การโคลนและการแสดงออกยีนแลกเคสจาก *Agrocybe* sp. CU43 ใน *Escherichia coli* เพื่อการย่อยสลายฟลูออรีน

นางสาวเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 1 7 2 2 9 5 1 2 3

CLONING AND EXPRESSION OF LACCASE GENE FROM *Agrocybe* sp. CU43 IN *Escherichia coli* FOR FLUORENE DEGRADATION

Miss Temsiri Tantibunthaweewat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกยีนแลกเคสจาก *Agrocybe* sp. CU43 ใน *Escherichia coli* เพื่อการย่อยสลายฟลูออรีน
โดย	นางสาวเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ : การโคลนและการแสดงออกยีนแลกเคสจาก *Agrocybe* sp. CU43 ใน *Escherichia coli* เพื่อการย่อยสลายฟลูออรีน. (CLONING AND EXPRESSION OF LACCASE GENE FROM *Agrocybe* sp. CU43 IN *Escherichia coli* FOR FLUORENE DEGRADATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, 136 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนแลกเคสจากรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* โดยเลี้ยงราในภาวะที่มีการเติมฟลูออรีน 500 ppm จากนั้นสกัด total RNA จากเส้นใยรา ในวันที่ 21 ซึ่งมีแอกติวิตีของแลกเคสเท่ากับ 111.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วสร้าง cDNA สายแรก และนำมาใช้เพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lacC-R5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 1,584 bp ได้รับการโคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM®-T easy vector และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pTTLC จากนั้นใช้ pTTLC เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสที่มีและไม่มี signal sequence จากรา แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET2126_4 เพื่อให้มีการแสดงออกใน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS โดยแลกเคสอยู่ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter และปลาย 5' เชื่อมต่อหลัง *pelB* coding sequence และปลาย 3' เชื่อมต่อเข้ากับ His Tag coding sequence เมื่อทดสอบบนอาหารแข็ง LB ที่มีกัวเอคอลเป็นสับสเตรตพบว่าแลกเคสไม่สามารถออกซิไดซ์สับสเตรตได้ เมื่อเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ในอาหารเหลว LB ที่ใส่ IPTG ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคส เมื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกด้วย SDS PAGE พบว่าทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence จากราแทรกอยู่มีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 55 KDa เกิดขึ้น และแสดงออกในรูปแบบ insoluble เนื่องจากสามารถสกัดได้ภายใต้ภาวะ denature เท่านั้น ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสมากที่สุดคือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น IPTG 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography แล้วนำไปผ่านกระบวนการ refolding พบว่าเอนไซม์มีปริมาณเท่ากับ 228.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบแอกติวิตี พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถออกซิไดส์ ABTS และไม่สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553

5172295123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : *Agrocybe* sp. CU43 / Laccase / *E. coli* / Fluorene

TEMSIRI TANTIBUNTHAWEEWAT : CLONING AND EXPRESSION OF LACCASE GENE FROM *Agrocybe* sp. CU43 IN *Escherichia coli* FOR FLUORENE DEGRADATION. ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 136 pp.

Laccase gene of *Agrocybe* sp. CU43 was cloned and expressed in *E. coli*. *Agrocybe* sp.CU43 was cultured in N-limit media containing 500 ppm fluorene and total RNA was extracted from dry mycelia harvested at day 21 which gave 111.11 U/ml of laccase activity. First strand cDNA was synthesized and used as template for cDNA of laccase gene amplification by PCR using lacC-F1 และ lacC-R5 primers. PCR product obtained was 1,584 bp and was cloned into pGEM®-T easy vector. The recombinanant plasmid was designated as pTTLC. pTTLC was used as a template to amplify laccase gene with and without fungal signal sequence. The PCR products were cloned into pET2126_4 vector for expressing in *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS. Laccase gene was expressed under the control of T7 promoter, the 5' end was adjacent to *pelB* coding sequence, and the 3' end was fused with six His Tag coding sequences. Transformants cultured on LB agar supplemented with guaiacol did not show any laccase activity. Selected transformants without signal sequence of fungi were cultured in LB liquid medium and induced by IPTG. SDS PAGE of insoluble protein extracted by denature condition revealed additional protein band at approximately 55 KDa. The optimum conditions for recombinant laccase expression are cultivation at 37° C with 400 µM IPTG induction for 3 hours. Affinity column chromatography followed by stepwise refolding method generated 228.51 µg/ml of protein with no laccase activity and was not able to degrade fluorene.

Department : Microbiology Student's Signature Temsiri Tantibunthaweewat

Field of Study : Industrail Microbiology Advisor's Signature Panan Rerngsamran

Academic Year : 2010

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือจาก อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยให้ความรู้ ความเอาใจใส่ ให้คำแนะนำในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีตลอดมา รวมถึงช่วยตรวจทานแก้ไขรูปเล่มให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และ ดร. ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง ที่ให้ความสะดวกในการอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำการวิจัยได้โดยสะดวกเป็นอย่างดีตลอดมา

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารัก และ สมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกท่านที่คอยเป็นห่วง ดูแลเอาใจใส่ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยมีช่วงเวลาที่ดีที่ประทับใจตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 14 (1/2554) ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นที่ปรึกษา ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 5

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 22

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 22

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ..... 25

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 29

3.3.1 รา..... 29

3.3.2 แบคทีเรีย..... 29

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์..... 29

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 31

3.5.1 การเก็บรักษารา..... 31

3.5.1.1 การเก็บรักษารา ในระยะสั้น..... 31

3.5.1.2 การเก็บรักษาในระยะยาว..... 32

3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย 32

3.5.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น..... 32

3.5.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว..... 32

3.6 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ..... 32

3.6.1 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์แลกเคส..... 33

3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอจากรา *Agrocybe* sp. CU43..... 33

บทที่ หน้า

3.8 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ..... 34

3.9 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส... 35

3.10 การสังเคราะห์สาย cDNA สายแรกด้วยชุดสำเร็จ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)..... 36

3.11 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA..... 36

3.11.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลกเคสจาก cDNA..... 36

3.11.2 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 37

3.11.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 37

3.12 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน..... 38

3.12.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน pGEM®-T easy vector (Promega, USA)..... 38

3.12.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock..... 38

3.12.2.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีรูบิเดียมคลอไรด์..... 38

3.12.2.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock..... 39

3.12.3 การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์..... 40

3.12.4 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis..... 41

3.12.5 การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแทรกอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 42

3.12.6 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่ด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germeny) เพื่อใช้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด..... 42

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.13 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B(DE3)pLysS…….. 43
3.13.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลกเคสเพื่อการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก…… 43
3.13.2 การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกโดยแทนที่ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-26b(+) กับบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+)……... 44
3.13.2.1 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pET-26b(+) เข้าสู่ *E. coli* DH5α…… 44
3.13.2.2 การวัดความเข้มข้นของเวกเตอร์ (ดีเอ็นเอ) ด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA)…. 44
3.13.2.3 การตัดชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+)…… 45
3.13.2.4 การตัดชิ้นส่วนบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-21c(+)…… 46
3.13.2.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germeny)…….. 46
3.13.2.6 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-26b(+) กับบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+)…… 47
3.13.2.7 การเตรียมเวกเตอร์ pET2126_4 เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับยีนแลกเคส…….. 48
3.13.3 การเตรียมชิ้นยีนแลกเคสเพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET2126_4…… 49
3.13.3.1 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบ…….. 49

บทที่ หน้า

3.13.3.2 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)…….. 50
3.13.3.3 การตัดชิ้นยีนแลกเคสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET2126_4…….. 50
3.13.4 การเชื่อมต่อยีนแลกเคสเข้ากับเวกเตอร์ pET2126_4…… 51
3.13.5 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 และ pETNS_1 เข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS…… 53
3.14 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลกเคส…….. 54
3.14.1 การทดสอบขั้นต้นของการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง…… 54
3.14.2 การชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์แลกเคส…….. 54
3.14.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์แลกเคสด้วยวิธี SDS-PAGE 55
3.14.4 การตรวจสอบแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วย zymogram staining……... 56
3.15 การแปรผันภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคส…… 57
3.15.1 แปรผันอุณหภูมิ…… 57
3.15.2 แปรผันความเข้มข้น IPTG……... 57
3.15.3 แปรผันเวลา…….. 57
3.16 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins (Clontech, USA)…….. 58
3.16.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์แลกเคสเพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์…….. 58
3.16.2 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins…… 58
3.16.3 การวัดปริมาณความเข้มข้นโปรตีนด้วย Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, USA)…….. 59
3.16.4 การ refolding รีคอมบิแนนท์แลกเคส…… 60

บทที่		หน้า
	3.17 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบริสุทธิ์ในการย่อยสลายฟลูออรีน……	60
4.	ผลการทดลอง……	62
	4.1 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อการสกัด total RNA……	62
	4.2 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA……	64
	4.3 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนและการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α……	66
	4.4 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกและการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS..	70
	4.4.1 การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET2126_4……	70
	4.4.2 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกและการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS……	72
	4.5 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลกเคส……	81
	4.6 การแปรผันภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคส……	83
	4.6.1 การแปรผันอุณหภูมิ……	83
	4.6.2 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG……	84
	4.6.3 การแปรผันเวลา……	85
	4.7 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์……	86
	4.8 แอกติวิตีของเอนไซม์แลกเคส……	88
	4.9 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบริสุทธิ์ในการย่อยสลายฟลูออรีน……	89
5.	สรุปผลการทดลอง……	90
รายการอ้างอิง……		98
ภาคผนวก……		109
	ภาคผนวก ก……	110
	ภาคผนวก ข……	113
	ภาคผนวก ค……	126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……		136

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง……..	29
3.2	ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลองนี้……..	30
3.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้……..	31
4.1	การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA จากตัวอย่างเส้นใย 5 ตัวอย่าง ค่าที่ได้มาจาก RNA ที่เจือจาง 1:100 เท่า……..	63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการเทียบลำดับกรดอะมิโนของแลกเคสจากรากลุ่ม Basidiomycetes และ Ascomycetes 20 สกุล โดยบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์ ได้แก่ ตำแหน่ง T1 T2 และT3 เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ ที่ประกอบด้วยฮิสทิดีน 10 หมู่ และซิสเทอีน 1 หมู่ มีการจัดเรียงตัวแบบ His-X-His.....	9
2.2	การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยอาศัยลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของแลกเคส.....	10
2.3	แสดงหลักการในการทำงานของระบบการแสดงออก pET.....	14
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของแลกเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) กับระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงรา (สัปดาห์).....	63
4.2	ภาพการทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของ total RNA ที่สกัดได้จากรา *Agrocybe* sp. CU43 หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 500 ppm เป็นเวลา 21 วัน.....	64
4.3	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนแลกเคสจาก cDNA สายแรก.....	65
4.4	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 เพื่อตรวจสอบหาทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่.....	67
4.5	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการตัดพลาสมิด pTTLC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI.....	68
4.6	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pTTLC.....	69
4.7	ไดอะแกรมการสร้างเวกเตอร์ pET2126_4.....	71
4.8	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีนแลกเคสซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F4 และ lacC-R4 กับ lacCFnoSS และ lacC-R4.....	73

รูปที่		หน้า
4.9	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 ของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของรา……	74
4.10	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 1 ของรูป 4.9 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI…	76
4.11	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 ของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มี signal sequence ของรา……	77
4.12	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 2 ของรูปที่ 4.11 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI.	78
4.13	ไดอะแกรมการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1……..	79
4.14	ไดอะแกรมการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7……	80
4.15	ภาพ SDS-PAGE สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* Rosetta-Gami B(DE3)pLysS ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7……	82
4.16	ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันอุณหภูมิ……	84
4.17	ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG……	85
4.18	ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันเวลา……	86

รูปที่		หน้า
4.19	ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยภาวะ denature.....	87
4.20	ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนหลังจากการ refolding.....	88
4.21	กราฟแสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์) ต่อเวลา (นาที).....	89

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) คือ สารประกอบที่เกิดจากการรวมตัวกันของวงแหวนอะโรมาติกตั้งแต่สองวงขึ้นไป PAHs ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง เป็นสารที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมหรือแม้แต่การปรุงอาหาร (Cerniglia, 1992; Piskonen และ Itavaara, 2004) มีรายงานว่า PAHs เป็นสารที่มีพิษและย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพคือ เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (Kanaly และ Harayama, 2000) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการบำบัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม วิธีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs วิธีหนึ่งคือ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ซึ่งราโดยเฉพาะราไวท์รอทเป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาศึกษาถึงการย่อยสลายสาร PAHs อย่างกว้างขวาง เนื่องจากราในกลุ่มนี้สามารถผลิตแลกเคสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการรายงานว่าเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลาย PAHs (Zumarraga และคณะ, 2007)

แลกเคส (เบนซีนไดออล : ออกซิเจนออกซิโดรีดักเทส ; EC1.10.3.2) คือ มัลติคอปเปอร์ออกซิเดสซึ่งประกอบด้วยคอปเปอร์จำนวน 4 อะตอมต่อโมเลกุลเอนไซม์ แลกเคสสามารถกระตุ้นให้เกิดการออกซิไดส์อิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากสารประกอบฟีนอล อะนิลีน และอะโรมาติกไธออล ทำให้ได้สารอยู่ในรูปอนุมูลอิสระไปพร้อมกับเกิดการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนไปเป็นน้ำ (Galhaup และ Haltrich, 2001; Camarero และคณะ, 2005) โดยทั่วไปแล้วแลกเคสมักประกอบด้วยกรดอะมิโน 520-550 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60-80 กิโลดาลตัน มีการไกลโคซิเลท 15-20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของแลกเคส (Thurston, 1994) ค่า pI 3-5 มีประมาณ 1-8 ไอโซไซม์ (Baldrian, 2006) ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3-6 ขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรต (Bollag และ Leonowicz, 1984) และมีความเสถียรที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส (Record และคณะ, 2002) แลกเคสจะถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จากนั้นจะหลั่งออกและสะสมที่บริเวณด้านนอกของเซลล์เป็นหลัก ซึ่งการผลิตเอนไซม์อาจอยู่ในรูปแบบที่มีการผลิตตลอดเวลาหรือรูปแบบที่ได้รับการชักนำก็ได้ (Record และคณะ, 2002; Mougin และคณะ, 2003) เอนไซม์แลกเคสมีความสามารถในการออกซิไดส์สับสเตรตได้หลากหลายชนิด เช่น

สารประกอบฟีนอล ได้แก่ ฟีนอล หรือ อะโรมาติกเอมีน และจะสามารถย่อยสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลได้ในกรณีที่มีสารจำพวกมีเดียเอเตอร์ที่เหมาะสม (Dantan-Gonzalez และคณะ, 2008) จากความสามารถนี้จึงมีการประยุกต์ใช้แลกเคสอย่างกว้างขวางทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมการฟอกกระดาษและผลิตเยื่อกระดาษ การผลิตเอทานอล การบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมไวน์ และด้านการแพทย์ เป็นต้น (Mayer และ Staples, 2002)

แลกเคสผลิตได้โดยราหลายชนิด โดยรากลุ่มหลักที่สามารถผลิตแลกเคสได้คือ ราไวท์รอท เช่น *Phlebia tremellosa* และ *Trametes versicolor* เป็นต้น (Jolivalt และคณะ, 2005) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์จากรามักผลิตขึ้นในระดับต่ำและอาศัยระยะเวลาในการผลิตที่นาน ทำให้ไม่เพียงพอกับความต้องการในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ในบางกรณียังจำเป็นต้องชักนำเพื่อให้เกิดการผลิตด้วย เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงมีการโคลนยีนแลกเคสจากราและแสดงออกในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น ยีสต์ ราสายใย หรือ แบคทีเรีย (Lu และคณะ, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการโคลนและการแสดงออกยีนแลกเคสจากราในแบคทีเรีย *Escherichia coli* เนื่องจากมีข้อดีในหลายๆ ด้าน ได้แก่ ในระบบการแสดงออกใน *E. coli* นั้นมีเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกให้เลือกใช้จำนวนมาก และให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงในกระบวนการหมัก สามารถแสดงออกโปรตีนที่ต้องการโดยไม่ต้องมีการชักนำ หรือมีการชักนำให้เกิดการแสดงออกโดยการใช้สารที่มีราคาถูก รวมทั้งสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ภายในเวลาที่รวดเร็ว (Lu และคณะ, 2009) ในการแสดงออกของโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นใน *E. coli* นั้นมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลักใหญ่อยู่ด้วยกัน 2 ข้อ คือ เวกเตอร์ที่ใช้เพื่อการแสดงออกและสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อให้เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (Sorensen และ Mortensen, 2005) จนถึงปัจจุบันมีการโคลนจีโนมิกดีเอ็นเอและ cDNA ของยีนแลกเคสจากราในกลุ่ม Basidiomyctes หลายชนิด เช่น *Ganoderma lucidum* (Joo และคณะ, 2008) *Pycnoporus cinnabarinus* (Record และคณะ, 2002) และ *Pleurotus ostreatus* (Giardina และคณะ, 1995) เป็นต้น จากการวิเคราะห์ลำดับของยีนแลกเคสจากราทั้งหมดที่มีการโคลนและรายงานไว้พบว่าแลกเคสในกลุ่มของรามีความเหมือนกันของลำดับ (sequence identity) ที่ค่อนข้างต่ำ แต่บริเวณที่จับคอปเปอร์จะเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโนสูง (Salony และคณะ, 2008) จากการจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโนของแลกเคสพบว่าบริเวณที่จับคอปเปอร์นี้จะประกอบด้วย 8 หมู่ของฮิสติดีนที่จัดเรียงตัวในรูปแบบที่เป็น 4 ชุดของ His-X-His (Colao และคณะ, 2003) จากลักษณะที่มีความอนุรักษ์สูงของบริเวณจับคอปเปอร์ของแลกเคส จึงมีการนำเทคนิค PCR

(polymerase chain reaction) มาใช้เพื่อโคลนยีนแลกเคสจากราหลายชนิด โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะออกแบบโดยวิธีดีเจนเนอเรตมาจากลำดับกรดอะมิโนในบริเวณที่จับคอปเปอร์ซึ่งมีการอนุรักษ์สูงนี้ (D'Souza และคณะ, 1996)

กุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) ได้คัดแยกราที่มีสมบัติในการย่อยสลายสาร PAHs และพบว่ารา *Agrocybe* sp. CU43 มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิด ได้แก่ แอนทราซีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน โดยพบว่าสามารถย่อยสลายฟลูออรีนความเข้มข้น 100 ppm ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 6 วัน และในระหว่างที่ย่อยสลายฟลูออรีนนั้น *Agrocybe* sp. CU43 สามารถผลิตแลกเคสได้สูงสุดถึง 470 หน่วยต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้ยังได้รายงานถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของลำดับจีโนมิกของยีนแลกเคสไว้ ซึ่งต่อมา เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550) ได้ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลกเคสนี้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแลกเคสโดยวิธีจีโนมวอร์กกิงร่วมกับการทำ nested PCR ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 2 ชิ้น จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสในชิ้นส่วนทั้งสองทำให้ทราบลำดับจีโนมิกของยีนแลกเคสรวมทั้งลำดับที่อยู่ล้อมรอบบริเวณนี้ เมื่อนำชิ้นส่วนทั้ง 2 มาจัดเรียงเทียบกันพบว่า ยีนแลกเคสบนจีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาด 3,083 bp โดยมี CAAT box และ TATA box ที่ได้จากการทำนายที่บริเวณ 161 และ 54 bp เหนือจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ATG ตามลำดับ มีกรอบรหัสเปิดขนาด 1,569 bp ซึ่งประกอบด้วยบริเวณอินทรอน 12 ตำแหน่ง มีขนาดตั้งแต่ 29 ถึง 81 bp และทำนายว่าจะแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 522 หมู่ และมี signal peptide ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน 1-19 โดยมี cleavage site ระหว่างตำแหน่งที่ 19 และ 20 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ทำให้ต่อมาในงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ได้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จากงานวิจัยของเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550) เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสเต็มจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 และพบว่ายีนแลกเคสที่ได้มีขนาดประมาณ 2.4 kb

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการแสดงออกของยีนแลกเคสในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ประโยชน์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอจากงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Agrocybe* sp. CU43 และแสดงออกใน *E. coli* เพื่อนำรีคอมบิแนนท์แลกเคสไปใช้ในการบำบัดฟลูออรีนต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อโคลน cDNA ของยีนแลกเคสจาก *Agrocybe* sp. CU43 และแสดงออกใน *E. coli* รวมถึงทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์แลกเคสในการย่อยสลายฟลูออรีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

แลกเคส

แลกเคส (*p*-diphenol:O_2 oxidoreductase; EC 1.10.3.2) เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่มีชื่อว่า Blue copper proteins หรือ Blue copper oxidases ประกอบด้วยอะตอมคอปเปอร์ 4 อะตอมต่อโมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการออกซิไดส์สับสเตรต โดยมีการกระจายตัวอยู่ใน 3 บริเวณคือ โมโนนิวเคลียร์หรือ T1 ซึ่งประกอบด้วยอะตอมคอปเปอร์ชนิดที่ 1 หรือ Blue copper (Cu1) ซึ่งมีส่วนทำให้เอนไซม์มีสีฟ้าและไตรนิวเคลียร์ (T2 และ T3) ที่ประกอบด้วยอะตอมคอปเปอร์ชนิดที่ 2 (Cu2) และอะตอมคอปเปอร์ชนิดที่ 3 ซึ่งมีการจับกันเป็นคู่ของอะตอมคอปเปอร์ (Cu3a และ Cu3b) โดยกลไกของการทำงานแลกเคสเริ่มจากสับสเตรตถูกออกซิไดส์ที่บริเวณ active site แล้วเปลี่ยนมาอยู่ในรูปอนุมูลอิสระ จากนั้นบริเวณ T1 รับอิเล็กตรอนจากสับสเตรตที่ถูกออกซิไดส์ แล้วส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังบริเวณไตรนิวเคลียร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนไปเป็นน้ำ (Messerschmidt, 1997; Record และคณะ, 2002; Mougin และคณะ, 2003) โดยทั่วไปแล้วแลกเคสมักประกอบด้วยกรดอะมิโน 520-550 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60-80 กิโลดาลตัน มีการไกลโคซิเลท 15-20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของแลกเคส (Thurston, 1994) ค่า pI 3-5 มีประมาณ 1-8 ไอโซไซม์ (Baldrian, 2006) ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 3-6 ขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรต (Bollag และ Leonowicz, 1984) และมีความเสถียรที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส (Record และคณะ, 2002) แลกเคสสามารถใช้สับสเตรตได้หลากหลายทั้งสารประกอบฟีนอลิก เช่น สารประกอบฟีนอล และอะโรมาติกเอมีน (Baldrian, 2006) และสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น เบนไซลิกแอลกอฮอล์ และอีเทอร์เมื่อมีสารมีเดียเอเตอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา เช่น 1-ไฮดรอกซีเบนโซไทรอะโซล (hydroxybenzotriazole, HBT) (D'Acunzo และคณะ, 2006) แลกเคสส่วนใหญ่ถูกผลิตอยู่ในรูปของเอนไซม์แบบหลั่งออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) แต่ในบางครั้งก็สามารถผลิตอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) และอยู่ที่ผนังเซลล์ด้วยเช่นเดียวกัน (Baldrian, 2006) ซึ่งการผลิตเอนไซม์อาจอยู่ในรูปแบบที่มีการผลิตตลอดเวลาหรือรูปแบบที่ได้รับการชักนำก็ได้ (Mayer และ Staples, 2002)

แหล่งผลิตแลกเคส

มีการรายงานพบว่าแลกเคสสามารถผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ ในพืชชั้นสูง เช่น *Mangifera indica*, *Schinus molle* (Joel และคณะ, 1978) ในแมลง เช่น *Bombyx mori* (Yamazaki, 1972) ในแบคทีเรีย เช่น *Streptomyces lavendulae* (Suzuki และคณะ, 2003) และในราซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่ที่สุดที่สามารถผลิตแลกเคสได้ ได้แก่ ราในกลุ่ม Deuteromycetes เช่น *Aspergillus nidulans* (Hermann และคณะ, 1983), *Botrytis cinerea* (Dubernet และคณะ, 1977) กลุ่ม Ascomycetes เช่น *Neurospora crassa* (Froehner และ Eriksson, 1974) *Podospora anserine* (Molitoris และ Esser, 1971) และกลุ่ม Basidiomycetes โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในกลุ่มไวท์รอท เช่น *Polyporus versicolor* (Fahraeus และ Ljunggren, 1961), *Phanerochaete chrysosporium* (Srinivasan และคณะ, 1995) โดยแลกเคสที่ผลิตจากรานั้นมีบทบาทและหน้าที่ที่หลากหลายในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น ใช้ในการย่อยสลายลิกนิน เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในพืช และทางด้านสัณฐานวิทยา ได้แก่ การสร้าง pigment ที่โครงสร้างต่างๆ ของรา เป็นต้น (Thurston, 1994)

ประโยชน์ของแลกเคสจากราทางด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

ปฏิกิริยาการออกซิเดชันมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในปฏิกิริยาการบำบัดของเสียต่างๆ ซึ่งเทคโนโลยีที่ใช้ในปฏิกิริยาการออกซิเดชันโดยทั่วไป ได้แก่ วิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี อย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีนี้มีราคาสูง และมักส่งผลกระทบตามมา เช่น เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่ต้องการ และสารที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเทคโนโลยีใหม่ที่ถูกนำมาใช้คือ เทคโนโลยีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการนำเอนไซม์มาใช้ในปฏิกิริยาการออกซิเดชัน โดยข้อดีของวิธีนี้คือ มีราคาถูก ให้ปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะและไม่รุนแรง (Couto และ Herrera, 2006b; Annuar และคณะ, 2009) ดังนั้นแลกเคสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้สับสเตรตได้อย่างหลากหลายจึงได้รับการนำมาประยุกต์ เพื่อใช้ในด้านต่างๆ มากมาย ยกตัวอย่างเช่น ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารโดยการเพิ่มหรือปรับปรุงสีของอาหารและเครื่องดื่ม เช่น กำจัดสารประกอบจำพวกฟีนอลิกที่มีผลทำให้เครื่องดื่มจำพวกน้ำผลไม้ เบียร์ หรือ ไวน์มีสีน้ำตาล มีลักษณะขุ่นและตกตะกอน (Couto และ Herrera, 2006b) ทางด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น ใช้ในการฟอกสีของฝ้ายโดยการย่อยสลายสีตามธรรมชาติของฝ้ายเพื่อให้ได้เส้นใยที่มีสีขาว (Couto และ Herrera, 2006a) ทางด้านอุตสาหกรรมการฟอกสีเนื้อไม้และกระดาษโดยใช้แลกเคสในการฟอกสีเนื้อไม้ด้วยการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ที่ทำให้เยื่อ

กระดาษมีสีน้ำตาล (Gamelas และคณะ, 2005) ทางด้านการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม เช่น ใช้ในการบำบัดยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง น้ำเสียจากอุตสาหกรรมสีย้อม และย่อยสลายสารประกอบจำพวกพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) (Mayer และ Staples, 2002; Mougin และคณะ, 2003) เป็นต้น

