รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรีคอมบิแนนท์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อใช้ในการเรียนการสอน

Recombinant Taq DNA polymerase production for laboratory teaching

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรีคอมบิแนนท์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อใช้ในการเรียนการสอน
Recombinant Taq DNA polymerase production for laboratory teaching

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b00268511
RC0013 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การผลิตรีคอมบิแนนท์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อใช้ในการเรียนการสอน
แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ถึง
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
นาย ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และ มีสมบัติทนความร้อนได้สูงถึง 98 องศาเซลเซียส จึงเหมาะกับการนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการผลิตเอนไซม์ในระดับการเรียนการสอนเพราะสามารถผลิตได้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ดังนั้นในโครงงานนี้จึงทำการผลิตเอนไซม์นี้ในระบบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pOpenTaq กระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์โดยใช้ Isopropyl- β-D-thiogalactoside (IPTG) เป็นเวลาหนึ่งคืน ทำให้เซลล์แตกด้วยการแช่แข็งและละลาย ควบคู่กับเอนไซม์ไลโซไซม์ จากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการด้วยความร้อน และ ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถผลิต และทำให้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสบริสุทธิ์ได้ และเมื่อตรวจหาแอคติวิตีด้วยเทคนิค PCR พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีสูงกว่า 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ซึ่งสูงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในงานวิจัย หรือ เชิงพาณิชย์ได้ วิธีการผลิตและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่โครงการนี้เลือกใช้ เป็นวิธีที่ง่าย และ ใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับปริญญาบัณฑิต หรือ บัณฑิตศึกษา เพื่อประกอบการเรียนรู้วิธีการผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์

คำสำคัญ : แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส การผลิตเอนไซม์ การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Recombinant *Taq* DNA polymerase production for laboratory teaching
Researcher: Dr. Tipachai Vatanavicharn
Faculty: Science **Department:** Biology

ABSTRACT

Taq DNA polymerase is an enzyme used to amplify DNA and has a heat-resistant property up to 98 degrees Celsius, so it is suitable for use as a model enzyme in the production of enzymes for teaching and learning that usually be done at room temperature. In this project, the enzyme is produced using *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) containing plasmid pOpenTaq. The production was induced by Isopropyl- β-D-thiogalactoside (IPTG) for one night. Bacterial cells were broken down by freezing and thawing coupled with lysozyme. Impurities were precipitated by heat and enzyme was purified with ammonium sulfate precipitation. Based on SDS-PAGE analysis, *Taq* DNA polymerase was produced and purified. Enzyme activity was determined using PCR technique and showed higher than 40 units per microliter that high enough to be used in research or commercial. The enzyme production and purification used in this project were appropriate for teaching in undergraduate or graduate class to learn how to produce protein or enzymes.

Keywords : *Taq* DNA polymerase, enzyme production, protein purification

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

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

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 5

3.1 การทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pOpenTaq เข้าสู่ Escherichia coli สายพันธุ์ BL21(DE3) 5

3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 5

3.3 การสกัดโปรตีนและการทำให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase บริสุทธิ์ 5

3.3 การตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 6

3.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยเทคนิค PCR 6

บทที่ 4 ผลการวิจัย 7

4.1 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase 7

4.2 แอคติวิตีของเอนไซม์ Taq DNA polymerase 7

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 9

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 9

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง 10

ประวัตินักวิจัย 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 แสดงผลการแยกขนาดโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 7
4.2 แสดงผลการแยกขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 2% agarose gel 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเออย่างจำเพาะที่ได้มีการนำไปใช้ในหลายแขนงงานเช่น ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัยกับดีเอ็นเอที่พบในที่เกิดเหตุ ทางด้านการแพทย์เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของเด็กก่อนหรือหลังคลอด รวมถึงการนำไปใช้ในการตรวจโรคเช่น การตรวจหาไวรัสในคนหรือสัตว์เป็นต้น ทางการเกษตรเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์พืชหรือพืชจีเอ็มโอ และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ เช่นการโคลนนิ่ง การตรวจสอบการแสดงออกของยีนส์ และการตรวจสอบการกลายพันธุ์ เป็นต้น

พีซีอาร์มีขั้นตอนหลักอยู่สามขั้นตอนคือ การแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) การจับคู่สมของสายดีเอ็นเอ (annealing) และการสร้างสายดีเอ็นเอ (extension) โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสจะทำงานในขั้นของการสร้างสายดีเอ็นเอด้วยการนำเอานิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบมาต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์เพื่อให้ได้สายดีเอ็นเอสายใหม่

ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสที่นำมาใช้ในเทคนิคพีซีอาร์นี้จะต้องสามารถทนอุณหภูมิสูงได้คือ 70 ถึง 90 องศาเซลเซียสเนื่องจากอุณหภูมิในขั้นตอนของการแยกสายดีเอ็นเออยู่ที่ประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตทั่วไปจะเสียสภาพอย่างถาวรคือไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกที่อุณหภูมิสูง แต่ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสจาก Thermus aquaticus (Taq DNA polymerase หรือ แทคดีเอ็นเอพอลีเมอเรส) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบริเวณน้ำพุร้อนสามารถทนต่อความร้อนได้สูงถึง 97 องศาเซลเซียสโดยที่ไม่เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อลดอุณหภูมิลงมาที่ 72 องศาเซลเซียสที่เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

ในการผลิตแทคดีเอ็นเอพอลีเมอเรสในช่วงแรกได้ใช้วิธีการแยกบริสุทธิ์จาก Thermus aquaticus โดยตรงซึ่งวิธีนี้จะได้ปริมาณเอนไซม์ที่น้อย และมีความซับซ้อนในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ดังนั้นในปัจจุบันได้มีวิธีผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการดัดแปลงเพื่อช่วยให้ขั้นตอนของการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ง่ายขึ้น และใช้แบคทีเรีย E. coli ที่เจริญเติบโตได้ง่ายและผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่มากกกว่า Thermus aquaticus ในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนท์แทคดีเอ็นเอพอลีเมอ-เรส

รีคอมบิแนนท์แทคดีเอ็นเอพอลีเมอเรสที่ใช้ในหน่วยวิจัยและบริษัทต่างๆในประเทศไทยที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ส่วนใหญ่สั่งซื้อมาจากจากต่างประเทศในรูปของชุดคิทพร้อมใช้ (Pre-mix) ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง (1 reaction ประมาณ 40 บาท) นอกจากนี้การเรียนการสอนที่ในระดับอุดมศึกษาและบัณฑิตศึกษาในหลายสถาบันของประเทศไทยได้มีการนำเอาเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในวิชาปฏิบัติการโดยการสาธิตให้นักศึกษาดูเป็นตัวอย่างเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้มีราคาแพงเกินกว่าที่จะให้นักศึกษาทุกคนได้ลองทำ

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังผลิตเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อนำมาใช้ในการเรียนการสอนในวิชาปฏิบัติการ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ผลิตรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อใช้ในการเรียนการสอน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อใช้ในการเรียนการสอน

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ทำการสั่งซื้อดีเอ็นเอต้นแบบของยีนดีเอ็นเอพอลีเมอเรสจากแบคทีเรีย Thermus aquaticus เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1.4.2 การทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pOpenTaq เข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

1.4.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

1.4.4 การสกัดโปรตีนและการทำให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase บริสุทธิ์

1.4.5 การตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1.4.6 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยเทคนิค PCR

1.4.7 วิเคราะห์ผลและเขียนรายงานการทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาปฏิบัติการชีวเคมีได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีบทบาทสำคัญในการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ที่เป็นเบสคู่สมของสายต้นแบบที่ปลาย 3' ของสายใหม่ ในปัจจุบันได้มีการนำดีเอ็นเอพอลิเมอเรสไปใช้ในงานทางด้านอณูชีววิทยา ส่วนใหญ่แล้วดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่นิยมนำมาใช้คือ Taq DNA polymerase ที่ถูกแยกจาก Thermus aquaticus คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนร้อน (thermophilic bacteria) มีคุณสมบัติพิเศษในการทนทานต่ออุณหภูมิสูง มีขนาดโมเลกุล 66-97 กิโลดาลตัน (Chien et al., 1976) เนื่องจากความทนทานต่อความร้อนของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) (Innis et al., 1988) ซึ่งมีขั้นตอนการให้ความร้อนสูงเพื่อทำให้สายดีเอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) จากนั้นจะมีการลดอุณหภูมิลงที่ 75-80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ Taq DNA polymerase ในการเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ เทคนิคดังกล่าวมีคุณประโยชน์อย่างยิ่งในงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งการนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆทางพันธุกรรมด้วย

