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยที่สภาวะของการแสดงออกที่ดีจะต้องประกอบไปด้วยสองตัวแปรคือ ความเข้มข้นของ IPTG และอุณหภูมิที่ใช้ในการแสดงออก โปรตีนที่ใช้งานได้นั้นจะต้องออกมาอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย (soluble fraction) แต่ถ้าหากมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกมากและต่อเนื่อง โปรตีนก็จะออกมาอยู่ในส่วนที่เป็นตะกอน (Inclusion body) ซึ่งจะทำให้โปรตีนทำงานไม่ได้ ดังนั้นขอบเขตการศึกษาครั้งนี้ จะได้หาภาวะที่เหมาะสมที่จะแสดงออกโปรตีนที่จะออกมาอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย เพื่อใช้ในการต่อยอดในการผลิตในระดับที่สูงขึ้นไป

เมื่อหาภาวะเหมาะสมที่ผลิตโปรตีนแล้ว จะได้มีการผลิตโปรตีนในระดับที่ใหญ่ขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนมากพอสำหรับการทำบริสุทธิ์ โดยจะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ในขนาดที่มากขึ้น จากนั้นทำการแตกเซลล์ออกเพื่อนำเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme) ออกมาเตรียมเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์โดยเลือกใช้ Ni-NTA agarose affinity column เมื่อได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วก็จะได้นำไปทดสอบคุณสมบัติอื่นต่อไปคือ หาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมแก่การทำงาน

ในการหากิจกรรมของเอนไซม์นั้น เนื่องด้วยเอนไซม์จะเชื่อมต่อกับปลายของดีเอ็นเอได้ดังที่ได้กล่าวถึง กลไกการทำงานเอาไว้ในหัวข้อที่ 10. จะได้มีการจำลองการเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอ โดยจะเลือกใช้ดีเอ็นเอวงปิด (Plasmid DNA) ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะที่เราทราบชนิดอย่างแน่นอน มาทำการตัดอย่างสมบูรณ์ (complete digestion) เพื่อทำให้ดีเอ็นเอวงปิดมีสภาพเป็นดีเอ็นเอเส้นตรง (Linearized DNA) จากนั้นจะได้มีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เราผลิตได้ต่อการเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอนี้ให้กลับไปสู่รูปแบบของวงปิด ปฏิกริยาจะถูกแยกในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel) จากนั้นความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในรูวงปิดและเส้นตรง จะเป็นตัวชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ว่าสามารถเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอได้ปริมาณเท่าใด นอกจากนี้แล้ว ผลของอุณหภูมิและ pH ก็จะถูกนำมาเป็นพารามิเตอร์ในการแสดงลักษณะของเอนไซม์ครั้งนี้ด้วย

เมื่อแสดงลักษณะของเอนไซม์พร้อมทั้งรู้ภาวะเหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 แล้วก็จะได้มีการผลิตเอนไซม์บรรจุหลอดสำหรับใช้ในงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังสามารถผลิตเพื่อขายในเชิงพาณิชย์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม

1. ส่งดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดที่ถูกต้อง โดยการสกัดพลาสมิดแล้วตัดเซกขนาดที่ถูกต้องด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)
3. เมื่อได้โคลนที่ถูกต้องแล้ว จะทำการเพิ่มปริมาณเซลล์ให้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความขุ่น (Optical density: OD₆₆₀) อยู่ในช่วง 0.6 ± 0.1
4. เติมตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน คือ IPTG ลงไป จากนั้นเก็บเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่แสดงออกมา ผ่านกระบวนการ SDS-PAGE
5. ทำการทดลองขั้นที่ 3 - 4 ซ้ำ โดยจะเปลี่ยนความเข้มข้นของ IPTG และ อุณหภูมิของการแสดงออก

การทำบริสุทธิ์โปรตีน

1. เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้ค่าความขุ่นของอาหาร OD₆₆₀ = 0.6 ± 0.1
2. เติม IPTG ตามความเข้มข้นที่ปรับภาวะ และตั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การแสดงออก
3. ปั่นเก็บเซลล์ตามเวลาที่ต้องการให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม
4. แดกเซลล์เพื่อให้เอนไซม์ออกมาอยู่นอกเซลล์ จะเรียกว่าเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme)
5. โหลดเอนไซม์หยาบนี้ลงบน Ni-NTA agarose affinity column ที่ผ่านการปรับภาวะที่เหมาะสมแก่การทำบริสุทธิ์โปรตีนมาอย่างเรียบร้อยแล้ว
6. ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เพื่อล้างเอาโปรตีนเจือปนออก จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย imidazole เพื่อไล่ให้โปรตีนที่ต้องการหลุดออกจากคอลัมน์
7. สารละลายโปรตีนที่หลุดออกมาจากคอลัมน์นี้ จะนำไปทำ dialysis เพื่อกำจัด imidazole ที่ปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ก็จะได้โปรตีนที่พร้อมนำไปใช้งานต่อ

การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์

1. ส่งดีเอ็นเอวงปิด (plasmid) ใดๆที่มีลักษณะ high copy number เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.*

coli เพื่อให้เซลล์มีปริมาณดีเอ็นเอวงปิดในปริมาณที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สกัดดีเอ็นเอวงปิด ทำการตัดพลาสมิดวงปิดให้เป็นเส้นตรง (Linearized DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)
3. ใช้ดีเอ็นเอที่ตัดเป็นเส้นตรงแล้วเป็น substrate สำหรับเอนไซม์ DNA ligase ที่เราเตรียมได้
4. แยกดีเอ็นเอผสม ระหว่างดีเอ็นเอเส้นตรงที่ยังเหลือและดีเอ็นเอที่กลายเป็นวงปิด ในวุ้นอะกาโรส
5. วัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐาน
6. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ที่เตรียมได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 สามารถเอนไซม์ขึ้นมาใช้จริงได้ในระดับห้องปฏิบัติการ
- 1.5.2 มีสถานะที่เหมาะสมแก่การใช้งานเอนไซม์ดังกล่าว
- 1.5.3 สามารถที่จะนำไปเป็นแนวทางเพื่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้

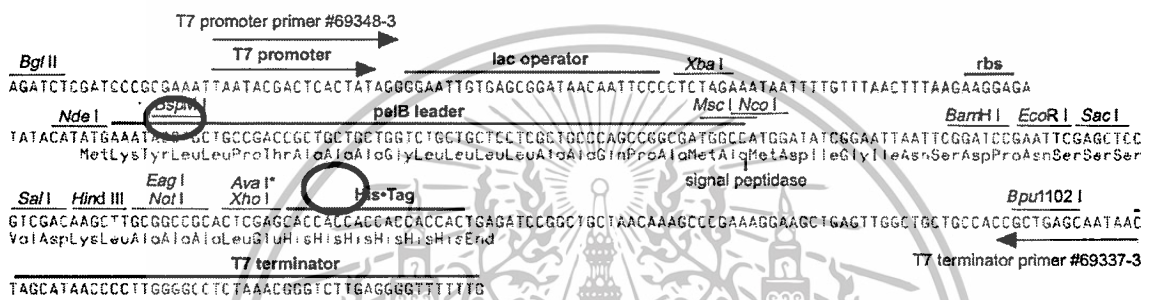
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

2.1 หลักการของการแสดงออกของโปรตีน

โปรตีนจะแสดงออกได้จะต้องเริ่มจากขั้นยืนที่ต่อแบบลงกรอบ (in-frame) ของการแปรรหัสของดีเอ็นเอบนเวกเตอร์ ดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ pET22b(+) อันมีแผนที่ยีนดังแสดงในรูปที่ 2.1



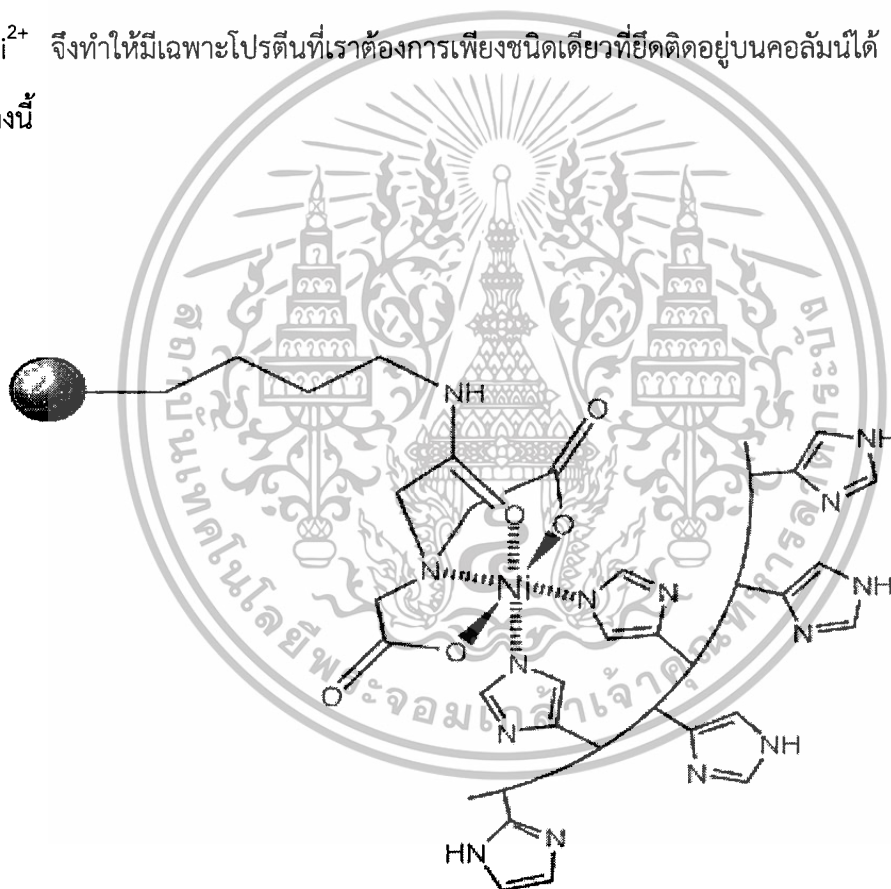
รูปที่ 2.1 แสดง pET22b(+) expression vector วงรีแสดงถึงตำแหน่งที่ *Nde I* และ *Xho I* ที่ใช้ในการตัด-ต่อดำแหน่งที่จะแทรกยีนลงในดีเอ็นเอเวกเตอร์

ดีเอ็นเอวงปิดของ pET22b(+) นี้ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde I* และ *Xho I* เพื่อให้มีตำแหน่งพร้อมเชื่อมต่อตรงกับขั้นยืนที่เอเอ็นเอที่ต้องการจะต่อเข้า เมื่อตัด pET22b(+) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองตำแหน่งดังกล่าวได้แล้ว จะทำให้ได้ขั้นยืนดีเอ็นเอของเวกเตอร์ในช่วง *Nde I* และ *Xho I* หายไป จากนั้นขั้นยืนที่ต้องการแสดงออกจะมาแทรกแทนที่ ส่งผลให้ ระบบการผลิตโปรตีนนี้สมบูรณ์ นั่นคือ ช่วงก่อนหน้าขั้นยืนจะมี T7 promotor ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งเสริมให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับบนเส้นดีเอ็นเอเพื่อเริ่มทำการถอดรหัส (Transcription) เพื่อสร้างโมเลกุล mRNA ต่อไป ส่วน lac operator จะทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้ mRNA ที่สร้างขึ้นมาแล้วนั้นเกิดการแสดงออกอย่างทันที แต่สามารถเปิดคำสั่งเพื่อให้เกิดการแปรรหัสของ mRNA ให้เป็นโมเลกุลของโปรตีนได้โดยการเติมสารเคมีบางชนิดลงไป หลังจากทำการเติมสารเคมีลงไปเพื่อเปิดให้ Ribosome เข้าเกาะบนเส้น mRNA ในบริเวณ rbs (ribosome binding site) ก็ จะเกิดการแปรรหัสให้เป็นโปรตีนโดยเริ่มที่ ATG บนขั้นยืนที่เราใส่เข้าแทนที่ในตำแหน่ง *Nde I* และ *Xho I* ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อสิ้นสุดการแปรรหัสของยีนแล้ว บนดีเอ็นเอเวกเตอร์จะยังคงมีบริเวณ His Tag เอาไว้เพื่อให้

โปรตีนที่ผลิตขึ้นมานั้น มีกรดอะมิโนฮิสทีดีนเพิ่มขึ้นพิเศษอีก 6 หน่วยทางด้านปลาย carboxylic ของ โมเลกุลโปรตีน กรดอะมิโนฮิสทีดีน 6 หน่วยนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในแง่ความสะดวกของการทำบริสุทธิ์ ผ่านการใช้คอลัมน์ชนิดจับจำเพาะ (affinity column)

2.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีน

โปรตีนที่จะแสดงออกจะเป็นโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) ที่มีฮิสทีดีน 6 หน่วยเพิ่มขึ้นมาทางด้านปลาย Carboxylic การที่มีฮิสทีดีนเพิ่มขึ้นมานี้จะช่วยให้สามารถที่บริสุทธิ์ได้ง่ายเพียงใน ขั้นตอนเดียวโดยใช้ Ni-NTA agarose affinity column วงแหวน imidazole จะเข้าจับอย่างจำเพาะ กับ Ni^{2+} จึงทำให้มีเฉพาะโปรตีนที่เราต้องการเพียงชนิดเดียวที่ยึดติดอยู่บนคอลัมน์ได้ ดังภาพที่แสดง ด้านล่างนี้



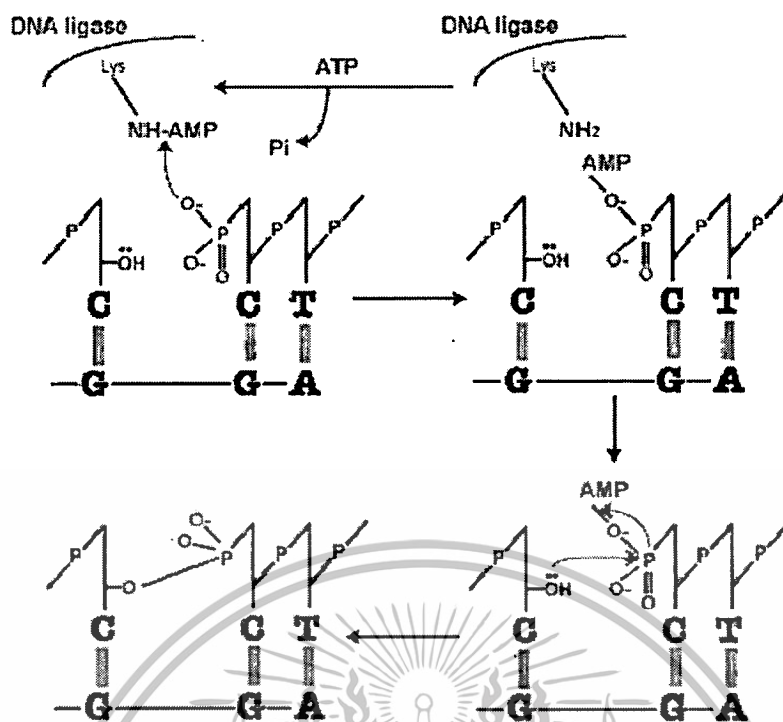
รูปที่ 2.2 การเข้าจับกันระหว่างฮิสทีดีนบนโปรตีนกับ Ni^{2+} ที่อยู่บน Agarose bead