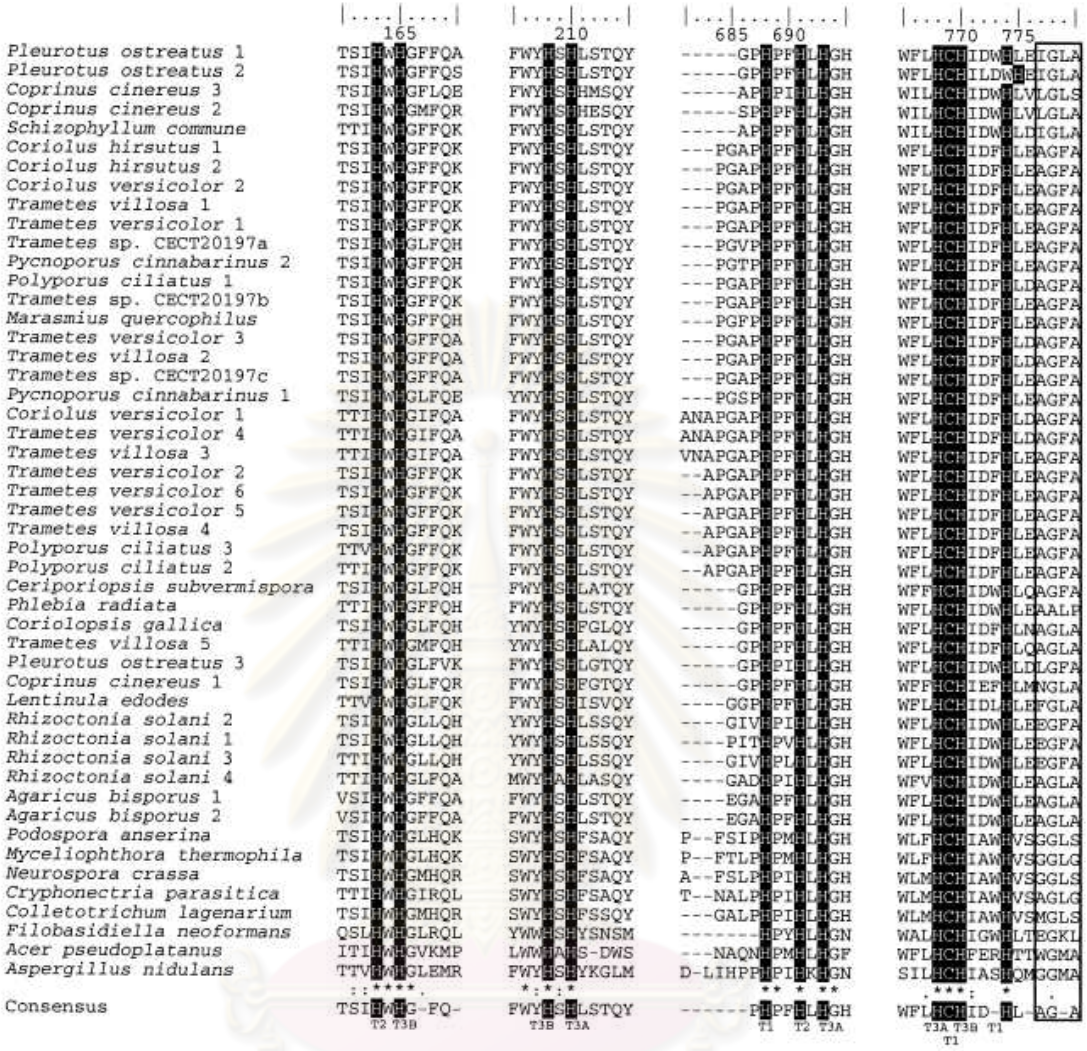
ราเส้นใยสามารถผลิตแลกเคสได้ในปริมาณสูง การผลิตแลกเคสเพื่อนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมจะผลิตผ่านกระบวนการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ โดยการผลิตแลกเคสเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมมีเป้าหมาย คือ ต้องการผลิตแลกเคสในปริมาณสูงด้วยต้นทุนการผลิตที่ต่ำ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสามารถทำได้โดยการเลือกใช้สับสเตรตให้เหมาะสม ซึ่งกระบวนการหมักที่ใช้ในการผลิตแลกเคสในระดับอุตสาหกรรมแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ Submerged fermentation และ Solid-state fermentation (Couto และ Toca-Herrera, 2007) ตัวอย่างงานวิจัยของ Songulashvili และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตแลกเคสของราในกลุ่ม Basidiomycetes 18 สายพันธุ์ด้วยวิธี Submerged fermentation โดยการใช้เปลือกส้มแมนดารินและของเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอลเป็นสับสเตรต พบว่าปริมาณแลกเคสที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของรา เช่น *Ganoderma* สามารถผลิตแลกเคสได้ในช่วง 192 - 61,488 ยูนิตต่อลิตร และ *Trametes* สามารถผลิตแลกเคสได้ในช่วง 9,000 - 20,000 ยูนิตต่อลิตร เป็นต้น และงานวิจัยของ Rosales และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณของแลกเคสที่ผลิตจากรา *Trametes hirsuta* โดยใช้กระบวนการหมักแบบ Solid-state fermentation พบว่า *T. hirsuta* สามารถผลิตแลกเคสได้ปริมาณสูงสุดที่ 31,786 ยูนิตต่อลิตร เมื่อใช้เปลือกส้มเป็นสับสเตรตและมีการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตแลกเคสในระดับอุตสาหกรรมด้วยกระบวนการหมักในถังหมักขนาดใหญ่นั้นยังขาดระบบการผลิตที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น การเจริญของราที่มากเกินไปจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหนืด ซึ่งมีผลต่อการถ่ายเทมวลและออกซิเจนได้อย่างจำกัด มีผลต่ออัตราการเมทาบอลิซึม การหลั่งผลิตภัณฑ์ของรา และในระหว่างกระบวนการหมักอาจมีการหลั่งของสารบางอย่าง เช่น เอนไซม์โปรตีเอสซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของแลกเคสได้ วิธีการแก้ไขปัญหาอาจทำได้โดยการแสดงออกยีนแลกเคสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงในระดับถังหมัก และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสได้ในปริมาณสูง ด้วยต้นทุนที่ต่ำ (Couto และ Toca-Herrera, 2007)

ยีนแลกเคส

จนถึงปัจจุบันมีการโคลนและแสดงออกยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอและ cDNA ของราในหลายสายพันธุ์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes เช่น *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert และคณะ, 1998) *Trametes sanguinea* (Hoshida และคณะ, 2001) *Ganoderma lucidum* (Joo และคณะ, 2008) *Pleurotus ostreatus* (Okamoto และคณะ, 2003) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามมียีนแลกเคสบางส่วนถูกโคลนจากราในกลุ่ม Ascomycetes ด้วยเช่นกัน ได้แก่ *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen และ Saloheimo, 2004)

การแสดงออกของแลกเคสถูกควบคุมโดยกลุ่มของยีนที่มีความซับซ้อนทำให้ราในบางสายพันธุ์สามารถผลิตแลกเคสได้มากกว่า 1 ไอโซฟอร์ม จากการวิเคราะห์ยีนแลกเคสจากราทั้งหมดที่มีการรายงานไว้พบว่าลำดับของหมู่กรดอะมิโนของยีนแลกเคสในกลุ่มของราโดยเฉพาะบริเวณที่จับกับอะตอมของคอปเปอร์ทั้ง 4 ตำแหน่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้สูงในแต่ละโมเลกุลของแลกเคส รูปที่ 1.1 แสดงให้เห็นถึงบริเวณอนุรักษ์ของแลกเคสซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโนฮิสทิดีน 10 หมู่ และซิสเทอีน 1 หมู่ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีการกระจายอยู่บนสายพอลิเพปไทด์ในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันในราทุกสายพันธุ์ คือ ทางด้านปลายอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนฮิสทิดีน 2 คู่ ส่วนที่เหลืออยู่ใกล้ทางด้านปลายคาร์บอกซี (Thurston, 1994; Mansur และคณะ, 1997) แต่อย่างไรก็ตามลำดับในบริเวณอื่นของแลกเคสจากรามีความเหมือนกันที่ค่อนข้างต่ำส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนบริเวณอื่นนอกเหนือจากบริเวณอนุรักษ์ และปริมาณการเติมหมู่น้ำตาลในโครงสร้างของแลกเคสมีความหลากหลาย (Joo และคณะ, 2008; Salony และคณะ, 2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 แสดงการเทียบลำดับกรดอะมิโนของแลกเคสจากรากลุ่ม Basidiomycetes และ Ascomycetes 20 สกุล โดยบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์ ได้แก่ ตำแหน่ง T1 T2 และ T3 เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ ที่ประกอบด้วยฮิสทิดีน 10 หมู่ และซิสเทอีน 1 หมู่ มีการจัดเรียงตัวแบบ His-X-His (Valderrama และคณะ, 2003)

วิธีที่ใช้กันทั่วไปในการโคลนจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนแลกเคส ได้แก่ วิธี short gun cloning ตัวอย่างงานวิจัยหนึ่งที่ใช้วิธีนี้ในการโคลนยีนแลกเคส คือ งานวิจัยของ Giardina และคณะ (1995) โดยเริ่มจากผู้วิจัยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *P. ostreatus* แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยยีนแลกเคสที่สมบูรณ์ โดยขนาดโมเลกุลที่ได้หลังจากการตัดแล้วนั้นอยู่ในช่วง 2,000-4,000 เบส

จากนั้นโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM7Zf(+) เพื่อสร้างเป็นคลัง (library) ของยีน แล้วคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยการทำโคโลนีไฮบริไดเซชันด้วยโพรบที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณอนุรักษ์ของยีนแลกเคสที่เคยมีการรายงานไว้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง และใช้เวลานาน

วิธีทางเลือกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการโคลนยีนแลกเคสจากราสายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็วมากขึ้นนั่นคือ การนำเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) มาประยุกต์ใช้ โดยใช้ประโยชน์จากบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจากรา โดยงานวิจัยของ D'Souza และคณะ (1996) ได้ออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์โดยการแปลงลำดับของกรดอะมิโนให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์บริเวณที่ 1 และรีเวิร์สไพรเมอร์จากบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์บริเวณที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดกรองหายีนแลกเคสในราไวท์รอท 9 สกุล ต่อมา Hoshida และคณะ (2001) ได้ใช้หลักการเดียวกันในการคัดกรองหายีนแลกเคสจากรา *Trametes sanguinea* แต่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอออกแบบจากบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์บริเวณที่ 1 และบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์บริเวณที่ 4 ซึ่งวิธีการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แสดงในรูปที่ 1.2 และจากการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแลกเคสบางส่วนที่เพิ่มจำนวนได้พบว่าสามารถแบ่งแลกเคสออกได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ *lcc1 - lcc5* และในงานวิจัยนี้ยังใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *lcc1* ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคส *lcc1* เต็มยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ และcDNA ของรา *Trametes sanguinea* ด้วยวิธี 5'RACE PCR อีกด้วย

	Copper-binding region I								Copper-binding region IV							
Amino acid sequences		H	W	H	G	F	F	Q		H	C	H	I	D	F	H
Putative nucleotide sequences	5'	CAC T	TGG	CAC T	GGA C T G	TTC T	TTC T	CAA G	3'	5'	CAC T	TGC T	CAC T	ATA C T	GAC T	TTC T	CAC T	3'
PCR primers	5'	CAY	TGG	CAY	GGN	TTY	TTY	CA	3'	3'	GTR	ACR	GTR	TAD	CAR	AAR	GT	5'

รูปที่ 2.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยอาศัยลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของแลกเคส (Hoshida และคณะ, 2001)

การโคลนและการแสดงออกของยีนแลกเคสในสิ่งมีชีวิตอื่น

โดยปกติในธรรมชาติราเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตแลกเคสได้ในปริมาณสูง แต่อย่างไรก็ตามการผลิตแลกเคสเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมยังถือว่าอยู่ในระดับที่ต่ำ ใช้เวลาในการผลิตนาน บางกรณีอาจต้องใช้สารชักนำเพื่อให้เกิดการผลิต อีกทั้งราแต่ละสายพันธุ์มักมียีนที่ควบคุมการแสดงออกของแลกเคสหลายยีน ซึ่งส่งผลให้ราสามารถผลิตแลกเคสได้มากกว่า 1 ไอโซฟอร์ม โดยที่แต่ละไอโซฟอร์มของแลกเคสมีโครงสร้างเอนไซม์ที่คล้ายกัน แต่ลักษณะทางกายภาพและเคมีมีความแตกต่างกันส่งผลให้ยากต่อการคัดแยกแลกเคสแต่ละไอโซฟอร์มเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ (Baldrian, 2006; Lu และคณะ, 2009) วิธีแก้ไขปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการโคลนยีนแลกเคสแล้วแสดงออกในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแลกเคส และมีความเหมาะสมต่อการผลิตในระดับถังหมักขนาดใหญ่ สิ่งมีชีวิตดังกล่าวนี้ ได้แก่ ราเส้นใย เช่น *Aspergillus niger* (Record และคณะ, 2002) *Aspergillus sojae* (Hatamoto และคณะ, 1999) ยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Kojima และคณะ, 1990) *Pichia pastoris* (Otterbein และคณะ, 2000) *Pichia methanolica* (Guo และคณะ, 2008) และแบคทีเรีย โดยงานวิจัยของ Salony และคณะ (2008) สามารถโคลนและแสดงออกยีนแลกเคสใน *Escherichia coli* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกอีกด้วย

E. coli นับได้ว่าเป็นโปรคาริโอตที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อการแสดงออกโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจาก *E. coli* มีข้อได้เปรียบในหลายๆ ด้าน ยกตัวอย่างเช่น

- *E. coli* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ซับซ้อนส่งผลให้โปรตีนสามารถแสดงออกได้ง่ายขึ้น
- เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงซึ่งเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตโปรตีน
- ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานของ *E. coli* ได้รับการเผยแพร่ไว้เป็นอย่างดี
- เวกเตอร์ที่ใช้เพื่อการแสดงออกของโปรตีนมีให้เลือกใช้เป็นจำนวนมาก
- ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้เหมาะสมต่อการแสดงออกโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (Sorensen และ Mortensen, 2005)

Sorensen และ Mortensen (2005) ได้รวบรวมปัจจัยต่างๆ ที่ต้องคำนึงถึงเมื่อต้องการแสดงออกโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นใน *E. coli* ไว้ดังนี้

1. เวกเตอร์เพื่อการแสดงออก

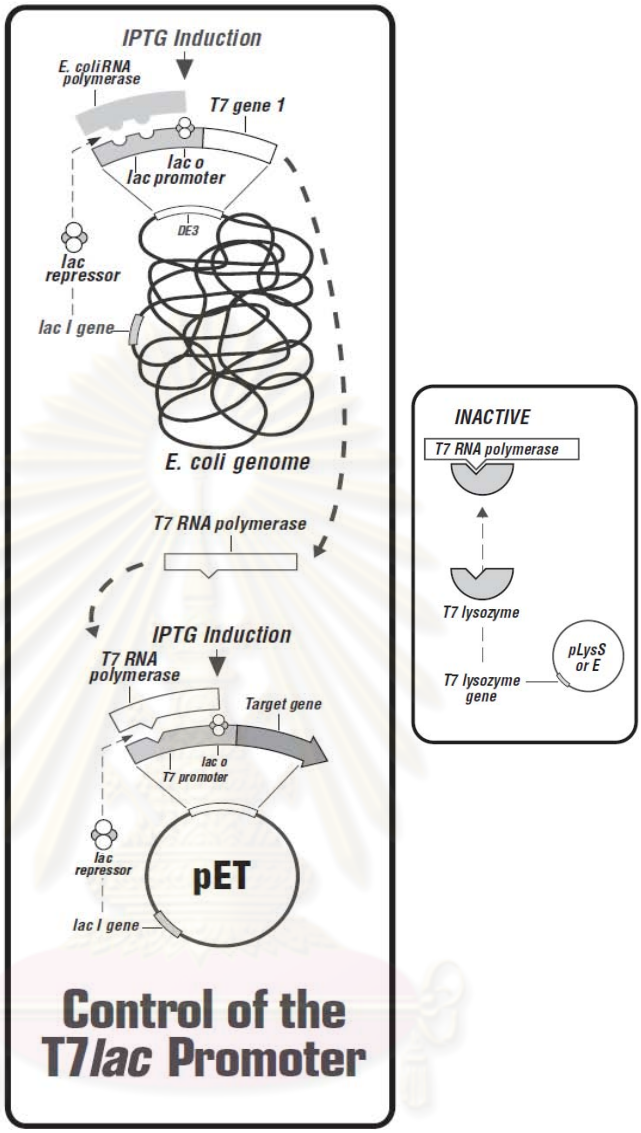
เวกเตอร์เป็นสิ่งที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน โดยองค์ประกอบในเวกเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ 1) Origin of replication (*ori*) ที่ควบคุมปริมาณ copy number ของเวกเตอร์ 2) ยีนต้านยาปฏิชีวนะ เช่น แอมพิซิลลิน คานามัยซิน คลอแรมเฟนิคอล หรือเตตระไซคลิน 3) โปรโมเตอร์ที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนในระดับสูง และมีระบบยังยั้งการแสดงออกได้ดีเมื่อไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออก 4) บริเวณ Translation initiation region (TIR) เพื่อการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งต้องการ Ribosomal binding site ได้แก่ บริเวณ Shine-Dalgarno (SD) sequence และรหัสเริ่มต้นการถอดรหัส AUG และ 5) Transcription terminator ซึ่งอยู่หลังจากยีนเป้าหมายที่แทรกในเวกเตอร์เพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับเวกเตอร์โดยป้องกันการถอดรหัสผ่านจุด *ori*

ระบบของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกที่ใช้กันในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายระบบ แต่ระบบที่นิยมใช้กันมาก คือ ระบบการแสดงออกในกลุ่มของ pET ระบบนี้มีเวกเตอร์ให้เลือกใช้หลากหลายตามแต่วัตถุประสงค์โดยการเพิ่มเติมลักษณะบางอย่างเข้าไป เช่น ในการแสดงออกของโปรตีนมักต้องการโปรตีนที่มีการละลายสูง และอยู่ในรูปแบบที่ทำงานได้ ซึ่งเวกเตอร์สามารถเพิ่มการละลาย และทำให้โปรตีนเป้าหมายมีการม้วนพับตัวที่ถูกต้องได้โดยเติมลำดับของ Fusion tags เชื่อมต่อกับยีนเป้าหมาย เนื่องจากตัว Tags มีความสามารถในการละลายสูงจึงช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีน อีกทั้งยังทำให้สะดวกต่อการติดตาม และใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยหลักการ Affinity chromatography อีกด้วย (Davis และคณะ, 1999) หรือมีการเพิ่มลำดับของ signal sequence ลงในเวกเตอร์โดย signal sequence ทำให้โปรตีนมีการเคลื่อนตัวไปที่บริเวณ periplasmic space ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ และเหมาะสมต่อการม้วนพับตัวของโปรตีน (Novagen pET system manual)

ระบบการแสดงออก pET แสดงเป็นภาพรวมในรูปที่ 1.3 ซึ่งระบบการแสดงออกนี้เป็นระบบที่สามารถควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้อย่างเข้มงวด เนื่องจากในบางครั้งการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนอาจมีผลต่อระบบการทำงานหรืออาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* โดยการทำงานของระบบการแสดงออกของเวกเตอร์ pET นั้น จะทำงานร่วมกับเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ λDE3 lysogens ในภาวะที่ไม่มีสารชักนำให้เกิดการแสดงออก ซึ่งได้แก่ isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ยีน *lacI* ซึ่งมีทั้งในเวกเตอร์ และเซลล์เจ้าบ้านจะผลิต *lac* repressor (*lacI*) ไปจับที่ *lacUV5* promoter ที่อยู่บนจีโนมิกดีเอ็นเอของเซลล์เจ้า

บ้าน ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีน T7 RNA polymerase ด้วย *E. coli* RNA polymerase ส่งผลให้ไม่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย T7 RNA polymerase และในขณะเดียวกัน *lacI* repressor ยังไปจับที่ T7*lac* promoter บนเวกเตอร์อีกด้วยเพื่อยังยับยั้งการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก T7 RNA polymerase ที่อาจถูกผลิตขึ้น และเพื่อการควบคุมการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มากขึ้นสามารถทำได้โดยการทำงานร่วมกันระหว่างเวกเตอร์ pET และเซลล์เจ้าบ้านที่มีเวกเตอร์ที่ทนต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล pLysE และ pLysS ซึ่งสามารถผลิต T7 lysozyme ที่ยับยั้ง T7 RNA polymerase ไม่ให้ทำงานโดยจับกับ T7 RNA polymerase ส่งผลให้ไม่เกิดการแปลรหัสของยีนเป้าหมาย จากนั้นเมื่อต้องการให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถทำได้โดยการเติมสารชักนำ IPTG ซึ่งจะจับกับโปรตีน LacI ส่งผลให้โปรโมเตอร์ทำงานได้ตามปกติ (Studier และ Moffatt, 1986; Studier และคณะ, 1990; Studier, 1991)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป 2.3 แสดงหลักการในการทำงานของระบบการแสดงออก pET (Novagen pET system manual)

2. เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

สายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยเซลล์เจ้าบ้านจะต้องมีสมบัติหลักๆ ที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

- ไม่ผลิตโปรตีเอสที่ส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเป้าหมาย
- รักษาความเสถียรของเวกเตอร์เป้าหมาย

- มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อระบบการแสดงออก

ในการเลือกระบบเพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนเป้าหมายนั้นควรเลือกให้เหมาะสมกับลักษณะของโปรตีนนั้นๆ ซึ่งจนถึงปัจจุบันมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *E. coli* เพื่อให้เหมาะสมกับการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบต่างๆ เช่น ช่วยเพิ่มการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ในไซโทพลาสซึม ปรับระดับการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย ป้องกันโปรตีนเป้าหมายไม่ให้อยู่ในรูปแบบ inclusion body และเพิ่ม tRNA สำหรับโคดอนที่พบในโปรตีนเป้าหมาย แต่ไม่พบในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เป็นต้น (Sorensen และ Mortensen, 2005)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมีดังนี้

Whitwam และคณะ (1995) โคลน cDNA ของยีน Mn peroxidase ไอโซไซม์ H4 จากรา *Phanerochaete chrysosporium* เข้าสู่เวกเตอร์ pET21a(+) โดยปราศจาก signal sequence ของยีน Mn peroxidase และแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ผลคือเอนไซม์ถูกผลิตในรูป inclusion body แต่เมื่อผ่านขั้นตอนการ refolding พบว่าเอนไซม์มีแอกติวิตีต่อสับสเตรตต่างๆ ได้แก่ ฟีนอลเรด กัวเอคอล และวานิลลิลอะซิโตน เมื่อมี Mn^{2+} และ H_2O_2 ในปฏิกิริยา

Di Lorenzo และคณะ (2005) โคลน cDNA ของยีนโปรไลเปสและไลเปสจากรา *Rhizopus oryzae* ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน 6 หมู่ สร้างเป็นพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ แล้วแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรไลเปสและไลเปสใน *E. coli* และเวกเตอร์ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อโคลนยีนด้วยเวกเตอร์ pET-11d และแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรไลเปสและไลเปสในรูปแบบที่ละลายได้ (soluble) และเมื่อเปรียบเทียบแอกติวิตีระหว่าง 2 เอนไซม์ พบว่าโปรไลเปสมีแอกติวิตีสูงกว่าไลเปส โดยมีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 166 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ชักนำการผลิตเอนไซม์ด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1

Liu และคณะ (2007) โคลนยีน *LKB1* ซึ่งมีหน้าที่เป็น tumor suppresser ของมนุษย์ในเวกเตอร์ pET-44a แล้วทรานสฟอร์มเพื่อให้มีการแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli*

Rosetta-Gami B (DE3) pLysS และพบว่าระดับของการแสดงออกและการละลายของโปรตีน LKB1 จาก *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดย *E. coli* BL21 (DE3) ผลิต His-LBK1 คิดเป็น 34.1 เปอรเซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด และส่วนใหญ่ถูกผลิตในรูปแบบไม่ละลาย (insoluble) และ His-LBK1 ที่อยู่ในรูปละลายได้ คิดเป็น 8.1 เปอร์เซ็นต์ของส่วนโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ส่วน His-LBK1 ที่ถูกผลิตใน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS คิดเป็น 39.3 เปอรเซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดและอยู่ในรูปที่ละลายได้ คิดเป็น 34.1 เปอร์เซ็นต์ของส่วนโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตจาก *E. coli* BL21 (DE3) มีปริมาณเท่ากับ 20 กรัมต่อมิลลิลิตร และ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS มีปริมาณเท่ากับ 92 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS สามารถยับยั้งเซลล์ hepatic carcinoma SMMC-7721 ได้ 24.97 และ 45.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Miki และคณะ (2009) โคลนและแสดงออกยีนของเอนไซม์ lignin peroxidase (Lip) จากรา *Trametes cervina* โดย cDNA ของยีน Lip ที่สมบูรณ์ (*mlip*) ถูกโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET23a ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS พบว่ารีคอมบิแนนท์ Lip ถูกผลิตในรูปแบบ inclusion bodies ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่มีแอกติวิตี แต่หลังจากการ refolding ในภาวะที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ GSSG 0.6 มิลลิโมลาร์ DTT 0.1 มิลลิโมลาร์ ยูเรีย 0.4 โมลาร์ hemin 5 ไมโครโมลาร์ และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์ ใน Tris–HCl 50 มิลลิโมลาร์ (pH 9.5) พบว่ารีคอมบิแนนท์ Lip สามารถย่อยสลายสับสเตรต 1,4-dimethoxybenzene และ ferrocytochrome c ซึ่งเป็นสับสเตรตที่มีขนาดใหญ่ได้

Zhou และคณะ (2008) โคลน cDNA ของยีน endo-1,4-β-xylanase จากรา *Aspergillus usamii* E001 เข้าเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-28a(+) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL จากการทดสอบแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์ไซแลเนสที่ได้จากสารสกัดของเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์พบว่ามีแอกติวิตีสูงสุดอยู่ที่ 49.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่ค่ากรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคือ สารเคมีที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันในลักษณะเส้นตรง ทำมุม หรือเป็นกลุ่ม (Wilson และ Jones, 1993) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2-3 วง ได้แก่ แนพทาลีน ฟีแนนทรีน และกลุ่มที่มีมวลโมเลกุลสูง ได้แก่ เบนโซเอไพรีน ฟลูออแรนทรีน และไพรีน เป็นต้น (Kanaly และ Harayama, 2000; Marcoux และคณะ, 2000) PAHs เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ (Heitkamp และ Cerniglia, 1988) โดยสารประกอบ PAHs ถือได้ว่าเป็นสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่พบได้ทั้งในอากาศ (Delgado-Saborit และคณะ, 2011) น้ำ (Zhu และคณะ, 2004) และดิน (Wilson และ Jones, 1993) ซึ่งแหล่งที่มาของการปล่อยสารประกอบ PAHs ออกสู่สิ่งแวดล้อม ได้แก่ การจราจรบนท้องถนน การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง การเกิดไฟป่า การรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเล เป็นต้น (Valentin และคณะ, 2007) สารประกอบ PAHs เป็นสารประกอบที่ต้องบำบัดออกจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเป็นสารที่เป็นพิษ มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Wilson และ Jones, 1993)

การบำบัดสารประกอบ PAHs นั้นสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการบำบัดคือการขุดเคลื่อนย้ายดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนไปสู่บริเวณใหม่แล้วบำบัดด้วยวิธีฝังกลบ ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียคือ ก่อให้เกิดความเสี่ยงจากการขุดและขนย้ายดินที่มีการปนเปื้อนสารอันตราย รวมถึงต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการหาบริเวณบำบัดแห่งใหม่ และต้องใช้เวลาในการติดตามผลการบำบัดและปิดบริเวณที่ใช้ในการบำบัดเป็นเวลานาน ดังนั้นวิธีการบำบัดอื่นที่น่าสนใจคือ การย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารประกอบ PAHs ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีความเป็นพิษ ได้แก่ วิธีบำบัดทางเคมี เช่น วิธี Fenton's chemistry ซึ่งใช้อนุมูลอิสระของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในการออกซิไดส์สารประกอบ PAHs (Bogan และคณะ, 2003) หรือวิธีบำบัดทางกายภาพ เช่น วิธีดูดซับ (adsorption) บนวัสดุต่างๆ ได้แก่ ซีโอไลท์ (Chang และคณะ, 2004) หรือสารประกอบคาร์บอนแกรฟีน (Gotovac และคณะ, 2007) หรือการเผาด้วยอุณหภูมิสูง เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถบำบัดสารประกอบ PAHs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีข้อเสียคือ เทคโนโลยีที่ใช้ในการบำบัดมีความซับซ้อน มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง ไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากการบำบัดอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของคนงานที่รับหน้าที่ในการบำบัด รวมถึงคนที่อยู่บริเวณใกล้เคียงได้ เพราะฉะนั้นวิธี

ทางเลือกอีกวิธีหนึ่งคือ การบำบัดทางชีวภาพโดยใช้หลักการบำบัดด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารประกอบ PAHs เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อย่างสมบูรณ์มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมคือ ถูกเปลี่ยนไปเป็นมวลของจุลินทรีย์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้วิธีนี้เป็นที่ยอมรับของคนทั่วไป อีกทั้งเทคโนโลยีที่ใช้ในการบำบัดไม่ซับซ้อน และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานมีราคาถูกด้วย (Gray และคณะ, 1994; Vidali, 2001)

มีงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่ศึกษาการบำบัดสารประกอบ PAHs ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Pseudomonas cepacia* (Juhasz และคณะ, 1996) *Sphingomonas* sp. (Daugulis และ McCracken, 2003) *Rhodococcus wratislaviensis* (Pizzul และคณะ, 2007) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ราโดยเฉพาะราไวท์รอทก็ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในการบำบัดสารประกอบ PAHs เช่นเดียวกัน เนื่องจากราในกลุ่มนี้สามารถหลั่งเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์แลกเคสที่สามารถออกซิไดส์พอลิเมอร์ของลิกนินซึ่งมีโครงสร้างของวงแหวนอะโรมาติกที่คล้ายคลึงกับวงแหวนอะโรมาติกของสารประกอบ PAHs ได้ (Valentin และคณะ, 2007)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แลกเคสและรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผลิตจากราในกลุ่มไวท์รอทในการบำบัดสารประกอบ PAHs มีดังนี้