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมถูกนำมาใช้ในการผลิตดีเอ็นเอลูกผสมของ Taq DNA polymerase (recombinant Taq DNA polymerase) โดยระบบของแบคทีเรีย Escherichia coli ซึ่งมีการใช้ IPTG ในการเหนี่ยวนำในส่วนของ lac promoter ให้มีการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมากและนำมาแยกให้บริสุทธิ์ เพื่อวิเคราะห์ความเสถียรของเอนไซม์ (Plutheo, 1993; Roayaei and Galehdari., 2008) นอกจากนี้ Thermus thermophilus สายพันธุ์ HB27 เป็นแบคทีเรียทนร้อนอีกชนิดหนึ่งซึ่งได้มีการศึกษาลำดับเบสของจีโนมและพบยีนชนิดใหม่ที่มีศักยภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Henne et al., 2004) ได้มีการศึกษา Taq DNA polymerase จาก T. thermophilus (Ruttimann et al., 1985) ซึ่งแสดงออกในระบบของ E. coli โดยการใช้พลาสมิดชนิดใหม่ pMKE ที่มีการปรับปรุง (modification) ในส่วนของ narp promotor (Nitrate reductase) เพิ่มพัฒนาการการผลิตให้เอนไซม์มีการแสดงออกในปริมาณมาก ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้มีการติด histidine tag เพื่อช่วยในการติดตามการแสดงออกและการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Overexpression) (Moreno et al., 2004)

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย E. coli เป็นวิธีที่ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ E. coli เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณมาก เช่น การพัฒนาระบบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบ high-cell density ซึ่งเป็นการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน shake-flask โดยควบคุมความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย อุณหภูมิและตัวเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์ (Brandis and Johnson, 2009) นอกจากนั้นการพัฒนาเทคนิคการทำ Taq DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ เป็นหนึ่งวิธีที่ช่วยรักษาคุณภาพของเอนไซม์ให้มี high specific activityและมีความบริสุทธิ์สูง affinity chromatography เป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (Bailon et al., 2000) โปรตีนที่มีการติด Tag ต่างๆจะทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ ตัวอย่างเช่น Histidine tag, GST tag, c-myc tag เป็นต้น การติด Histidine tag ที่ปลาย N หรือ ปลาย C ของโปรตีนเป็นที่นิยมใช้กันมากในแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ Nikel-NTA สำหรับการผลิต Taq

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA polymerase ให้บริสุทธิ์สูง ได้มีการนำ nucleotide-mimetic affinity chromatography มาใช้ในการแยกโดยอาศัยหลักการการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase และโครงสร้างของดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการแยกด้วยวิธีนี้มีความบริสุทธิ์สูงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และมี activity อยู่ที่ประมาณ 61,500 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Melissis et al., 2007) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะผลิต recombinant Taq DNA polymerase จาก Thermus aquaticus โดยใช้ระบบของ E. coli โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณมากและแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity chromatography หลังจากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมการเติมนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ เช่น ความทนทานต่ออุณหภูมิ เกลือ และอุณหภูมิในการเก็บรักษา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pOpenTaq เข้าสู่ Escherichia coli สายพันธุ์ BL21(DE3)

นำพลาสมิด pOenTaq ความเข้มข้น 100 ng/uL ปริมาตร 1 µL ใส่ลงในคอมพิเทนท์เซลล์ E. coli BL21(DE3) ปริมาตร 50 µL ผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 min นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 sec แล้วเติม Luria bertani broth (LB broth) ปริมาตร 1 ml ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 hr ปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาตร 100 µL ลงในอาหาร LB agar ที่มี ampicillin 100 µg/mL แล้วเกลี่ยให้ทั่วทั้งเพลท นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 hr เก็บเพลทที่ 4°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

3.2 การผลิตโปรตีน

เตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นในเพลทจากขั้นตอนที่ 3.1 จำนวน 1 โคโลนี ลงใน LB broth ที่มี ampicillin 100 µg/mL (LB-Amp) ปริมาตร 5 ml แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 16 hr ปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 1 ml ลงใน LB-Ampปริมาตร 50 ml โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพูขนาด 250 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 3 hr เหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนโดยการเติม Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) 1 M ปริมาตร 50 µL แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 16 hr ปั่นเก็บเซลล์ด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 min ทิ้งส่วนนำใส นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดโปรตีนในขั้นต่อไป

3.3 การสกัดโปรตีนและการทำให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase บริสุทธิ์