จากแผนภาพ จะเห็นได้ว่าผิวของ Agarose bead (วัตถุทรงกลมสีเทา) จะถูกปรับปรุงให้มี คุณสมบัติจับกับนิเกิลไอออนได้ ซึ่งจะทำให้โครงสร้างเชิงซ้อนนี้มีความสามารถพิเศษในการจับกับวง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหวนอิมิดาโซล นั้นคือกรดอะมิโนฮิสทีดินจะมีหมู่ฟังก์ชันที่มีโครงสร้างคล้ายกับวงแหวนอิมิดาโซล จึงทำให้โปรตีนใดๆที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดิน สามารถเข้าจับกับคอลัมน์ชนิดนี้ได้อย่างจำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตาม โปรตีนชนิดอื่นๆซึ่งอาจจะมีฮิสทีดินเป็นองค์ประกอบอันจะทำให้สามารถจับกับคอลัมน์ชนิดนี้ได้ เช่นเดียวกัน แต่การที่โปรตีนลูกผสมมีกรดอะมิโนฮิสทีดินถึง 6 หน่วย จะทำให้ความสามารถในการเข้าจับกับคอลัมน์ชนิดนี้แข็งแรงขึ้น อันจะทำให้สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการชนิดอื่นๆออกไปได้ง่าย โดยการล้างคอลัมน์ด้วยการใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอิมิดาโซลต่ำๆ (ประมาณ 20 mM) ส่งผลให้มีเฉพาะโปรตีนที่ต้องการทำบริสุทธิ์ก็จะติดอยู่ในคอลัมน์เพียงชนิดเดียว จากนั้นสามารถชะเอาโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์โดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอิมิดาโซลสูงขึ้น (ในช่วง 100 - 500 mM) เป็นตัวไล่ให้โปรตีนหลุดออกจากคอลัมน์ ก็จะทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการออกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอิมิดาโซลปนอยู่ ต่อมาก็ทำการ dialysis เพื่อกำจัดอิมิดาโซลที่อยู่ในสารละลายโปรตีนออกไป สุดท้ายจะได้สารละลายโปรตีนที่ต้องการมาใช้งานนั่นเอง

2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส

เมื่อได้โปรตีนลูกผสมที่ต้องการแล้ว จะได้มีการนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (Activity assay) เอนไซม์ไลเกสนี้ จะเร่งการสร้างพันธะ Phosphodiester ระหว่างปลาย 5'-phosphate กับปลาย 3'-hydroxyl ที่อยู่ติดกันในดีเอ็นเอที่เข้าคู่กัน โดยจะมี ATP เป็น co-enzyme นอกจากนั้นแล้ว เอนไซม์ไลเกสยังสามารถซ่อมแซมรอยขาด (Nick) ของดีเอ็นเอที่อยู่ในดีเอ็นเอคู่สมได้ด้วยดังแสดงในแผนภาพที่ 2 นอกจากนี้แล้วความสามารถของเอนไซม์ไลเกสนี้ยังสามารถจะให้เชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอทั้งที่เป็นแบบปลายเหนียว (Sticky end) และปลายทื่อ (Blunt end)



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเกสในการซ่อมแซมบริเวณที่ขาด (Nick) ของ ดีเอ็นเอคู่สม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การทบทวนวรรณกรรม

ในระบบการแสดงออกนั้นจะประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลายตัวแปร อันได้แก่ ดีเอ็นเอของระบบแสดงออก กลไกการควบคุมการแสดงออก ความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำ อุณหภูมิที่ใช้แสดงออก และเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้แสดงออก

แม้ว่าดีเอ็นเอของระบบแสดงออกจะมีอยู่หลากหลายระบบ อาทิเช่น pBAD (Invitrogen), pCal (Stratagene), pQE (Qiagen), pMAL (NEB), pTrc (Invitrogen), pGEX (Pharmacia) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ pET (Novagen) เนื่องด้วยความสะดวกต่อการเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอ อีกทั้งยังเกี่ยวเนื่องกับกลไกการควบคุมการแสดงออกผ่านการใช้ตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกคือสารเคมี Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) อันมีราคาไม่สูงนัก อีกทั้งโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะพิเศษคือมีกรดอะมิโนฮิสทีดินเพิ่มขึ้นมา 6 หน่วยเพื่อเพิ่มความสะดวกในการทำรีซูธิโปรตีนครั้งนี้

งานวิจัยที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าแม้จะได้เชื่อมดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการเข้ากับดีเอ็นเอของระบบแสดงออกนั้น ภาวะของการแสดงออกอันได้แก่ความเข้มข้นของ IPTG และอุณหภูมิเองก็มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนนั่นเอง

Oluwafemi A. Olaofea และคณะ (Olaofe, Burton et al. 2010) ได้ศึกษาช่วงความเข้มข้น 0 – 1000 μ M IPTG พบว่าที่ความเข้มข้น 400 μ M จะทำให้เหนี่ยวนำได้โปรตีนที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำ (Water soluble fraction) ได้ดีที่สุด แม้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IPTG ให้สูงขึ้น จะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากขึ้นก็จริงแต่สัดส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำกลับมีปริมาณลดลง ผลการทดลองครั้งนี้ก็ได้สอดคล้องไปกับงานของ O. Durany และคณะ (Durany, Caminal et al. 2004) และ H.S. Makhongela (Makhongela, Glowacka et al. 2007) ที่พบว่าความเข้มข้นค่าหนึ่งของ IPTG จะทำให้มีโปรตีนในชั้นน้ำสูงที่สุด การเพิ่มความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำจะไม่ทำให้มีโปรตีนในชั้นน้ำสูงขึ้นอีก อย่างไรก็ตาม งานของ Oluwafemi A. Olaofea และคณะนี้ได้ทดสอบที่อุณหภูมิเพียงค่าเดียวคือ 30 องศา

สำหรับอุณหภูมิในการแสดงออกโปรตีนนั้นขึ้นกับธรรมชาติของโปรตีนแต่ละชนิด บางโปรตีนสามารถแสดงออก

ในช่วงอุณหภูมิที่ไม่สูงนัก เช่น Ariane Leites Larentis ได้แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่ใช้ผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli* ครั้งนี้คือ 25 องศาเซลเซียส จะเหมาะสมที่สุด (Larentis, Argondizzo et al. 2011) หรือไม่ว่าจะเป็นกรณีของโปรตีนชนิดอื่นๆ สามารถผลิตที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เลี้ยงแบคทีเรีย เช่น ที่ 35 องศาเซลเซียส หรือแม้แต่บางโปรตีนก็ยังสามารถแสดงออกได้ที่อุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้เลยคือที่ 37 องศาเซลเซียส Ana Maria Vélez (Velez, Horta et al. 2013) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยไขมันชนิดทนร้อน (Thermo-stable lipase) ผลการศึกษาพบว่า ที่ 45 องศาเซลเซียส จะเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้ หรือไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ย่อยไขมันชนิดทนร้อนของ *Bacillus thermocatenulatus* ก็สามารถแสดงออกได้ดีที่อุณหภูมิเหนียววันที่ 50 องศาเซลเซียส จากข้อมูลเหล่านี้จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีนจะขึ้นกับชนิดของโปรตีนนั้นๆด้วย

งานวิจัยบางเรื่องได้แสดงให้เห็นว่าขี้นยีนจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 สามารถนำมาแสดงออกได้ในระบบการแสดงออกของ pET system จากการศึกษาของ Yodsang และคณะ (2011) ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน potD สามารถแสดงออกได้ในระบบของ pET system ดังที่การศึกษาครั้งนี้ต้องการใช้เช่นกัน อีกทั้งโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) นั้น ยังมีกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์ได้อย่างสะดวกมากขึ้น รายงานยังได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA agarose affinity chromatography นั้น จะยังคงมีประสิทธิภาพคงเดิมอยู่

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ

1. Fast protein liquid chromatograph (FPLC) บริษัท AKTA
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) บริษัท Metrohm swiss made รุ่น 827 pH Lab ประเทศ
สวีตเซอร์แลนด์ และ Hot Plate ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น Fisher Stirring Hotplate
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม (Analytical Balance) 4 ตำแหน่งยี่ห้อ METTLER TOLEDO
รุ่น ML204/01 ชนิด New Classic MF
4. เตาอบ (Hot Air Oven) และ เดซิเคเตอร์ (Desiccators)
5. เครื่องคนสาร (Magnetic Stirrer) และ Heating Mantle ยี่ห้อ Electrothermal และ
เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity Meter) ยี่ห้อ Consort รุ่น C860 ชนิด multi-parameter
analyzer
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น JSAC-60
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refridgerated Centrifuge) ยี่ห้อ
Thermo-Scientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo-Scientific
รุ่น Genesys 10S UV-Vis
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
10. เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น FISHERBRAND

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ชุดกรองสารสูญญากาศ (Glass Vacuum Filter Holder)

12. ปีมสูญญากาศ

13. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 20 ± 1 °C ยี่ห้อ JSR รุ่น JSBI-150C, JSBI-250C, JSBI-420C

14. ตู้ดูดควัน (HOOD) ยี่ห้อ FLEXLAB รุ่น FH5-11/FB

15. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astec รุ่น Astecair 3000E

3.1.2 อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ (Beaker)
2. ช้อนตักสาร (Plastic spatula)
3. กระบอกตวง (Cylinder)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
5. กระจกนาฬิกา (Watch glass)
6. กรวยกรองบุชเนอร์เซรามิก (Buchner funnels)
7. ขวดกรองสาร (Suction flask)
8. ช้อนตักสารเคมีสแตนเลส (Spatula, Stainless)
9. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml
10. ฐานตั้งเหล็ก (Stand and Base)
11. ที่จับคอนเดนเซอร์ (Condensor clamp)
12. สำลี
13. สายยาง
14. กรวยกรองแก้ว (Funnel angle)
15. หลอดหยดสาร (Dropper)
16. หลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ตัวอย่างและสารเคมี

1. DNA primer
2. Pfu polymerase
3. Ni-NTA column
4. Agarose
5. Tris
6. Acetic acid
7. EDTA
8. Ethidium bromide
9. NdeI restriction enzyme
10. XhoI restriction enzyme
11. *SalI* restriction enzyme
12. pET22b(+) vector
13. T4 DNA ligase
14. Agar
15. Peptone
16. Yeast extract
17. Sodium chloride
18. Ampicillin
19. NaH_2PO_4
20. NaHPO_4
21. KCl
22. Dithiothreitol
23. Adenosine triphosphate
24. Flavin adenine dinucleotide
25. Nicotinamide adenine dinucleotide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. Glycerol
27. $MgCl_2$
28. Sucrose
29. Glucose
30. Lactose
31. Phenylmethylsulfonylfluoride
32. Imimidazol



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทำนายลักษณะของโปรตีนดีเอ็นเอไลเกส

ลำดับของกรดอะมิโนและค่า pI ถูกทำนายโดยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatic tools) ผ่านทางเว็บไซต์ www.expasy.org โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน sl1209 เป็นข้อมูลป้อนให้กับโปรแกรม จะได้ลำดับการแปลรหัสให้เป็นกรดอะมิโนออกมาพร้อมกับค่าการทำนาย pI จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เข้าสู่โปรแกรมออนไลน์ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อทำนายโดเมนต่างๆของโปรตีน

นำลำดับกรดอะมิโนเข้าทำการตรวจสอบความเหมือนกับโปรตีนอื่นๆในฐานข้อมูล NCBI เพื่อนำลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆทั้งสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ [*Spirulina subsalsa* (reference sequence: WP_017306310.1), *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 (GenBank: AFZ32442.1), *Fischerella muscicola* (reference sequence: WP_016866247.1), *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (GenBank: EKE99735.1), *Nostoc piscinale* CENA21 (GenBank: ALF52331.1), *Halothece* sp. PCC 7418 (GenBank: AFZ42673.1), *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202 (GenBank: AFZ46724.1)] กลุ่มแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ [*Halanaerobium praevalens* DSM 2228 (GenBank: ADO77719.1), *Thermodesulfatator indicus* DSM 15286 (GenBank: AEH44041.1), *Klebsiella variicola* At-22 (GenBank: ADC57224.1), *Escherichia coli* DH1 (GenBank: ACX38924.1), *Nitrosomonas* sp. AL212 (GenBank: ADZ27228.1), *Burkholderia* sp. CCGE1002 (GenBank: ADG15842.1)] และกลุ่มสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต 4 สายพันธุ์ [*Plasmodium falciparum* (GenBank: AAN64156.1), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: CAA91582.1), *Mus musculus* (reference sequence: NP_001186239.1), *Homo sapiens* (reference sequence: NP_000225.1)] เข้ามาทำการ align เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงจนสุดท้ายสร้างเป็น Neibor joining bootstrap phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Bioedit (Hall, T.A. 1999) แผนภาพ tree ถูกสร้างขึ้นด้วยโปรแกรม tree view (Page, R. D. M. 1996)

ลำดับของกรดอะมิโน ได้ถูกทำนายเพื่อหาโครงสร้างสามมิติในผลึก (three dimensional structure prediction) โดยการนำลำดับกรดอะมิโนเข้าสู่โปรแกรมออนไลน์ Raptor X ที่เว็บไซต์ <http://www.raptorx.org/> เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/> (Ma J, et al. 2013, Jianzhu Ma, et al. 2012, Jian Peng and Jinbo Xu, 2011a, Jian Peng and Jinbo Xu, 2011b, Jian Peng and Jinbo Xu, 2010, Jian Peng and Jinbo Xu, 2009) โปรแกรมจะส่งผลแจ้งผ่านทางจดหมายอิเล็กทรอนิกส์ พร้อมทั้งข้อมูลผลการทำนายต่างๆจะอยู่ในหน้าแสดงผลการทำนาย

3.3.2 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม

ทำการส่งดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* พลาสมิด p22Lig6803 ได้ถูกส่งเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ด้วยวิธี CaCl_2 นำพลาสมิดปริมาณ 20 ng ใส่ลง *E. coli* competent เซลล์ปริมาตร 100 μl แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นรีบจุ่มหลอดเซลล์ลงในน้ำ 42°C เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 1 มิลลิลิตรลงสู่หลอด นำหลอดเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อบนอาหารรุ้นที่มี 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin เพื่อเป็นการคัดเลือกการได้รับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ที่ต้องการ

จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการ โดยการสกัดพลาสมิดแล้วตัดขนาดที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) นำโคลนที่เติบโตบนอาหารรุ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin จากนั้นทำการสกัด plasmid ออกมา ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะขนาดข้างของซันยีนบนเวกเตอร์ ในที่นี้จะใช้เอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* รูปแบบการตัดที่ต้องการจะถูกคัดเลือกให้เป็นโคลนที่จะใช้ทำการศึกษาคู่ พร้อมทั้งจะต้องทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์อีกครั้งเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ อันเป็นการยืนยันว่าโคลนที่เลือกขึ้นมาได้เป็นเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดอย่างถูกต้อง ไม่มีความผิดพลาดเรื่องการเลื่อนของกรอบการแปลรหัสโปรตีน (frame shift)

เมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้ว จะทำการเพิ่มปริมาณเซลล์ให้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความขุ่น (Optical density: OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.6 ± 0.1 นำโคลนที่ถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นเตรียมการแสดงออกของโปรตีน โดยจะลงแบคทีเรีย 1 % จากนั้นเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ติดตามค่า OD_{600} ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.6 ± 0.1 เพื่อเตรียมเติมสาร IPTG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน คือ IPTG ลงไป จากนั้นเก็บเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่แสดงออกมา ผ่านกระบวนการ SDS-PAGE เติมสาร IPTG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน โดยหลังจากที่เติมสาร IPTG แล้ว จะต้องทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆสองชั่วโมงเพื่อใช้เปรียบเทียบเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนอย่างสูงที่สุด ตัวอย่างเซลล์นี้จะทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง นำเซลล์ที่ได้มาทำการ sonicate เพื่อให้เซลล์แตกในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนน้ำใสกับส่วนตะกอนเศษเซลล์ เพื่อทำการศึกษาส่วนที่โปรตีนไปอยู่ว่าเป็นส่วนละลายน้ำ (soluble fraction) หรือส่วนที่เกิดการพับม้วนตัวผิดปกติจนได้ inclusion body (pellet fraction) ทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อไหลลง acrylamide gel สำหรับแยกโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ต่อไป

ทำการทดลองขั้นที่ 3 - 4 ซ้ำ โดยจะเปลี่ยนความเข้มข้นของ IPTG และ อุณหภูมิของการแสดงออก ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิและความเข้มข้นของ IPTG เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแก่การแสดงออกโปรตีนดีเอ็นเอไลเอสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการศึกษาระบบอาหารแบบ auto induction medium (AIM) นั่นคือไม่มีการใช้ IPTG ตั้งแต่ต้น แต่จะมีการเติมน้ำตาลกลูโคสและแลคโทสเข้าไปแทนตั้งแต่ต้น ในกระบวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จะกินน้ำตาลกลูโคส จนหมด ซึ่งจะเป็นระยะที่พอดีกับค่าความขุ่นของน้ำแบคทีเรียจะอยู่ที่ช่วง 0.6 ต่อมาเมื่อกลูโคสหมด เซลล์จะเริ่มใช้แลคโทสแทน อันจะทำให้แลคโทสเปลี่ยนเป็นอัลโลแลคโทสในเซลล์ด้วยการทำงานของเบต้ากาแลคโตไซด์ (beta-galactosidase) อัลโลแลคโทสจะทำให้เกิดการเปิดยีนสำหรับการสร้างโปรตีนดีเอ็นเอไลเอสต่อไป

3.3.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้ค่าความขุ่นของอาหาร $OD_{660} = 0.6 \pm 0.1$ ตามสภาวะที่ได้ปรับไว้เหมาะสมแก่การผลิตโปรตีนที่ละลายในชั้นน้ำ (soluble fraction) ดังแสดงไว้ในข้อ 3.3.2 เมื่อได้เซลล์ที่ผลิตโปรตีนเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ทำการปั่นแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากกันที่ 5,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนชั้นน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง กระจายเซลล์ใน 50 มล. ทริสบัฟเฟอร์ ที่

ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ กระจายเซลล์และนำน้ำเซลล์เข้าสู่เครื่อง sonicator ทำการแตกเซลล์เพื่อให้เอนไซม์ออกมาอยู่นอกเซลล์ จะเรียกว่าเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme)

โหลดเอนไซม์หยาบนี้ลงบน Ni-NTA agarose affinity column ที่ผ่านการปรับภาวะที่เหมาะสมแก่การทำบริสุทธิ์โปรตีนมาอย่างเรียบร้อยแล้ว โดยลำดับวิธีการทดลองให้เป็นไปตาม manual ที่มากับสินค้า ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เพื่อล้างเอาโปรตีนเจือปนออก จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย imidazole เพื่อให้โปรตีนที่ต้องการหลุดออกจากคอลัมน์

สารละลายโปรตีนที่หลุดออกมาจากคอลัมน์นี้ จะนำไปทำ dialysis เพื่อกำจัด imidazole ที่ปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ เมื่อน้ำโปรตีนถูกกำจัด imidazole แล้วก็จะถูกนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นผ่านการใช้ Amicon filter membrane ที่มีขนาดการคัดกรองที่ 30 KDa โดยทำการใส่น้ำโปรตีนไว้ในกระบอกปั่นส่วนที่เหนือเมมเบรน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 3,500xg จนกระทั่งปริมาตรลดน้อยลงไป จึงค่อยๆทำการเติมน้ำโปรตีนที่เจือจางต่อ แล้วทำการปั่นเช่นเดิมไปเรื่อยๆ ก็จะได้โปรตีนที่เข้มข้นพร้อมนำไปใช้งานต่อไป

3.3.4 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์

ในเบื้องต้นได้วางแผนการติดตามหากิจกรรมของเอนไซม์โดยจะใช้สับสเตรตเป็นดีเอ็นเอสองชิ้นที่มีตำแหน่งตัดเป็นแบบปลายเหนียว (sticky end) โดยที่คาดหวังว่าการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์จะทำได้สองทางคือ วัดปริมาณของสับสเตรตที่ลดลง หรือวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น ผ่านการแยกปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรส แล้วทำการวัดความเข้มข้นของแถบสับสเตรตที่ลดลง หรือความเข้มข้นของแถบผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งสับสเตรต และผลิตภัณฑ์ ทำให้มีความลำบากแก่การติดตามวัดความเข้มข้น จึงได้เปลี่ยนวิธีมาเป็นการวัดกิจกรรมชนิดใหม่

การติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยใช้พลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector ที่เป็นวงปิดด้วยตัวเอง (self circularization) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชื่อ *Sall* เพื่อให้เกิดเป็นปลายเหนียว (Sticky end) เกิดขึ้น จากนั้นทำการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่กลายเป็นเส้นตรง (linearized plasmid) นี้ด้วยชุดคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์ ก็จะได้ดีเอ็นเอเส้นตรงที่มีบริเวณตัดเป็น *Sall* เพื่อใช้เป็นสับสเตรตของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อยดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอจะประกอบไปด้วยองค์ประกอบดังต่อไปนี้

○ Linear DNA	100	ng
(pGEM [®] -T Easy Vector self ligated/Sall)		
○ 10X T4 DNA Ligase buffer	5	ul
○ T4 DNA ligase *	5	U
○ Water, nuclease-free	up to	50 ul

โดยที่ 10X บัฟเฟอร์จะประกอบไปด้วย 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 ที่ 25 °C)

ทำการบ่มปฏิกิริยาไว้เพียง 5 นาที จากนั้นนำ 10 ul ของปฏิกิริยาส่งเข้า (Transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ต่อไป

การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ให้อยู่ในสภาพพร้อม (competent cell) รับผิดชอบอื่นนั้นทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบนอาหารวัน ลงในอาหารน้ำ LB เขย่าข้ามคืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) จากนั้นให้แบ่งน้ำเซลล์แบคทีเรียนี้ 500 ไมโครลิตร ลงสู่อาหารใหม่ LB ปริมาตร 50 มิลลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร ทำการเลี้ยงที่ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ติดตามค่าความขุ่นของน้ำเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรจนได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.4 – 0.5 ให้ทำการเตรียมปั่นเก็บเซลล์ โดยนำพลาสติกออกจากตู้เขย่า แช่พลาสติกบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หรือจนแน่ใจว่าสารละลายเซลล์ได้เย็นจัดแล้ว จากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ 4 °C ที่ความแรง 3,500xg เป็นเวลา 5 นาที (ความแรงและเวลานี้ จะใช้ทุกครั้งสำหรับการปั่นเซลล์แบคทีเรียสำหรับเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน) เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ CaCl₂ ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 40 มิลลิตร กระจายเซลล์เพื่อทำการล้างเศษอาหารที่ติดอยู่กับเซลล์ จากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง กระจายเซลล์ใน 100 มิลลิโมลาร์ CaCl₂ ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 0.5 มิลลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร เพื่อเอาไว้ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับรับดีเอ็นเอวงปิด (Plasmid) ต่อไป อย่างไรก็ตาม สามารถใช้ 100 มิลลิโมลาร์ CaCl₂ ที่มี 10% กลีเซอรอลได้ หากต้องการเก็บหลอดเอาไว้ที่ -80 °C สำหรับการใช้งานภายใน 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังดีเอ็นเอวงปิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (recircularized ligation reaction) สามารถทำได้โดยนำ 10 ไมโครลิตรปฏิกิริยา ผสมกับเซลล์เจ้าบ้านที่อยู่ในสภาพพร้อม (competent cell) เนื่องจากผิวเซลล์จะมีความบอบบางมาก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะบาง เพื่อสะดวกแก่การสังดีเอ็นเอเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ ดังนั้นจึงผสมพอให้เข้ากัน จากนั้นบ่มเซลล์ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงทำการย้ายหลอดลงสู่น้ำร้อน 42 °C (heat shock) ทันที เป็นเวลา 60 วินาที ทำการเติมอาหารเหลว LB 1 มิลลิตร แล้วเขย่าหลอดด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำน้ำเซลล์ 100 ไมโครลิตร เทลงอาหารวุ้น LB ที่มี ampicillin 100 ug/ml และ x-gal 40 ug/ml อยู่ด้วย

บ่มเพลทที่ตู้ 37 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีสีฟ้าที่เกิดขึ้น เพื่อแสดงถึงกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่ได้เชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอให้เป็นวงปิด ทำการคำนวณกิจกรรมของเอ็นไซม์ โดยให้ค่าจำนวนโคโลนีสูงที่สุดเป็น 100% สัมพัทธ์



บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอในเวกเตอร์

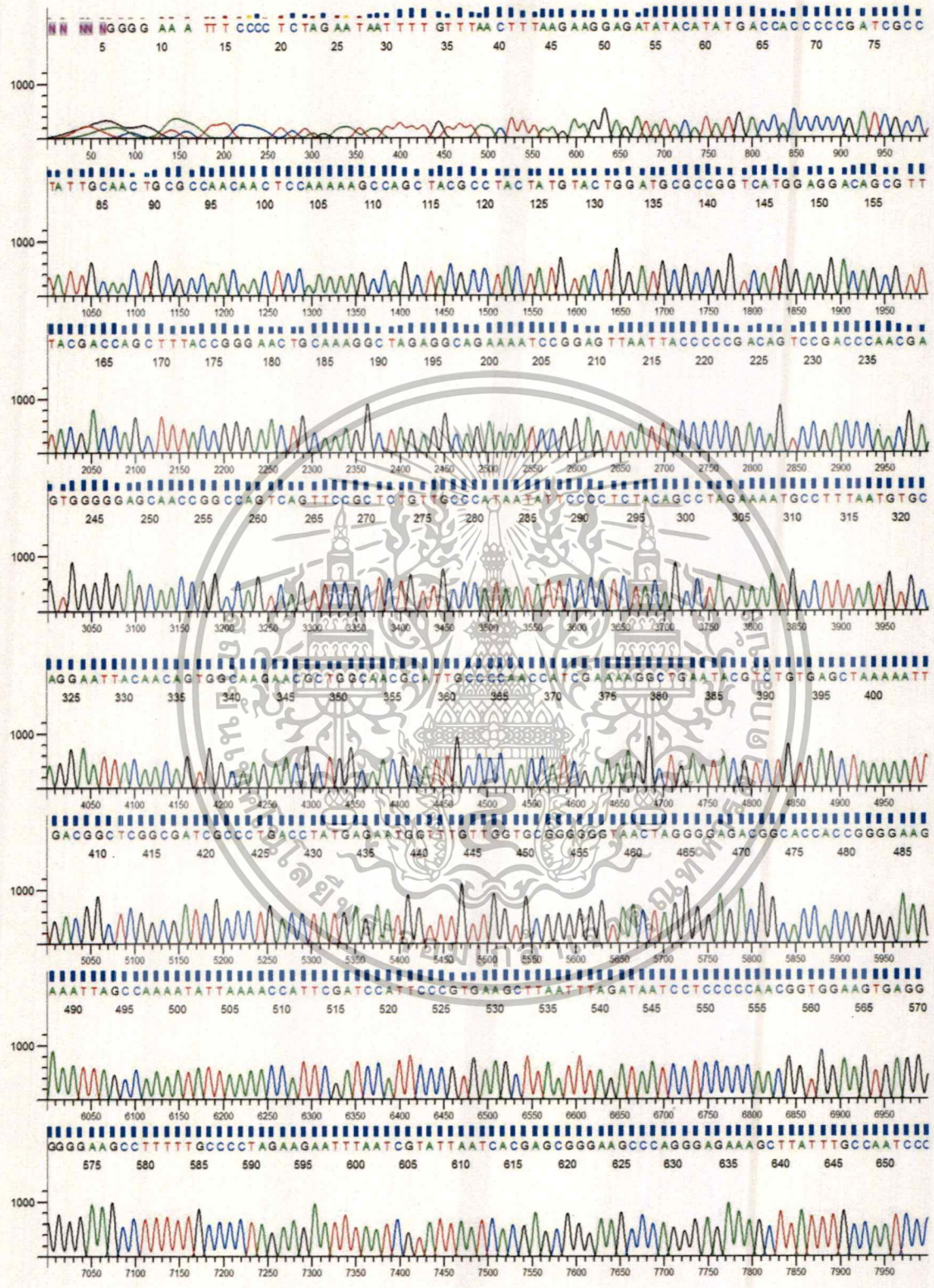
ดีเอ็นเอที่เป็นลูกผสมอันเกิดจากชิ้นยีนที่ศึกษา sll12090 จากฐานข้อมูล cyanobase ได้ถูกเพิ่มจำนวนและต่อเข้ากับดีเอ็นเอของระบบแสดงออก (pET22b(+)) โดยตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมวงปิดวงใหม่นี้ว่า p22lig6803 (ดังแสดงตามรูปที่ 4.1)



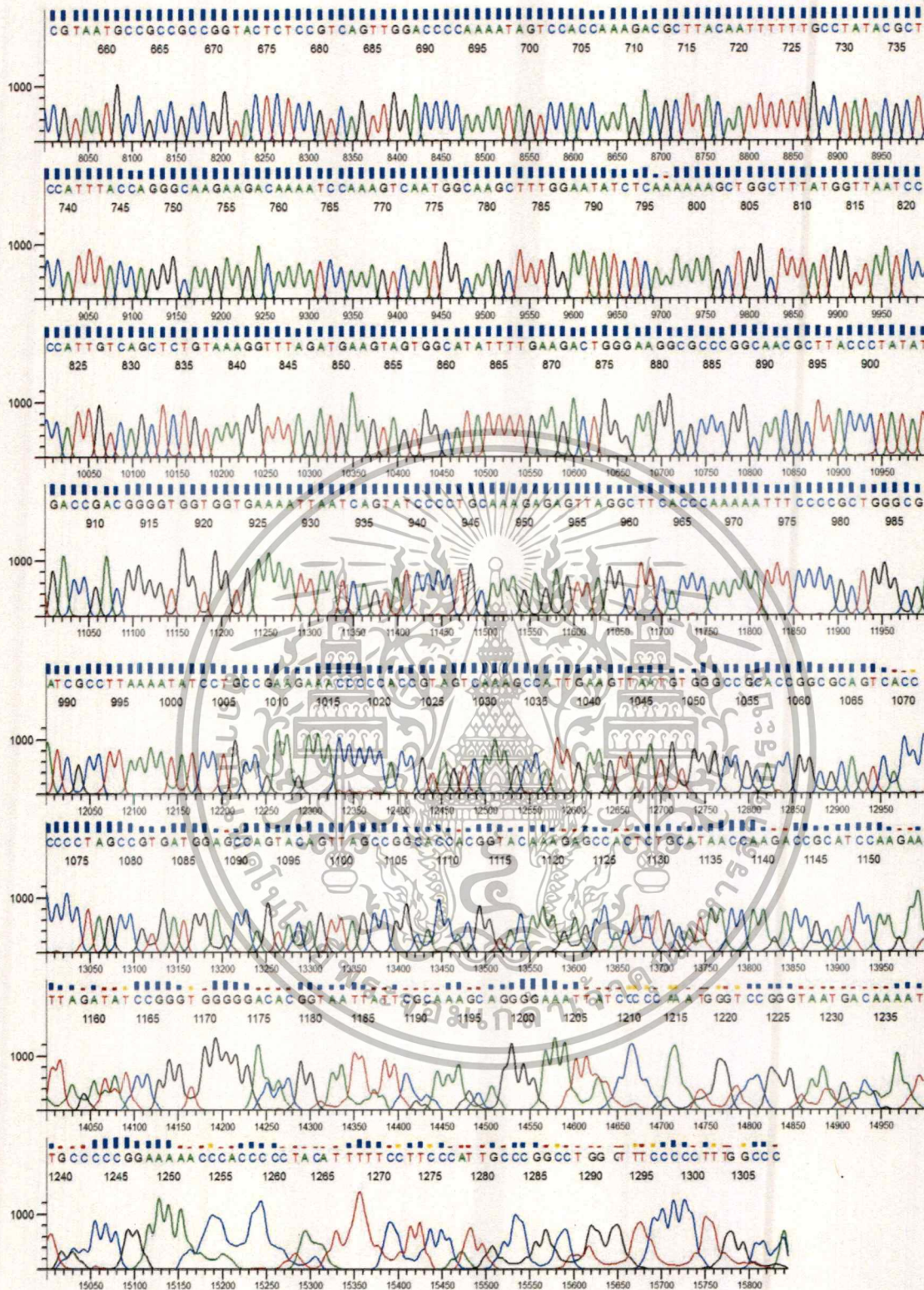
รูปที่ 4.1 แผนที่ยีนของ p22Lig6803 เพื่อแสดงตำแหน่งและทิศทางของชิ้นยีนที่วางตัวอยู่ในดีเอ็นเอของระบบแสดงออก