แลกเคสจากรา *Trametes versicolor* ถูกนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs 14 ชนิด โดยหลังจากการบ่มสารประกอบ PAHs กับแลกเคสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าอะซีแนพทิลีนถูกย่อยสลาย 37 เปอร์เซ็นต์ แอนทราซีน 18 เปอร์เซ็นต์ เบนโซเอไพรีน 19 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบ PAHs 8 ชนิดที่ถูกย่อยสลายประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ อะซีแนพทีน ฟลูออแรนทีน ไพรีน เบนโซเอแอนทราซีน ไครซีน เบนโซบีฟลูออแรนทีน เบนโซเคฟลูออแรนทีนและไพริลีน ส่วนแนพทาลีน ฟลูออรีนและฟีแนนทรีนไม่ถูกย่อยสลายด้วยแลกเคส แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเติม 1-hydroxybenzotriazole (HBT) ซึ่งมีหน้าที่เป็นมีเดียเอเตอร์ลงไปพบว่า อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน แอนทราซีน เบนโซเอไพรีนและไพริลีน ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนไพรีน เบนโซเอแอนทราซีน ถูกย่อยเพิ่มจาก 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 48 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารประกอบ PAHs อื่นๆ ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญ (Majcherczyk และคณะ, 1998)

แลกเคสจากราไวท์รอท *Ganoderma lucidum* Chaaim-001 BCU สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิด โดยสามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้อย่างสมบูรณ์ทั้งในปฏิกิริยาที่มีและไม่มีสารมีเดียเอเตอร์ ได้แก่ 1-hydroxybenzotriazole และสามารถย่อยสลายเบนโซเอไพรีน ฟลูออรีน อะซีแนพทีน อะซีแนพทิลีน และเบนโซเอแอนทราซีน ได้ถึง 100 98.6 95.4 90.1 และ85.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อมีสารมีเดียเอเตอร์ในปฏิกิริยา แต่ความสามารถของแลกเคสในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เหล่านี้ลดลงเป็น 71.71 62.9 80.49 85.85 และ 9.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อไม่มีสารมีเดียเอเตอร์ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Punnapayak และคณะ, 2009)

รา *Trametes versicolor* มียีน 4 ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแลกเคสทั้งหมด 4 ไอโซไซม์ ได้แก่ *lccα lccβ lccγ* และ *lccδ* ซึ่งทั้งหมดถูกโคลนและแสดงออกใน *Pichia pastoris* โดยรีคอมบิแนนท์แลกเคสทั้ง 4 ไอโซไซม์ ถูกนำไปใช้ทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แก่ แนพทาลีน ฟลูออรีน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน อะซีแนพทีน และอะซีแนพทิลีน แล้ววิเคราะห์ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง GC/MS พบว่า Lccβ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลารสารประกอบ PAHs สูงสุด โดยสามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ อะซีแนพทีน 50 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีน 18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Lccα สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ 30 เปอร์เซ็นต์ อะซีแนพทีน 20 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีน 10 เปอร์เซ็นต์ Lccγ สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีน 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Lccδ ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ใดๆ ได้เลย จากนั้นเมื่อเติมสารประกอบ ABTS ลงไปในปฏิกิริยาพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น โดย Lccβ สามารถย่อยฟลูออรีนได้เป็น 82 เปอร์เซ็นต์ อะซีแนพทีนใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีน 85 เปอร์เซ็นต์ Lccα ย่อยสลายฟลูออรีนได้เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ อะซีแนพทีน 35 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีน 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Lccγ พบมีการย่อยสลายฟลูออรีนแต่อยู่ในระดับต่ำมาก อะซีแนพทีนเพิ่มเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีนประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และ Lccδ พบมีการย่อยสลายฟลูออรีนในระดับต่ำมาก อะซีแนพทีน 25 เปอร์เซ็นต์ และอะซีแนพทิลีนประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมื่อมีการเติม ABTS แลกเคสทั้ง 4 ไอโซไซม์สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ซึ่ง Lccβ สามารถย่อยแอนทราซีนได้สูงที่สุดถึง 83 เปอร์เซ็นต์ Lccα 52 เปอร์เซนต์ Lccγ 63 เปอร์เซ็นต์ และ Lccδ สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ในระดับที่ต่ำมาก แต่อย่างไรก็ตามแลกเคสทั้ง 4 ไอโซไซม์ไม่สามารถย่อยสลายแนพทาลีนและฟีแนนทรีนได้ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสาร ABTS (Koschorreck และคณะ, 2008)

ยีนแลกเคสของรา *Myceliophthora thermophila* variant T2 (MtLT2) ถูกโคลนเข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพและความสามารถของแลกเคสในการทนต่อความเข้มข้นของสาร organic co-solvents ที่ใช้ในการเพิ่มการละลายของสารประกอบ PAHs ที่ถูกบำบัด แต่สาร organic co-solvents เหล่านี้มีผลเชิงลบต่อโครงสร้างของโปรตีน ดังนั้นจึงคัดเลือกโคลนที่สร้างขึ้นผ่านวิธี random mutagenesis แล้วทดสอบความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นต่างๆ ของอะซิโตไนไตรด์และเอทานอลด้วยวิธี directed evolution จากนั้นนำโคลน 2B10 ที่มีประสิทธิภาพในการทนต่ออะซิโตไนไตรด์ 30% (v/v) และเอทานอล 50% (v/v) เพิ่มขึ้น 7.5 และ 4.0 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวต้นแบบคือ MtLT2 จากการทดสอบการย่อยสลายแอนทราซีนความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ โดยในปฏิกิริยามีการเติมสารมีเดียเอเตอร์ ABTS และ organic co-solvents คือ อะซิโตไนไตรด์ 20% (v/v) พบว่าแอนทราซีนถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ใน 24 ชั่วโมง (Zumarraga และคณะ, 2007)

การศึกษายีนแลกเคสจากรา *Agrocybe sp.* CU43

กุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) ได้คัดแยกราจากแหล่งต่างๆในประเทศไทยเพื่อคัดกรองหาราที่มีศักยภาพสูงในการบำบัดสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และพบว่ารา *Agrocybe* sp. CU43 มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น แอนทราซีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน และชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น ฟลูออนทีน และไพรีนได้ จากงานวิจัยพบว่า *Agrocybe* sp. CU43 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนความเข้มข้น 100 ppm ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 6 วัน โดยในระหว่างการย่อยสลายนี้พบว่ามีแอกติวิตีการทำงานของแลกเคสประมาณ 470 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากฐานข้อมูลที่มีในปัจจุบันพบว่ายังไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของแลกเคสจากราในสกุล *Agrocybe* รายงานไว้ กุลนี ชูพึ่งอาตม์ จึงได้นำลำดับกรดอะมิโนของแลกเคสจากราหลายชนิดมาจัดเรียงเทียบ จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณจับอะตอมคอปเปอร์ที่มีการอนุรักษ์สูง แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU43 เป็นแม่แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าประมวลรหัสบางส่วนของแลกเคส

เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550) ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลกเคสจากรา *Agrocybe* sp. CU 43 จากงานวิจัยของ กุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) ในการโคลนจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนแลกเคสเต็มยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 ด้วยวิธีจีโนมวอร์กกิงซึ่งใช้

หลักการการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ nested PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ครั้งนี้ทำให้ได้ชิ้นส่วนของแลกเคส 2 ชิ้นส่วน เมื่อนำชิ้นส่วนทั้ง 2 มาจัดเรียงเทียบกันพบว่ายีนแลกเคสบนจีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาด 3,083 bp โดยมี CAAT box และ TATA box ที่ได้จากการทำนายที่บริเวณ 161 และ 54 bp เหนือจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ATG ตามลำดับ มีกรอบรหัสเปิดจากการทำนายขนาด 1,569 bp ซึ่งประกอบด้วยบริเวณอินทรอน 12 ตำแหน่ง มีขนาดตั้งแต่ 29 ถึง 81 bp และทำนายว่าจะแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 522 หมู่ และมี signal peptide ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน 1-19 โดยมีตำแหน่งตัด (cleavage site) ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 19 และ 20 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ต่อมาในงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ได้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จากงานวิจัยของเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550) เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสเต็มจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 และพบว่ายีนแลกเคสที่ได้มีขนาดประมาณ 2.4 kb อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการแสดงออกของยีนแลกเคสในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ประโยชน์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอจากงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการโคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แลกเคสในการบำบัดฟลูออรีนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Gyromax™737 บริษัท Amerex Instruments Inc., USA และรุ่น Innova™4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
2. เครื่องเขย่าเจล SDS-PAGE (Mini-rocker shaker) รุ่น MR-1 บริษัท Biosan Ltd., Latvia
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน รุ่น Accublock™ Digital Dry Bath บริษัท Labnet international, Inc., USA
4. เครื่องชั่ง รุ่น PG 6002-S และรุ่น AG285 บริษัท Mettler-Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ และโปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
6. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ (Ultra pure water) รุ่น Maxima บริษัท Elga, UK
7. เครื่องทำให้แห้งด้วยระบบสุญญากาศ (Freeze dryer) รุ่น FD-1 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan
8. เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose gel electrophoresis) รุ่น Mini gel electrophoresis system บริษัท Mupid-2 Advance, Japan และรุ่น i-Myrun electrophoresis complete system บริษัท Cosmo bio, Japan
9. เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโปรตีน (SDS-PAGE) รุ่น Mini PROTEAN®3 Cell บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Co., Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV -25, บริษัท Hirayama, Co.,Ltd., Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น SP220VAC บริษัท Bio-Active Co., Ltd., Thailand
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500, รุ่น 1920 และรุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Japan

13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Mikro120 บริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 5200 บริษัท Kubota Corporation, Japan
15. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
16. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer™ Instruments, USA
17. เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (Concentrator) รุ่น 5301 บริษัท Eppendorf AG, Germany
18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Thermo Spectronic, USA
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารพันธุกรรมด้วยรังสียูวี (UV-VIS spectometer) รุ่น Lambda25 และโปรแกรม UV Winlab บริษัท Perkin Elmer™ Instruments, USA
20. เครื่องวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ รุ่น Qubit® 2.0 Fluorometer บริษัท Invitrogen, USA
21. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler-Toledo Co., Ltd., Switzerland
22. เครื่อง UV transilluminator (Foto-Prep UV transilluminator) รุ่น Fotodyne 3-3500 บริษัท Pegasus Scientific Inc., USA
23. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น Clean บริษัท Lab Service Ltd., Part., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA และ Sanyo Electric, Japan
26. ตู้บ่ม (Incubator) รุ่น BE800 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
27. ตู้เย็น (Refrigerator) รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi Electric, Thailand
28. ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UE600 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
29. ตู้อบความร้อน รุ่น UL80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
30. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 บริษัท Gilson, France

31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
32. อ่างน้ำทำความเย็นควบคุมอุณหภูมิ รุ่น CCA-1110 และรุ่น cool ace CA-1111 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดอะซิติก บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
3. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
4. กลูโคส บริษัท Merck, Germany
5. กัวเอคอล บริษัท Fluka, USA
6. ไกลซีน บริษัท Amresco Inc., USA
7. คลอแรมเฟนิคอล บริษัท Nacalai tesque, Japan
8. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท RCL Labscan Co., Ltd., Ireland
9. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
10. คานามัยซิน บริษัท Nacalai tesque, Japan
11. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
12. โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) บริษัท May&Baker Ltd., England
13. ชุดสำเร็จสำหรับวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit บริษัท Invitrogen, USA
14. ชุดสำเร็จสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit บริษัท Qiagen, Germeny
15. ชุดสำเร็จสำหรับทำบริสุทธิ์โปรตีน TALON® Metal Affinity Resins User Manual บริษัท Clontech Laboratories, Inc., USA
16. ชุดสำเร็จสำหรับทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส QIAquick PCR Purification Kit บริษัท Qiagen, Germany
17. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germeny
18. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
19. ชุดสำเร็จสำหรับสังเคราะห์สาย cDNA สายแรก RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit บริษัท Fermentas, USA
20. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy

21. ซูโครส บริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
23. โซเดียมอะซิเตท (NaOAc) บริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
25. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
26. แบคโตเพบโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
27. แบคโตอะการ์ บริษัท Difco Laboratories, USA
28. โบรโมฟีนอลบลู บริษัท LabChem Inc., Australia
29. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
30. โพแทสเซียมอะซิเตท (KOAc) บริษัท Merck, Germany
31. ฟอร์มาไมด์(CH_3NO) บริษัท Bio Basic Inc., Canada
32. ฟีนอล (Equilibrated Phenol, pH 8.0) บริษัท USB Corporation, USA
33. ฟลูออรีน บริษัท Sigma-Aldrich, Co., USA
34. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
35. แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
36. แมงกานีส (II) ซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) บริษัท Merck, Germany
37. ยูเรีย (CH_4N_2O) บริษัท Merck, Germany
38. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma-Aldrich, Co., USA
39. สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท RCL Labscan Co., Ltd., Ireland
40. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Bio-Springer, France
41. อะกาโรสเจล (SeaKem® LE Agarose) บริษัท Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA
42. เอทานอล บริษัท Merck, Germany
43. เอธิเดียมโบรไมด์ บริษัท BioExcellence CO., Ltd., Thailand
44. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I บริษัท New England BioLabs, USA
45. เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest® *Nco*I, *Pst*I, *Xho*I, *Bgl*II บริษัท Fermentas, USA
46. เอนไซม์ Ribonuclease A (RNase A) บริษัท USBiological, USA

47. เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase with ThermoPol buffer บริษัท New England BioLabs, USA, *Taq* DNA Polymerase (recombinant) และ *pfu* DNA Polymerase บริษัท Fermentas, USA
48. เอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท New England BioLabs, USA
49. แอมพิซิลลิน บริษัท Bio Basic Inc., Canada
50. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท J.T.Baker, USA
51. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต [$(NH_4)_2S_2O_8$] บริษัท Bio Basic Inc., Canada
52. ไอรอน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
53. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt บริษัท Sigma-Aldrich, Co., USA
54. 2% Bis-Acrylamide บริษัท Amersham Biosciences AB, Sweden
55. 2-Mercaptoethanol บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
56. 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES) บริษัท Sigma-Aldrich, Co., USA
57. 6X Loading Dye บริษัท Fermentas, USA
58. 40% m/v ฟอร์มัลดีไฮด์ บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
59. 40% Acrylamide PAGE บริษัท Amersham Biosciences AB, Sweden
60. Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, USA)
61. Coomassie brilliant blue R250 บริษัท Fluka, Germany
62. dATP, dGTP, dTTP, dCTP บริษัท Fermentas, USA
63. DEPC ($C_6H_{10}O_5$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada
64. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Sigma-Aldrich, Co., USA
65. GeneRuler 1Kb DNA Ladder บริษัท Fermentas, USA
66. IPTG (Isopropyl thio-ß-D galactoside) บริษัท Fermentas, USA และ Promega, USA
67. MOPS, FREE ACID บริษัท Bio Basic Inc., Canada
68. Purified BSA 100X บริษัท New England BioLabs, USA
69. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) บริษัท Amresco Inc., USA
70. TEMED ($C_6H_{16}N_2$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada
71. Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] บริษัท Research organics, USA

72. Unstained Protein MW Marker บริษัท Fermentas, USA
73. X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-galactoside) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 รา

รา *Agrocybe* sp. CU43 (Chupungars และคณะ, 2009; กุลนี ชูพึ่งอาตม์, 2550) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลกเคส

3.3.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียและจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli สายพันธุ์ DH5α	*supE*44, *deoR*, Δ*lac*U169(φ80*lacZ*ΔM15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1	Hanahan (1983)
Escherichia coli สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS	F- *ompT hsd*S_B(r_B-m_B-) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522::*Tn*10 trxB* pLysSRARE (Cam^R, Kan^R, Tet^R)	Novagen, Germany

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลองนี้

พลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
pGEM®-T Easy Vector	Amp^r, P_{T7}, *lacZ*	Promega, USA
pET-26b(+)	Kan^R, $P_{T7\ lac}$, His·Tag®, *pelB* coding sequence	Novagen, Germany
pET-21c(+)	Amp^r, $P_{T7\ lac}$, T7·Tag®11, His·Tag®	Novagen, Germany
pET2126_4	Amp^r, พลาสมิด pET-21c(+) ที่บริเวณ multiple cloning site ถูกแทนที่ด้วยบริเวณ *pelB* coding sequence และ multiple cloning site ของ pET-26b(+)	สร้างในการทดลองนี้
pTTLC	Amp^r, พลาสมิด pGEM-T easy vector ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ lacC-F1 และ lacC-R5 แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pETSS_7	Amp^r, พลาสมิด pET2126_4 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแลกเคสที่เชื่อมต่ออยู่กับ His tag ทางด้าน 3' และทางด้าน 5' มี signal sequence ของยีนแลกเคสแทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pETNS_1	Amp^r, พลาสมิด pET2126_4 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแลกเคสที่เชื่อมต่ออยู่กับ His tag ทางด้าน 3' และทางด้าน 5' ไม่มี signal sequence ของยีนแลกเคสแทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-->3' (T_m)	เอกสารอ้างอิง
lacC-F1	GTC CCT TTG TTC TCG CA (57.2 องศาเซลเซียส)	เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550)
lacC-R5	CTG GGA AAT CAG TTG TTG AAG AC (61 องศาเซลเซียส)	สร้างในการทดลองนี้
lac F-1	ACC TGC ATC GGA CGC GAC TTT GAT CAA C (69 องศาเซลเซียส)	เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550)
lac-R1	ACG TTG ACG GAG TCG ACC TCG ATG ATC (69.2 องศาเซลเซียส)	เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550)
lacC-R3	AGT GAA CCA ATG TCC TCT CG (60.4 องศาเซลเซียส)	สร้างในการทดลองนี้
lacCFnoSS	ATT TCC AGC ACC TAT GCT GCC ATG GGT C (69 องศาเซลเซียส)	สร้างในการทดลองนี้
lacC-F4	TGT TCT CGC AAA CCA TGG TTC TC (62.8 องศาเซลเซียส)	สร้างในการทดลองนี้
lacC-R4	TGG GAG GAT CCT TGT TGA AGA CTT G (64.6 องศาเซลเซียส)	สร้างในการทดลองนี้

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1 การเก็บรักษารา

3.5.1.1 การเก็บรักษารา ในระยะสั้น

เขี่ยเส้นใยรา *Agrocybe* sp. CU43 ลงบนอาหารแข็งเอียง Malt extract agar (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.5.1.2 การเก็บรักษาในระยะยาว

เขี่ยเส้นใยรา *Agrocybe* sp. CU43 ลงบนอาหารแข็ง Malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยเลี้ยงในอาหารเหลว Malt extract (ภาคผนวก ก 2) นำไปบ่มโดยเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ นำเส้นใยมาทำไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) และเก็บรักษาในรูปเส้นใยแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

เลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็งเอียง Luria-Bertani (ภาคผนวก ก3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.5.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก4) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.6 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ

เลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 บนอาหารแข็ง malt extract ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยเขี่ยเส้นใยราใส่ในอาหารเหลว malt extract ปริมาตร 150 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีลูกแก้ว 7 ลูก นำไปบ่มโดยเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ เก็บเส้นใยราโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วล้างตะกอนเส้นใยราด้วยน้ำปลอดเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นชั่งเส้นใยราที่ได้ 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัดไนโตรเจน (ภาคผนวก ก5) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีลูกแก้ว 7 ลูก และมีฟลูออรีนความเข้มข้น 500 ppm (ภาคผนวก ข2) เพื่อใช้ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์แลกเคส นำไปบ่มโดยเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28

องศาเซลเซียส จากนั้นวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.6.1 และเก็บเส้นใยของราในวันที่ให้แอกติวิตีสูงสุดโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วห่อเส้นใยราด้วยฟอยล์ที่ปราศจากเชื้อแช่ลงในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปไลโอฟิไลซ์จนแห้ง เก็บเส้นใยราที่แห้งแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.1 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์แลกเคส

ทดสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์แลกเคสตามวิธีของ Bourbonnais และ Paice (1990) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย

น้ำเลี้ยงเชื้อ	ปริมาตรที่เหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสง	
500 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเทต (ความเป็นกรดเบส 4.5) (ภาคผนวก ข3)	250	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมลาร์ ABTS (ภาคผนวก ข4)	250	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเทตให้เป็น 2500 ไมโครลิตร บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 300 วินาที ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดย 1 หน่วยของแลกเคส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดส์ ABTS ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที (ε_{420} = 36000 $m^{-1}cm^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอจากรา *Agrocybe* sp. CU43

ก่อนการสกัดนำโกร่งและที่บดแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ภาคผนวก ข5) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ นำโกร่งแลที่บดที่แห้งแล้ว รวมถึงทิปที่ใช้ในการดูดสารและหลอดไมโครฟิวจ์ไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอบให้แห้ง โดยน้ำและอุปกรณ์ทั้งหมดไม่ใช้ร่วมกับงานด้านดีเอ็นเอ เริ่มต้นสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็ Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) บดเส้นใยราจากข้อ 3.6 ให้ละเอียดด้วยโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว (ระวังไม่ให้เส้นใยราเกิดการละลาย) เติม PureZOL 1 มิลลิลิตรต่อเส้นใย 100 มิลลิกรัม บดให้เข้ากันแล้วดูดแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร เขย่าหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นบ่มที่

อุณหภูมิห้อง 5 นาที โดยมีการผสมให้เข้ากันเป็นระยะ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสด้านบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข6) ที่เตรียมด้วยน้ำ DEPC (ภาคผนวก ข7) ลงไปในปริมาตรที่เท่ากันกับส่วนน้ำใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง ดูดสารละลายผสมทีได้ครั้งละ 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน RNA binding mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง แล้วทำซ้ำตัวอย่างอาร์เอ็นเอหมด เติมสารละลาย low-stringency wash 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง เติม DNaseI (ภาคผนวก ข8) 80 ไมโครลิตร ลงตรงกลางเมมเบรนของคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง เติมสารละลาย high-stringency 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงเพิ่มอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดูดน้ำ DEPC (อุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) 30-40 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางเมมเบรนของคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วชะคอลัมน์ด้วยน้ำ DEPC ซ้ำอีกครั้ง เก็บอาร์เอ็นเอที่ -70 องศาเซลเซียส

3.8 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.7 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260}และA_{280}) เพื่อหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สมการคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ</u>

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 40* x dilution factor

* เมื่อวัดค่า A_{260} ได้เท่ากับ 1.0 หมายถึงมีปริมาณอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวประมาณ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอคำนวณจากอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} โดยอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์สูงจะมีอัตราส่วนอยู่ที่ 1.8-2.1

3.9 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

แช่อุปกรณ์ทุกชิ้นที่ใช้ในการทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ นำอุปกรณ์ที่แห้งแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอบให้แห้ง เตรียมเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.9 กรัม ลงในขวดเตรียมเจลที่เตรียมไว้ตามวิธีข้างต้น เติมน้ำ DEPC ปริมาตร 44.5 มิลลิลิตร นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึก นำเจลไปละลายด้วยไมโครเวฟ แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นเติมน้ำ DEPC จนได้น้ำหนักเท่ากับที่จดบันทึกไว้ก่อนละลายเจล ผสม 10X MOPS buffer (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร กับฟอร์มัลดีไฮด์ปริมาตร 9.8 มิลลิลิตร ในหลอดผสมสาร แล้วเทลงในสารละลายเจล ผสมให้เข้ากัน เทลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวีเสียบ โดยระวังอย่าให้เกิดฟอง ปล่อยให้เจลแข็งตัว

เตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่จะใช้ทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยดูดแบ่งอาร์เอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นแล้วจากการวัดในข้อ 3.8 มาใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ หลอดละ 20 ไมโครกรัม แล้วนำอาร์เอ็นเอไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการผสมกับอาร์เอ็นเอ โดยผสมสารตามลำดับดังต่อไปนี้

ฟอร์มัลดีไฮด์	4 ไมโครลิตร
ฟอร์มาไมด์	10 ไมโครลิตร
10X MOPS buffer	2 ไมโครลิตร
เอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข10)	1 ไมโครลิตร
น้ำ DEPC	3 ไมโครลิตร

ผสมบัฟเฟอร์ให้เข้ากัน แล้วเติมลงในอาร์เอ็นเอที่แห้งแล้วหลอดละ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบาๆเพื่อละลายอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที นำเจลที่เตรียมไว้วางลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส เติม 1X MOPS running buffer ให้ท่วมเจล โหลดอาร์เอ็นเอที่ผสมกับบัฟเฟอร์แล้วทั้งหมดในหลุมเจล ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 50 นาที ตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล (Gel Documentation) โปรแกรม Quantity One และบันทึกผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การสังเคราะห์สาย cDNA สายแรกด้วยชุดสำเร็จ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)

สร้างสาย cDNA สายแรกจาก total RNA จากข้อ 3.7 ด้วยวิธี RT-PCR โดยเติมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาลงในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดนิวคลีเอสปลอดเชื้อที่แช่ในน้ำแข็งดังต่อไปนี้

total RNA	5	ไมโครกรัม
oligo $(dt)_{18}$ primer	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ DEPC ให้เป็น 12 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกสู่ก้นหลอดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารเพิ่มเติมตามลำดับดังต่อไปนี้

5Xreaction buffer	4	ไมโครลิตร
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
dNTPs mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข11)	2	ไมโครลิตร
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	20	ไมโครลิตร

ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกสู่ก้นหลอดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บ cDNA สายแรกที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.11 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA

3.11.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลกเคสจาก cDNA

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์มีชื่อว่า lacC-F1 (ตารางที่ 3.3) ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนแลกเคสบริเวณเหนือจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ซึ่งได้รับการออกแบบในงานวิจัยของ เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ (2550) ส่วนรีเวิร์สไพรเมอร์ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้จากการคาดเดาด้วยโปรแกรม FGENESH ตรงบริเวณสิ้นสุดการถอดรหัส ตั้งชื่อว่า lacC-R5 (ตารางที่ 3.3)

3.11.2 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เตรียมส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้

10X*Taq* buffer ใน $(NH_4)_2SO_4$	5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ lacC-F1 (50 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ lacC-R5 (50 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
cDNA	10	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	8	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (Fermentas, USA)	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 50 ไมโครลิตร

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 cycles
Annealing	: 51 องศาเซลเซียส	0.45	นาที	
Extension	: 72 องศาเซลเซียส	2.5	นาที	
Final extension	: 72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยชุดควบคุมผลบวกทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lac-R1

3.11.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจล 1 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งผงอะกาโรส 1 กรัมลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เติมบัฟเฟอร์ 1XTAE (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึก ละลาเจลด้วยไมโครเวฟ แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 1XTAE จนได้น้ำหนักเท่ากับที่จดบันทึกไว้ก่อนละลายเจล เทเจลที่ละลายแล้วลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวีเสียบ โดยระวังอย่าให้เกิดฟอง ปล่อยให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำเจลที่แข็งตัวแล้ววางลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส เท

บัฟเฟอร์ 1XTAE จนท่วมเจล โหลดผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีการผสมกับสีย้อม โดยให้สีย้อมมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เท่าลงในหลุมของเจล และโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 25-30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5-10 นาที จากนั้นนำเจลแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล (Gel Documentation) โปรแกรม Quantity One และบันทึกผล

3.12 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน

3.12.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน pGEM®-T easy vector (Promega, USA)

เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.11.2 เข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน pGEM®-T easy vector ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5	ไมโครลิตร
pGEM®-T easy vector	1	ส่วน
ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	1	ส่วน
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสให้เป็น 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

3.12.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001)

3.12.2.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีรูบิเดียมคลอไรด์ (Sambrook และ Russell, 2001)

ขีดเชื้อ *E. coli* DH5α ลงบนอาหารแข็ง ψb (ภาคผนวก ก6) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb (ภาคผนวก ก7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.3 ถ่ายเชื้อทั้ง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.48 นำฟลาสก์ไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเชื้อทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วกระจายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข13) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องผสมสาร ซึ่งในขั้นนี้ควรรักษาความเย็นของเชื้อโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นระยะๆระหว่างกระจายตะกอนเซลล์ จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วกระจายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข14) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตต์ชะตะกอนเบาๆ ซึ่งในขั้นตอนนี้ควรรักษาความเย็นของเชื้อโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นระยะๆระหว่างกระจายตะกอนเซลล์ จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปราศจากเชื้อหลอดละ 100 ไมโครลิตร ทำอย่างรวดเร็วแล้วแช่หลอดที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้