นำเซลล์ที่ปั่นเก็บจากขั้นตอนที่ 3.2 มาทำให้แตกโดยผสมกับ lysis buffer (Tris-HCl pH8 10 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, Triton-X-100 1%) ปริมาตร 5 ml เขย่าให้เซลล์กระจายตัว แล้วเติม 1000x lysozyme (lysozyme 20 mg/mL ละลายใน lysis buffer) 50 µL เขย่าแบบพลิกไปมาแล้วนำไปแช่แข็งที่ -20°C เป็นเวลา 16 hr นำสารละลายเซลล์ที่แช่แข็งมาละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 min เติมสารละลาย $CaCl_2$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mM และ สารละลาย DNase (DNase 1mg/ml, Tris-HCl pH7.5 10 mM, $CaCl_2$ 1 mM, glycerol 50%) ปริมาตร 10 µL นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 hr แบ่งสารละลายที่ได้มา 80 µL เพื่อนำไปวิเคราะห์ (fraction 01) ส่วนที่เหลือนำไปบ่มที่ 75°C เป็นเวลา 1 hr เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ DNase และ ตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการ ปั่นตกตะกอนด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 min เก็บส่วนใสโดยแบ่งส่วนใสมา 80 µL เพื่อนำไปวิเคราะห์ (fraction 02) นำส่วนใสที่ได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 30 min แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ 7,000 rpm เป็นเวลา 15 min เก็บส่วนใสโดยแบ่งส่วนใสมา 80 µL เพื่อนำไปวิเคราะห์ (fraction 03) นำส่วนใสมาเติม NH_4SO_4 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 g/mL เพื่อตกตะกอนเอนไซม์ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเป็นเวลา 10 min นำไปปั่นด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 min ทิ้งส่วนใสโดยแบ่งส่วนใสมา 80 µL เพื่อนำไปวิเคราะห์ (fraction 04) ส่วนตะกอนโปรตีนที่ได้นำไปละลายด้วย Taq storage buffer (Tris-HCl pH8.6 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, Glycerol 10%) ปริมาตร 200 µL แบ่งมา 10 µL เพื่อนำไปวิเคราะห์ (fraction 05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่เก็บไว้แต่ละ fraction มาผสมกับ 5x sample loading dye (Bio-Rad) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1x แล้วนำไปโหลดลง 8% SDS-PAGE (Bio-Rad) โดยโหลด fraction ละ 10 µL แยกขนาดโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้า 25 mA ต่อหนึ่งเจล เป็นเวลา 1 hr จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย staining solution (Bio-Rad) และกำจัดสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution (Bio-Rad) บันทึกภาพด้วยเครื่องสแกน

3.5 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยเทคนิค PCR

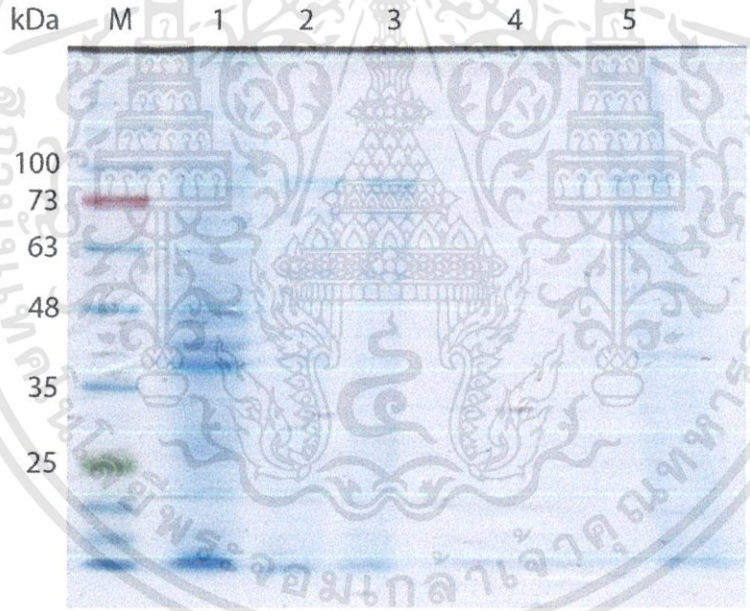
ทำการหาแอคติวิตีอย่างง่ายโดยใช้วิธีเทียบกับ Taq DNA polymerase ที่รู้แอคติวิตีแล้ว (RBC Taq DNA polymerase 5 unit/µL) โดยเจือจางเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่สกัดได้ 2, 4, และ 8 เท่า นำเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว รวมถึงเอนไซม์ที่รู้แอคติวิตีไปทำ PCR โดยในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 25 µL มีส่วนประกอบดังนี้ 10x buffer (RBC) 2.5 µL, 10 mM dNTP 0.5 µL, Forward primer 0.5 µL, Reverse primer 0.5 µL, DNA ต้นแบบ 1 µL และ เอนไซม์ที่เจือจางแล้ว หรือ RBC Taq DNA polymerase (5 unit/µL) 0.125 µL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 µL โดยมีหลอดที่ไม่ใส่ DNA ต้นแบบเป็นหลอดควบคุม ปฏิกิริยาของ PCR เกิดขึ้นในสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 Denaturation 94°C 3 min ขั้นที่ 2 Denaturation 94°C 30 sec ขั้นที่ 3 annealing 55°C 30 sec ขั้นที่ 4 extension 72°C 1 min ทำซ้ำขั้นที่ 2 ถึงขั้นที่ 4 ทั้งหมด 29 รอบ ขั้นที่ 5 final extension 72°C 7 min นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 2% agarose gel ที่มี SYBR safe (Invitrogen) เป็นสารย้อม DNA นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เก็บมาจากขั้นตอนต่างๆของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดนการนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ขนาด 90 kDa ใน fraction ที่ 1, 2, 3, และ 5 (ภาพที่ 4.1) ซึ่งเป็น fraction ที่อยู่ในขั้นตอนที่จะทำให้เอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยไม่พบใน fraction ที่ 4 ซึ่งเป็นส่วนของน้ำใสที่ได้ภายหลังจากการตกตะกอนเอนไซม์นี้ไปแล้วด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) นอกจากนี้ยังพบว่าแถบโปรตีนขนาดอื่นๆที่ไม่ใช่เอนไซม์ Taq DNA polymerase (ที่มีขนาดมากกว่า หรือ น้อยกว่า 90kDa) มีจำนวนน้อยลงเรื่อยๆไล่จาก fraction ที่ 1 ไป fraction ที่ 5 จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าระบบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนนี้สามารถผลิต Taq DNA polymerase ได้ และ การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนทำให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ผลิตได้นั้นมีความบริสุทธิ์มากขึ้น