ความถูกต้องของลำดับเบสทั้งหมดของชิ้น sll1209 ถูกส่งไปทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNA sequencing รูปที่ 4.6 แสดงผลของการหาลำดับเบสของ p22Lig6803 บริเวณที่มีชิ้น sll1209 แทรกตัวอยู่ ผลการตรวจสอบพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมีความถูกต้องและตรงกับฐานข้อมูลที่ได้แสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์เอาไว้ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้ได้ยืนยันว่าการส่งชิ้นยีน sll1209 เข้าสู่ระบบแสดงออก pET22b(+) นั้นมีความถูกต้องและสมบูรณ์ ดังแสดงในรูป 4.2 และยังพบว่าผลการตรวจสอบลำดับกับฐานข้อมูลพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีความถูกต้อง 100 % กับลำดับของ sll1209 ในฐานข้อมูล cyanobase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

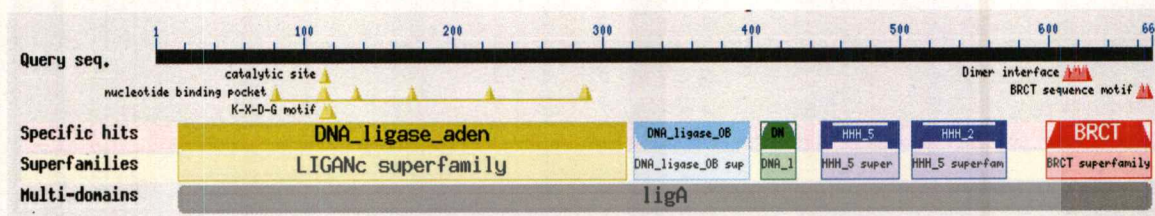


รูปที่ 4.2 ตัวอย่างแผนภาพสัญญาณการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ในพลาสมิด p22Lig6803 เป็นไปอย่างถูกต้อง

ลาสมิติ p22Lig6803 เป็นไปอย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นได้ทำการตรวจสอบว่าลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอไลเกส มีความคล้ายกับโปรตีนตัวใดในฐานข้อมูล NCBI โดยอาศัยโปรแกรม blast ลำดับโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกัน ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 การแสดงลักษณะแต่ละโดเมนที่ตรวจพบบนโปรตีนดีเอ็นเอไลเกสจากยีน sll1209

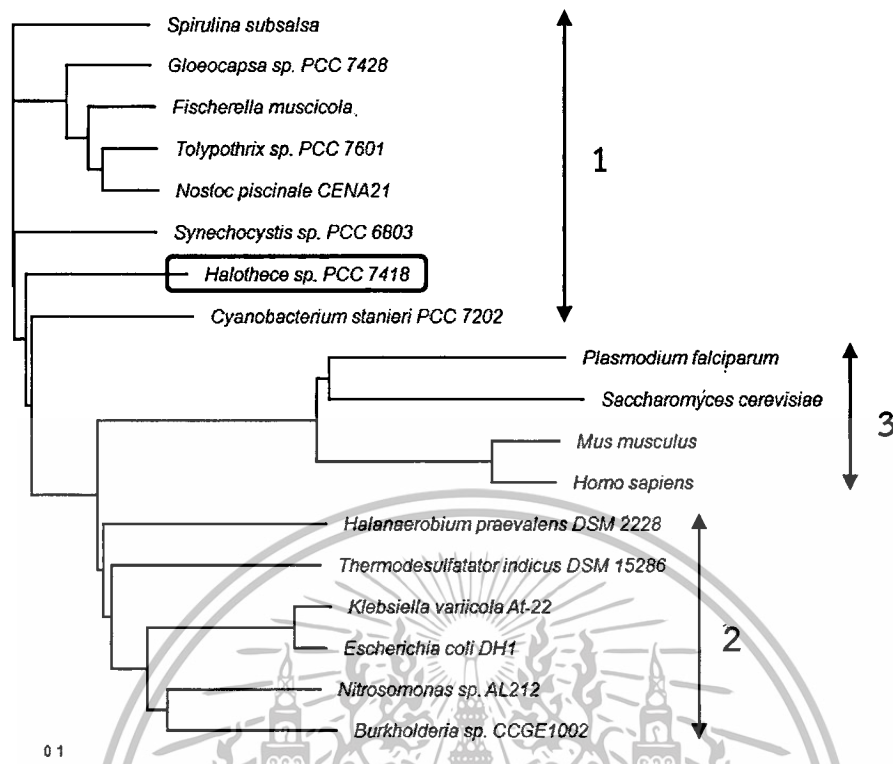
ผลการตรวจสอบนั้น พบโดเมนที่เป็นลักษณะสำคัญของเอ็นไซม์ไลเกส ได้แก่

- Adenylation domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16 – 316) โดเมนนี้ตกอยู่ในกลุ่มของ LIGANC superfamily โดเมนนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการเชื่อมต่อสายของดีเอ็นเอทั้งสองเส้นในปฏิกิริยา ligation ผ่านการใช้ NAD^+ เป็น cofactor นอกจากนี้แล้วยังเจอลักษณะสำคัญคือลำดับกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันเป็น KXDG (ตำแหน่งที่ 114-117) อันเป็นลักษณะสำคัญที่กรดอะมิโนไลซีน (K) จะเข้าจับกับกับ AMP เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอทั้งสองเส้นเข้าด้วยกัน
- OB domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 321 – 398) โดเมนนี้มักจะพบต่อจาก Adenylation domain ของกลุ่ม NAD^+ -dependent ligase โดยทั่วไปแล้ว OB domain นี้จะมีส่วนช่วยในการจับสายดีเอ็นเอเพื่อสะดวกแกตอนเกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอทั้งสองเส้นเข้าด้วยกัน
- DN domain หรือ small cystein4 zinc finger domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 406 – 430) โดเมนนี้มักถูกพบใน NAD^+ -dependent ligase เท่านั้น โดยคาดว่าลักษณะการพับม้วนตัวของโปรตีนจะเกิดจาก Zn^{2+} จะมีพันธะ co-ordinate กับ cystein 4 เรสิดิว โปรตีนในช่วงดังกล่าวนี้จะมีส่วนช่วยในการจับสายดีเอ็นเอในขณะที่เกิดปฏิกิริยา
- HHH domain หรือ Helix hairpin Helix (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 447 – 499 และ 508 - 571) โดเมนนี้เป็นส่วนของโปรตีนที่ใช้ในการจับเส้นดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ในเส้นดีเอ็นเอ ไม่มีผลต่อการเข้าจับของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- BRCT domain หรือ breast cancer carboxy-terminal domain (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 593 – 571) เป็นโดเมนที่เป็นสมาชิกของ Breast Cancer Suppressor Protein (BRCA1) โดเมน BRCT นี้พบได้ทั่วไปในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอและโปรตีนที่ควบคุมรอบวัฏจักรของการแบ่งเซลล์ โปรตีนในช่วง BRCT นี้อาจจะจับตัวกันเป็น homo/hetero BRCT multimer เพื่อไปจับกับเส้นดีเอ็นเอที่มีความเสียหายต่อไป

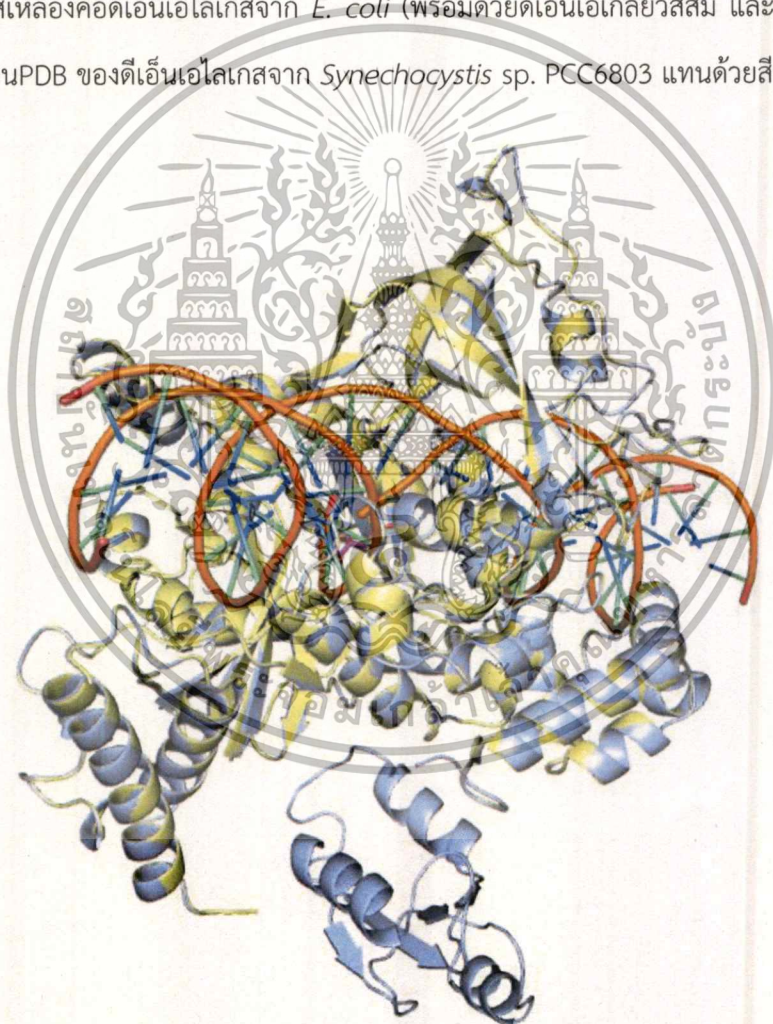
จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบ (Amino acid alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal omega ตามด้วย Bootstrap NJ phylogenetic tree ลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 กับลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันนี้ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย ได้แก่ กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ [*Spirulina subsalsa* (reference sequence: WP_017306310.1), *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 (GenBank: AFZ32442.1), *Fischerella muscicola* (reference sequence: WP_016866247.1), *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (GenBank: EKE99735.1), *Nostoc piscinale* CENA21 (GenBank: ALF52331.1), *Halotheca* sp. PCC 7418 (GenBank: AFZ42673.1), *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202 (GenBank: AFZ46724.1)] กลุ่มแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ [*Halanaerobium praevalens* DSM 2228 (GenBank: ADO77719.1), *Thermodesulfatator indicus* DSM 15286 (GenBank: AEH44041.1), *Klebsiella variicola* At-22 (GenBank: ADC57224.1), *Escherichia coli* DH1 (GenBank: ACX38924.1), *Nitrosomonas* sp. AL212 (GenBank: ADZ27228.1), *Burkholderia* sp. CCGE1002 (GenBank: ADG15842.1)] และกลุ่มสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต 4 สายพันธุ์ [*Plasmodium falciparum* (GenBank: AAN64156.1), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: CAA91582.1), *Mus musculus* (reference sequence: NP_001186239.1), *Homo sapiens* (reference sequence: NP_000225.1)] จากนั้นนำผลการเปรียบเทียบมาสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แผนภูมิ Phylogenetic tree จากการจัดหมวดหมู่ของเอ็นไอเอ็มดีเอ็นเอไลเกสจากสามกลุ่มสิ่งมีชีวิต ได้แก่ กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (กลุ่ม 1) กลุ่มแบคทีเรีย (กลุ่ม 2) และกลุ่มยูคาริโอต (กลุ่ม 3)

แผนภูมิ Phylogenetic tree ได้แยกให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไอเอ็มดีเอ็นเอไลเกสสามารถถูกแบ่งแยกออกไปได้เป็นสามกลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1 จะเป็นกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสิ้น ทั้งนี้ลำดับกรดอะมิโนของสาหร่าย Synechocystis ก็ได้แสดงเอาไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม ซึ่งก็ถูกจัดเข้าไปอยู่ในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียเช่นกัน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้เหมือนในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย แผนภูมิสามารถแยกไลเกสของกลุ่มสิ่งมีชีวิตนี้ออกจากไลเกสของกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียได้ และกลุ่มสุดท้าย กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มยูคาริโอต นั่นคือ มนุษย์ หนู ยีสต์ หรือแม้แต่พาราไซต์ที่ติดต่อกับคนอย่าง *P. falciparum* ก็มีความแตกต่างทำให้แผนภูมิสามารถแยกไลเกสจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ออกจากไลเกสที่มาจากทั้งไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียได้