3.12.2.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock

นำคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ที่เก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาปล่อยให้ค่อยๆ ละลายในน้ำแข็ง จากนั้นดูดคอมพีเทนต์เซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีสารผสมจากปฏิกิริยาในข้อ 3.12.1 อยู่ ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที จากนั้นรีบแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ดูดเซลล์ของ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วกระจายเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข15) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการเกลี่ยผิวหน้าของอาหารแข็งไว้ก่อนด้วย 100 ไมโครลิตร ของสารละลายผสมของ X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside) (ภาคผนวก ข16) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารละลาย IPTG (Isopropyl thio-ß-D-galactoside) (ภาคผนวก ข17) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ นำเซลล์ที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสเหนือตะกอนทิ้งโดยให้เหลือไว้

ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงจนเซลล์กระจายตัวดี นำเซลล์ทั้งหมดมากระจายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้างต้น แล้วนำไปบ่มโดยไม่ให้สัมผัสกับแสง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีฟ้าและขาวที่เกิดขึ้น

3.12.3 การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ด้วยวิธี blue/white selection โดยโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีที่น่าจะมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ ส่วนโคโลนีสีฟ้ามีเวกเตอร์ตั้งต้นใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ ขีดเชื้อทั้งโคโลนีสีขาวและสีฟ้าลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเกลี่ยผิวหน้าอาหารด้วยสาร X-gal กับ IPTG นำไปบ่มโดยไม่ให้สัมผัสกับแสงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเก็บเชื้อ พร้อมกับกระจายเซลล์จากโคโลนีเดียวกันในหลอดไมโครฟิวจ์ที่บรรจุน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลอดละ 5 โคโลนี ยกเว้นโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบใส่เพียง 1 โคโลนี จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก จากนั้นดูดส่วนน้ำใสด้านบนซึ่งมีพลาสมิดดีเอ็นเอแม่แบบไปใช้ในการทำโคโลนีพีซีอาร์

เตรียมส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้

10X ThermoPol Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ lacC-F1 (50 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ lac-R1 (50 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	10	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (NEB, USA)	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 50 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 cycles
Annealing	: 51 องศาเซลเซียส	0.45	นาที	
Extension	: 72 องศาเซลเซียส	2	นาที	
Final extension	: 72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3

3.12.4 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis

นำทรานสฟอร์แมนต์จากชุดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ให้ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมาแยกเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลือกโคโลนีสีฟ้าที่มีเฉพาะเวกเตอร์จำนวน 1 โคโลนีมาปฏิบัติเช่นเดียวกันเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยวิธี Rapid alkaline lysis ดังนี้ (Sambrook และ Russell, 2001)

นำเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์จากอาหารเหลว 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Solution I (ภาคผนวก ข18) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องผสมสาร เติมสารละลาย Solution II (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันทันที โดยการกลับหลอดจนสารละลายในหลอดมีลักษณะใสและหนืด จากนั้นภายใน 3 นาที เติมสารละลาย Solution III (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันทันทีจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ โดยห้ามดูดติดตะกอนขาวที่ก้นหลอดขึ้นมา เติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนพลาสมิดโดยเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500

ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนพลาสมิดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นเติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข21) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบพลาดสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 และเก็บ พลาสมิดที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.12.5 การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแทรกอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.12.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (NEB, USA) โดยมีพลาสมิดจากโคโลนีสีฟ้าเป็นชุดควบคุมผลลบ โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิด	5	ไมโครลิตร
10X *Eco*RI buffer	1.5	ไมโครลิตร
*Eco*RI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง และตรวจสอบพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3

3.12.6 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่ด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germeny) (ภาคผนวก ข22) เพื่อใช้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด

ขีดแยกเชื้อทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่จากการตรวจสอบในข้อ 3.12.5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เทส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง ทำซ้ำจนหมด เติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตรแล้วกระจายตะกอนเซลล์ออกจากก้นหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องผสมสาร เติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันทันทีโดยการกลับหลอดจนสารละลายในหลอดมีลักษณะใสและหนืด จากนั้นภายใน 3 นาที เติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันทันทีจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ QIAprep spin column โดยห้ามดูดติดตะกอนขาวที่ก้นหลอดขึ้นมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 1 นาที เทส่วนน้ำใสด้านล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 1 นาที เทส่วนน้ำใสด้านล่างทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 1 นาที เพื่อขจัดบัฟเฟอร์ที่เหลืออยู่ ย้าย QIAprep spin column ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ชะพลาสมิดโดยใส่น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วชะพลาสมิดซ้ำอีกครั้ง ตรวจสอบพลาดสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 และเก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยบริษัท 1st BASE ประเทศสิงคโปร์ ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pTTLC

3.13 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก และการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B(DE3)pLysS

3.13.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลกเคส เพื่อการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลกเคสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจากการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC โดยออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่มีในยีนแลกเคส ซึ่งวิเคราะห์จากโปรแกรม NEBcutter V2.0 ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (lacC-F4) ซึ่งออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I ที่บริเวณจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส และฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (lacCFnoSS) ที่ออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I ที่บริเวณหลังลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal sequence ของยีนแลกเคส ส่วนรีเวิร์สไพรเมอร์ (lacC-R4) ออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่บริเวณจุดสิ้นสุดของการถอดรหัส แต่ไม่รวมรหัส stop codon ในโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

3.13.2 การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกโดยแทนที่ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-26b(+) กับบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+)

3.13.2.1 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pET-26b(+) เข้าสู่ *E. coli* DH5α

ทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pET-26b(+) (ภาคผนวก ค2) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.12.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน (ภาคผนวก ข23) ความเข้มข้นสุดท้าย 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีเดี่ยวของทรานสฟอร์แมนต์เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.12.6 ตรวจสอบขนาดของเวกเตอร์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

เวกเตอร์	5	ไมโครลิตร
10X *Bam*HI buffer	1.5	ไมโครลิตร
*Bam*HI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (NEB, USA)	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง และตรวจสอบเวกเตอร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3

3.13.2.2 การวัดความเข้มข้นของเวกเตอร์ (ดีเอ็นเอ) ด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA)

เตรียม Qubit™ working solution โดย dilute สารละลาย Qubit™ dsDNA BR reagent ในอัตราส่วน 1 ต่อ 200 ด้วยสารละลาย Qubit™ dsDNA BR buffer จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 และ 2 โดยดูด Qubit™ working solution ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในหลอด Qubit™ assay ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมดีเอ็นเอมาตรฐานลงไปปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร 2-3 วินาที ระวังไม่ให้เกิดฟอง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที สำหรับการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอทำด้วยวิธีเดียวกัน แต่ปริมาตรของ Qubit™

working solution สามารถปรับได้ในช่วง 180-199 ไมโครลิตร โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Qubit® 2.0 Fluorometer

3.13.2.3 การตัดชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+)

เตรียมชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+) เพื่อใช้ในการแทนที่บริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+) (ภาคผนวก ค3) โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Bgl*II (Fermentas,USA) ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

pET-26b(+)	16	ไมโครกรัม
2X Tango buffer	150	ไมโครลิตร
*Xho*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
*Bgl*II (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยการเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข24) 1 เท่า ของปริมาตรสุทธิในปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำใสด้านบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่โดยไม่ไปรบกวนชั้นตะกอนโปรตีนตรงกลางแล้วเติมโซเดียมอะซิเทต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตรสุทธิของส่วนน้ำใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยกากลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกให้หมด นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำปลอประจุปลอดเชื้อ 50 ไมโครลิตร

3.13.2.4 การตัดชิ้นส่วนบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-21c(+)

เตรียมเวกเตอร์ pET-21c(+) เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+) ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.13.2.3 โดยแทนที่บริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-21c(+) ที่ถูกตัดออก

ขีดเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีเวกเตอร์ pET-21c(+) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.12.6 และตรวจสอบเวกเตอร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 จากนั้นวัดความเข้มข้นของเวกเตอร์ด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.2.2 แล้วตัดบริเวณ multiple cloning site ออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Bgl*II ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

pET-21c(+)	13	ไมโครกรัม
2X Tango buffer	150	ไมโครลิตร
*Xho*I	2	ไมโครลิตร
*Bgl*II	2	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เข้มข้นตามวิธีในข้อ 3.13.2.3

3.13.2.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germeny) (ภาคผนวก ข25)

ตัดแยกเฉพาะชิ้นส่วนของเวกเตอร์ที่ต้องการโดยใช้ชุดสำเร็จ QIAquick Gel Extraction Kit โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของเวกเตอร์ pET-26b(+) และ pET-21c(+) จากข้อ 3.13.2.3 และ 3.13.2.4 ตามวิธีในข้อ 3.11.3 โดยโหลดเวกเตอร์ทั้ง 2 ลงไปทั้งหมด นำเจลไปถ่ายรูปเก็บไว้ด้วยเครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล จากนั้นนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator โดยใช้รังสียูวีในช่วง preparative จากนั้นใช้มีดที่จุ่มเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์แล้วผ่านไฟก่อนใช้มาตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ นำชิ้นส่วนเจลที่ตัดแล้วหั่นแบ่งเป็น

ชิ้นเล็กๆใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ผ่านการชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่งมาแล้ว จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักของเจล (น้ำหนักของเจลไม่ควรเกิน 400 มิลลิกรัมต่อหลอด) เติม QG Solubilization buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 2 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด ดูดสารละลายใส่ลงใน QIAquick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำซ้ำจนกว่าสารละลายหมด จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย QG Solubilization buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรอีกหนึ่งครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม PE wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือ ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ชะดีเอ็นเอด้วยการใส่น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางเมมเบรนของคอลัมน์ บ่ม 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปวางบนหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่แล้วชะซ้ำอีกครั้ง ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 นำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จ Qubit ตามวิธีในข้อ 3.12.2.2 และเก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3.13.2.6 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-26b(+) กับบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+)

นำชิ้นส่วนทั้งสองที่เตรียมไว้จากข้อ 3.13.2.5 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (NEB, USA) ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

10XT4 DNA Ligase Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pET-26b(+)	3	ส่วน
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pET-21c(+)	1	ส่วน
T4 DNA Ligase (400 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง โดยมีปฏิกิริยาที่ใส่เฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pET-21c(+) เป็นชุดควบคุม และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ตาม

วิธีในข้อ 3.12.2.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของทรานสฟอร์แมนต์จากทั้งสองชุดปฏิกิริยาจำนวนหนึ่งลงอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพลทใหม่ พร้อมกับเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis ตามวิธีในข้อ 3.12.4 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I (Fermentas, USA) และ *Nco*I (NEB, USA) เพื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	5	ไมโครลิตร
10X Buffer O	1.5	ไมโครลิตร
*Pst*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
*Nco*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาขีดแยกเชื้อบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.12.6 แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยบริษัท 1st BASE ประเทศสิงคโปร์ และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pET2126_4

3.13.2.7 การเตรียมเวกเตอร์ pET2126_4 เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับยีนแลกเคส

นำเวกเตอร์ pET2126_4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I (NEB, USA) และ *Bam*HI (NEB, USA) โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

pET2126_4	36	ไมโครกรัม
10X buffer3	61	ไมโครลิตร
BSA (10มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	6.1	ไมโครลิตร
*Nco*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	4	ไมโครลิตร
*Bam*HI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	4	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 610 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง จากนั้นทำเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์มตามวิธีในข้อ 3.13.2.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.13.3 การเตรียมชิ้นยีนแลกเคสเพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET2126_4

3.13.3.1 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบ

เตรียมส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้

10X*pfu* DNA polymerase buffer+$MgSO_4$ (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ lacC-F4 หรือ lacCFnoSS	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ lacC-R4	1	ไมโครลิตร
dNTPs	2	ไมโครลิตร
pTTLC	0.5	ไมโครลิตร
pfu DNA polymerase (Fermentas, USA)	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 50 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 cycles
Annealing	: 53 องศาเซลเซียส	0.45	นาที	
Extension	: 72 องศาเซลเซียส	4	นาที	
Final extension	: 72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 วัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.2.2

3.13.3.2 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข26)

เติมบัฟเฟอร์ PB 5 เท่าของปริมาตรสุทธิของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายไปใส่ใน QIAquick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วินาที ซ้ำอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปตรงกลางคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วซะซ้ำอีกครั้ง เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3.13.3.3 การตัดชิ้นยีนแลกเคสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET2126_4

นำชิ้นยีนแลกเคสจากข้อ 3.13.3.2 ทั้งที่มีและไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal sequence จากรามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest® *Nco*I (Fermentas, USA) และ

*Bam*HI (NEB, USA) เพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET2126_4 จากข้อ 3.13.2.7 ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ยีนแลกเคส	150	ไมโครลิตร
10X FastDigest® buffer	7	ไมโครลิตร
FastDigest® *Nco*I	2	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 170 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ทำบริสุทธิ์ยีนแลกเคสที่ตัดแล้วด้วยชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.3.2 แล้วนำไปตัดต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ยีนแลกเคสที่ตัดด้วย *Nco*I	100	ไมโครลิตร
10X *Bam*HI buffer	12	ไมโครลิตร
*Bam*HI	1	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 120 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ทำบริสุทธิ์ยีนแลกเคสที่ตัดแล้วด้วยชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.3.2 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 แล้ววัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.2.2

3.13.4 การเชื่อมต่อยีนแลกเคสเข้ากับเวกเตอร์ pET2126_4

เชื่อมต่อยีนแลกเคสจากข้อ 3.13.3.3 ทั้งที่มีและไม่มี signal sequence ของยีนแลกเคสจากรา *Agrocybe* sp. CU43 กับเวกเตอร์ pET2126_4 จากข้อ 3.13.2.7 ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

10XT4 DNA Ligase Reaction Buffer	1.5	ไมโครลิตร
pET2126_4	1	ส่วน
ยีนแลกเคส	3	ส่วน
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 15 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง โดยมีปฏิกิริยาที่ไม่ใส่ยีนแลกเคสเป็นชุดควบคุม และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.12.2.2 แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และทำโคโลนีพีซีอาร์ตามวิธีในข้อ 3.12.3

เตรียมส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้

10X ThermoPol Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ lacCFnoss	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ lacC-R4	1	ไมโครลิตร
dNTPs	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	10	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 50 ไมโครลิตร

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	: 94 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 cycles
Annealing	: 54 องศาเซลเซียส	0.45	นาที	
Extension	: 72 องศาเซลเซียส	2	นาที	
Final extension	: 72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.11.3 จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนต์จากชุดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ให้ขนาดที่ต้องการมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis ตามวิธีในข้อ 3.12.4 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	5	ไมโครลิตร
10X *Eco*RI buffer	1.5	ไมโครลิตร
*Eco*RI	0.5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาขีดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.12.6 แล้วตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้ววัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ Quant-it™ dsDNA BR Assay Kit ตามวิธีในข้อ 3.13.2.2 ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี signal sequence ของยีนแลกเคสว่า pETSS_7 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่มี signal sequence ของยีนแลกเคสว่า pETNS_1 จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกในทั้ง 2 พลาสมิด โดยบริษัท 1st BASE ประเทศสิงคโปร์

3.13.5 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 และ pETNS_1 เข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS

ทรานสฟอร์ม pETSS_7 และ pETNS_1 จากข้อ 3.13.4 เข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ตามวิธีในข้อ 3.12.2.2 เพื่อการผลิตเอนไซม์แลกเคส โดยคอมพีเทนเซลล์เตรียมตามวิธีในข้อ 3.12.2.1 แต่ในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ต้องเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (ภาคผนวก ข27) ความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จำนวนหนึ่งเลี้ยงบนอาหารเดียวกันเพลทใหม่ บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ไปใช้ทดสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสต่อไป

3.14 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลกเคส

3.14.1 การทดสอบขั้นต้นของการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จุดเชื้อ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีกัวเอคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรต คอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ (Joo และคณะ, 2008; Lu และคณะ, 2009) และมีการเกลี่ยผิวหน้าอาหารด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สังเกตโซนสีน้ำตาลแดงที่เกิดขึ้นจากการออกซิไดส์สับสเตรต

3.14.2 การชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์แลกเคสในอาหารเหลว

นำทรานสฟอร์มแมนต์จากข้อ 3.13.5 ที่ผ่านการทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 และ pETNS_1 มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการแสดงออกของเอนไซม์ โดยลงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเดียวกันปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.6 เติมสารละลาย IPTG ลงไป ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อออก แล้วนำตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์แลกเคส

3.14.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์แลกเคสด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

เตรียม SDS-PAGE เจลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์แลกเคสดังต่อไปนี้

เตรียม Seperating gel ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายต่างๆดังนี้

40% Acrylamide	2.43	มิลลิลิตร
2% Bis-Acrylamide	1.34	มิลลิลิตร
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8 (ภาคผนวก ข28)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข29)	0.1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	3.58	มิลลิลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ภาคผนวก ข30)	50	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายลงในช่องกระจกเตรียมเจล โดยให้มีความสูงต่ำกว่าหวีเสียบประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไปที่ผิวหน้าประมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็ง จากนั้นเทน้ำออกจนหมด แล้วเติม Stacking gel ลงไป

เตรียม Stacking gel โดยผสมสารละลายต่างๆดังนี้

40% Acrylamide	0.48	มิลลิลิตร
2% Bis-Acrylamide	0.26	มิลลิลิตร
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 (ภาคผนวก ข31)	1.26	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.92	มิลลิลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต	25	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาตรสุทธิ	5	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายลงในช่องกระจกเตรียมเจลทับผิวหน้าของ Seperating gel จนพอดีขอบกระจก เสียบหวีลงไป แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็ง จากนั้นนำเจลไปประกอบในแท้งค์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วเท 1X SDS running buffer (ภาคผนวก ข32) ลงไปให้ท่วมเจลด้านในและให้ท่วมขดลวดนำไฟฟ้าด้านนอก

เตรียมตัวอย่างสำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำตะกอนเซลล์จากข้อ 3.14.1 มาเติมสีย้อม 2X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข 33) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โหลดตัวอย่างลงไปในแต่ละหลุมของเจลที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 40 ไมโครลิตร ส่วน Unstained Molecular weight protein (Fermentas, USA) (ภาคผนวก ข34) ซึ่งใช้เป็น marker โหลด 10 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ค่าความต่างศักย์ 200 โวลต์ 50 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมดูโปรตีนด้วยสี Coomassie blue staining (ภาคผนวก ข35) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีที่ไม่ติดที่โปรตีนออกจากเจลด้วย Destaining solution (ภาคผนวก ข36) และเปลี่ยน Destaining solution จนกระทั่งพื้นหลังใส นำไปถ่ายรูปบันทึกผล

3.14.4 การตรวจสอบแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วย zymogram staining

นำทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ซึ่งสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสได้มาทดสอบแอกติวิตีด้วยวิธี zymogram staining ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Salony และคณะ (2006), Garcia และคณะ (2007) และ Salony และคณะ (2008) เริ่มจากทำอิเล็กโทรโฟเรซิส SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์แลกเคสตามวิธีในข้อ 3.14.2 โดยปั่นเก็บเซลล์ที่ผ่านการชักนำด้วย IPTG แล้วละลายด้วย 50 ไมโครลิตร 2X Laemmli buffer จากนั้นโหลดตัวอย่างลงในเจล SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์โดยไม่ต้องต้ม ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเจลที่ได้มาล้างในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้งๆ ละ 45 นาที แล้วย้ายเจลไปใส่ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสับสเตรต ABTS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูการมีแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคสจากแถบสีเขียวที่ปรากฏขึ้นบนเจล

3.15 การแปรผันภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคส

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคส ได้นำทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์แลกเคส pETNS_1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 แล้วนำไปแปรผันภาวะในการเลี้ยงต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.15.1 แปรผันอุณหภูมิ

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 แล้ว เติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหาร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อในแต่ละอุณหภูมิให้เท่ากันโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร แล้วปั่นเก็บเซลล์นำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วย SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.14.2

3.15.2 แปรผันความเข้มข้น IPTG

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 แล้ว เติม IPTG แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 25 50 100 200 400 600 800และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ลงในอาหาร แล้วนำไปเลี้ยงในอุณหภูมิที่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสสูงที่สุดในข้อ 3.15.1 บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อในแต่ละอุณหภูมิให้เท่ากันโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร แล้วปั่นเก็บเซลล์ นำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วย SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.14.2

3.15.3 แปรผันเวลา

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 แล้ว เติม IPTG ความเข้มข้นที่ให้การแสดงออกรีคอมบิแนนท์แลกเคสมากที่สุดในข้อ 3.15.2 ลงในอาหาร แล้ว

นำไปเลี้ยงในอุณหภูมิที่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสสูงที่สุดที่ได้ในข้อ 3.15.1 บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อในแต่ละอุณหภูมิให้เท่ากันโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร แล้วปั่นเก็บเซลล์ นำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วย SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.14.2

3.16 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins (Clontech, USA) (ภาคผนวก ข37)

3.16.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์แลกเคสเพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ที่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสในภาวะที่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกตามวิธีในข้อ 3.14.1 โดยนำตะกอนเซลล์จากการเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย denaturing buffer ลงไปปริมาตร 14 มิลลิลิตร เขย่าจนได้สารละลายใส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วดูดส่วนใสเก็บไว้โดยไม่รบกวนตะกอน และเก็บส่วนใสไว้ส่วนหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.14.2 ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.16.2 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins

ดูดสารแขวนลอยเรซินปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1X equilibration buffer ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง แล้วทำขั้นตอนการเติมสารละลาย 1X equilibration buffer ซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่เตรียมไว้ในข้อ 3.15.1 ลงในเรซิน ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มโดยเขย่า เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จากนั้นล้างเรซินครั้งแรกโดยเติม denaturing buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มโดยเขย่า เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE แล้วล้างเรซินซ้ำอีก 1 ครั้งด้วยวิธีการข้างต้น เติม denaturing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป แล้วย้ายเรซินลงสู่คอลัมน์ขนาด 2 มิลลิลิตร รอให้เรซินตกรวมกันที่ก้นคอลัมน์ จากนั้น

ปล่อยบัฟเฟอร์ออกจากคอลัมน์ แล้วเติม denaturing buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป ปล่อยบัฟเฟอร์ออกจากคอลัมน์ แล้วชะรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยเติม 1X elution buffer ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเรซิน fraction ละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสีย้อม 5X SDS-PAGE sample buffer (ภาคผนวก ข38) 12 ไมโครลิตร

ส่วนเรซินที่ผ่านการใช้งานแล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยการล้างด้วยสารละลายต่างๆ ตามลำดับดังนี้

1X equilibration bufferปริมาตร	5	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร	3	มิลลิลิตร
เอทานอล 25 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร	5	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร	3	มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร (ความเป็นกรดเบส 8.0)	5	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร	3	มิลลิลิตร
100 มิลลิโมลาร์ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ปริมาตร (ภาคผนวก ข39)	2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร	3	มิลลิลิตร
เอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร	1	มิลลิลิตร

ดูดเรซินใส่หลอดไมโครฟิวจ์ แล้วแช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.16.3 การวัดปริมาณความเข้มข้นโปรตีนด้วย Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, USA)

ทำ standard ของโปรตีน BSA เพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยช่วงความเข้มข้นของ BSA ที่ใช้ในการทำ stardard อยู่ระหว่าง 1.2 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมสารต่างๆ ในปฏิกิริยาดังนี้

BSA ในความเข้มข้นต่างๆ	800	ไมโครลิตร
Dye	200	ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อง 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งในการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างทำเช่นเดียวกัน

3.16.4 การ refolding รีคอมบิแนนท์แลกเคส

ตัดถุง dialyse ให้มีความยาวประมาณ 15 เซ็นติเมตร จากนั้นนำไปต้มกับ EDTA 1 เปอร์เซ็นต์ ล้างในน้ำกลั่นจนไม่มีกลิ่นของ EDTA เหลืออยู่แล้วแช่ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ จากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในข้อ 3.16.2 ลงในถุง dialyse ที่ผูกปลายด้านหนึ่งด้วยด้ายไว้ก่อนแล้ว จากนั้นมัดปิดปากถุงด้วยด้าย แล้วนำไป dialyse ในบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก 40) ที่มีความเข้มข้นของยูเรียเริ่มจาก 8 6 4 2 1 0.5 0.25 และ 0 โมลาร์ ตามลำดับ ทำ dialyse โดยให้ปฏิกิริยาอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ยกเว้นที่ความเข้มข้นยูเรีย 8 โมลาร์ทำที่อุณหภูมิห้อง และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 3 ชั่วโมง ดูดเก็บโปรตีนที่ผ่านการ dialyse ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อ แล้วนำไปวัดความเข้มข้นโปรตีนตามวิธีในข้อ 3.16.3 และทดสอบแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.6.1 กับวิธี zymogram staining ตามวิธีในข้อ 3.14.3 เก็บรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการ refolding ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.17 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบริสุทธิ์ในการย่อยสลายฟลูออรีน

นำรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.16.4 มาทดสอบการย่อยสลายฟลูออรีนตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Koschorreck และคณะ (2008) โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายมีการผสมสารดังนี้

ฟลูออรีนความเข้มข้น	0.1	มิลลิโมลาร์
ABTS	1	มิลลิโมลาร์
บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5)	0.1	โมลาร์
รีคอมบิแนนท์แลกเคส	1.5	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	5	มิลลิลิตร

ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมแลกเคส บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0 10 20 30 40 50 60 90 และ 120 นาที ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งล

300 ไมโครลิตร แล้วสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตอบแห้งทีละน้อยจนกระทั่งอิ่มตัว ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน วิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC

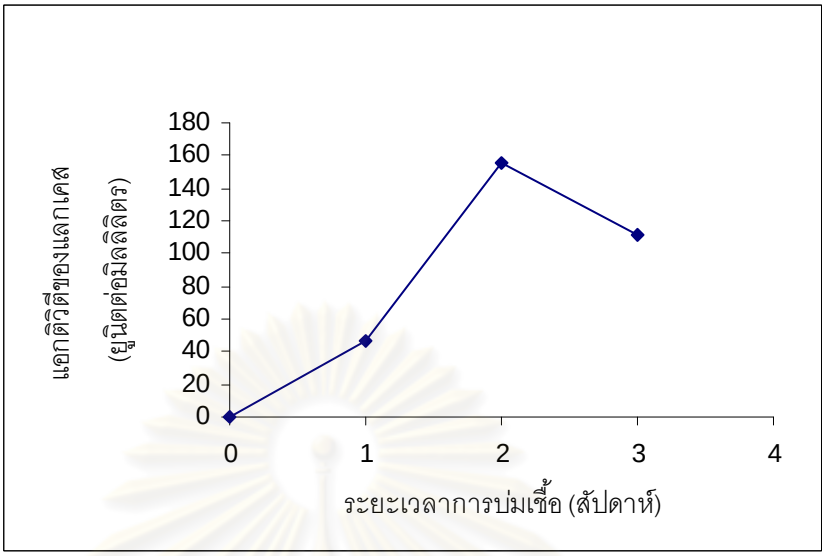
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อการสกัด total RNA

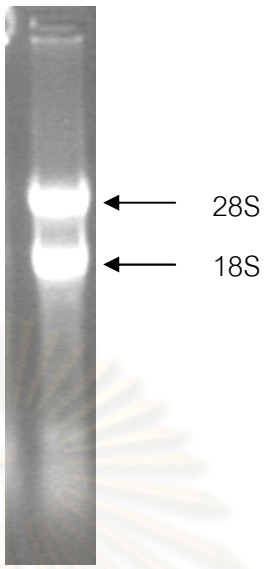
จากการเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 ในภาวะที่มีการชักนำด้วยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 ppm เพื่อให้เกิดการผลิตแลกเคสตามวิธีในข้อ 3.6 เมื่อดูแนวโน้มแอกติวิตีของแลกเคสจากงานวิจัยของกุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) และ Chupungars และคณะ (2009) พบว่าราจะมีแอกติวิตีของแลกเคสสูงสุดในวันที่ 21 โดยมีแอกทิวิตีอยู่ที่ 470 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นแอกติวิตีจะลดลงในสัปดาห์ที่ 4 แต่ในงานวิจัยนี้รูปแบบของแอกติวิตีแตกต่างจากผลการทดลองในงานวิจัยของกุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) และ Chupungars และคณะ (2009) โดยพบว่าในวันที่ 14 ของการเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 แลกเคสมีแอกติวิตีสูงสุดคือ 155.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งบอกถึงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแลกเคสในระดับสูง และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 21 พบว่ารามีแอกติวิตีของแลกเคสลดลงอยู่ที่ 111.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ทำให้ต้องเก็บเส้นใยราโดยการไลโอฟิไลซ์ให้แห้งในวันที่ 21 แม้ว่าจะไม่ใช่วันที่ให้แอกติวิตีสูงสุด แล้วนำไปใช้ในการสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.7 ด้วยชุดสำเร็จ Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit จากนั้นนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ total RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ผลการวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดจากเส้นใย 5 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงโดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง A260/A280 อยู่ในช่วง 1.88-1.93 จึงนำ total RNA ทั้งหมดมารวมกัน จากนั้นนำ total RNA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ไปทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9 เพื่อตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ total RNA ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งแสดงถึง total RNA ที่สกัดได้จากรา *Agrocybe* sp. CU43 ว่าประกอบด้วย ribosomal RNA ขนาด 18S และ 28S total RNA ที่สกัดได้โดยมีคุณภาพดี มีแถบของ RNA ที่คมชัด ไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA ต่อไป