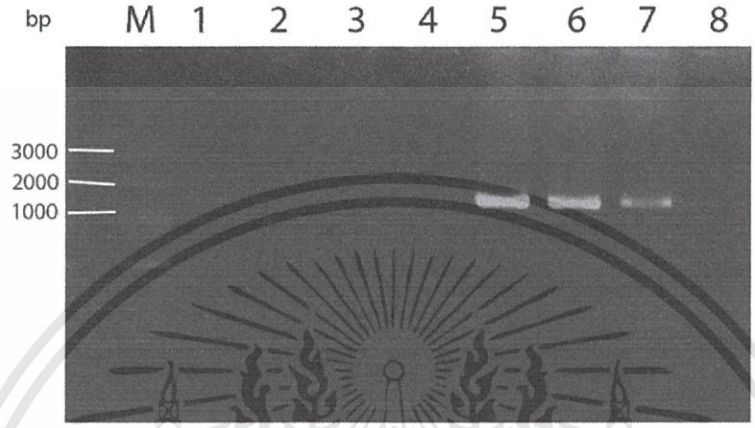
ภาพที่ 4.1 แสดงผลการแยกขนาดโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 8% polyacrylamide gel เลน M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Blue eye prestain protein ladder) เลน 1 ถึง 5 คือ fraction ที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ

4.2 แอคติวิตีของเอนไซม์ Taq DNA polymerase

หลังจากการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีทำ PCR เปรียบเทียบกับ Taq DNA polymerase ที่ทราบแอคติวิตีที่แน่นอนแล้ว เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel ให้ผลดังรูปที่ 2 พบแถบ DNA ที่ขนาด 1100 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ทางนักวิจัยได้ออกแบบให้ primer สามารถเพิ่มปริมาณได้ จาก PCR ที่ใช้เอนไซม์เจือจาง 2, 4, และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8 เท่า และ เอนไซม์ที่รู้แอคติวิตีแล้ว โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดดังกล่าวในหลอดควบคุม (ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า นอกจากนั้น ความเข้มของแถบ DNA ที่ได้ลดลงตามการเจือจางของเอนไซม์ แต่ก็ยังเข้มกว่าแถบ DNA ที่ได้จากเอนไซม์ที่ทราบแอคติวิตี จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้มีแอคติวิตีสูงกว่า 40 unit/μL (เทียบกับ Taq DNA polymerase 5unit/μL)