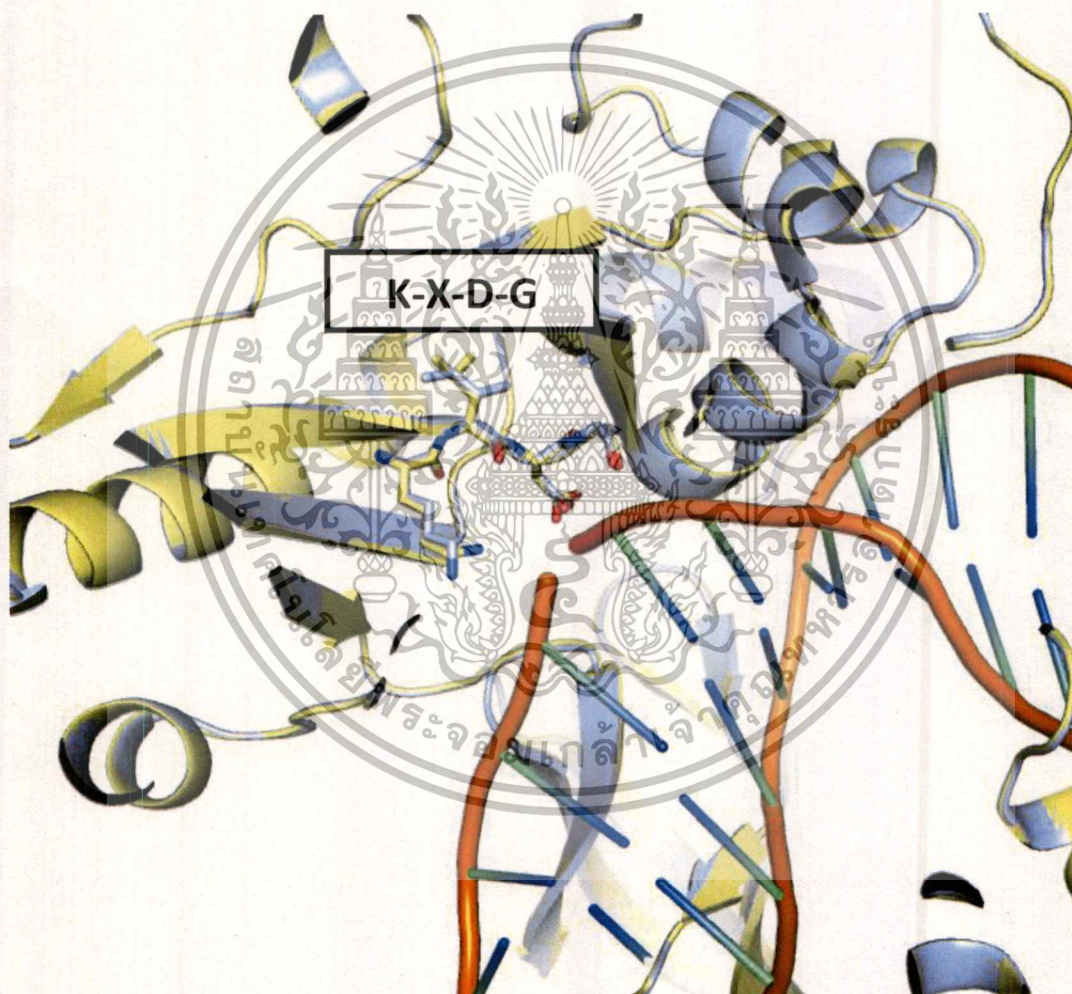
นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการทำนายโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอไลเกสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 อีกด้วย ลำดับกรดอะมิโนทั้ง 669 เรซิดิวได้ถูกส่งเข้าไปทำนายโครงสร้างสามมิติออนไลน์ผ่านเว็บไซต์ <http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/> ผลการทำนายพบว่าโปรแกรมใช้ PDB 2OWO ต้นแบบ โดยที่ PDB นี้เป็นโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากแบคทีเรีย *E. coli* ผลการทำนายยังให้ค่า e-value ที่ดีที่สุด คิดเป็น $1.25e-22$ โดยจะใช้อยู่ในช่วงเรซิดิวที่ 2 – 586 (คิดเป็น 87.4%) ส่วนเรซิดิวที่ 588 – 669 (ช่วงของ BRCT domain) จะทำนายโครงสร้างขึ้นมา โดยมีค่า e-value $7.26e-06$ ภาพแสดงลักษณะของโครงสร้างสามมิติได้ถูกแสดงเอาไว้ในรูปแบบที่ 4.6 PDB 2OWO แทนด้วยสีเหลืองคือดีเอ็นเอไลเกสจาก *E. coli* (พร้อมด้วยดีเอ็นเอเกลียวสีส้ม และ AMP ที่แสดงด้วยสีชมพูเข้ม) ส่วน PDB ของดีเอ็นเอไลเกสจาก *Synechocystis* sp. PCC6803 แทนด้วยสีฟ้าอ่อน



รูปที่ 4.6 โครงสร้างสามมิติของ 2OWO (สีเหลือง) พร้อมด้วยดีเอ็นเอ (สีส้ม) และ AMP (สีชมพู) พร้อมกับโครงสร้างทำนายสามมิติของดีเอ็นเอไลเกสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. (สีฟ้า) ในมุมมองที่ซ้อนโครงสร้างทั้งสองเข้าด้วยกัน (Superimposition)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างระดับทุติยภูมิได้พบว่า โปรตีนที่ทำนายประกอบด้วย α -helix 39 % เป็น β -sheet 15% และที่เหลืออีก 44% เป็น coil หรือ loop ต่างๆ ตำแหน่งที่สำคัญของ KXDG ใน *E. coli* พบเป็น KIDG ในขณะที่ของ *Synechocystis* sp. PCC6803 พบเป็น KLDG อย่างไรก็ตาม ลักษณะ KXDG จากทั้งสองสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นตำแหน่งที่สำคัญที่ใช้ในการเข้าจับกับ DNA ที่เป็น substrate เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อสายระหว่าง 5' backbone phosphate และ 3' hydroxyl terminus ของสองสายดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.7)



อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเอสจากยีน sll1209

ได้มีการส่ง pSynlig22b เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยเลือกใช้ *E. coli* BL21(DE3) ทำการคัดเลือกโคลนินที่ได้รับพลาสมิดอย่างถูกต้อง เพื่อนำมาใช้ในการหาภาวะเหมาะสมแก่การผลิตโปรตีนต่อไป

เซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pSynlig22b จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร LB จนกระทั่งมีความขุ่น OD_{600} อยู่ที่ 0.6 จากนั้นทำการแบ่งน้ำเลี้ยงที่มีเซลล์นี้ออกเป็นห้าส่วนเพื่อจะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอ็นไซม์ไลเอส การเหนี่ยวนำของแต่ละส่วนจะเป็นไปดังนี้

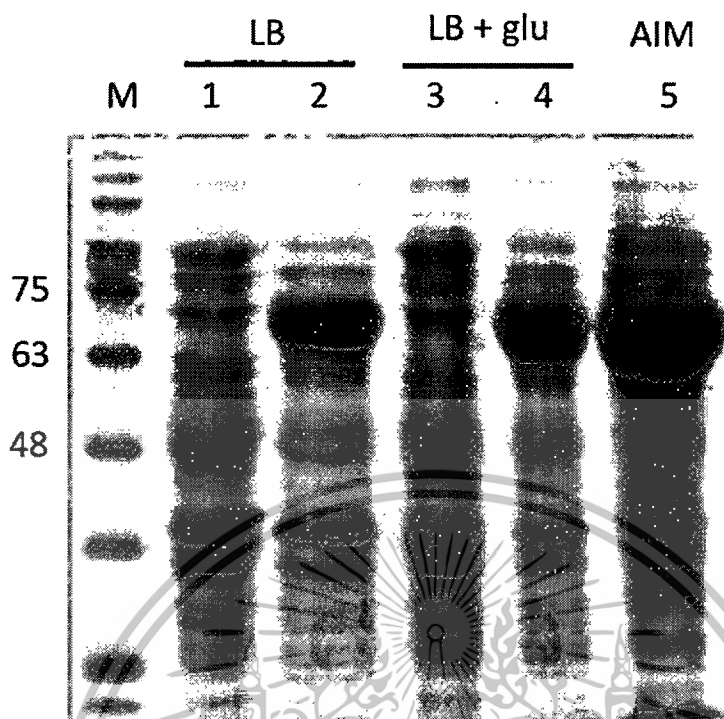
- | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ส่วนที่ 1 | ไม่ใส่ IPTG เลี้ยงต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (negative control แบบที่ 1) |
| ส่วนที่ 2 | ใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เลี้ยงต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง |
| ส่วนที่ 3 | เติม glucose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% แต่ไม่เติม glucose เลี้ยงต่อที่ 16 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (negative control แบบที่ 2) |
| ส่วนที่ 4 | เติม glucose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% จากนั้นใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เลี้ยงต่อที่ 16 องศา เป็นเวลา 16 ชม |
| ส่วนที่ 5 | Auto Induction Medium (AIM): ไม่เติม IPTG เลี้ยงต่อที่ 16 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง |

ส่วนที่ 1 และ 2 จะใช้เป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกด้วยระบบดั้งเดิมคือการใช้สาร IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ แล้วให้เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ 37 °C

ส่วนที่ 3 หรือ 4 จะใช้เพื่อทดสอบการช่วยส่งเสริมการแสดงออกด้วยน้ำตาลกลูโคส

ส่วนที่ 5 จะใช้เพื่อเสี่ยงการเหนี่ยวนำการแสดงออกโดยใช้สารเคมี IPTG

ทำการเก็บ cell ของแต่ละส่วนมา 1 ml ทำการปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วเทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นจึง resuspend เซลล์ด้วย 100 ul buffer จึงใส่ loading dye 25 ul ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงโหลดตัวอย่างช่องละ 20 ul ได้ผลดังรูปที่ 4.8

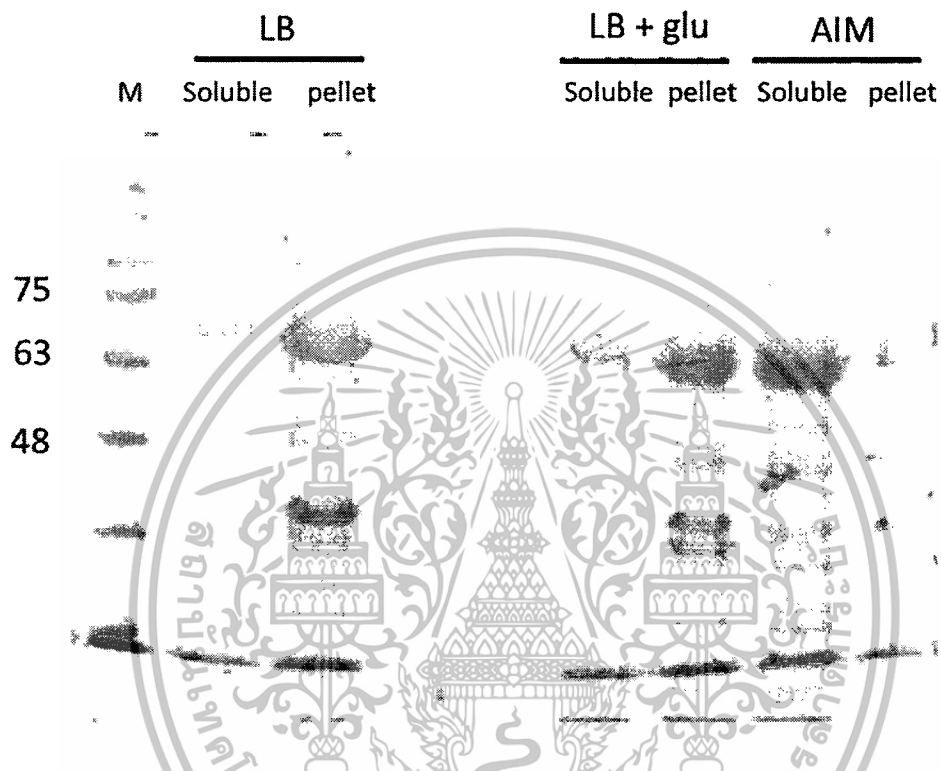


รูปที่ 4.8 ผลการแยกโปรตีนใน Acrylamide gel (Lane 1 : 0 mM IPTG, LB, 37 °C; Lane 2: 1 mM IPTG, LB, 37 °C; Lane 3: 0 mM IPTG, LB + 1% Glucose , 16 °C; Lane 4: 1 mM IPTG, LB + 1% Glucose , 16 °C; Lane 5: 0 mM IPTG, AIM, 16 °C)

เอ็นไซม์ไลเกสที่ต้องการ จะมีขนาดจากการทำนายคือ 74.6 KDa ซึ่งหากดูจากภาพที่ 1 จะพบว่า มีแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มากเกิดขึ้นหลังจากที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้ว (เลน 2 และ 4) ในส่วนที่เป็น AIM นั้นก็สามารถพบแถบของโปรตีนที่มีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในรูปที่ 4.8 นี้ยืนยันว่าโปรตีนไลเกสน่าจะมีการผลิตเอ็นไซม์ไลเกสแต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าโปรตีนที่ผลิตขึ้นมา นั้น เป็นส่วนละลายน้ำได้ (soluble fraction) หรือจะเป็นส่วนที่โปรตีนจับตัวกันเป็นก้อน (inclusion body) ดังนั้นจึงได้ทำการแตกเซลล์แล้วปั่นแยกเอาส่วนน้ำใสออกจากส่วนตะกอน นำสองส่วนนี้มาแยกใน acrylamide gel อีกครั้ง การทดลองส่วนนี้จะนำเซลล์จากช่องที่ 2 4 และ 5 มาทำการแตกเซลล์ ด้วยเครื่อง sonicator หัวเบอร์ MS73, 4x10% cycle pulse 30 เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง ปั่นแยกส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

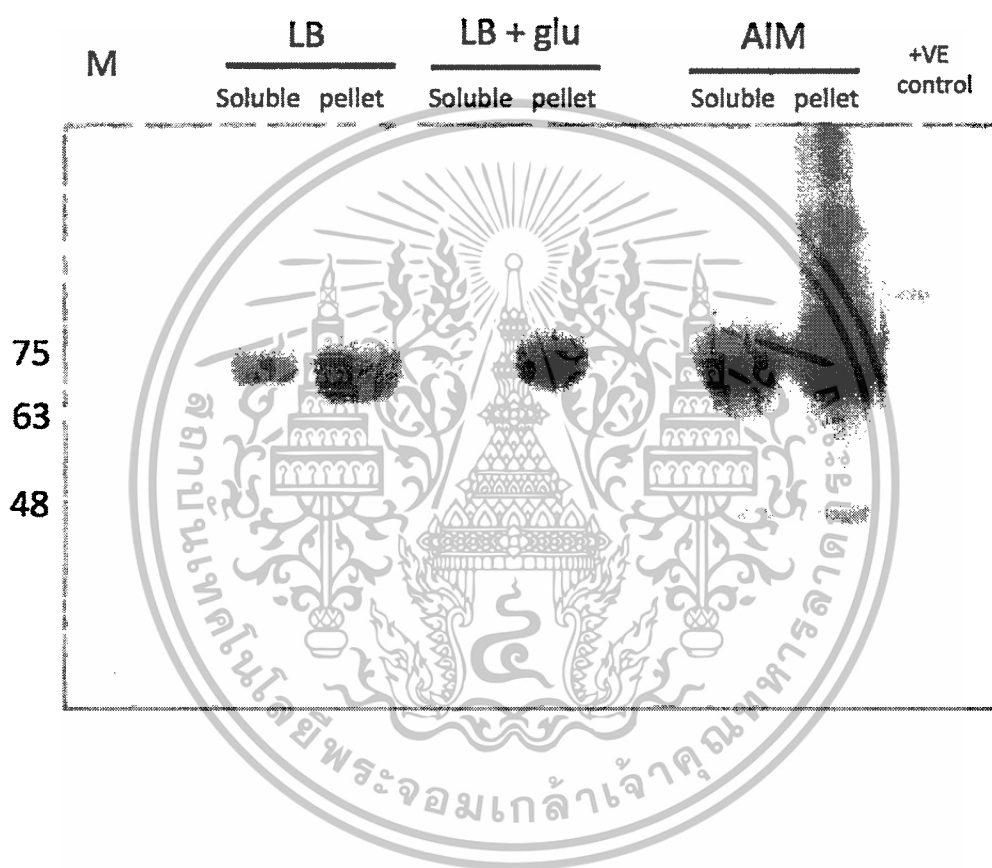
ตะกอนกับน้ำใสที่การปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยก soluble fraction กับ inclusion body ได้ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ผลการแยกโปรตีนใน Acrylamide gel เพื่อแสดงว่าโปรตีนที่ผลิตอยู่ในส่วนละลายได้ (soluble) หรือส่วนที่จับตัวกันเป็นก้อน (pellet)