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของแลกเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) กับระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 (สัปดาห์)

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA จากตัวอย่างเส้นใย 5 ตัวอย่าง ค่าที่ได้มาจาก RNA ที่เจือจาง 1:100 เท่า

ตัวอย่าง	A260	A280	ปริมาณ total RNA (µg/µl)	A260/A280
1	0.2182	0.1157	0.8726	1.89
2	0.1780	0.0921	0.712	1.93
3	0.2289	0.1216	0.9156	1.88
4	0.1806	0.0962	0.7224	1.88
5	0.1783	0.0932	0.7132	1.91

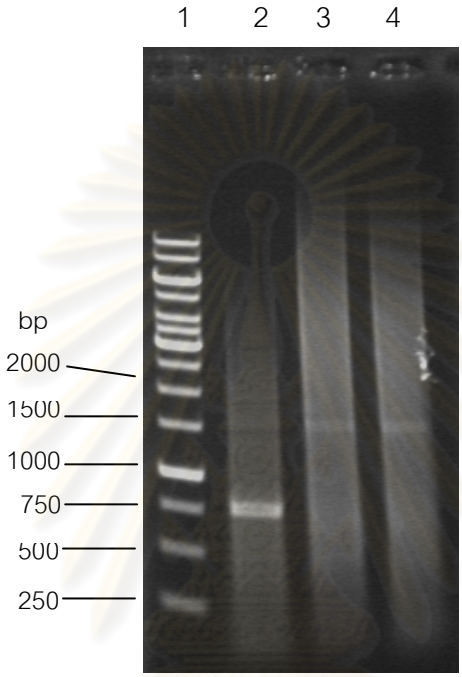


รูปที่ 4.2 ภาพการทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของ total RNA ที่สกัดได้จากรา *Agrocybe* sp. CU43 หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 500 ppm เป็นเวลา 21 วัน

4.2 การเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA

นำ total RNA ที่สกัดได้จากข้อ 4.1 มาใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA สายแรกตามวิธีในข้อ 3.10 จากนั้นนำสาย cDNA สายแรกที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lacC-R5 ส่วนชุดควบคุมผลบวกทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 จากนั้นตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU43 ที่ได้จากงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ด้วยโปรแกรม FGENESH (www.softberry.com) ควรได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,569 bp และชุดควบคุมควรได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 750 bp นอกจากนี้หากในตัวอย่าง total RNA มีจีโนมิกดีเอ็นเอปนเปื้อนจะทำให้ชุดควบคุมเกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,200 bp ด้วย ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.3 ในช่องที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวกผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 750 bp เพียงขนาดเดียว ซึ่งแสดงว่า cDNA สายแรกที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสมบูรณ์ ไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ และเหมาะสมที่จะใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนแลกเคส

ส่วนในช่องที่ 3 และ 4 แสดงผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ขนาดประมาณ 1,500 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนแลกเคสตรงตามที่วิเคราะห์ไว้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบ



รูปที่ 4.3 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนแลกเคสจาก cDNA สายแรก

ช่องที่ 1 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

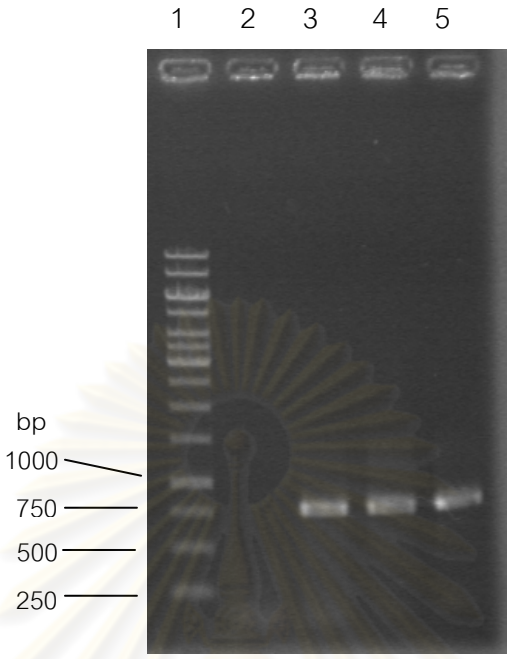
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 ที่มี cDNA สายแรกเป็นแม่แบบ (ชุดควบคุมผลบวก)

ช่องที่ 3 และ 4 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F1 และ lacC-R5 ที่มี cDNA สายแรกเป็นแม่แบบ

4.3 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนและการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

นำยีนแลกเคสจากข้อ 4.2 ที่เพิ่มจำนวนจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน pGEM®-T easy vector ตามวิธีในข้อ 3.12.1 แล้วทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการเกลี่ยผิวหน้าของอาหารแข็งไว้ก่อนด้วย 100 ไมโครลิตร ของสารละลายผสมของ X-gal ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารละลาย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ มาตรวจสอบการได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ตามวิธีในข้อ 3.12.3 โดยในแต่ละหลอดปฏิกิริยาของการทำโคโลนีพีซีอาร์จะประกอบด้วย 3-4 ทรานสฟอร์แมนต์ แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 750 bp โดยมีชุดควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนต์ที่มีโคโลนีสีฟ้าซึ่งได้รับเวกเตอร์ pGEM®-T easy vector ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.4 ในช่องที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบไม่ให้ผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์เนื่องจากโคโลนีสีฟ้าเป็นทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีการแทรกของยีนแลกเคส ส่วนช่องที่ 3-5 เป็นการทำโคโลนีพีซีอาร์ของทรานสฟอร์แมนต์ที่มีโคโลนีสีขาว ซึ่งปรากฏผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ขนาด 750 bp ตามที่ต้องการ จึงสามารถสรุปได้ว่าทรานสฟอร์แมนต์ที่อยู่ในแต่ละปฏิกิริยาจากการทำโคโลนีพีซีอาร์มีทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 เพื่อตรวจสอบหาทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่

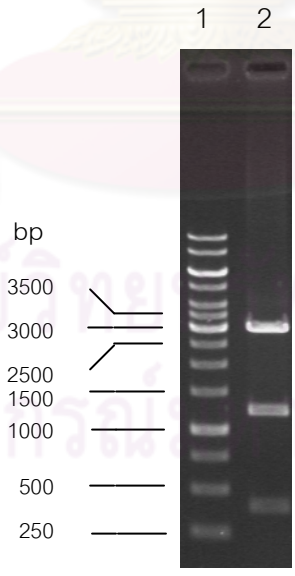
ช่องที่ 1 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 ที่มีพลาสมิดจากโคโลนีสีฟ้าเป็นแม่แบบ (ชุดควบคุมผลลบ)

ช่องที่ 3-5 ผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F1 และ lac-R1 ที่มีพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวเป็นแม่แบบ

จากนั้นเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่อยู่ในปฏิกิริยาโคโลนีพีซีอาร์ของช่องที่ 4 ในรูปที่ 4.4 ซึ่งมีทั้งหมด 3 ทรานสฟอร์แมนต์ไปแยกเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบว่าทรานสฟอร์แมนต์ใดที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่โดยการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis ตามวิธีในข้อ 3.12.4 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ตามวิธีในข้อ 3.12.5 เพื่อตรวจสอบการแทรกอยู่ของยีนแลกเคส ซึ่งจากการคำนวณขนาดดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ควรได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด

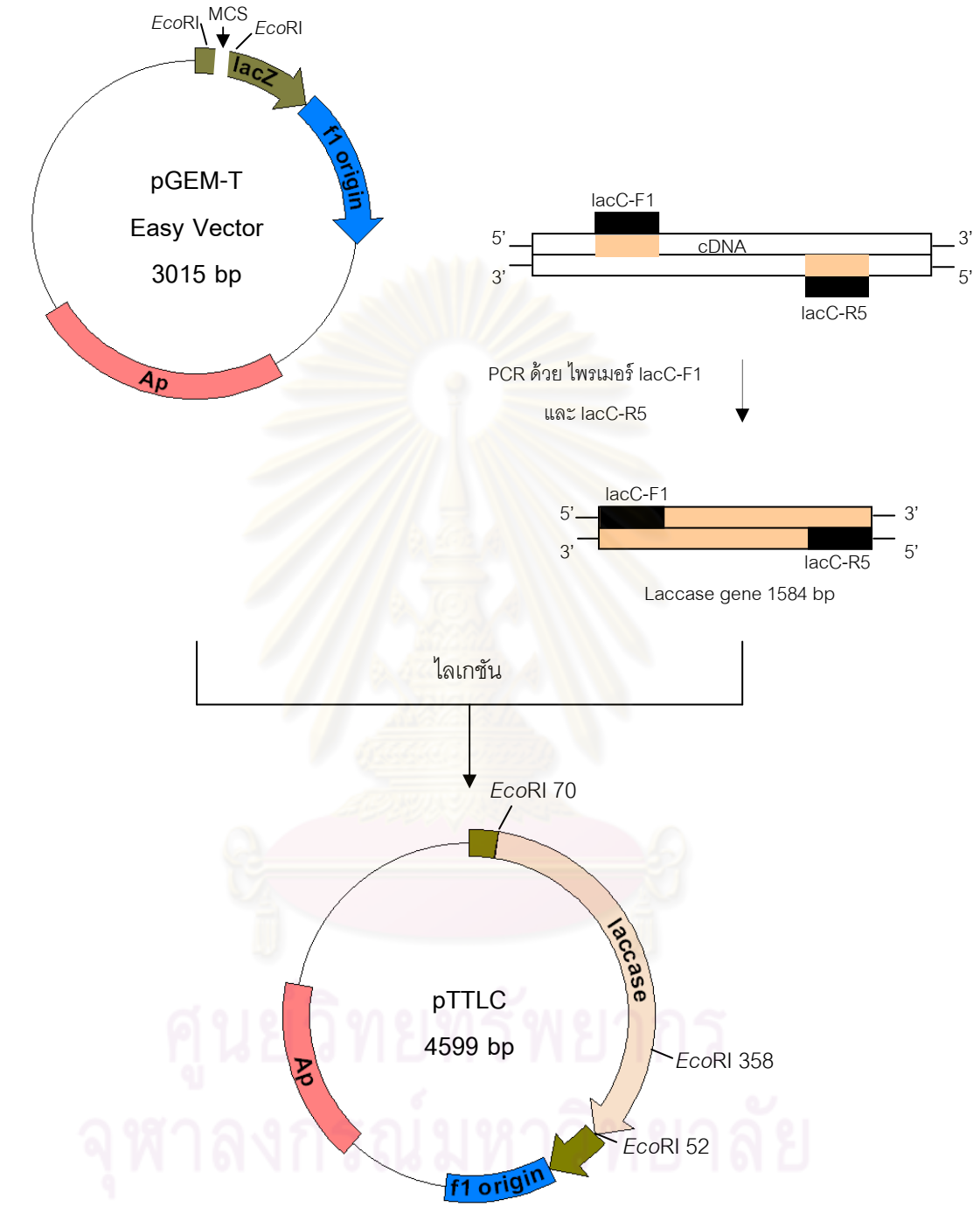
ประมาณ 3,015 bp 1,211 bp และ 358 bp เนื่องจาก pGEM®-T easy vector (ภาคผนวก ค1) มีขนาด 3,015 bp มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI อยู่ที่ตำแหน่งที่ 52 และ 70 bp ซึ่งเป็นบริเวณหัวและท้ายของจุดที่แทรกของยีนแลกเคส และ cDNA ของยีนแลกเคสจากการทำนายด้วยโปรแกรม FGENESH มีขนาด 1,569 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์หาจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยโปรแกรม NEBcutter V 2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/) พบว่ายีนแลกเคสมีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ที่ตำแหน่ง 358 bp ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งพบว่าจากการตัดพลาสมิดดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 3,000 bp 1,200 bp และ 400 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดคะเนไว้ ซึ่งแสดงว่าพลาสมิดนี้มียีนแลกเคสแทรกอยู่ และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pTTLC จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit แล้วส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC ที่สกัดได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกอยู่ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ T7 promoter และ SP6 ซึ่งอยู่บนเวกเตอร์ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค4 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pTTLC แสดงสรุปไว้ในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการตัดพลาสมิด pTTLC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 1 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pTTLC ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



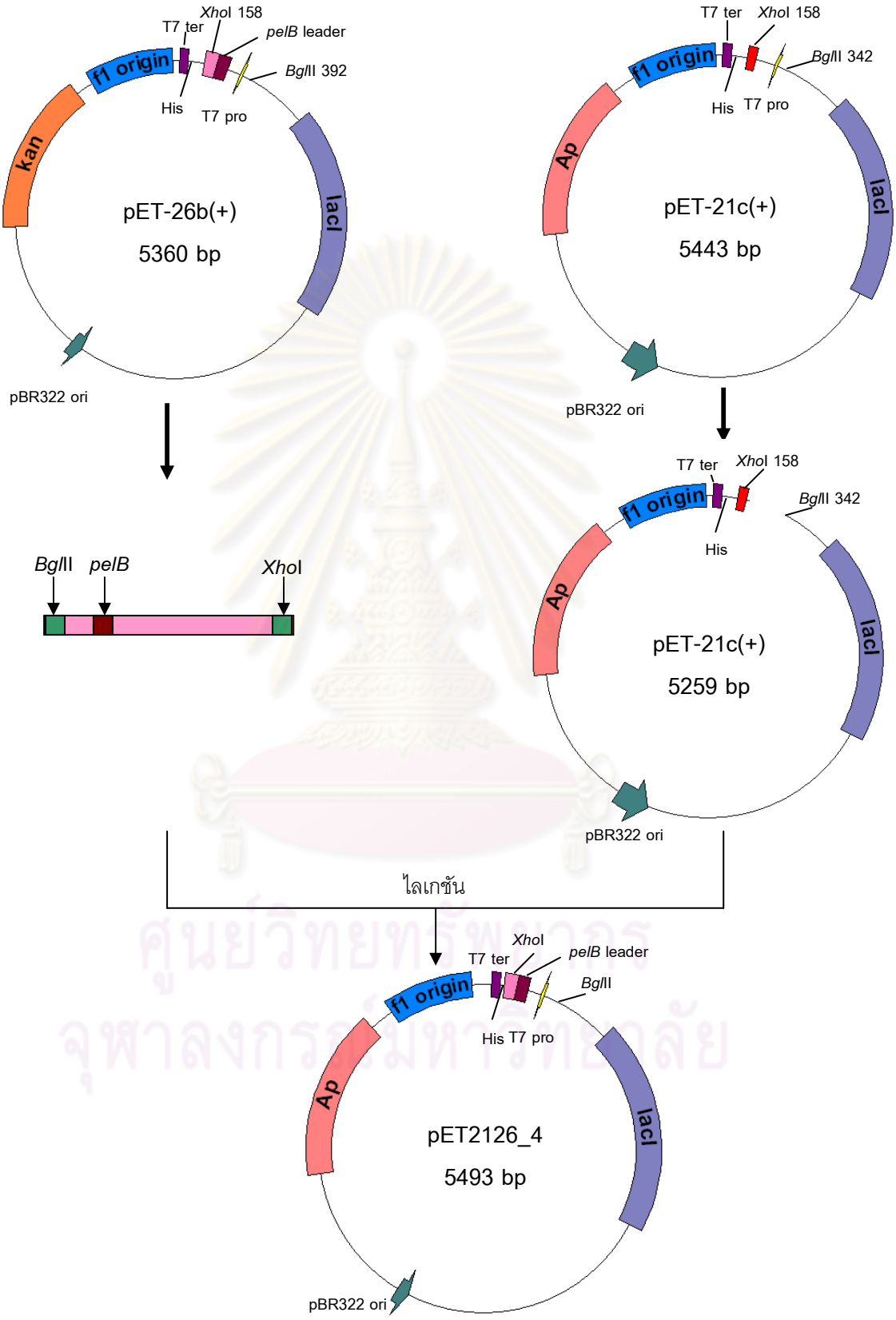
รูปที่ 4.6 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pTTLC

4.4 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกและการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS

4.4.1 การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET2126_4

เนื่องจากต้องการให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสออกสู่นอกเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ซึ่งต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคานามัยซิน จึงจะนำ cDNA ของยีนแลกเคสไปเชื่อมต่อกับบริเวณ signal sequence ของยีน *pelB* ซึ่งในห้องปฏิบัติการมีเพียงเวกเตอร์ pET-26b(+) (ภาคผนวก ค2) ที่มีบริเวณนี้ แต่เวกเตอร์นี้มี selectable marker เป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ดังนั้นจึงต้องสร้างเวกเตอร์ใหม่โดยย้ายบริเวณ signal sequence และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+) ไปแทนที่บริเวณ T7 Tag และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-21c(+)(ภาคผนวก ค3) ซึ่งเวกเตอร์ pET-21c(+) มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ได้ โดยขั้นตอนการแทนที่ signal sequence (*pelB* leader) และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-26b(+) กับบริเวณ T7 Tag และ multiple cloning site ของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET-21c(+) ปฏิบัติตามวิธีในข้อ 3.13.2 ตั้งชื่อเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกที่ได้ว่า pET2126_4 โดยไดอะแกรมการสร้างเวกเตอร์ pET2126_4 แสดงดังในรูปที่ 4.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



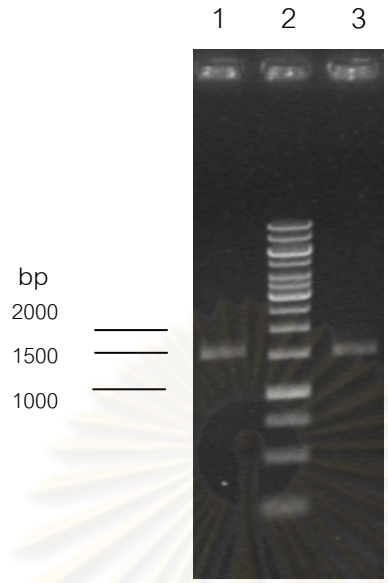
รูปที่ 4.7 ไดอะแกรมการสร้างเวกเตอร์ pET2126_4

4.4.2 การโคลนยีนแลกเคสเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกและการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS

ในขั้นตอนนี้ได้โคลนยีนแลกเคสทั้งแบบที่มีและไม่มี signal sequence ของรา ดังนี้

เพิ่มจำนวนยีนแลกเคสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งมีพลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F4 และ lacC-R4 ซึ่งออกแบบเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มีลำดับ signal sequence ของรา *Agrocybe* sp. CU43 และด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 ซึ่งออกแบบเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไม่มีลำดับ signal sequence ของราตามวิธีในข้อ 3.13.3.1 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงในรูปที่ 4.8 โดยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีนแลกเคสด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F4 และ lacC-R4 กับคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 นั้นมีขนาดประมาณ 1,500 bp ตามที่ต้องการ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ในช่องที่ 1 และช่องที่ 3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Bam*HI ตามวิธีในข้อ 3.13.3.3 เพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET2126_4 โดยแทรกระหว่างบริเวณ multiple cloning site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Bam*HI ตามวิธีในข้อ 3.13.4 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีนแลกเคสซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F4 และ lacC-R4 กับ lacCFnoSS และ lacC-R4

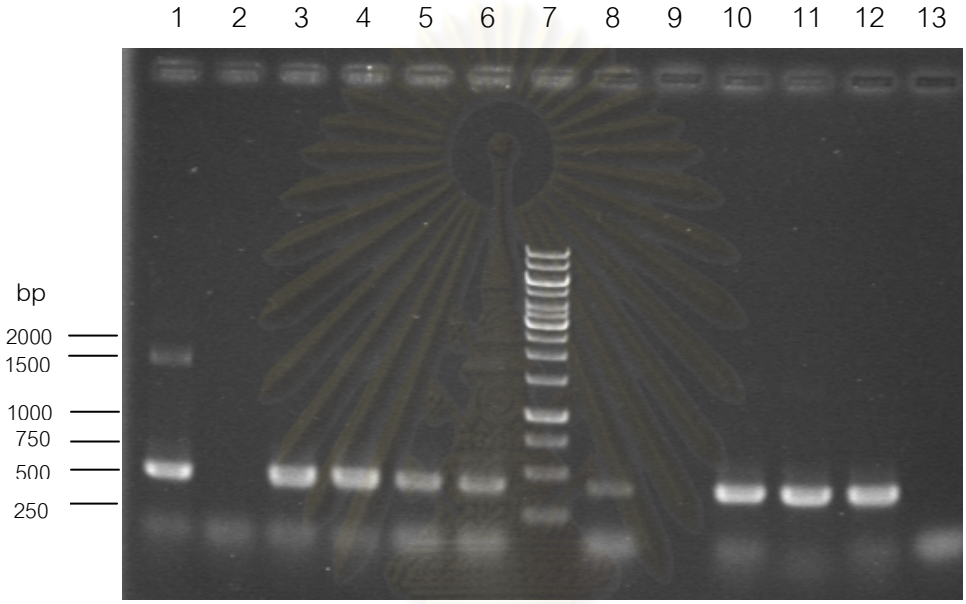
ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีนแลกเคสซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4

ช่องที่ 2 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสยีนแลกเคสซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC เป็นแม่แบบด้วยคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacC-F4 และ lacC-R4

สำหรับโคลนที่ไม่มี signal sequence ของรา คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ตามวิธีในข้อ 3.12.3 ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 โดยในแต่ละหลอดของการทำโคโลนีพีซีอาร์ประกอบด้วยทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนี และมีชุดควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยปฏิกิริยาการไลเกตเวกเตอร์ pET2126_4 ที่ปราศจากการเติมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ของชิ้นยีนแลกเคสลงไปแล้วตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ชิ้นยีนแลกเคสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ

1,500 bp ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.9 ในช่องที่ 1 ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาด 1,500 bp ที่ชัดเจน ซึ่งเป็นขนาดของยีนแลกเคส ส่วนชิ้นส่วนขนาดประมาณ 500 bp ที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ non specific



รูปที่ 4.9 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 ของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของรา

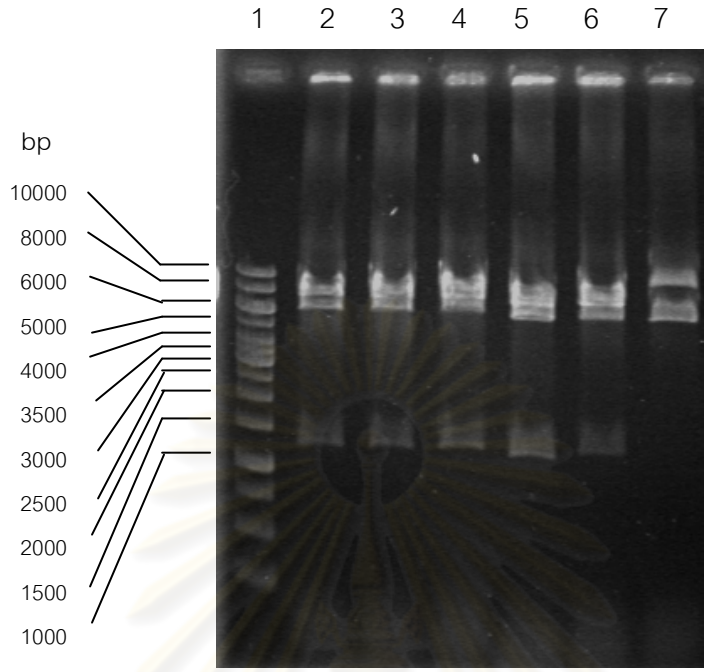
ช่องที่ 1-6 และ 9-12 ผลิตภัณฑ์จากโคโลนีพีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มีส่วน signal sequence จากราแทรกอยู่เป็นแม่แบบ

ช่องที่ 7 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 13 ผลิตภัณฑ์จากโคโลนีพีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของชุดควบคุมผลลบเป็นแม่แบบ

จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนต์ทั้ง 5 โคโลนีจากช่องที่ 1 ในรูปที่ 4.9 ไปคัดเลือกต่อไปโดยการแยกเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ทั้ง 5 โคโลนีในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ตามวิธีในข้อ 3.13.4 เพื่อตรวจสอบว่าทรานสฟอร์แมนต์ใดมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสที่ไม่มีส่วน signal sequence จากราแทรกอยู่ โดยตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI อยู่หลังตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ในเวกเตอร์ pET2126_4 ซึ่งบริเวณที่มีการแทรกยีนแลกเคสเข้าไปอยู่ระหว่างตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Bam*HI และยีนแลกเคสมีจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ที่ตำแหน่ง 358 ดังนั้นเมื่อทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วควรได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp และ 5,800 bp มีชุดควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มจากปฏิกิริยาการไลเกตเวกเตอร์ pET2126_4 โดยปราศจากการเติมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ของชิ้นยีนแลกเคสลงไป ซึ่งควรให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5,400 bp ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 ซึ่งพบว่าผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในช่องที่ 2-6 ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp และ 5,800 bp ตามที่ได้คาดคะเนไว้ แสดงว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เลือกมาทั้ง 5 พลาสมิดมียีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของราแทรกอยู่ ส่วนชุดควบคุมผลลบได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5,400 bp เท่านั้น ซึ่งเป็นขนาดของเวกเตอร์ pET2126_4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



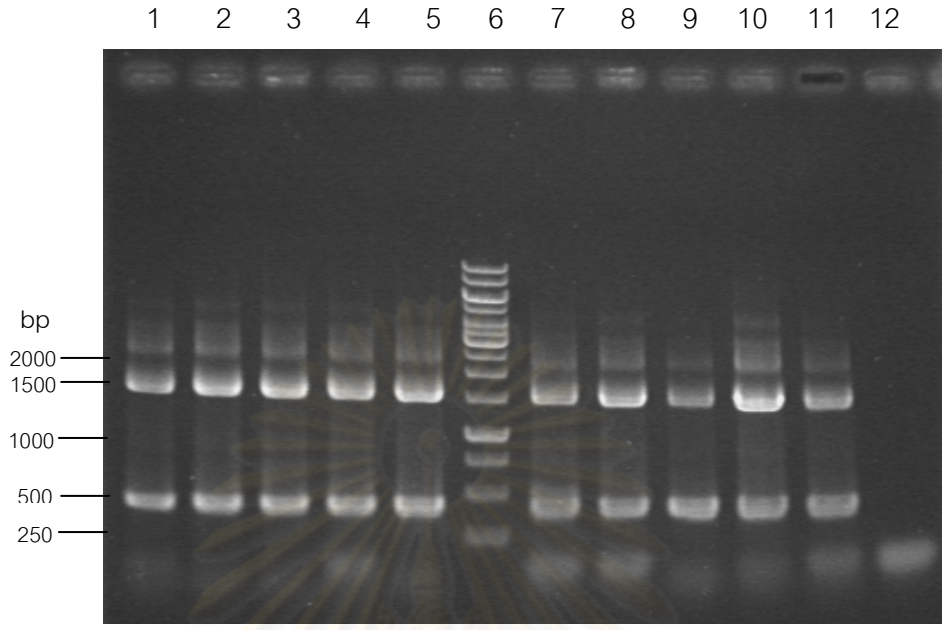
รูปที่ 4.10 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 1 ของรูป 4.9 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 1 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 2-6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 1 ของรูปที่ 4.9 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของชุดควบคุมผลลบที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

สำหรับโคลนที่มี signal sequence ของรานั้น จากรูปที่ 4.11 ช่องที่ 1-5 และ 7-11 ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนแลกเคสแทรกอยู่ จึงนำทรานสฟอร์แมนต์จากช่องที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีไปคัดเลือกต่อไปโดยการแยกเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ทั้ง 5 โคโลนีในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบว่าทรานสฟอร์แมนต์ใดมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสที่มีส่วน signal sequence จากราแทรกอยู่



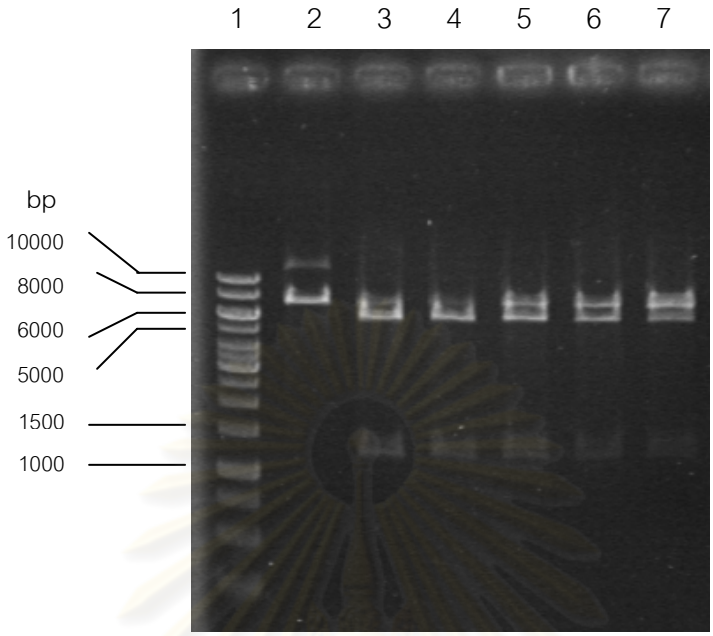
รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจากการทำโคโลนีพีซีอาร์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 ของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มี signal sequence ของรา