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการแยกขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 2% agarose gel เลน M คือ DNA มาตรฐาน (100bp DNA ladder) เลน 1 ถึง 4 คือ PCR ที่ทำโดยไม่ใส่ DNA ต้นแบบแต่ใส่เอนไซม์เจือจาง 2, 4, 8, เท่า และ เอนไซม์ที่รู้แอคติวิตี ตามลำดับ เลน 5 ถึง 8 คือ PCR ที่ทำโดยใช้เอนไซม์เจือจาง 2, 4, 8, เท่า และ เอนไซม์ที่รู้แอคติวิตี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้ผลิตเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้ระบบของ E. coli สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pOpenTaq จากผลที่ได้พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่มีความบริสุทธิ์ โดยมีแอคติวิตีสูงกว่า 40 unit/μL วิธีการผลิตและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่โครงการนี้ใช้เป็นวิธีที่ง่าย และ ใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับปริญญาบัณฑิต หรือ บัณฑิตศึกษา เพื่อประกอบการเรียนรู้วิธีการผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือ ในงานวิจัยต่างๆ

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 เอนไซม์ Taq DNA polymerase 40 unit/μL ปริมาตร 200 μL

6.2 วิธีการผลิต และ การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase เพื่อใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง

Bailon, P., Ehrlich, G. K., Fung, W.-J., Berthold, W. (Eds.), Affinity Chromatography: Methods and Protocols, Humana Press, Clifton 2000.

Brandis, J. W. and Johnson, K.A. High-cell density shake-flask expression and rapid purification of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I using a new chemically and temperature inducible expression plasmid in Escherichia coli. Protein Expression and Purification 2009; 63: 120-127.

Chien A., Edgar BD. and Trela M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme Thermophile Thermus aquaticus. Journal of Bacteriology 1976. 127: 1550-1557.

Henne, A., H. Bruggemann, C. Raasch, A. Wiezer, T. Hartsch, H. Liesegang, A. Johann, T. Lienard, O. Gohl, R. Martinez-Arias, C. Jacobi, V. Starkuviene, S. Schlenczeck, S. Dencker, R. Huber, H. P. Klenk, W. Kramer, R. Merkl, G. Gottschalk, and H. J. Fritz. The genome sequence of the extreme thermophile Thermus thermophilus. Nat. Biotechnol 2004. 22: 547–553.

Innis M. A., Myabo K. B., Gelfand D.H., Brow M.A. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA, Procceding of the Natural Acaddemy of Sciences of the USA 1988; 85: 9436-9440.

Moreno R., Haro., Castellanos A. and Berenguer. High-level overproduction of His-tagged Tth DNA Polymerase in Thermus thermophilus. Appled and Environmental Microbiology 2005; 71: 591-593.

Melissis S, Labrou N. E., Clonis Y. D. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. Biotechnology Journal. 2007; 2: 121-32

Plutheo FG. Rapid purification of high activity Taq DNA polymerase. Nucleic Acids Research 1993; 21: 4850-4851.

Roayaei M, Galehdari H. Cloning and Expression of Thermus aquaticus DNA polymerase in Escherichia coli. Jundi Shapur Journal of Microbiology. 2008; 1: 1–5.

Ruttimann C, Cotoras M, Zaldivar J, Vicuna R. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium Thermus thermophilus HB-8. European Journal of Biochemistry 1985; 149: 41-46.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	**ชีวเคมี**	**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**	**2546**
วท.ด.	**ชีวเคมี**	**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**	**2552**

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) **การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ**

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2547	**โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก**	**สกว.**
2557	**ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่**	**สกว.**

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

1. Vatanavicharn T., Prapavorarat A., Jaree P., Somboonwiwat K., Tassanakajon A. (2014). PmVRP15, a Novel Viral Responsive Protein from the Black Tiger Shrimp, Penaeus monodon, Promoted White Spot Syndrome Virus Replication. PLoS ONE. 9(3): e91930 [Impact Factor: 3.73]
2. Vatanavicharn T., Pongsomboon S., Tassanakajon A. (2012). Two plasmolipins from the black tiger shrimp, Penaeus monodon and their response to virus pathogens. Dev Comp Immunol. Oct;38(2):389-94 [Impact Factor: 3.238]
3. Prapavorarat, A., Vatanavicharn, T., Soderhall, K., Tassanakajon, A. (2010). A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, Penaeus monodon. Journal of Biological Chemistry. 285: 21467-21477 [Impact Factor: 5.328]
4. Vatanavicharn, T., Supungul, P., Puanglarp, N., Yingvilasprasert, W., Tassanakajon, A. (2009). Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from Penaeus monodon. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology. 153: 244-252. [Impact Factor: 1.607]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้