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า โปรตีนที่เหนียวนำการผลิตด้วย IPTG นั้นจะมีส่วนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำได้อยู่น้อยกว่าโปรตีนที่อยู่ในส่วนที่จับตัวกันเป็นก้อน ส่วนระบบการเหนียวนำการแสดงออกแบบ auto induction medium (AIM) จะมีโปรตีนที่ถูกผลิตอยู่ในส่วนที่เป็น soluble fraction ได้มากกว่าส่วนที่จับตัวกันเป็นก้อน ในการทดลองต่อไปเพื่อผลิตโปรตีนในปริมาณมากขึ้นนั้น จึงจะใช้ระบบการเหนียวนำแบบ auto induction medium (AIM) ในการผลิตโปรตีนปริมาณมากต่อไป

นอกจากนี้แล้ว โปรตีนที่ถูกผลิตมากขึ้น จะเป็นโปรตีนที่มี (His)₆ tag ดังนั้นจึงต้องการทำการทดสอบว่าโปรตีนที่แสดงออกดังกล่าว เป็นโปรตีนคาดหวังหรือไม่ โดยการทำ western blot ซึ่งจะใช้ anti (His)₆ ใช้ในการเกิด hybridization กับในส่วนของ (His)₆ tag หากโปรตีนที่แสดงออกนั้นมี (His)₆ tag ก็จะทำให้เห็นแถบสีม่วงเข้มขึ้นมา ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 Western blot analysis ของโปรตีนที่แยกได้จากรูปที่ 4.9 ช่อง +VE คือ positive control โดยใช้โปรตีนชนิดอื่นที่มีการศึกษามาก่อนแล้วว่า มี (His)₆ tag อยู่จริงเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นแถบสีม่วงเข้มที่เกิดขึ้น

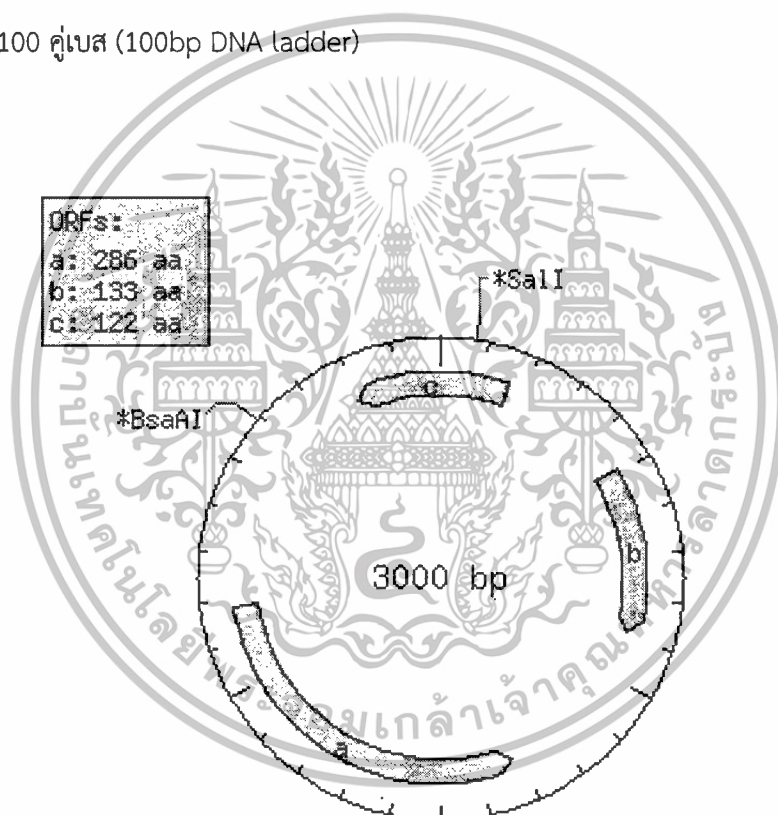
ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า โปรตีนที่แสดงออกในการศึกษาครั้งนี้ มี (His)₆ tag อยู่จริงในเส้นของ โปรตีน อันเป็นอีกหนึ่งหลักฐานที่บ่งชี้ว่าระบบการแสดงออกของโปรตีนครั้งนี้ น่าจะได้เอนไซม์ไลเกสอย่าง ถูกต้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์

เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสได้ถูกผลิตและทำบริสุทธิ์เพื่อใช้ตรวจติดตามลักษณะของเอ็นไซม์ต่อไป เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วได้ถูกนำมาทดสอบการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์เบื้องต้นแล้วโดยอาศัย self ligated T-easy DNA vector เป็น substrate plasmid ดังกล่าวนี้จะถูกนำมาตัดด้วย BsaAI และ Sall เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอเส้นตรงสองเส้น ที่แต่ละเส้นจะมีปลายเหนียว (sticky end) 1 ปลาย และ ปลายทื่อ (blunt end) อีก 1 ปลาย รูปที่ 4.11 จะแสดงแผนที่ดีเอ็นเอของการตัดของเอ็นไซม์ทั้งสองบนพลาสมิด T-easy plasmid การตัดนี้จะทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นตรงสองเส้น ขนาด 2,514 และ 486 คู่เบส เทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด 100 คู่เบส (100bp DNA ladder)



รูปที่ 4.11 แสดงแผนที่ดีเอ็นเอของพลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector เมื่อจะทำการตัดด้วย BsaAI (Blunt end) และ Sall (Sticky end)

ชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงทั้งสองเส้นนี้จะถูกนำมาใช้เป็น substrate ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase ต่อไป ในการวัดค่ากิจกรรมนี้ จะได้ใช้ ligase จากผลิตภัณฑ์ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบด้วย การดูผลการทดลองคือ จะดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เป็น substrate ที่ลดลงหรือจางลงไป ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.12



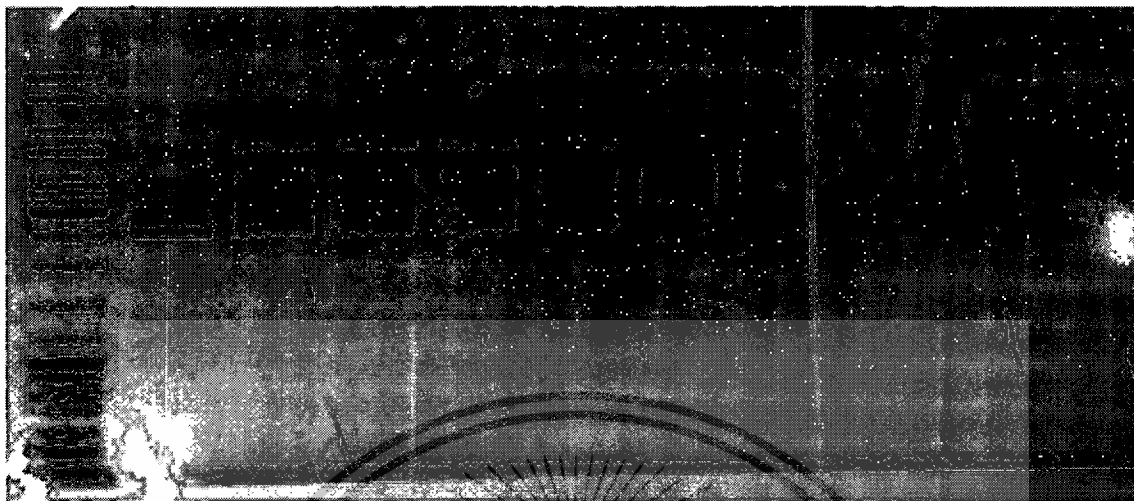
รูปที่ 4.12 ออคาโรสเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับการตรวจติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase ทั้งจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า (ซ้าย) และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ขวา) สามเหลี่ยมแสดงถึงเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 3 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที

จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้านั้น จะมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จางลงอย่างเห็นได้ชัด พร้อมทั้งมีแถบดีเอ็นเอของผลผลิตเกิดขึ้น (ขนาดใหญ่กว่า 2,514 คู่เบส) ในส่วนของเอ็นไซม์ที่ผลิตจากการศึกษาครั้งนี้ ผลการทดลองชี้ไปว่าเอ็นไซม์ที่ผลิตขึ้นมาได้นั้น อาจจะเสียสภาพไป สังเกตได้จากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 2,514 และ 486 คู่เบส จะมีความเข้มของแถบเท่าเดิม นั่นคือ ยังคงเป็นซับสเตรตให้กับเอ็นไซม์ในปริมาณเท่าเดิม เพราะหากเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายได้แล้ว ความเข้มของแถบควรจะลดลง พร้อมทั้งควรมีแถบของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นไปด้วย อันจะสามารถสังเกตเห็นได้จากชุดการทดลองของผลิตภัณฑ์ทางการค้า อย่างไรก็ตาม จึงได้ทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ใหม่อีกครั้งเพื่อทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ DNA ligase ดังแสดงผลเอาไว้ในรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ ligase ทางการค้า

ผลิตภัณฑ์ ligase ที่ผลิตขึ้นในงานนี้

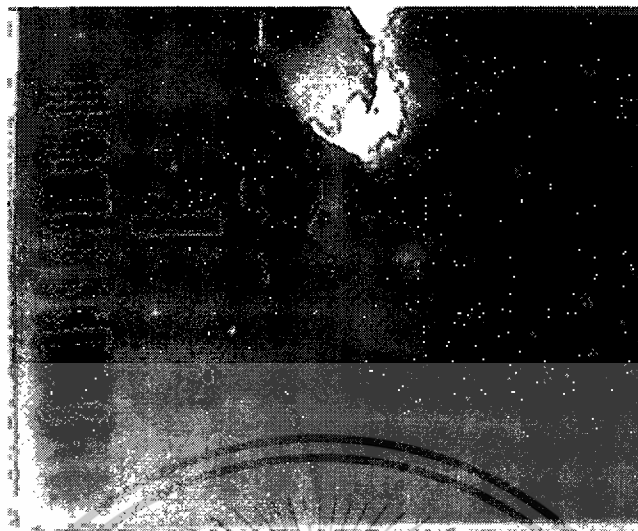


รูปที่.4.13 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase ทั้งจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า (ซ้าย) และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ขวา) สามเหลี่ยมแสดงถึงเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 2 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที

ผลการทดลองครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เอ็นไซม์ไลเกสจากผลิตภัณฑ์ทางการค้ายังคงทำงานได้อย่างปกติเหมือนในการทดสอบครั้งแรก แต่ความแตกต่างเกิดขึ้นกับเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการทดลอง นั่นคือลักษณะของแถบดีเอ็นเอจะมีลักษณะที่เป็นแถบมีความฟุ้ง อีกทั้งขนาดของแถบดีเอ็นเอก็มีขนาดที่สูงขึ้น โดยอยู่ที่ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ซึ่งมากกว่ารูปที่ 1 อีกทั้งขนาด 3,000 นี้ ยังเป็นช่วงขนาดของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อเห็นผลการทดลองในลักษณะเช่นนี้แล้ว ผู้ทำการทดลองยังไม่ปักใจเชื่อว่าจะเป็นแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์จริง เนื่องด้วยเมื่อสังเกตเห็นรูปแบบจากฝั่งผลิตภัณฑ์ทางการค้าแล้ว จึงทำให้คาดว่า เอ็นไซม์ที่ผลิตขึ้นจากการทดลอง ก็ควรจะมียูรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่คล้ายกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าเช่นเดียวกัน ทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบซ้ำอีกหลายครั้งแต่ผลการทดลองก็ยังคงชี้ให้เห็นว่ารูปแบบของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จากเอ็นไซม์ที่ผลิตขึ้นได้ในครั้งนี้ มีรูปแบบของผลผลิตที่เป็นแบบเดียวกัน ดังแสดงเอาไว้ในรูปที่ 4.14

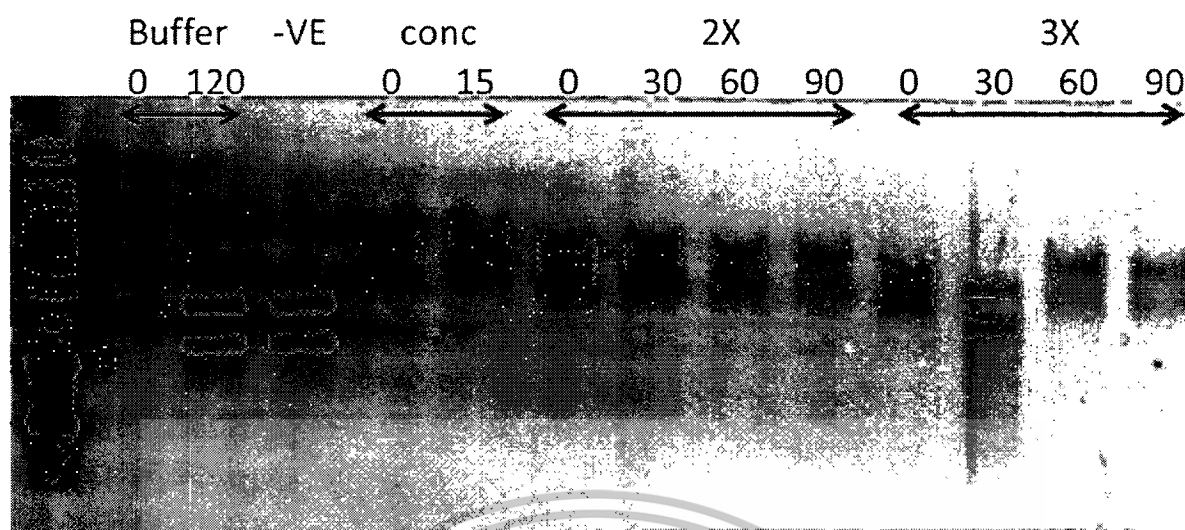
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ ligase ที่ผลิตขึ้นในงานนี้



รูปที่ 4.14 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจทำซ้ำในการติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase จากเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามเหลี่ยมแสดงถึงเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาที่นานขึ้น จาก 0 - 2 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นช่องละ 30 นาที

การที่เห็นแถบของดีเอ็นเอมีขนาดของผลิตภัณฑ์เพียงขนาดเดียวในเวลาอันสั้น อาจเกิดจากปริมาณของเอ็นไซม์นั้นมากเกินไป จึงได้ลองทำการเจือจางปริมาณเอ็นไซม์ดู เพื่อสำหรับการแน่ใจว่าปริมาณของเอ็นไซม์นั้น ยังคงให้ผลการทดลองในลักษณะเช่นเดิม คือแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะที่ฟุ้ง ผลการทดลองเป็นไปตามรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (negative exposure) สำหรับการตรวจติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ligase จากเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่การเจือจางเอ็นไซม์ หนึ่งเท่า สองเท่า และสามเท่า ตามลำดับ ตัวเลขแสดงเวลาในหน่วยนาทีของการบ่มปฏิกิริยา

จากรูปที่ 4.15 จะเป็นการทดสอบสถานะของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง พบว่าระบบบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อการเกิด up-shift ของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ และในส่วนของชุดการทดลองที่การเจือจางเอ็นไซม์ หนึ่งเท่า (conc) สองเท่า (2X) และสามเท่า (3X) ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์นั้นจะมีรูปแบบคงเดิมคือเป็นแถบขนาดใหญ่ขึ้นและมีความฟุ้ง อย่างไรก็ตามควรแจ้งไว้ว่า การเจือจางที่สามเท่า เมื่อบ่มปฏิกิริยา 30 นาที ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ได้ ซึ่งคาดว่าเกิดจากความผิดพลาดในขั้นการเติมเอ็นไซม์ลงหลอดทดลอง