ช่องที่ 1-5 และ 7-11 ผลิตภัณฑ์จากโคโลนีพีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนแลกเคสที่มีส่วน signal sequence จากราแทรกอยู่เป็นแม่แบบ

ช่องที่ 6 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

ช่องที่ 12 ผลิตภัณฑ์จากโคโลนีพีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ lacCFnoSS และ lacC-R4 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของชุดควบคุมผลลบเป็นแม่แบบ

ในรูปที่ 4.12 แสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าในช่องที่ 3-7 ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp และ 5,800 bp ตามที่ได้คาดคะเนไว้ ซึ่งแสดงว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เลือกมาทั้ง 5 พลาสมิดมียีนแลกเคสที่มี signal sequence ของราแทรกอยู่



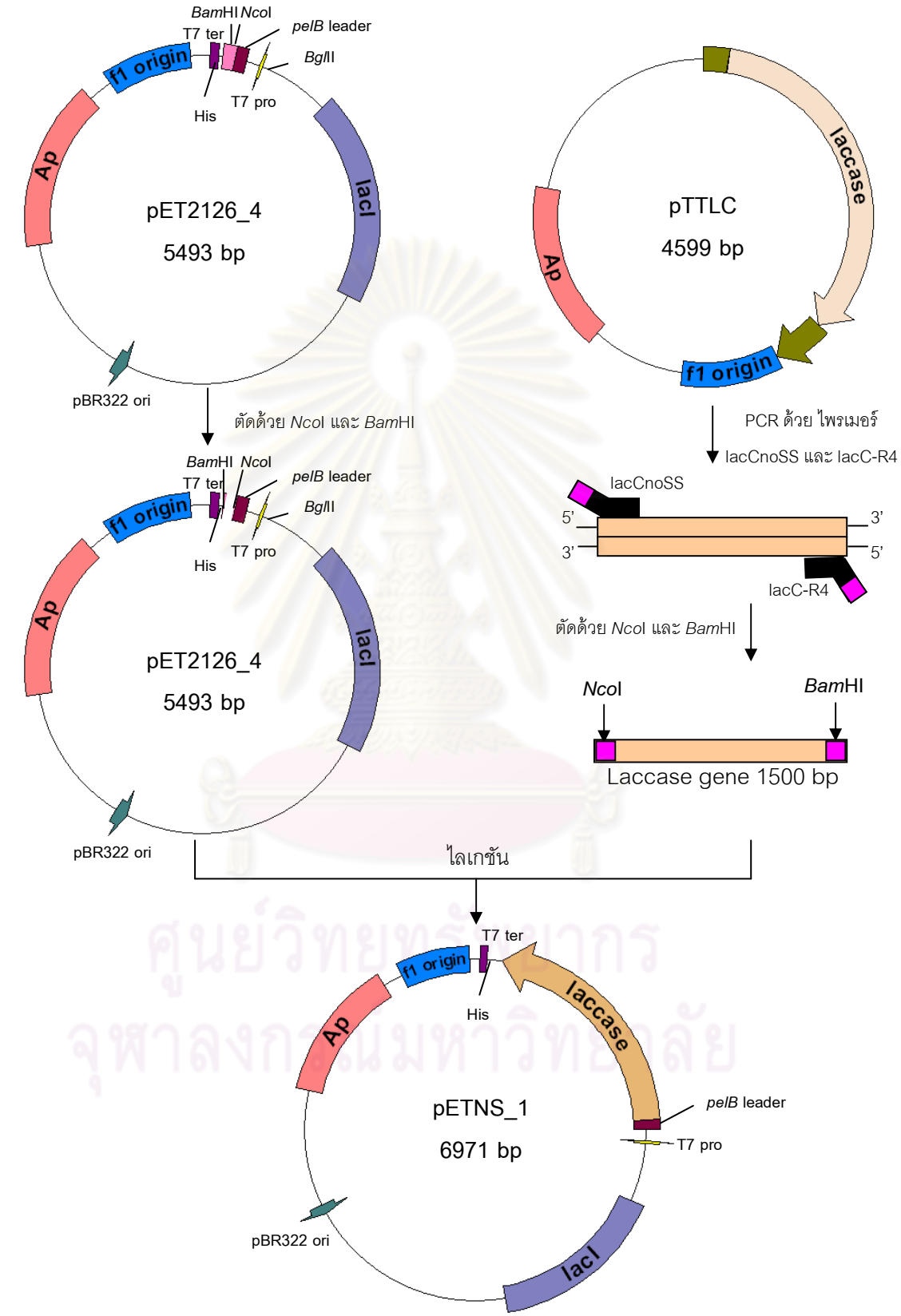
รูปที่ 4.12 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 2 ของรูปที่ 4.11 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 1 GeneRuler 1Kb DNA Ladder

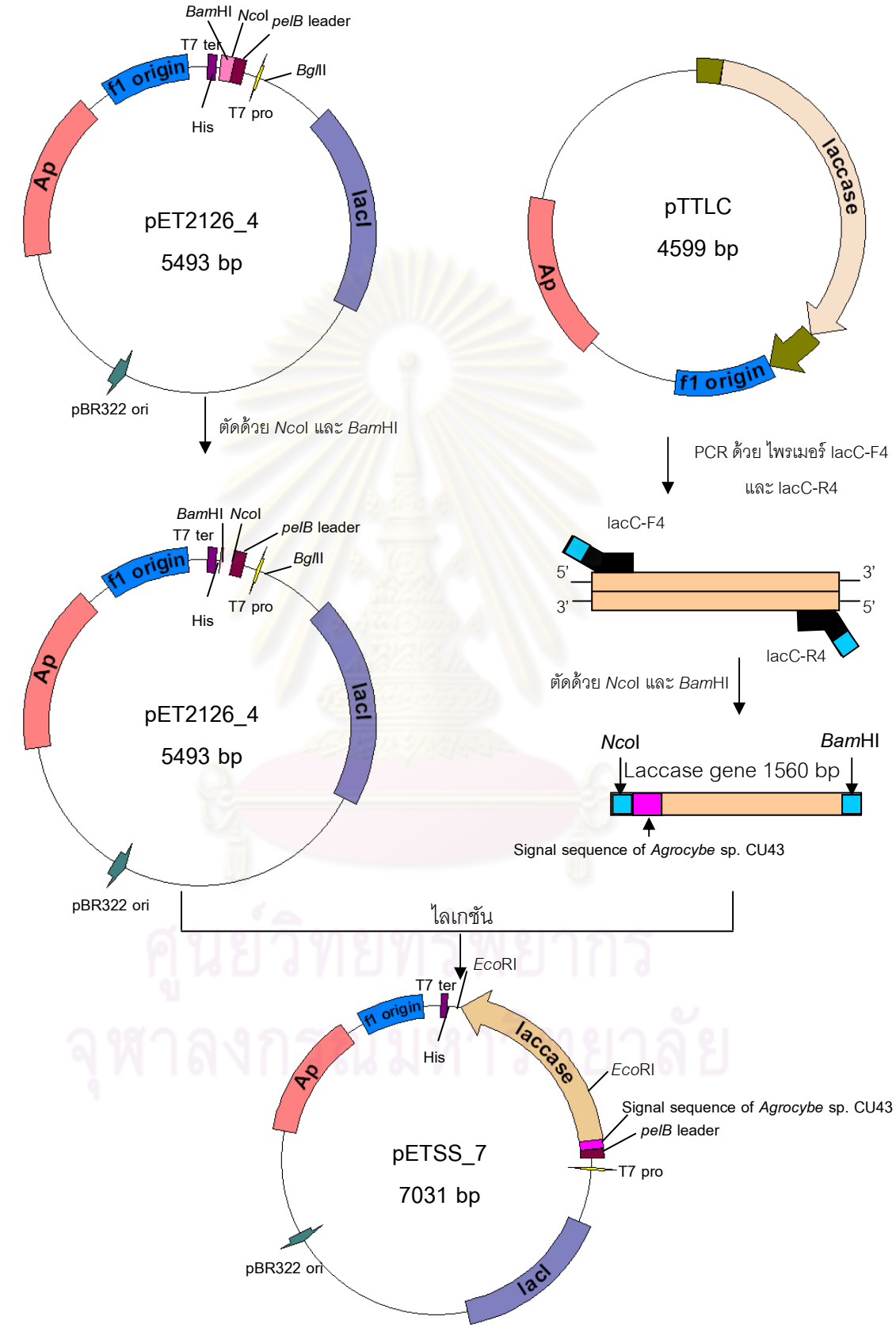
ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของชุดควบคุมผลลบที่ถูกตัดด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 3-7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นยีนแลกเคสที่มี signal sequence ของราแทรกอยู่จากทรานสฟอร์แมนต์ 5 โคโลนีจากช่องที่ 2 ของรูปที่ 4.11 ถูกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสที่ไม่มี signal sequence จากรา ในช่องที่ 2 ของรูปที่ 4.10 และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pETNS_1 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนแลกเคสที่มี signal sequence จากราในช่องที่ 4 ของรูปที่ 4.12 และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pETSS_7 มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ QIAprep Spin Miniprep Kit แล้วส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกอยู่และตรวจสอบบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างยีนแลกเคสกับเวกเตอร์ pET2126_4 ซึ่งผลการตรวจสอบแสดงในภาคผนวก ค5 และภาคผนวก ค6 โดยไดอะแกรมการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7 แสดงดังในรูปที่ 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 ไดอะแกรมการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1

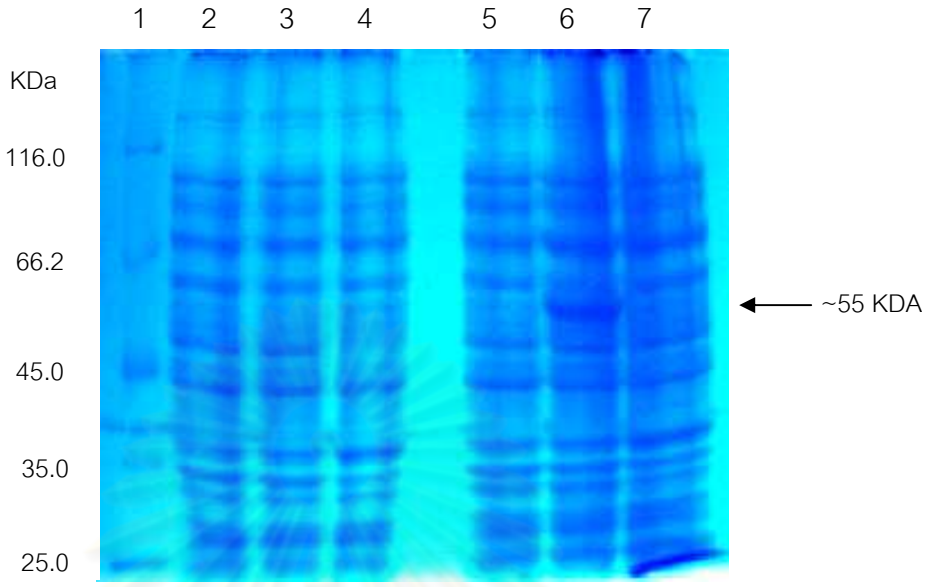


รูปที่ 4.14 ไดอะแกรมการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7

4.5 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลกเคส

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7 จากข้อ 4.4.2 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนแลกเคสตามวิธีในข้อ 3.13.5 จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หรือ pETSS_7 ไปทดสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีการเติมกัวเอคอลเป็นสับสเตรต ตามวิธีในข้อ 3.14.1 ผลการทดลองไม่พบโซนสีน้ำตาลแดงรอบโคโลนีของทุกทรานสฟอร์แมนต์ จึงนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ในภาวะที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตแลกเคสด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 3.14.2 จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกเบื้องต้นโดยการปั่นเก็บเซลล์แล้วตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยมีชุดควบคุมผลลบเป็นการแสดงออกโปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ทรานสฟอร์มด้วยเวกเตอร์ pET2126_4 ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 ภาพ SDS-PAGE สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* Rosetta-Gami B(DE3)pLysS ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7

ช่องที่ 1 Unstained Protein MW Marker

ช่องที่ 2 โปรตีนของชุดควบคุมผลลบก่อนการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 3 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ก่อนการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 4 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 ก่อนการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 5 โปรตีนของชุดควบคุมผลลบหลังการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 6 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หลังการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 7 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 หลังการชักนำด้วย IPTG

จากผลของ SDS-PAGE ในรูปที่ 4.16 ซึ่งเป็นผลการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแลกเคสในเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออก *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่แสดงออกก่อนการชักนำด้วย IPTG ของทั้งทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หรือ pETSS_7 มีการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบที่

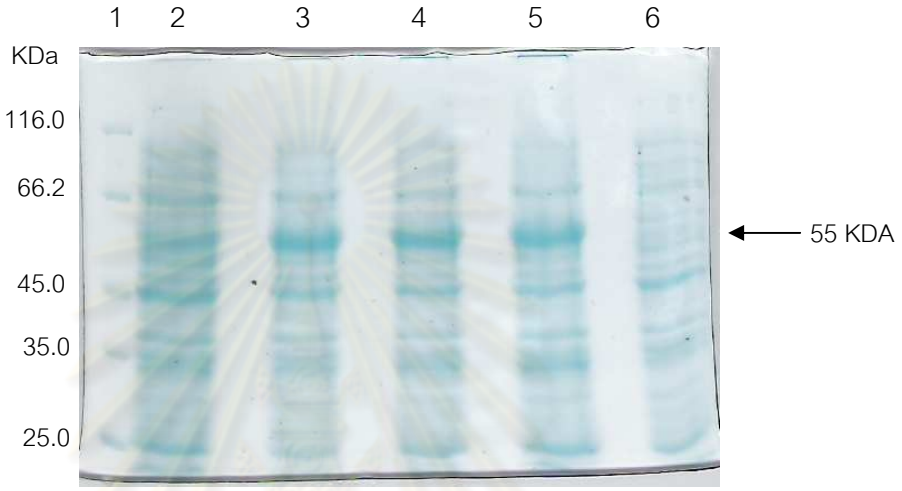
เหมือนกับชุดควบคุมผลลบทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคส และเมื่อมีการชักนำด้วย IPTG พบว่ารูปแบบของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 มีความแตกต่างจากชุดควบคุมผลลบ โดยมีแถบของโปรตีนที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 45.0 และ 66.2 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้นมาในปริมาณมากอย่างชัดเจน และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีนแลกเคสซึ่งถูกแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 (ภาคผนวก ค5) ตั้งแต่จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของ *pelB* coding sequence ไปจนถึงจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสด้วยโปรแกรม translate tool (http://au.expasy.org/tools/dna.html) พบว่าโปรตีนแลกเคสจะมีลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 543 หมู่ (ภาคผนวก ค7) และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม protein molecular weight calculator (http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm) พบว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสควรมีน้ำหนักโมเลกุล 58.39 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดของโปรตีนที่ถูกผลิตเพิ่มขึ้นมาจากที่ตรวจพบด้วย SDS-PAGE ในรูปที่ 4.15 ช่องที่ 6 เมื่อนำมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานจากการทำ SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับที่คำนวณจากโปรแกรม จึงคาดว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เกิดขึ้นแล้วมีความแตกต่างจากชุดควบคุมผลลบน่าจะเป็นขนาดของรีคอมบิแนนท์แลกเคส ส่วนทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 เมื่อถูกชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 7) ไม่พบแถบของโปรตีนที่มีขนาดที่แตกต่างไปจากชุดควบคุมผลลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนต์นี้ไม่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคส หรือมีการแสดงออกแต่ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนโดยวิธี SDS-PAGE และจากการทดสอบแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วยวิธี zymogram ตามวิธีในข้อ 3.14.4 ไม่พบว่ารีคอมบิแนนท์สามารถออกซิไดส์สับสเตรต ABTS ได้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบสีเขียวบนเจล SDS-PAGE

4.6 การแปรผันภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคส

4.6.1 การแปรผันอุณหภูมิ

เลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสตามวิธีในข้อ 3.15 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เท่ากันแล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยวิธี SDS PAGE ผลพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสในปริมาณน้อยที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสในปริมาณเท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียสไปแปรผันต่อไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมะสมต่อการเจริญของ *E. coli* และมีความเหมาะสมทางด้านค่าใช้จ่ายในระดับอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิของกระบวนการในการผลิตอยู่ในระดับสูง ผลแสดงดังในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันอุณหภูมิ

ช่องที่ 1 Unstained Protein MW Marker

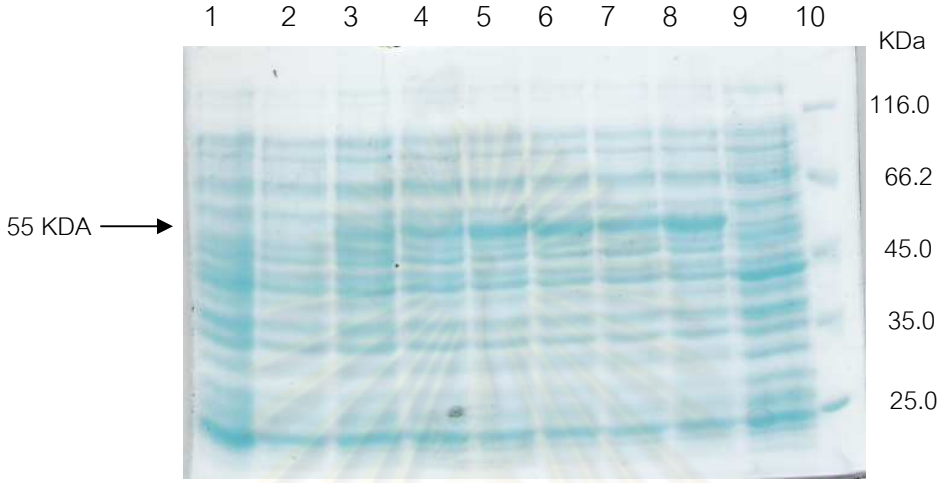
ช่องที่ 2-5 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ช่องที่ 6 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนการชักนำด้วย IPTG เป็นชุดควบคุม

4.6.2 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG

เลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสตามวิธีในข้อ 3.15 โดยแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสดังนี้ 25 50 100 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เท่ากัน ปั่นเก็บเซลล์ แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยวิธี SDS PAGE ผลแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าที่ความเข้มข้น IPTG 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ไม่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคส และเริ่มมีการผลิตที่ความเข้มข้นของ IPTG ตั้งแต่ 100 ไมโครโมลาร์ จนถึง 1,000 ไมโครโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น IPTG

400 ไมโครโมลาร์ ให้การแสดงออกที่สูงเท่ากับ 1,000 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้น IPTG 400 ไมโครโมลาร์ ไปใช้ในขั้นตอนการแปรผันเวลาต่อไป



รูปที่ 4.17 ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG

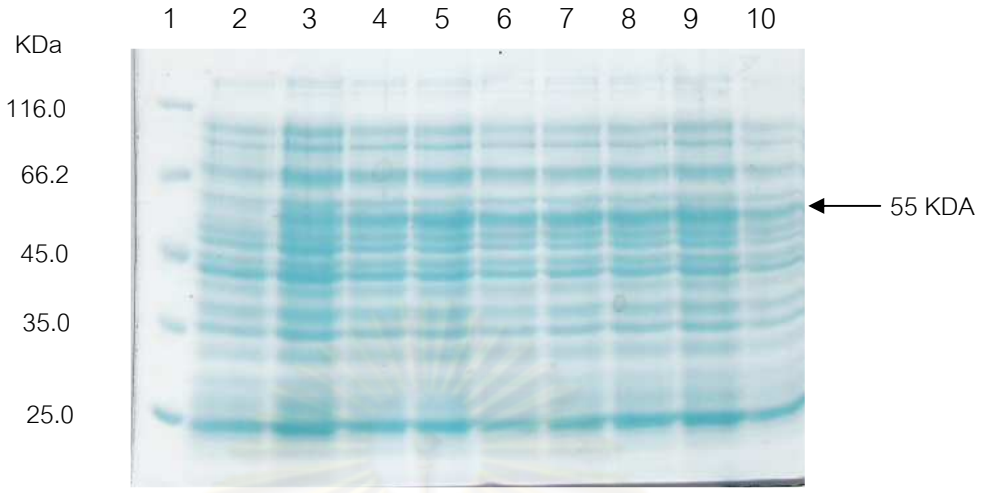
ช่องที่ 1-8 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับจากการเลี้ยงที่ความเข้มข้น IPTG 25-1,000 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ

ช่องที่ 9 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ก่อนถูกชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 10 Unstained Protein MW Marker

4.6.3 การแปรผันเวลา

เลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสตามวิธีในข้อ 3.15 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วยความเข้มข้น IPTG เท่ากับ 400 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-8 มาตรวจสอบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วยวิธี SDS PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสมีการแสดงออกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และมีปริมาณที่เท่ากันจนถึงชั่วโมงที่ 8 ผลแสดงดังในรูปที่ 4.18 ดังนั้นจึงสามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสคือ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น IPTG 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



รูปที่ 4.18 ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่เลี้ยงในภาวะที่ชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสโดยการแปรผันเวลา

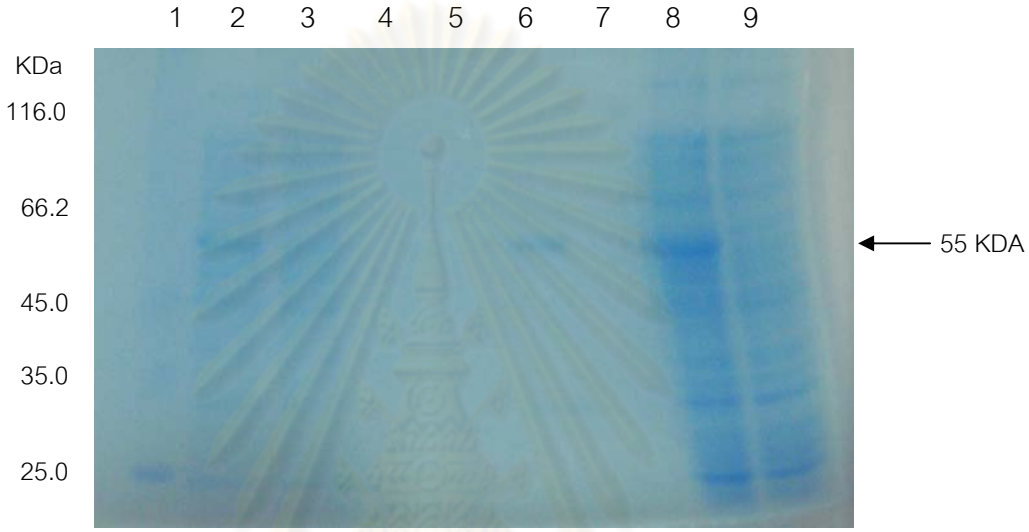
ช่องที่ 1 Unstained Protein MW Marker

ช่องที่ 2-10 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น IPTG 400 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0-8 ชั่วโมง ตามลำดับ

4.7 การทำรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้บริสุทธิ์

เพื่อเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ต้องการจึงนำโปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับพลาสมิด pETNS_1 ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins โดยเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่จะใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.16.2 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาผ่านเรซินซึ่งจะทำให้เกิดการจับของหมู่กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 หมู่ที่อยู่ในโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แลกเคสกับไอออนของโคบอลท์ โดยเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์แลกเคสจากการทำบริสุทธิ์ในภาวะ native ไม่สามารถทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนของ soluble fraction ดังนั้นจึงทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์แลกเคสในภาวะ denature ตามวิธีในข้อ 3.16.2 แล้วตรวจสอบการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.19 ซึ่งพบว่าโปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หลังผ่านการชะคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ช่องที่ 6) ได้แถบของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 55 KDa ในตำแหน่งเดียวกับ crude

protein ก่อนการทำบริสุทธิ์ (ช่องที่ 8) ที่ไม่พบในชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 9) อีกด้วย จึงเป็นการยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์นี้เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนแลกเคสที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 หมู่ที่ปลายด้านคาร์บอกซีที่ผลิตได้จากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 โดยผลิตในรูปแบบของ inclusion body



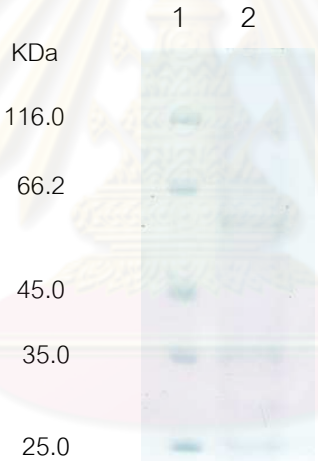
รูปที่ 4.19 ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนจากทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยภาวะ denature

ช่องที่ 1	Unstained Protein MW Marker
ช่องที่ 2	โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ก่อนผ่านการผสมกับเรซิน
ช่องที่ 3	โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หลังผ่านการผสมกับเรซิน
ช่องที่ 4	น้ำใสของการล้างเรซินครั้งแรก
ช่องที่ 5	น้ำใสของการล้างเรซินครั้งที่สอง
ช่องที่ 6	โปรตีนจากการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1
ช่องที่ 7	โปรตีนจากการชะคอลัมน์ครั้งที่ 2
ช่องที่ 8	โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 หลังการชักนำด้วย IPTG เป็นชุดควบคุมผลบวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 9 โปรตีนของทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ก่อนการชักนำด้วย IPTG เป็นชุดควบคุมผลลบ

จากนั้นนำแลกเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มา refold ตามวิธีในข้อ 3.15.4 แล้วนำไปวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยน้ำยา Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ตามวิธีในข้อ 3.15.3 เจือจางรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 100 เท่า แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เมื่อนำค่าที่ได้เท่ากับ 0.109 ไปคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ค8) พบว่าได้รีคอมบิแนนท์แลกเคสที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 228.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่ได้แสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 ภาพ SDS-PAGE ของโปรตีนหลังจากการ refolding

ช่องที่ 1 Unstained Protein MW Marker

ช่องที่ 2 โปรตีนหลังจากการ refolding

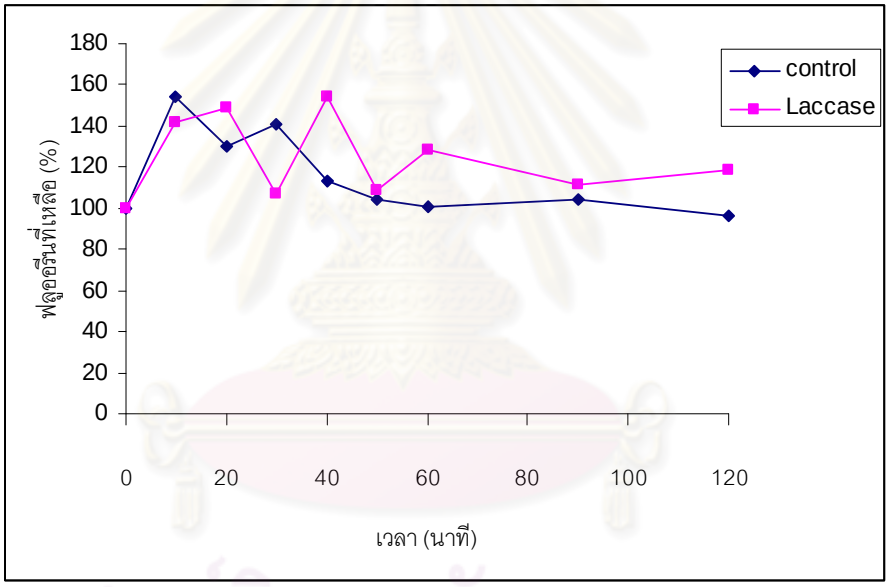
4.8 แอกติวิตีของเอนไซม์แลกเคส

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ที่ผ่านการ refolding แล้ว นำโปรตีนนี้ปริมาตร 228.51 ไมโครกรัม มาทดสอบแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.6.1 พบว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสบริสุทธิ์ไม่มีแอกติวิตีเนื่องจากไม่สามารถออกซิไดส์สับสเตรต ABTS ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์แลกเคสบริสุทธิ์ในการย่อยสลายฟลูออรีน

นำรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนตามวิธีในข้อ 3.17 โดยมีชุดควบคุมเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์แลกเคส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 10 20 30 40 50 60 90 และ 120 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC ผลแสดงดังในรูปที่ 4.21 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าชุดที่มีการเติมรีคอมบิแนนท์แลกเคสไม่มีการลดลงของปริมาณฟลูออรีน แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสไม่สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้