เมื่อผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเอ็นไซม์ที่สร้างแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ในลักษณะดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยจึงได้เพิ่มความแน่ใจว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ เป็นปฏิกิริยาที่ถูกต้องจริงๆ โดยเปลี่ยนวิธีการทำการทดลองใหม่ อีกทั้งตั้งข้อสังเกตว่าการมีปลายทื่อ (blunt end) ใน substrate อาจจะทำให้เกิดการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป็นวงปิดให้เหมือนเดิมจะเกิดได้ลำบาก ดังนั้นจึงเลือกใช้ substrate ที่เป็น pGEM[®]-T Easy Vector self ligated/Sall เพียงอย่างเดียวเพื่อให้เอ็นไซม์เชื่อมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉพาะส่วนที่เป็น sticky end เมื่อเอ็นไซม์ทำการเชื่อมต่อสายเข้าด้วยกันให้เป็นดีเอ็นเอวงปิดแล้ว ก็ได้นำดีเอ็นเอวงปิดนี้ไปทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 ผลการทดลองพบโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นบนอาหารวุ้นจริง ดังนั้น เอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถทำงานได้อย่างถูกต้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การแสดงลักษณะกิจกรรมของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเอสจาก *Synechocystis* sp. PCC6803

ผลทั้งหมดทำให้ได้ข้อสรุปว่า แผนที่ยาวไว้ว่าการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ด้วยการวัดความเข้มข้นของ substrate ที่ลดลง หรือ จะวัดความเข้มข้นของ product ที่สูงขึ้นเพื่อใช้คำนวณหากิจกรรมของเอ็นไซม์นี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากผลิตภัณฑ์อาจเกิดได้หลายขนาด อีกทั้งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอนั้นยากแก่การวัดความเข้ม ส่งผลให้ต่อไปจะได้ทำการแสดงลักษณะที่เหมาะสมกับเอ็นไซม์ชนิดนี้โดยการนำ ligation reaction ที่เวลาต่าง ๆ นั้น ทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 เพื่อนำจำนวนโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดวงปิดต่อไป โดยจะทำการเทียบกับ positive control ทุกครั้ง นั่นคือ ligation reaction จากการใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้า โดยจะคิดว่าเป็น 100%

ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์นั้น ได้ใช้ระบบบัฟเฟอร์ของผลิตภัณฑ์ทางการค้า T4 DNA ligase (Thermo) อันประกอบไปด้วย 40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 ที่ 25 °C) เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าเอ็นไซม์ทางการค้าเกิดปฏิกิริยาได้จริง โดยยึดตามคู่มือที่มาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ (manual) สำหรับ ligase ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้จะมีการใส่เอ็นไซม์ลงในปฏิกิริยาให้มีจำนวนโมลเท่ากับปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ทางการค้า กล่าวคือในปฏิกิริยา จะเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

- Linear DNA 100 ng
(pGEM[®]-T Easy Vector self ligated/Sall)
- 10X T4 DNA Ligase buffer 5 μ l
- T4 DNA ligase * 5 U
- Water, nuclease-free up to 50 μ l

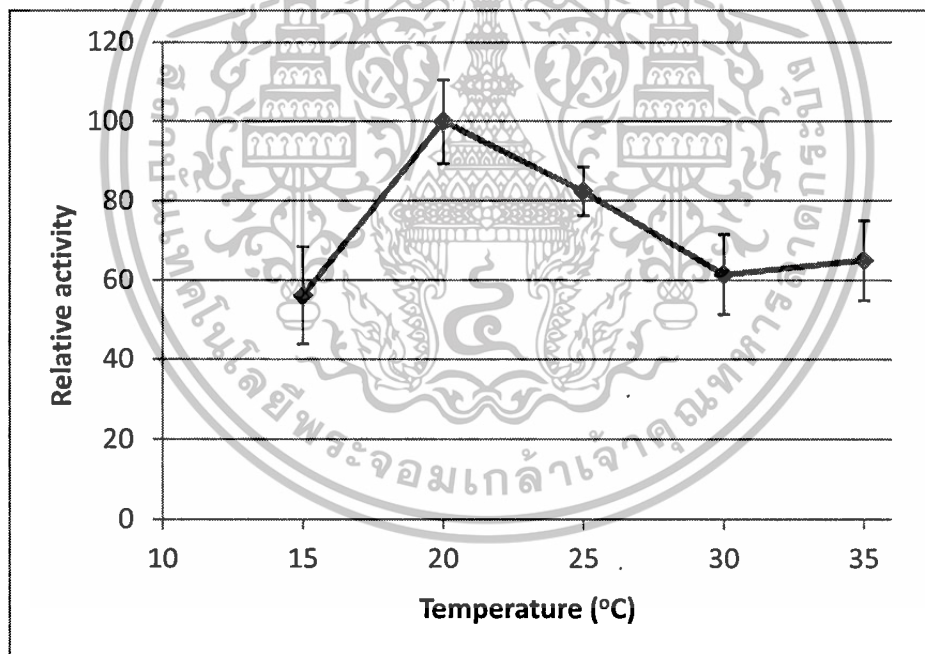
* สำหรับปฏิกิริยาที่เติม ligase ที่ผลิตขึ้นจากงานนี้จะมีการเติมให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับเอ็นไซม์ทางการค้า ในหน่วยโมล

ทำการบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ 10 μ l ของปฏิกิริยา ทรานฟอร์มเข้าเซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี CaCl₂ จากนั้นเทเซลล์ 100 μ l ลงบนอาหาร LB-Agar ที่มี Ampicillin และ X-gal เพื่อเป็นการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ถูกต้อง บ่มเพลทที่ 37 °C เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีสีฟ้าที่เกิดขึ้น โดยทำทั้งหมด 5 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์

อุณหภูมิส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจจะส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ และส่งผลต่อพันธะไฮโดรเจนที่เบสคู่สมของ substrate เพื่อการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อให้เป็นดีเอ็นเอวงปิดอีกครั้งหนึ่ง แต่ในทางกลับกัน หากอุณหภูมิไม่สูงพอ พลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาอาจจะไม่เพียงพอที่จะให้ปฏิกิริยาเดินหน้าได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อเป็นการทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอ็นไซม์ จึงได้ทำการบ่มปฏิกิริยา ที่ไม่มีเอ็นไซม์ ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 15 – 35 องศาเซลเซียสในน้ำเป็นเวลา 3 นาทีก่อน เพื่อเป็นการปรับอุณหภูมิของสารทั้งหมดก่อนเติมเอ็นไซม์ เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.16 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจะทำงานได้ดีที่สุด หากลดหรือเพิ่มอุณหภูมิ เอ็นไซม์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานที่ลดลง เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจึงเหมาะสมที่จะทำงานได้ดีที่ 20 องศาเซลเซียส



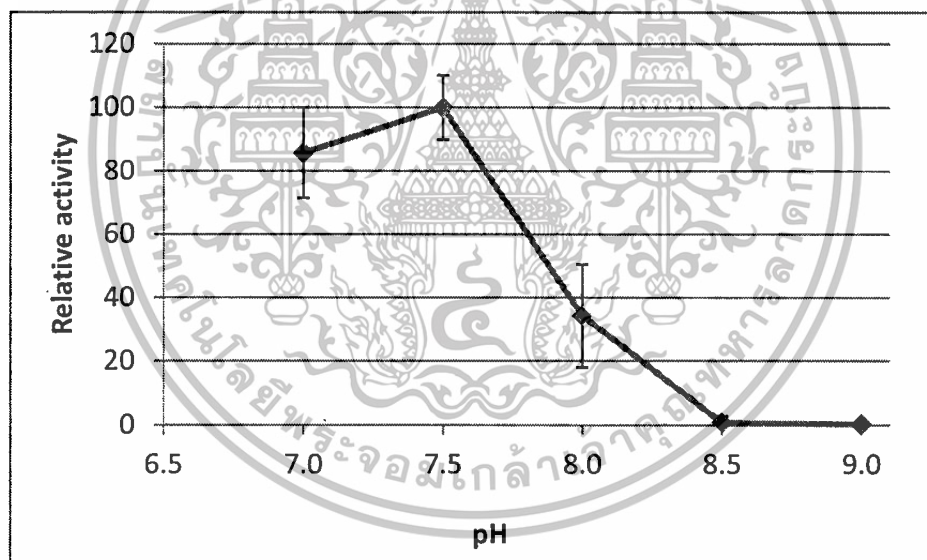
รูปที่ 4.16 การปรับสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของดีเอ็นเอไลเกสที่ผลิตมาจาก

Synechocystis sp. PCC 6803

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์

จากระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในตอน 4.5.1 นั้น ได้ใช้บัฟเฟอร์ทางการค้า ซึ่งมีการควบคุม pH ด้วย Tris buffer pH 7.8 ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมบัฟเฟอร์ใหม่ โดยให้คงที่ความเข้มข้นสารต่างๆต่อไปนี้ได้แก่ 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP จากนั้นบัฟเฟอร์จะมีการเปลี่ยนไปใช้สารอื่น ได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และ 7.5 หรือสบัฟเฟอร์ pH 8.0 – 9.0 ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 20 °C จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส เป็นเวลา 5 นาที ผลการทดสอบวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์เป็นไปดังรูปที่ 4.16 โดยพบว่าเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจาก *Synechocystis* sp. จะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดที่ pH 7.5 ส่วนที่ค่า pH อื่น เอ็นไซม์จะทำงานได้ลดลง และเป็นสิ่งที่สังเกตได้ว่าเอ็นไซม์จะไม่ทำงานเมื่อ pH มีค่าตั้งแต่ 8.5 เป็นต้นไป

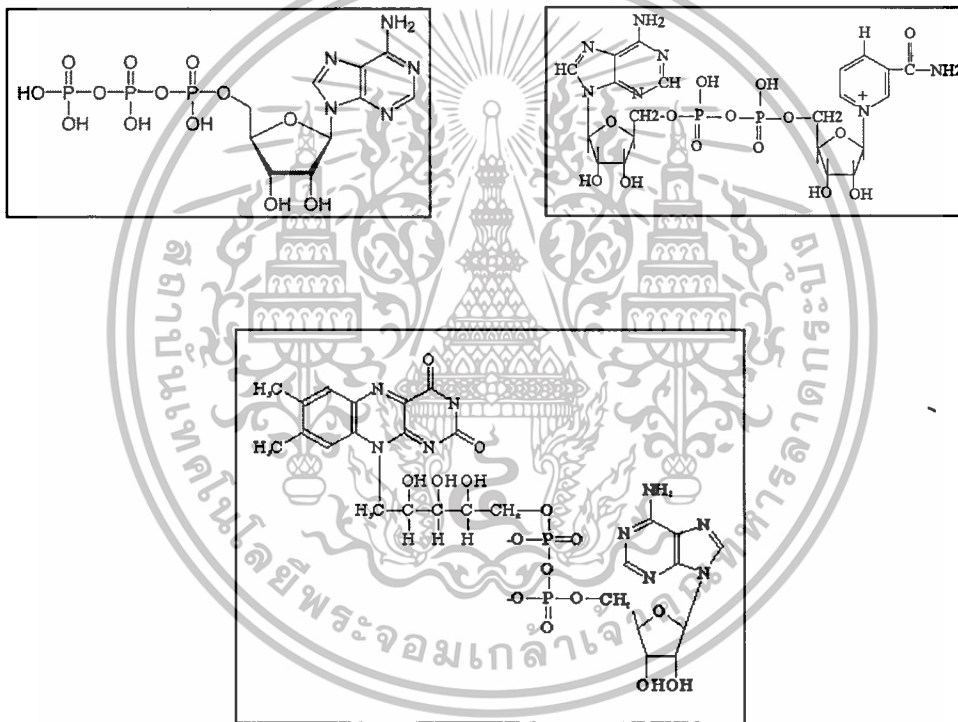


รูปที่ 4.17 การปรับสภาวะ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของดีเอ็นเอไลเกสที่ผลิตมาจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลของโคเอ็นไซม์ต่อการทำงานของเอ็นไซม์

จากผลการทดลองในส่วน 4.5.1 และ 4.5.2 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอไลเอสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20 °C ที่ pH 7.5 อย่างไรก็ตาม โคเอ็นไซม์ที่ใช้ยังคงเป็น ATP ซึ่งจะยังไม่ใช่สับสเตรตที่แท้จริงของเอ็นไซม์นี้ ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนโคเอ็นไซม์ให้เป็น FAD และ NAD⁺ โครงสร้างของโคเอ็นไซม์ทั้งสามชนิดได้แสดงเอาไว้ที่รูปที่ 4.17 จะเห็นว่าโครงสร้างทั้งสาม สามารถถูกย่อยแล้วสลายตัวให้ AMP ได้ทั้งสามโมเลกุล โมเลกุล AMP สามารถมองเห็นได้จากโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอไลเอสจาก *E. coli* ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.7

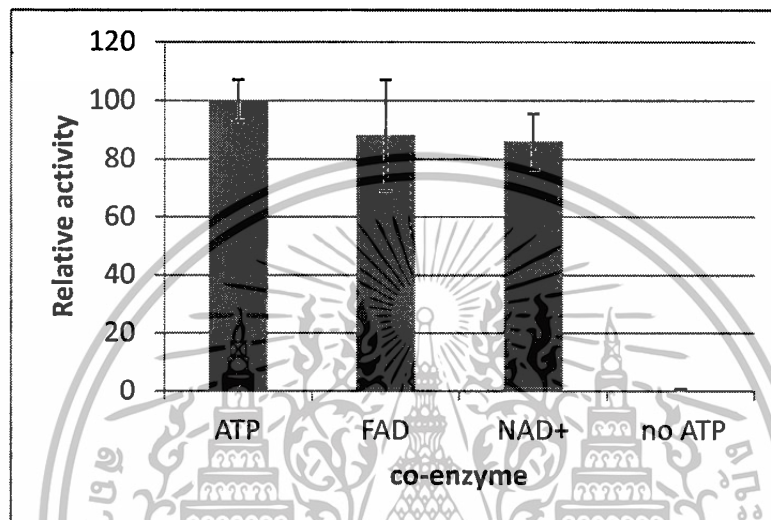


รูปที่ 4.18 โครงสร้างของ ATP (บนซ้าย) NAD⁺ (บนขวา) และ FAD (ล่าง)

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงาน โดยใช้ความเข้มข้นของสารทั้งสามตัวเท่ากันที่ 0.5 mM และทำเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่เติมโคแฟกเตอร์ (ไม่เติม ATP) ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.18 แสดงให้เห็นว่าการใช้โคแฟกเตอร์ทั้งสามชนิดได้แก่ ATP FAD และ NAD⁺ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม โคเอ็นไซม์เหล่านี้จำเป็นที่จะให้เอ็นไซม์ทำงาน เนื่องจากหากไม่เติมโคเอ็นไซม์แล้ว (no ATP) เอ็นไซม์ก็ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป



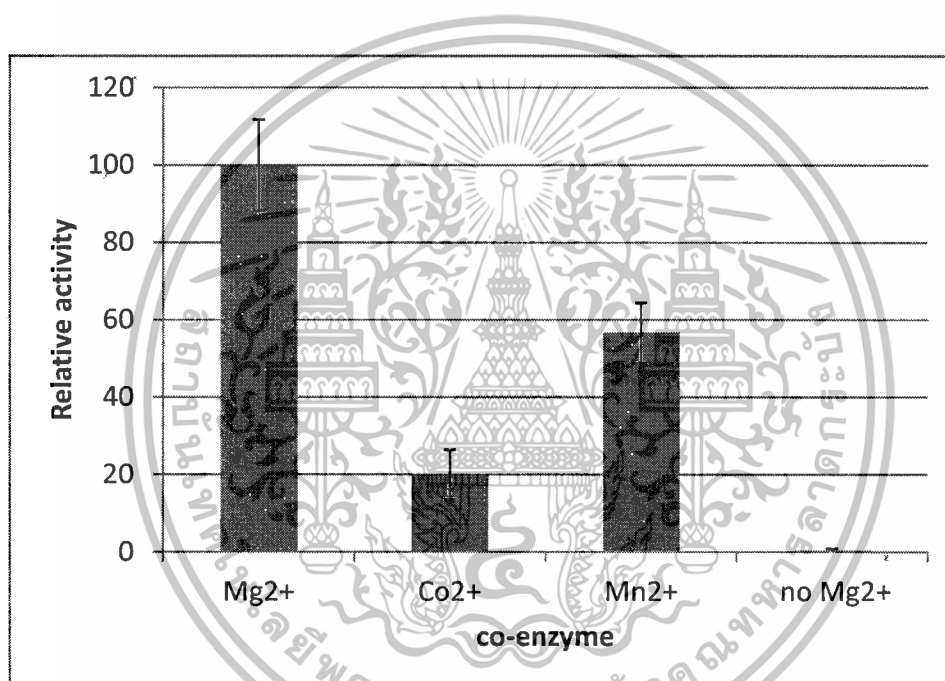
รูปที่ 4.19 โคเอ็นไซม์ต่อการทำงานของดีเอ็นเอไลเกสที่ผลิตมาจาก *Synechocystis* sp. PCC

6803

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.4 ผลของโคแฟกเตอร์ต่อการทำงานของเอ็นไซม์

โดยทั่วไปแล้ว จะมีการเติมไอออนของโลหะที่มีประจุ 2+ ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อลดความเป็นประจุ - ของฟอสเฟต เพื่อความสะดวกในการเข้าจับระหว่างเอ็นไซม์กับสับสเตรต ดังนั้นจึงได้ทำการลองศึกษา ชนิดของประจุ 2+ ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นเดิมในบัฟเฟอร์ก็คือ 10 mM ผลการทดลองพบว่า Mg^{2+} ให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ได้ดีที่สุดในขณะที่ Mn^{2+} จะทำให้ประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ทำงานได้เพียงประมาณครึ่งเดียว แต่หาก Co^{2+} จะทำให้เอ็นไซม์ทำงานได้น้อยมาก โดยเหลือเพียง 20% อย่างไรก็ตามหากปฏิกิริยาไม่มีการเติมไอออนของโลหะ 2+ เลย จะทำให้เอ็นไซม์ทำงานไม่ได้นั่นเอง



รูปที่ 4.20 โคแฟกเตอร์ต่อการทำงานของดีเอ็นเอไลแอสที่ผลิตมาจาก *Synechocystis* sp. PCC

6803

ผลการทดลองในการแสดงลักษณะการทำงานของดีเอ็นเอไลเอสจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 พบว่าเอ็นไซม์ทำงานได้ดีที่ 20 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.5 เอ็นไซม์สามารถใช้โคเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิดคือ ATP FAD และ NAD^+ โดยที่จะต้องมียโคแฟกเตอร์เป็นไอออนของโลหะ $2+$ พบว่าการใช้ Mg^{2+} จะทำให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพสูงที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การโคลนยีน DNA ligase จากจีโนมของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 เข้าสู่ระบบแสดงออก pET 22b(+) vector ประสบความสำเร็จโดยยืนยันจากการหาลำดับดีเอ็นเอเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ลักษณะของโปรตีนดีเอ็นเอไลเอสนี้มีการศึกษาถึงลักษณะของโปรตีนโดเมนต่างๆ พบว่าโปรตีนดีเอ็นเอไลเอสนี้ประกอบไปด้วย 5 โดเมน ซึ่งได้แก่ Adenylation domain, OB domain, DN domain, HHH domain และ BRCT domain ทั้ง 5 โดยเมื่อนำไปศึกษาที่ซีไปว่าเป็นเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเอสชนิดที่ใช้ NAD^+ จากการศึกษา Phylogenetic tree พบว่าเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเอสสามารถถูกจัดกลุ่มได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่มสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต ซึ่งผลการทดสอบนี้ก็สอดคล้องกับสิ่งที่ควรจะเป็น นั่นคือ ดีเอ็นเอไลเอสของสาหร่าย *Synechocystis* sp. ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในพวกดีเอ็นเอไลเอสที่มาจากไซยาโนแบคทีเรียโดยเฉพาะ นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการทำนายโครงสร้างโปรตีนของดีเอ็นเอไลเอสที่ทำการศึกษา พบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับดีเอ็นเอไลเอสของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีรหัส PDB เป็น 2OWO สาย A อย่างไรก็ตามค่าความเหมือนถูกแสดงโดย p-value พบว่าค่า p-value จะอยู่ที่ $1.25e-22$ เฉพาะโดเมนที่ 1 – 4 แต่ในโดเมนที่ 5 BRCT domain มีความคล้ายเพียง e-value $7.26e-06$ เท่านั้น นั่นอาจจะเป็นไปได้ว่า BRCT domain แสดงเอกลักษณ์บางอย่างเฉพาะสำหรับแบคทีเรีย ในส่วนของโครงสร้างผลึกสามมิติของดีเอ็นเอไลเอสในสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย ยังไม่มีการศึกษา ทำให้ค่าทางสถิติ p-value ของ BRCT domain มีค่าที่สูงอยู่

การผลิตโปรตีนนั้น สามารถเหนี่ยวนำได้หลากหลายวิธี อย่างไรก็ตามการเหนี่ยวนำที่สูงเกินไปจะทำให้เกิด protein folding ที่ไม่เหมาะสมได้ อันจะทำให้ protein ไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนออกมาในรูป inclusion body นั่นจะทำให้การติดตามกิจกรรมของเอ็นไซม์ ทำไม่ได้ โปรตีนจะไม่ทำงาน ดังนั้นระบบที่สำเร็จในการแสดงออกโปรตีนให้อยู่คงอยู่ในรูปของส่วนที่ละลายน้ำ (soluble fraction) คือการใช้ auto induction medium (AIM) คือการใส่น้ำตาลกลูโคสและแลคโทส เซลล์แบคทีเรียจะค่อยๆกินน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคสให้หมด จากนั้นเซลล์จะใช้แลคโทสแทนซึ่งก็เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมกับปริมาณเซลล์ที่จะบังคับให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน น้ำตาลแลคโทสที่นำเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์จะถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลอัลโลแลคโทสโดยเอนไซม์ β -galactosidase ผลก็คือ อัลโลแลคโทสจะไปเปิดยีนเพื่อให้เกิดการถอดรหัสเพื่อเริ่มสังเคราะห์เส้นโปรตีนดีเอ็นเอไลเกสต่อไป ทำให้เราสามารถผลิตโปรตีนดีเอ็นเอไลเกสในส่วนที่ละลายชั้นน้ำได้ต่อไป

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยปกติแล้วจะใช้สารรังสีในการติดตามกิจกรรม อย่างไรก็ตามการใช้สารรังสีอาจจะเป็นอันตรายสูง จึงได้ทดสอบหาวิธีต่างๆคืออาศัยการที่มี substrate ที่เป็นดีเอ็นเอ 2 เส้น จากนั้นจะวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อเวลา หรือวัดความเข้มของแถบสับสเตรตที่ลดลงต่อเวลาเพื่อเป็นการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไม่สามารถติดตามได้ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเนื่องจาก รูปแบบของแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ไม่แน่นอน และลำบากต่อการวัดความเข้มของแถบ จึงได้เปลี่ยนวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์ นั่นคือวัดอัตราการเกิดโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอเอง ปิดจากการทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว เพื่อเป็นการลดความไม่แน่นอน จึงได้มีการนับโคลนบนเพลทจำนวน 5 เพลท (5 ซ้ำ) เพื่อลดโอกาสความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นได้

หลังจากได้วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แล้ว พบว่าเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสจากสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใน pH = 7.5 โคเอนไซม์ที่ใช้ สามารถใช้ ATP-FAD และ NAD⁺ ได้ทั้งสามชนิด ไดวาเลนซ์ไอออน (โลหะให้ประจุ 2+) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยที่ Mg²⁺ ให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด หากไม่มีไอออนของโลหะดังกล่าวแล้ว เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สามารถทำการศึกษาเฉพาะในส่วนของ BRCT domain ให้ละเอียดลึกซึ้งขึ้นได้ว่า เฉพาะ BRCT มีวิวัฒนาการมาจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตอย่างไร มีความสำคัญ จำเพาะต่อกลุ่มสิ่งมีชีวิตอย่างไร
2. สามารถเลือกกลุ่มสิ่งมีชีวิตเพิ่มเติมเพื่อแสดงว่าตีเอ็นเอไอเอสยังสามารถจัดกลุ่มออกไปได้หลากหลายกลุ่มเช่นกลุ่ม อาเคียแบคทีเรีย กลุ่มพืช กลุ่มสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น
3. สามารถปรับระบบการแสดงผลออกให้มีแต่ส่วนที่เป็นชั้นการละลายน้ำ (soluble fraction) จะได้ไม่มีส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) เพื่อการเลี้ยงเซลล์จำนวนเท่าเดิมแต่ได้ปริมาณของเอ็นไซม์ที่ละลายน้ำได้ที่มากขึ้น
4. ปรับค่าอุณหภูมิที่ละเอียดขึ้นเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการทำงานของเอ็นไซม์
5. ปรับค่า pH ที่ละเอียดขึ้นเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการทำงานของเอ็นไซม์
6. สามารถทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยโดเมนซีไอออนชนิดอื่นๆ



บรรณานุกรม

1. Durany, O., G. Caminal, et al. (2004). "Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*." Process Biochemistry 39(11): 1677-1684.
2. Larentis, A. L., A. P. C. Argondizzo, et al. (2011). "Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage." Protein Expression and Purification 78(1): 38-47.
3. Makhongela, H. S., A. E. Glowacka, et al. (2007). "A novel thermostable nitrilase superfamily amidase from *Geobacillus pallidus* showing acyl transfer activity." Appl Microbiol Biotechnol 75(4): 801-11.
4. Olaofe, O. A., S. G. Burton, et al. (2010). "Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*." Biochemical Engineering Journal 52(1): 19-24.
5. Velez, A. M., A. C. L. Horta, et al. (2013). "Enhanced production of recombinant thermo-stable lipase in *Escherichia coli* at high induction temperature." Protein Expression and Purification 90(2): 96-103.
6. N.A. Valdez-Cruz, L. Caspeta, N.O. Pérez, et al. (2010). "Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda p_L and/or p_R promoters." Microb. Cell Fact 9: 18
7. W.H. Schwarz, S. Schimming, et al. (1987). "High level expression of *Clostridium thermocellum* cellulose genes in *Escherichia coli*." Appl. Microbiol. Biotechnol 27: 50-56
8. W. Jechlinger, M.P. Sztostak, et al. (1999). "Altered temperature induction sensitivity of the lambda p_{R} /cl857 system for controlled gene expression in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol. Lett 173: 347-352

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Jifang Sheng a, Haiying Yu, et al. (2007). " Cloning and expression of the human augmenter of liver regeneration at low temperature in Escherichia coli" J. Biochem. Biophys. Methods 70: 465-470
10. Yodsang, P.a, Raksajit, W., Brandt, A.-M., Salminen, T.A., Mäenpää, P., Incharoensakdi, A. (2011). "Recombinant polyamine-binding protein of *Synechocystis* sp. PCC 6803 specifically binds to and is induced by polyamines." Biochemistry (Moscow) 76(6): 713-719
11. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
12. Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
13. Ma J, Wang S, Zhao F, Xu J. Protein threading using context-specific alignment potential. Bioinformatics (Proceedings of ISMB 2013). 2013 Jul 1;29(13):i257-65. doi: 10.1093/bioinformatics/btt210.
14. Jianzhu Ma, Jian Peng, Sheng Wang and Jinbo Xu. A conditional neural fields model for protein threading. Bioinformatics (Proceedings of ISMB 2012), 2012.
15. Jian Peng and Jinbo Xu. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. PROTEINS, 2011.
16. Jian Peng and Jinbo Xu. A multiple-template approach to protein threading. PROTEINS, 2011.
17. Jian Peng and Jinbo Xu. Low-homology protein threading. Bioinformatics (Proceedings of ISMB 2010), 2010.
18. Jian Peng and Jinbo Xu. Boosting protein threading accuracy. In the Proceedings of the 13th International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB), Lecture Notes in Computer Science. Vol. 5541, pp. 31-45, 2009. Springer.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

	วันที่	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ
ไตรมาสที่ 1 (ต.ค. 57 - ธ.ค. 57)	-	-	-
ไตรมาสที่ 2 (ม.ค. 58 - มี.ค. 58)	-	-	-
ไตรมาสที่ 3 (เม.ย. 58 - มิ.ย. 58)	30 มิ.ย. 58	-	116,983.10
ไตรมาสที่ 4 (ก.ค. 58 - ก.ย. 58)	20 ส.ค. 58	-	36,743.80
	20 ส.ค. 58	-	10,860.50
	17 ก.ย. 58	3,000	-
	17 ก.ย. 58	-	32,412.60
	รวม	3,000	197,000

รวมรายจ่าย

200,000.00



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ-สกุล (ไทย) อาจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
(อังกฤษ) Cherdsak Maneeruttanarungroj, Ph.D.
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4
- การทำงาน
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
สถานที่ทำงาน สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10520
โทรศัพท์ 02-329-8400-11 ต่อ 6243 โทรสาร 02-329-8412
โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149 email: kmcherds@kmitl.ac.th
- ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ประสบการณ์งานวิจัย
 - ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเชิงโมเลกุล
 - ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน
 - ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในจุลชีพสีเขียว

ผลงานวิจัย

- Maneeruttanarungroj, C., Incharoensakdi, A. Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551 (2016) World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32 (6), art. no. 99, .
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energ37:15105-15116. (Impact factor 2010 = 4.053)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **Maneeruttanarungroj, C.,** Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ* 35:13193-13199. (Impact factor 2010 = 4.053)
4. Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.,** Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2603–2610. (Impact factor 2010 = 4.672)
5. Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.,** Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. *ACS ChemBiol* 4:29–40. (Impact factor 2010 = 5.698)
6. Supungul, P., Tang, S., **Maneeruttanarungroj, C.,** Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 32, 61–70. (Impact factor 2010 = 3.293)
7. **Maneeruttanarungroj, C.,** Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Anim Genet* 37, 363–368. (Impact factor 2010 = 2.203)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รางวัลที่เคยได้รับ

1. 25 November 2012
Best oral presentation award from Young Scientist Program (13th FAOMBM congress). Sirindhorn Science Home, NSTDA, Thailand
2. 20 April 2012
Best oral presentation award from The Science Forum 2012 (Applies Science and Technology session). Mahamakut Building, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand: April 19 – 20, 2012.
3. 03 April 2011
Outstanding presentation award from RGJ-Ph.D. Congress XII, Jomtein Palm Beach Resort Pattaya, Chonburi, Thailand.
4. 17 June 2010
Recognized as best graduate student, Chulalongkorn University, Thailand
5. 21 August 2005
The excellent graduate student award, the Prof. Dr. Tab Nilanidhi Foundation (the award was presented to the student who received the highest GPA above 3.70 in each department).
6. 13 July 2005
Outstanding Thesis Award, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University