รูปที่ 4.21 กราฟแสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์) ต่อเวลา (นาที)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการโคลน cDNA ของยีนแลกเคสจากรา *Agocybe* sp. CU43 เพื่อการแสดงออกใน *E. coli* โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายฟลูออรีน เนื่องจาก *Agrocybe* sp. CU 43 มีความสามารถผลิตแลกเคสได้ในระดับสูง ซึ่งแลกเคสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและด้านอุตสาหกรรมต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงราเพื่อการผลิตเอนไซม์นั้นต้องใช้ภาวะในการเลี้ยงที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน ดังนั้นการโคลนยีนจากรา *Agrocybe* sp. CU43 โดยแสดงออกในเซลล์ *E. coli* จะช่วยลดระยะเวลา รวมถึงช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้ ซึ่งจากการโคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Agrocybe* sp. CU43 เพื่อการแสดงออกใน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS พบว่าเซลล์เจ้าบ้านสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสได้ในรูปแบบ inclusion bodies ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่สามารถทำงานได้ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกในรูปแบบนี้มีข้อดีคือ โปรตีนจะถูกแสดงออกในระดับสูง สามารถแยกโปรตีนจากการปนเปื้อนของส่วนต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้านได้ง่าย ช่วยลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน โปรตีนถูกย่อยทำลายในระดับต่ำ ทนต่อการถูกย่อยจากโปรตีเอสของเซลล์เจ้าบ้าน เป็นต้น ซึ่งจากข้อดีของ inclusion bodies ดังกล่าวทำให้การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ในรูป inclusion bodies จาก *E. coli* เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม (Singh และ Panda, 2005)

จากการเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU43 ในภาวะที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ด้วยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 ppm พบว่าในสัปดาห์ที่สองของการชักนำมีแอกติวิตีของแลกเคสเท่ากับ 155.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงกว่าในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 ซึ่งมีความแตกต่างจากงานวิจัยของกุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) และ Chupungars และคณะ (2009) ที่แอกติวิตีของแลกเคสจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 คือ 470 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีแอกติวิตีต่ำที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 เป็นผลทำให้การเก็บเซลล์ของราเพื่อใช้ในการสกัด total RNA มีความคลาดเคลื่อนไป สาเหตุอาจเกิดจากราที่ใช้มีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสบนอาหารแข็งเอียง Malt extract agar เป็นเวลานาน จึงอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของราซึ่งทำให้รูปแบบการผลิตแลกเคสที่ได้มีความแตกต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าลักษณะของราที่เลี้ยงในอาหารเหลว Malt extract มีลักษณะเป็นขุยไม่เป็น pellet ซึ่งต่างไปจากในงานวิจัยของกุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) อีกด้วย อีก

ทั้งในขณะที่เลี้ยงเพิ่มจำนวนพบว่าในบางครั้งต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณมาก เนื่องจากเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราคือ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้รามีการเจริญเติบโตช้าลงส่งผลให้เซลล์ของราที่เก็บได้มีอายุค่อนข้างมาก ดังนั้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลกเคสลดลงได้

จากการเพิ่มจำนวนยีนแลกเคสจาก cDNA พบว่ามีขนาด 1,563 bp เมื่อนำไปจัดเรียงเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสจากจีโนมิกดีเอ็นเอในรายงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ด้วยโปรแกรม ClustalX พบว่าประกอบไปด้วย 13 อินทรอน ถอดรหัสให้โปรตีนขนาด 520 อะมิโน มีตำแหน่งของ signal peptide อยู่ที่กรดอะมิโนที่ 1-20 ส่วนบริเวณ cleavage site ของ signal peptide อยู่ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 19 กับ 20 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) ซึ่งมีความแตกต่างจากที่ทำนายไว้ในงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) ที่ยีนแลกเคสจาก cDNA มีขนาด 1,569 bp มี 12 อินทรอน และโปรตีนมีขนาด 522 อะมิโน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์แลกเคสไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastx พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีนแลกเคสของรา *Pholiota nameko* มากที่สุด 73% ด้วยหมายเลขเข้าถึง ABR24264.1 ค่า E-value 0.0 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์แลกเคส สามารถทำนายบริเวณอนุรักษ์ของรีคอมบิแนนท์แลกเคสได้ ซึ่งพบว่ามีการจัดเรียงตัวในรูปแบบ His-X-His โดยพบบริเวณจับคอปเปอร์ T1 เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่มีฮิสติดีน 2 หมู่ และซิสเทอีน และพบบริเวณอนุรักษ์ T2 และ T3 ประกอบด้วยฮิสติดีน 8 หมู่ และยังมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอีก 4 หมู่ซึ่งใช้ในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ อีกทั้งยังมีลำดับกรดอะมิโนที่น่าจะเป็นบริเวณที่เกิดการไกลโคซิเลทอีกด้วย (ภาคผนวก ค7)

จากรายงานของกุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) ซึ่งรายงานว่าแลกเคสที่ผลิตจากรา *Agrocybe* sp. CU43 นั้น มีการผลิตแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ เนื่องจากสามารถตรวจสอบแอกติวิตีของแลกเคสได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนแลกเคสจากงานวิจัยของ Tantibunthaweewat และ Rerngsamran (2009) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal sequence ของรา แต่อย่างไรก็ตามในการโคลนยีนจากราซึ่งเป็นยูคาริโอต แล้วให้มีการแสดงออกใน *E. coli* ซึ่งเป็นโปรคาริโอตนั้นมีข้อจำกัดคือ *E. coli* อาจไม่มี signal peptidase ที่สามารถจดจำตำแหน่งการตัด signal peptide ของราเพื่อส่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกนอกเซลล์

E. coli (Choi และ Lee, 2004) โดย signal sequence ของทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตนั้นจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ N-domain H-domain และ C-domain ซึ่งในระหว่างที่มีการส่งโปรตีนออกนอกไซโทพลาสซึมนั้นจะมีการตัดส่วน signal sequence ออกด้วย signal peptidase ซึ่งบริเวณ cleavage นี้จะอยู่ที่ C-damain (Choi และ Lee, 2004) มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับบริเวณ cleavage site ของ signal sequence ด้วยการจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโนของ signal sequence ของยูคาริโอต 78 ตัวอย่างพบว่าบริเวณ cleavage site นั้นจะอยู่ระหว่างตำแหน่ง -1 และ +1 ปลายของ signal sequence มักเป็นกรดอะมิโนอะลานีน ไกลซีน เซอร์รีน ซิสเทอีน ทรีโอนีน และกลูทามีน (Heijnev, 1983) ส่วนของโปรคาริโอตนั้นบริเวณ cleavage site จะมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบ Ala-X-Ala เนื่องจากที่บริเวณ -3 และ -1 มักเป็นกรดอะมิโนอะลานีน ซึ่งจะถูกจดจำตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ signal peptidaseI โดย signal sequence ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการหลั่งออกนอกเซลล์ของโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งการตัดสินใจที่จะเลือกใช้ signal sequence ใดนั้นจำเป็นต้องทำผ่านขั้นตอน trial-and-error (Choi และ Lee, 2004) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกที่จะโคลนยีนแลกเคสจากรา *Agrocybe* sp. CU43 ทั้งแบบที่มี signal sequence และไม่มี signal sequence จากราเพื่อต้องการทดสอบว่า signal sequence ของรานั้นมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์หรือไม่ เนื่องจากมีงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการแสดงออกโปรตีนของยูคาริโอตจากการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* โดยการโคลนยีนที่มีส่วนของ signal sequence ของยูคาริโอตติดมาด้วย Matroudi และคณะ (2008) สามารถแสดงออกไคติเนสจากรา *Trichoderma atroviride* ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) โดยโคลนยีน chitinase 33 เข้าสู่เวกเตอร์ pET26b(+) โดยในการไลเกตจะเชื่อมต่อยีน chitinase 33 ซึ่งมีส่วนของ signal sequence จากราเข้ากับ *pelB* coding sequence และนอกจากนี้ นิลเนตร อัศวะศิริจินดา (2551) ได้โคลนยีนเด็กซ์แทรนเนสที่มีส่วนของ signal sequence จากรา *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เข้าสู่เวกเตอร์ pETHis พบว่าเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสามารถหลั่งออกสู่นอกเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS และย่อยสลายเด็กซ์แทรนบนอาหารแข็งได้ เป็นต้น

โดยการโคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Agrocybe* sp. CU43 เข้าสู่เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกที่สร้างขึ้นเองในการทดลองนี้ที่มาจากการเชื่อมต่อบริเวณ signal sequence (pelB leader) และบริเวณ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-26b(+) กับเวกเตอร์ pET-21c(+) โดยไปแทนที่กับตำแหน่งบริเวณ T7 tag และ multiple cloning site ของเวกเตอร์ pET-21c(+)

เวกเตอร์ที่สร้างขึ้นนี้มีชื่อว่า pET2126_4 จุดประสงค์ของการสร้างเวกเตอร์นี้คือเพื่อให้เวกเตอร์มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินซึ่งทำให้เหมาะสมต่อการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ซึ่งทนต่อยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน คานามัยซิน และคลอแรมเฟนิคอล โดยแสดงออกภายใต้ T7 promoter และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสยังเชื่อมต่อเข้ากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *pelB* coding sequence ทางปลายด้าน 5' และเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสให้กรดอะมิโนฮิสติดีนหกหมู่ที่ปลายด้าน 3' อีกด้วย ซึ่ง *pelB* coding sequence นั้นเป็น signal peptide ที่สามารถทำให้เกิดการส่งออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากไซโทพลาสซึมไปสู่บริเวณ periplasmic space ได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA ซึ่งตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงตำแหน่ง -1 ซึ่งเป็นบริเวณ cleavage site ของ *pelB* coding sequence (Choi และ Lee, 2004) โดยเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนระหว่างบริเวณไซโทพลาสซึมกับบริเวณ periplasmic space แล้วพบว่าการแสดงออกที่บริเวณ periplasmic space มีข้อดีมากกว่าการแสดงออกในไซโทพลาสซึมในหลายๆ ด้าน เช่น เป็นบริเวณที่มีเอนไซม์โปรตีเอสน้อยกว่า การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ง่ายกว่า โดยลดโอกาสการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นๆ ของเซลล์เจ้าบ้าน และยังเป็นบริเวณที่ส่งเสริมให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากบริเวณนี้มีสภาพแวดล้อมที่เป็น oxidative มากกว่าบริเวณไซโทพลาสซึม (Makrides, 1996) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ได้รับการตั้งชื่อว่า pETSS_7 และ pTTNS_1 สำหรับโคลนที่มีและไม่มี signal sequence ของรา ตามลำดับ จากนั้นทรานสฟอร์ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7 และ pETNS_1 เพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS ซึ่งมีจีโนไทป์ที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพราะเป็นเซลล์เจ้าบ้านได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมให้ไม่มีการแสดงออกของโปรตีเอส 2 ชนิด คือ lon และ ompT ซึ่งโปรตีเอส 2 ชนิดนี้มีผลรบกวนขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ขาดสมบูรณ์ของโครงสร้างได้ (Sorensen และ Mortensen, 2005) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์แลกเคสพบว่ามีโคดอนที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* ได้แก่ AGA, AGG, GGA และ CCC ซึ่งการที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป้าหมายมีโคดอนที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการถอดรหัสเป็นโปรตีนผิดพลาดหรือไม่สมบูรณ์ หรือหยุดการถอดรหัสเมื่อถอดรหัสจนถึงบริเวณโคดอนที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* หรืออาจมีการอ่านรหัสโคดอนคาดเคลื่อนไปจากกรอบการอ่านรหัสเดิมได้ (Kurland และ Gallant, 1996; Sorensen และคณะ, 2003) และเจ้าบ้านสายพันธุ์นี้ยังมีการดัดแปลงพันธุกรรมไม่ให้มีการแสดงออกของยีน *gor* และ *trxB* ซึ่งทำ

ให้เซลล์เจ้าบ้านสามารถเพิ่มการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ ซึ่งเหมาะสมต่อการแสดงออกของแลกเคสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างของพันธะไดซัลไฟด์ ที่เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมาก เพราะถ้ารีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์อาจถูกย่อยสลายหรือแสดงออกในรูปที่ทำงานไม่ได้ (Bessette และคณะ, 1999) ผลการทดลองเมื่อคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมกัวเอคอลเพื่อใช้เป็นสับสเตรตพบว่าทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 และ pETSS_7 ไม่สามารถออกซิไดส์สับสเตรตได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีการผลิตรีคอมบิแนนท์แลกเคสในทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1 ซึ่งการแสดงออกนี้อาจเนื่องมาจาก *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) pLysS เป็นสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่มีชื่อว่า pLysSRARE ซึ่งมียีนที่ใช้ในการแสดงออกของ tRNA สำหรับโคดอนที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* แต่พบในยูคาริโอต ได้แก่ AGA และ AGG (อาร์จินีน), GGA (ไกลซีน), AUA (ไอโซลิวซีน), CUA (ลิวซีน) และ CCC (โพรลีน) (Rogulin และคณะ, 2004) แต่อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผลิตขึ้นมีการผลิตออกมาในรูปแบบของ inclusion bodies ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ การที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีการแสดงออกในรูปแบบของ inclusion bodies อาจเกิดจากการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสอยู่ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนในระดับสูงมาก (Terpe, 2006) ซึ่งในบางครั้งการใช้โปรโมเตอร์ที่แรงอาจไม่ใช่ทางเลือกที่ดี เพราะการผลิต RNA ที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการอิ่มตัวของกลไกการถอดรหัส ดังนั้นในบางครั้งอาจไม่มีความจำเป็นในการสังเคราะห์ RNA ให้ได้ปริมาณสูงสุด วิธีแก้ไขอาจเปลี่ยนการแสดงออกของยีนภายใต้โปรโมเตอร์ที่มีความแรงลดลง ซึ่งอาจทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้อยู่ในรูป soluble และมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ (Gerstein, 2001) รีคอมบิแนนท์แลกเคสเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต้องมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ ดังนั้นการส่งโปรตีนไปยังบริเวณ periplasmic space จึงเป็นสิ่งจำเป็น แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกภายใต้ T7 promoter ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ทำให้มีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงมากประกอบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความซับซ้อนสูง อาจไปจำกัดระดับของการส่งออกรวมถึงการม้วนพับตัวรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ ซึ่งส่งผลให้เกิด inclusion ขึ้นที่บริเวณ periplasmic space เพื่อลดการผลิตโปรตีนในรูปแบบ inclusion bodies มีวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือการแสดงออกร่วมของโมเลกุล chaperones บริเวณ periplasmic space ได้แก่ โปรตีนในตระกูล disulfide-bond formation (Dsb) ที่ประกอบด้วย SurA FkpA และ Skp ซึ่งมีรายงานว่าสามารถช่วยให้เกิดการ

ส่งออกและทำให้เกิดการม้วนพับตัวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้อย่างถูกต้องโดยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นมาใหม่หรือจัดเรียงพันธะไดซัลไฟด์เดิมให้ถูกต้องได้ (Choi และ Lee, 2004)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่สามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์แลกเคสใน *E. coli* ในรูปแบบที่สามารถทำงานได้ ตัวอย่างเช่น Salony และคณะ (2008) ได้โคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Cyathus bulleri* ซึ่งถูกรายงานว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมได้ เข้าสู่เวกเตอร์ pCR 2.1 เพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ด้วยวิธี ligation-anchored PCR โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยรีเวิร์สไพรเมอร์ที่ไม่มีรหัสหยุด ซึ่งทำให้เกิดการอ่านรหัสภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* ทำให้รีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าแลกเคสจากรา ซึ่งส่วนของยีน *lacZ* ที่เพิ่มเข้ามาในเอนไซม์รีคอมบิแนนท์แลกเคสอาจมีส่วนช่วยให้เอนไซม์เกิดการม้วนพับตัวอย่างถูกต้อง ส่งผลให้รีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผลิตโดยเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* มีความสามารถในการใช้สับสเตรต คือไดอะมิโนเบนซิดีนได้เมื่อทดสอบแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคสด้วยวิธี zymogram ซึ่งวิธีนี้เป็นระบบการแสดงออกที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการแสดงออกของยีนแลกเคสจากราสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป

เมื่อทราบว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ได้ถูกแสดงออกในรูป inclusion bodies ซึ่งเป็นรูปแบบของโปรตีนที่ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จึงต้องทำภายใต้ภาวะที่มียูเรียเพื่อทำให้รีคอมบิแนนท์แลกเคสซึ่งอยู่ในรูปของ insoluble กลับมาอยู่ในรูป soluble จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการ refolding เพื่อให้เกิดการม้วนพับตัวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามหลังจากนำรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผ่านกระบวนการ refolding โดยการ dialyse ในภาวะที่มีการลดความเข้มข้นของยูเรียออกจากโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์แลกเคส แล้วนำมาทดสอบแอกติวิตีไม่พบว่าสามารถใช้สับสเตรตได้ อาจเนื่องมาจากภาวะที่ใช้ในการ dialyse มีความไม่เหมาะสม ทำให้ในระหว่างการ refolding อาจเกิดการม้วนพับตัวผิดรูปแบบหรือเกิดการตกตะกอนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเกิดขึ้น เนื่องจากกระบวน refolding นั้นไม่มีวิธีการที่แน่นอนในการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบของ inclusion bodies เปลี่ยนมาอยู่ในรูปแบบ native ดังนั้นวิธีการแก้ไขปัญหานี้คือทำการทดลองแปรผันปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบ inclusion bodies กลับมาอยู่ในรูปแบบที่ถูกต้องคือ ขั้นตอนของการละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการใช้สาร chaotropic ซึ่งได้แก่ ยูเรีย กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ หรือสารจำพวก detergent และขั้นตอนการ refolding ซึ่งมีวิธีให้เลือกใช้อย่างหลากหลาย (Singh และ Panda, 2005)

ตัวอย่างงานวิจัยที่สามารถ refolding รีคอมบิแนนท์เอนไซม์จากรูปแบบ inclusion bodies ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ได้แก่ Whitwam และ Tien (1996) ได้โคลนยีน Mn peroxidase isozyme H4 (λMP1) จาก cDNA ของราไวท์รอท *Phanerochaete chrysosporium* เพื่อให้มีการแสดงออกใน *E. coli* และพบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์มีการแสดงออกในรูปแบบ inclusion bodies ที่ไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นได้แปรผันปัจจัยต่างๆ ในขั้นตอนการละลายและการ refolding และพบว่าในขั้นตอนการละลายรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ด้วยยูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ ยังมีการจับกันของพันธะไดซัลไฟด์ 5 พันธะจึงเติมสาร dithiothreitol ลงไปเพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนขั้นตอน refolding พบว่าการเจือจางให้ความเข้มข้นสุดท้ายของยูเรียเป็น 2 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดเบส 8.0 นั้นมีประสิทธิภาพในการ refolding มากที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร $CaCl_2$ hemin และ oxidized glutathione ที่เติมลงไปในขั้นตอนการ refolding เนื่องจาก heme และไอออนของแคลเซียม 2 อะตอมจะเข้าไปจับกับโครงสร้างของเอนไซม์ในกระบวนการ post-translational modification ในรา และ oxidized glutathione ช่วยในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรดเบส ความเข้มข้นของกลีเซอรอล ไอออน Mn^{2+} ซึ่งเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ก็มีผลต่อการกลับมามีแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ด้วยเช่นเดียวกัน หลังจากการ refolding พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์มีคุณสมบัติต่างๆ เหมือนกับเอนไซม์ Mn peroxidase ในรา และสามารถย่อยสับสเตรตคือ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และ Mn^{2+} ออกซาเลทได้ ดังนั้นจะเห็นว่ามีปัจจัยมากมายที่เกี่ยวข้องกับการ refolding โปรตีนเพื่อทำให้โปรตีนกลับมามีแอกติวิตีตามต้องการได้ และควรได้รับการศึกษาต่อไปสำหรับรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาว่าปัจจัยใดบ้างที่มีผลต่อการม้วนพับตัวของเอนไซม์ต้นแบบในรา แล้วนำมาประยุกต์ใช้เพิ่มเติมในการ refolding รีคอมบิแนนท์แลกเคส เช่น การเติมสารที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดส์สับสเตรต ได้แก่ คอปเปอร์ลงไปในขั้นตอนการ refolding หรืออาจเติมสาร oxidized glutathione ลงไปเพื่อช่วยในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ รวมถึงแปรผันปัจจัยต่างๆ เช่น ค่าความเป็นกรดเบสความเข้มข้นของกลีเซอรอล เวลาที่ใช้ในการ refolding รวมถึงความเข้มข้นของยูเรียที่ใช้ เป็นต้น

ปัจจัยอีกข้อหนึ่งที่อาจส่งผลให้รีคอมบิแนนท์ที่ผ่านกระบวนการ refolding ไม่มีแอกติวิตี คือเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ไม่มีกระบวนการไกลโคซิเลท เพราะใน *E. coli* ไม่มีกระบวนการ post-translational modification ซึ่งอาจส่งผลให้รีคอมบิแนนท์แลกเคสซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้องมีการไกลโคซิเลทไม่สามารถม้วนพับตัวและมีแอกติวิตีที่ถูกต้องได้ วิธีการแก้ไขคือการแสดงออกรีคอมบิแนนท์แลกเคสในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นยูคาริโอต เช่น ยีสต์ หรือราสายใยชนิดอื่น เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่มี

กระบวนการไกลโคซิเลท ซึ่งอาจทำให้รีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ได้สามารถทำงานได้ โดยกระบวนการไกลโคซิเลทในบางครั้งถือว่ามีความสำคัญต่อแอกติวิตีของรีคอมบิแนนท์แลกเคส ซึ่งมีงานวิจัยที่รายงานว่ารีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ได้มีสมบัติต่างๆ ที่เปลี่ยนไปจากแลกเคสปกติ จากการเกิดกระบวนการเกิดไกลโคซิเลทมากเกินไป (hyperglycosylation) ของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมของเอนไซม์ ค่า K_m และค่า redox potential เป็นต้น (Kilaru และคณะ, 2006)

ตัวอย่างเช่น Lu และคณะ (2009) ได้โคลนยีนแลกเคสจาก cDNA ของรา *Pycnoporus sanguineus* เพื่อให้มีการแสดงออกใน *P. pastoris* สายพันธุ์ SMD1168H ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ alcohol oxidase (AOX1) โดยรีคอมบิแนนท์แลกเคสมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 62.8 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับแลกเคสของราที่มีขนาด 61.4 กิโลดาลตัน อีกทั้งรีคอมบิแนนท์เอนไซม์หลั่งออกนอกเซลล์โดยใช้ signal peptide ของรา ซึ่งสามารถตรวจสอบพบแอกติวิตีของแลกเคสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของรีคอมบิแนนท์แลกเคสพบว่ามีความคล้ายคลึงกับแลกเคสจากรา และ specific activity ของเอนไซม์บริสุทธิ์จากราเท่ากับ 340.76 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในขณะที่รีคอมบิแนนท์มี specific activity ลดลงเท่ากับ 172.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์แลกเคสที่ผลิตได้ยังคงเป็น putative laccase เนื่องจากโปรตีนที่ได้ไม่มีแอกติวิตี อีกทั้งยังไม่มีการทำ western blot เพื่อยืนยันว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้คือรีคอมบิแนนท์แลกเคสจริง ดังนั้นทิศทางงานวิจัยในอนาคตเพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์แลกเคสที่สามารถทำงานได้ ควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในแง่การเปลี่ยนสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เวกเตอร์ และ signal sequence ที่ใช้ รวมถึงเปลี่ยนชนิดของเซลล์เจ้าบ้านและระบบการแสดงออก ตลอดจนปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แลกเคสให้อยู่ในรูปแบบ soluble ที่สามารถทำงานได้ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กุลนี ชูพึ่งอาตม์. (2550). การคัดแยกและลักษณะสมบัติของราที่สลายสารพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน. คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์. (2550). การโคลนจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนแลคเคสจากรา *Agrocybe* sp.CU43 สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิลเนตร อัศวะศิริจินดา. (2551). การโคลนและการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์. สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Annuar, M.S.M., Adnan, S., Vikineswary, S. and Chisti, Y. 2009. Kinetics and energetics of azo dye decolorization by *Pycnoporus sanguineus*. Water Air and Soil Pollution. 202: 179-188.

Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews. 30: 215-242.

Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96: 13703-13708.

Bogan, B.W., Trbovic, V. and Paterek, J.R. 2003. Inclusion of vegetable oils in Fenton's chemistry for remediation of PAH-contaminated soils. Chemosphere. 50: 15-21.

Bollag, J.M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology. 48: 849-854.

Bourbonnais, R. and Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267: 99-102.

Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Applied and Environmental Microbiology. 71: 1775-1784.

Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

Chang, C.F., Chang, C.Y., Chen, K.H., et al. 2004. Adsorption of naphthalene on zeolite from aqueous solution. Journal of Colloid and Interface Science. 277: 29-34.

Choi, J.H. and Lee, S.Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology. 64: 625-635.

Chupungars, K., Rerngsamran, P. and Thaniyavarn, S. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 93-99.

Colao, M.C., Garzillo, A.M., Buonocore, V., Schiesser, A. and Ruzzi, M. 2003. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 153-158.

Couto, S.R. and Herrera, J.L.T. 2006a. Lacasses in the textile industry. Biotechnology and Molecular Biology Review. 1: 115-120.

Couto, S.R. and Herrera, J.L.T. 2006b. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnology Advances. 24: 500-513.

Couto, S.R. and Toca-Herrera, J.L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Biotechnology Advances. 25: 558-569.

D'Acunzo, F., Galli, C., Gentili, P. and Sergi, F. 2006. Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates. New Journal of Chemistry. 30: 583-591.

D'Souza, T.M., Boominathan, K. and Reddy, C.A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Applied and Environmental Microbiology. 62: 3739-3744.

Dantan-Gonzalez, E., Vite-Vallejo, O., Martinez-Anaya, C., et al. 2008. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. International Microbiology. 11: 163-169.

Daugulis, A.J. and McCracken, C.M. 2003. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. Biotechnology Letters. 25: 1441-1444.

Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. and Harrison, R.G. 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 65: 382-388.

Delgado-Saborit, J.M., Stark, C. and Harrison, R.M. 2011. Carcinogenic potential, levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in indoor and outdoor environments and their implications for air quality standards. Environment International. 37: 383-392.

Di Lorenzo, M., Hidalgo, A., Haas, M. and Bornscheuer, U.T. 2005. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 71: 8974-8977.

Dubernet, M., Ribereau-Gayon, P., Lerner, H.R., Harel, E. and Mayer, A.M. 1977. Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. Phytochemistry. 16: 191-193.

Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E.L. and Dean, J.F.D. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 1766-1772.

Fahraeus, G. and Ljunggren, H. 1961. Substrate specificity of a purified fungal laccase. Biochimica et Biophysica Acta. 46: 22-32.

Froehner, S.C. and Eriksson, K.E. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. Journal of Bacteriology. 120: 458-465.

Galhaup, C. and Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 225-232.

Gamelas, J.A.F., Tavares, A.P.M., Evtuguin, D.V. and Xavier, A.M.B. 2005. Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. 33: 57-64.

Garcia, T.A., Santiago, M.F. and Ulhoa, C.J. 2007. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 311-318.

Gerstein, A.S. (2001). Molecular biology problem solver. A laboratory guide. United States of America: A John Wiley & Sons, Inc.

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., et al. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 61: 2408-2413.

Gotovac, S., Honda, H., Hattori, Y., et al. 2007. Effect of nanoscale curvature of single-walled carbon nanotubes on adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. Nano Letters. 7: 583-587.

Gray, M.R., Banerjee, D.K., Fedorak, P.M., et al. 1994. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology. 40: 933-940.

Guo, M., Lu, F.P., Liu, M.Y., et al. 2008. Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Biotechnology Letters. 30: 2091-2096.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology. 166: 557-580.

Hatamoto, O., Sekine, H., Nakano, E. and Abe, K. 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 63: 58-64.

Heijnev, G.V. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. European Journal of Biochemistry. 133: 17-21.

Heitkamp, M.A. and Cerniglia, C.E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1612-1614.

Hermann, T.E., Kurtz, M.B. and Champe, S.P. 1983. Laccase localized in Hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology. 154: 955-964.

Hoshida, H., Nakao, M., Kanazawa, H., et al. 2001. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92: 372-380.

Joel, D.M., Marbach, I. and Mayer, A.M. 1978. Laccase in Anacardiaceae. Phytochemistry. 17: 796-797.

Jolivalt, C., Madzak, C., Brault, A., et al. 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 66: 450-456.

Joo, S.S., Ryu, I.W., Park, J.K., et al. 2008. Molecular cloning and expression of a laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties. Molecules and Cells. 25: 112-118.

Juhasz, A.L., Britz, M.L. and Stanley, G.A. 1996. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. Biotechnology Letters. 18: 577-582.

Kanaly, R.A. and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology. 182: 2059-2067.

Kiiskinen, L.L. and Saloheimo, M. 2004. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 137-144.

Kilaru, S., Hoegger, P.J., Majcherczyk, A., et al. 2006. Expression of laccase gene lcc1 in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 200-210.

Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., et al. 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. The Journal of Biological Chemistry. 265: 15224-15230.

Koschorreck, K., Richter, S.M., Swierczek, A., et al. 2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. Archives of Biochemistry and Biophysics. 474: 213-219.

Kurland, C. and Gallant, J. 1996. Errors of heterologous protein expression. Current Opinion in Biotechnology. 7: 489-493.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Liu, J., Hu, T.M. and Hou, X. 2007. High-level expression of functional tumor suppressor LKB1 in *Escherichia coli*. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica. 39: 779-786.

Lu, L., Zhao, M., Liang, S.C., et al. 2009. Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. Journal of Applied Microbiology. 107: 1149-1156.

Majcherczyk, A., Johannes, C. and Huttermann, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology. 22: 335-341.

Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews. 60: 512-538.

Mansur, M., Suarez, T., Fernandez-Larrea, J.B., Brizuela, M.A. and Gonzalez, A.E. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology. 63: 2637-2646.

Marcoux, J., Déziel, E., Villemur, R., et al. 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in a two-liquid-phase bioreactor. Journal of Applied Microbiology. 88: 655-662.

Matroudi, S., Zamani, M.R. and Motallebi, M. 2008. Molecular cloning of chitinase 33 (chit33) gene from *Trichoderma atroviride*. Brazilian Journal of Microbiology. 39: 433-437.

Mayer, A.M. and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 60: 551-565.

Messerschmidt, A. (1997). Multi-copper oxidases. Singapore: World Scientific.

Miki, Y., Morales, M., Ruiz-Duenas, F.J., et al. 2009. *Escherichia coli* expression and *in vitro* activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue. Protein Expression and Purification. 68: 208-214.

Molitoris, H.P. and Esser, K. 1971. The phenoloxidases of the Ascomycete *Podospora anserina*. Archives of Microbiology. 77: 99-110.

Mougin, C., Jolivalt, C., Briozzo, P. and Madzak, C. 2003. Fungal laccases: From structure-activity studies to environmental applications. Environmental Chemistry Letters. 1: 145-148.

Okamoto, K., Ito, Y., Shigematsu, I., Yanagi, S.O. and Yanase, H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Mycoscience. 44: 0011-0017.

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M. and Moukha, S. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. European Journal of Biochemistry. 267: 1619-1625.

Piskonen, R. and Itavaara, M. 2004. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology. 65: 627-634.

Pizzul, L., Castillo, M.D. and Stenstrom, J. 2007. Effect of rapeseed oil on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Rhodococcus wratislaviensis*. International Biodeterioration & Biodegradation. 59: 111-118.

Punnapayak, H., Prasongsuk, S., Messner, K., Danmek, K. and Lotrakul, P. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by laccase from a tropical white rot fungus *Ganoderma lucidum*. African Journal of Biotechnology. 8: 5897-5900.

Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., et al. 2002. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. European Journal of Biochemistry. 269: 602-609.

Rogulin, E.A., Perevyazova, T.A., Zheleznaya, L.A. and Matvienko, N.I. 2004. Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site-specific nickase N. *Bsp*D6I. Biochemistry (Moscow). 69: 1123-1127.

Rosales, E., Couto, S.R. and Sanroman, M.A. 2007. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. Enzyme and Microbial Technology. 40: 1286-1290.

Salony, Mishra, S. and Bisaria, V.S. 2006. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 646-653.

Salony, Garg, N., Baranwal, R., et al. 2008. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics. 1784: 259-268.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3 rd ed. New York: Cold Spring Habor Laboratory Press.

Singh, S.M. and Panda, A.K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99: 303-310.

Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E. and Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. Enzyme and Microbial Technology. 41: 57-61.

Sorensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U. and Mortensen, K.K. 2003. Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: Completion of protein synthesis is the bottleneck. Journal of Chromatography B. 786: 207-214.

Sorensen, H.P. and Mortensen, K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology. 115: 113-128.

Srinivasan, C., D'Souza, T.M., Boominathan, K. and Reddy, C.A. 1995. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Bkm-F1767. Applied and Environmental Microbiology. 61: 4274-4277.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of Molecular Biology. 189: 113-130.

Studier, F.W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. Journal of Molecular Biology. 219: 37-44.

Studier, W.F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. and David, V.G. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In *Methods in Enzymology*, pp. 60-89: Academic Press.

Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., et al. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 67: 2167-2175.

Tantibunthaweewat, T. and Rerngsamran, P. (2009). Cloning of laccase gene from *Agrocybe* sp. CU43. International Conference on Green and Sustainable Innovation: Sufficiency and Sustainability Life Cycle Thinking, pp. 132. Le Meridien Chiang Rai Resort.

Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology. 72: 211-222.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26.

Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A. and Vazquez-Duhalt, R. 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 84: 289-299.

Valentin, L., Lu-Chau, T.A., Lopez, C., et al. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Process Biochemistry. 42: 641-648.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 73: 1163-1172.

Whitwam, R. and Tien, M. 1996. Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn peroxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 333: 439-446.

Whitwam, R.E., Gazarian, I.G. and Tien, M. 1995. Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications. 216: 1013-1017.

Wilson, S.C. and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environmental Pollution. 81: 229-249.

Yamazaki, H.I. 1972. Cuticular phenoloxidase from the silkworm, *Bombyx mori*: Properties, solubilization, and purification. Insect Biochemistry. 2: 431-444.

Zhou, C., Bai, J., Deng, S., et al. 2008. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*. Bioresource Technology. 99: 831-838.

Zhu, L., Chen, B., Wang, J. and Shen, H. 2004. Pollution survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water of Hangzhou, China. Chemosphere. 56: 1085-1095.

Zumarraga, M., Plou, F.J., Garcia-Arellano, H., Ballesteros, A. and Alcalde, M. 2007. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases engineered by directed evolution. Biocatalysis and Biotransformation. 25: 219-228.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract

สารสกัดจากมอล์ต (malt extract)	20	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract

เตรียมอาหารตามวิธีในข้อ ก1 แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB broth)

เตรียมอาหารตามวิธีในข้อ ก3 แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. **อาหารเลี้ยงเชื้อจำกัดไนโตรเจน**

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร	
NH_4NO_3	0.1	กรัมต่อลิตร	Stock A
KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร	
$MgSO_4 \cdot 7H2O$	0.5	กรัมต่อลิตร	Stock B
$FeSO_4 \cdot 7H2O$	0.01	กรัมต่อลิตร	
$ZnSO_4 \cdot 7H2O$	0.001	กรัมต่อลิตร	Stock C
$MnSO_4$	0.001	กรัมต่อลิตร	
$CuSO_4 \cdot 5H2O$	0.001	กรัมต่อลิตร	

ดูด stock สาร stock ละ 10 มิลลิลิตร ก่อนปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้าเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. **อาหารแข็ง ψb**

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb

เตรียมอาหารตามวิธีในข้อ 6 แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกหนึ่งครั้ง

2. ฟลูออรีนความเข้มข้น 100,000 ppm

ชั่งผงฟลูออรีน 1,000 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ให้เป็น 10 มิลลิลิตร ละลายผลึกด้วยเครื่องผสมสารหรือโซนิเคตจนผลึกละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อด้วยฟอยล์ให้มิดชิด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเทต ความเข้มข้น 500 **มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส** 4.5

ชั่งผงโซเดียมอะซิเทต 14.545 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นจนเป็น 4.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลาย ABTS **ความเข้มข้น** 10 **มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเทตความเข้มข้น** 50 **มิลลิโมลาร์**

ชั่งผง ABTS 0.055 กรัม แล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเทตความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร ห่อภาชนะด้วยฟอยล์ป้องกันการสัมผัสกับแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุในภาชนะพลาสติก

6. ชุดสำเร็จสกัดอาร์เอ็นเอ Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

ประกอบด้วย

RNA binding mini columns

DNaseI (ไลโอฟิไลซ์)

Low stringency wash solution (5X concentrae)

High stringency wash solution

Elution solution

DNase dilution solution

PureZol RNA isolation reagent

เมื่อใช้ครั้งแรกละลาย DNaseI ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris (ความเป็นกรดเบส 7.5) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลาย DNaseI โดยปิเปตต์สารขึ้นลงจนสารละลายหมด แล้วแบ่งสารละลายใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 5 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

เจือจางเอทานอล 95% ด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 70% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. น้ำ DEPC

นำน้ำปลอดประจุปริมาตร 999 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่ปลอดเชื้อ เติม DEPC ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. 10X MOPS buffer

ละลาย MOPS 41.8 กรัม ในน้ำ DEPC จนหมด จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 7.0 เติมโซเดียมอะซีเทต 6.8 กรัม คนจนละลายหมด เติม EDTA 1.46 กรัม คนจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใสไม่มีตะกอน

10. เอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับงานด้าน RNA)

เจือจางเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ในน้ำ DEPC 96 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด

11. สารละลาย dNTP ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 10 ไมโครลิตรให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

12. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris base	242	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจจนปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที

13. TfbI

โพแทสเซียมอะซีเทต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกชนิดเข้าด้วยกันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็น 5.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต ขนาดรูกว้าง 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid	0.290	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.103	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.121	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็น 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทตขนาดรูกว้าง 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผงของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทตขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

16. X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal 500 มิลลิกรัม ในสารละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในหลอดปิดสนิทและพันหลอดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันสารละลายสัมผัสกับแสง

17. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทตขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

18. Solution I

ซูโครส (ภาคผนวก ข41)	ความเข้มข้น	5	มิลลิโมลาร์
Tris, ความเป็นกรดเบส 8.0	ความเข้มข้น	25	มิลลิโมลาร์
EDTA, ความเป็นกรดเบส 8.0 (ภาคผนวก ข42)	ความเข้มข้น	10	มิลลิโมลาร์

19. Solution II

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	ความเข้มข้น	0.2	นอร์มอล
SDS	ความเข้มข้น	1%	(w/v)

20. Solution III

สารละลายโซเดียมอะซีเทต	ความเข้มข้น	3	โมลาร์
ความเป็นกรดเบส 5.2 (ภาคผนวก ข43)			

21. RNaseA **ความเข้มข้น** 20 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

Tri-HCl, ความเป็นกรดเบส 8.0	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	15	มิลลิโมลาร์
RNaseA	0.2	กรัม

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตรให้เข้ากัน จากนั้นเติมผง RNaseA 0.2 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร

22. **ชุดสำเร็จ** QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

- บัฟเฟอร์ P1
- บัฟเฟอร์ P2
- บัฟเฟอร์ N3
- บัฟเฟอร์ PB
- บัฟเฟอร์ PE
- RNase A
- Collection tube
- Qiaprep Spin column

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

23. ชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ PB

บัฟเฟอร์ PE

บัฟเฟอร์ EB

QIAquick column

ก่อนใช้ให้เติม 96-100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลลงในบัฟเฟอร์ PE ตามที่แสดงไว้ข้างขวด

24. ยาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผงของยาปฏิชีวนะคานามัยซิน 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทตขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

25. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย Tris-HCl กับสารละลายคลอโรฟอร์มเข้าด้วยกันในอัตราส่วนฟีนอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26. ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผงของยาปฏิชีวนะคานามัยซิน 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

27. ชุดสำเร็จ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germeny)

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ QG

บัฟเฟอร์ PE

QIAquick column

บัฟเฟอร์ EB

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

28. Tris-HCl 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	181.71	กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสโดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

29. สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาต 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

30. 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 1 มิลลิลิตร ละลายจนหมด

31. Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	60.57	กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบส โดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

32. 10X SDS running buffer

Trisma base	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดแยกกันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

33. 2X Laemmli buffer

87 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล	2.29	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรดเบส 6.8	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
Bromphenolblue	0.001	กรัม
10 เปอร์เซ็นต์ SDS	4	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันและนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-Mercaptoethanol ในอัตราส่วน 2X Laemmli buffer 950 ไมโครลิตรต่อ 50 ไมโครลิตร 2-Mercaptoethanol

34. Unstained Molecular weight protein (Fermentas, USA)

ละลาย Unstained Molecular weight protein ที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้วดูดแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นและผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปโหลดเจล เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ในการใช้ครั้งต่อไปละลายที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากัน นำไปโหลดเจล ห้ามบ่มที่อุณหภูมิสูง

35. Coomassie blue staining

Coomasie brilliant blue R250	2	กรัม
เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

36. Destaining solution

เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

37. ชุดสำเร็จ TALON® Metal Affinity Resins (Clontech, USA)

ประกอบด้วย

TALON Metal Affinity Resin

บัฟเฟอร์ 5X Equilibration/Wash

(250 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate, 1.5 โมลาร์ NaCl, ความเป็นกรดเบส 7)

บัฟเฟอร์ 5X Equilibration

(250 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate, 1.5 โมลาร์ NaCl, ความเป็นกรดเบส 8)

บัฟเฟอร์ 10X Elution (1.5 โมลาร์ imidazole, ความเป็นกรดเบส 7)

2 มิลลิลิตร Disposable Gravity Columns

10 มิลลิลิตร Disposable Gravity Column

ก่อนใช้ 5X Equilibration/Wash หรือ 5X Equilibration ให้เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให เป็น 1X ส่วนการใช้ในภาวะ denature ละลายผงยูเรียที่ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 โมลาร์ ด้วย 1X บัฟเฟอร์ Equilibration/Wash หรือ บัฟเฟอร์ Equilibration และ บัฟเฟอร์ 10X Elution ก่อนใช้ชะเรซินให้เจือจางเป็น 1X ด้วย 1X บัฟเฟอร์ Equilibration/Wash หรือ บัฟเฟอร์ Equilibration ที่มียูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์

38. 5X SDS PAGE sample buffer

Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8	2.5	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ SDS	1	กรัม
โบรโมฟีนอลบลู	0.05	กรัม
85 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล	5.75	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุเป็น 10 มิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-Mercaptoethanol ในอัตราส่วน 5X SDS PAGE sample buffer 950 ไมโครลิตรต่อ 50 ไมโครลิตร 2-Mercaptoethano

39. 100 **มิลลิโมลาร์** $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	23.784	กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุ ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

40. 5X **บัฟเฟอร์** dialyse

บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ความเป็นกรดเบส 8.0)	250	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์	300	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งผงยูเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ ละลายด้วย 1X บัฟเฟอร์ dialyse ผสมกับ 85 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ปริมาตร 352.94 มิลลิลิตร เมื่อผงยูเรียละลายจนหมดแล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วย 1X บัฟเฟอร์ dialyse เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยกเว้นที่ความเข้มข้นยูเรีย 8 โมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

41. **ซูโครส ความเข้มข้น** 1 **โมลาร์**

ซูโครส	342.3	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

42. **สารละลาย** EDTA **ความเข้มข้น** 0.5 **โมลาร์ ความเป็นกรดเบส** 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$)	93.05	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	10	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

43. **สารละลายโซเดียมอะซีเทต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส** 5.2

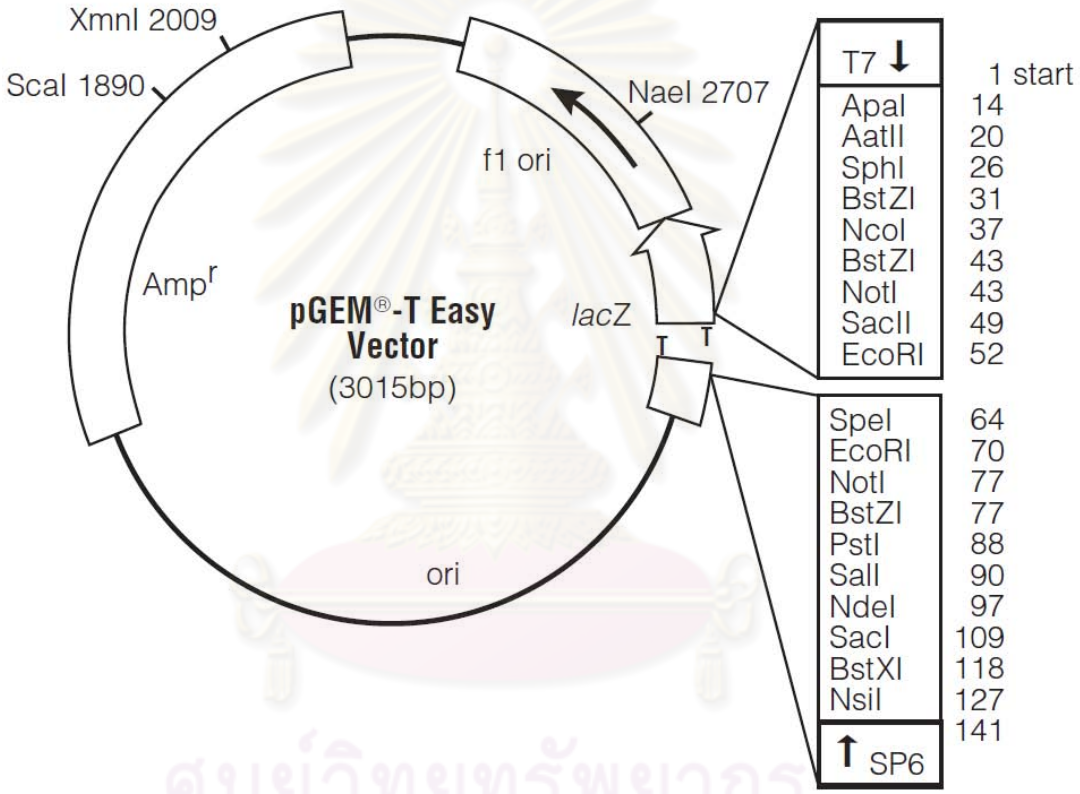
ละลายโซเดียมอะซีเทต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

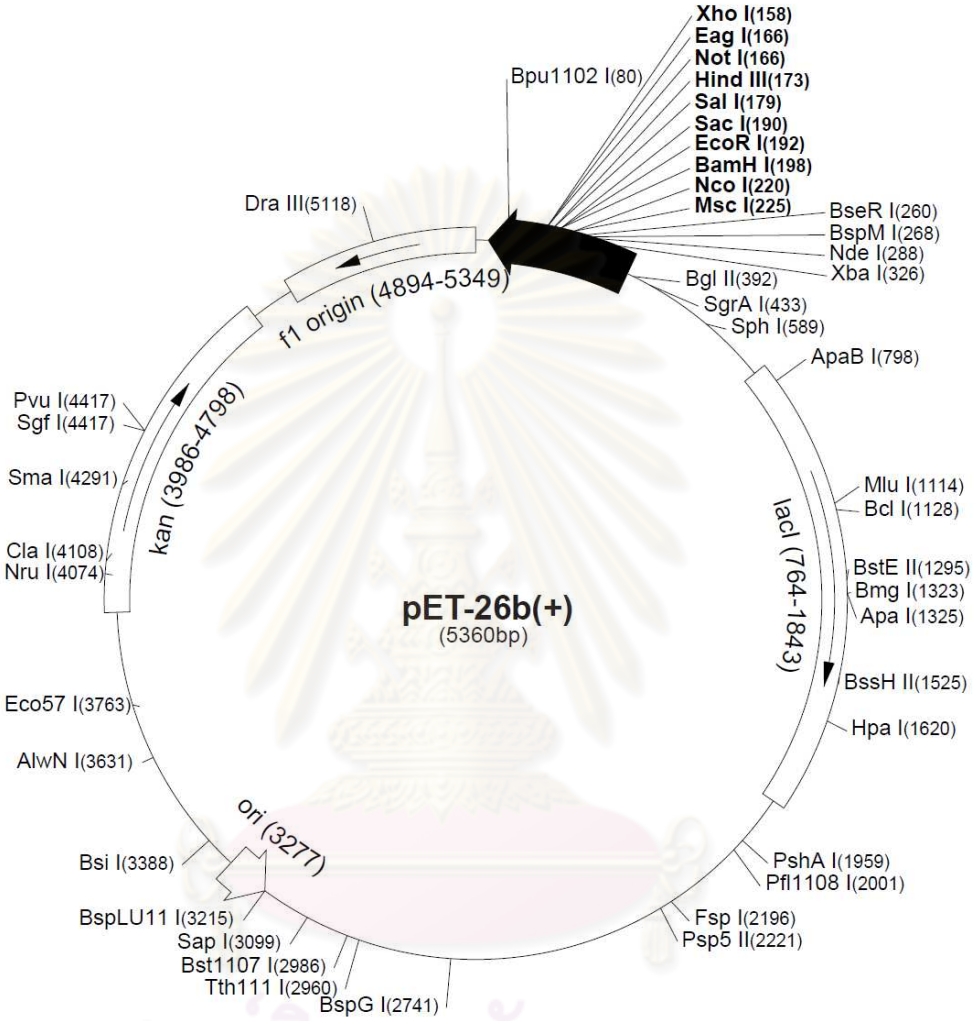
เวกเตอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์

1. เวกเตอร์ pGEM®-T easy vector (Promega, USA)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

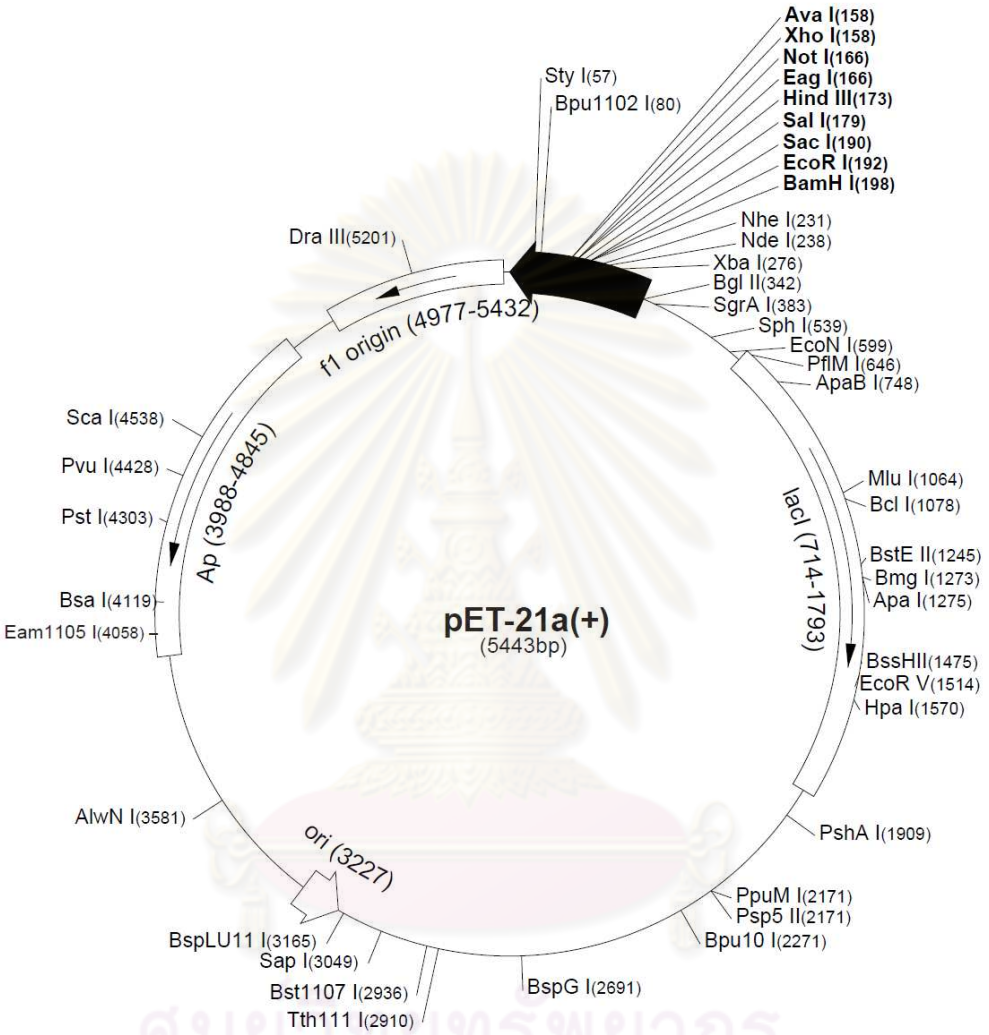
2. เวกเตอร์ pET-26b(+) (Novagen, USA)

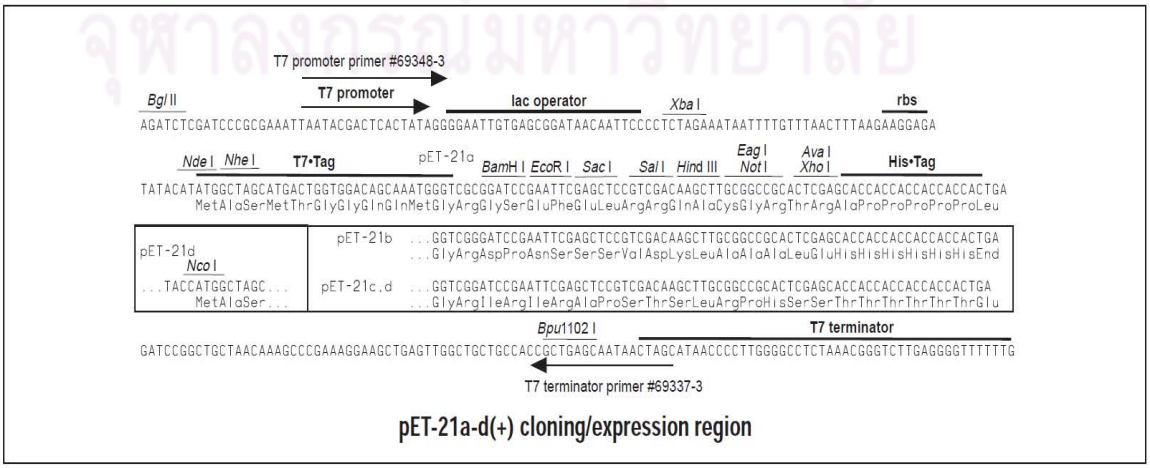


pET-26b(+) cloning/expression region

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เวกเตอร์ pET-21c(+) (Novagen, USA)





4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนแลกเคสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTTLC

lacC-F1 primer ⟶

TAGTGATT**GTCCCTTCGTTCTCGCA**AAAC**ATG**GTTCTCCTCTTTGCTGGCTTCGTTT
GCCTTTCCGTCATTTCCAGCACCTATGCTGCCATAGGCCCTGCTGCGAACTTGTTCA
TCGCAAACAAATTCATCCACCCCGATGGGTTCAATCGATCGGCTGTTCTTGCGGGAG
CCACCACCGATTCTGTGTCATTCCCGGGACCTGTCATCACCGGGAAGAAGGGGGATA
CGTTCCGCATGAACGTCATCGACGCCTTGACCGACACGACCATGCTGGTCAGCACGT
CCATCCACTGGCACGGTTTCTTCCAACACGGGACCAACTGGGCTGACGGCCCTGTAG
GAGTGAACCAATGTCCTCTCGCCCCTGGACATGCCTTCCTCTACGAATTCTCCACTC
CGGACCAAGCTGGAACCTTCTGGTACCACTCTCATTATTCAACTCAATACTGTGATG
GCCTCAGAGGAGCACTCGTGGTCTACGACGACAATGACCCGCACGCGCACTTATACG
ACTTCGACGACGAGAGCACCATTATCACTCTGGCGGACTGGTACCATACGGTTGCTC
CGTCTGCTGGGTTGGTACCTGGGTCGGATGCGACTTTGATCAACGGCGTCGGCCGCT
TTGCTGGCGGACCTGCCGTCGACCTGGCGGTTATCAACGTGTTGCCCAACAAGAGGT
ACCGGTTCCGCTTGATTTCCGTCTCTTGCGACCCCAATTTCATTTTCTCTATCGATG

Lac-R1 primer ⟵

GGCACAACATGAC**GATCATCGAGGTCGACTCCGTCAACGT**CGAACCCCTCACCGTCG
ATTCCATTCAGATCTTCGCCGCCCAGCGGTACTCCTTCGTGCTGAACGCCAACCAGC
CGATCGATAACTACTGGATTCGCGCCCTCCCCAACGGCAACGCCACCGGCTTCGACG
GTGGCGTTAACTCTGCCATATTAAGGTACAGTGGCGCACCCGTCGCCGAGCCAAGCA
CGACTGCCGCTTCGAGTAACCCGATGCTCGAGACCAATCTGCATCCGCTCGAGAACC
CCGGAGCGCCGGGCATCCCTGCCCCCGGTGCCGCCGACGTCAATCTCAATCTCCAGA
TCGTGTTCAATCTGACGTCGTTGCTGTTCACGGTCAACAACGCCACGTTCATCCCGC
CTTCGGTCCCGGTCCTGCTTCAGATCATGAGCGGTTCGTTGACAGCACAGGAGCTGC
TGCCCCCTGGGTCGGTCTATGTCCTGCCGCCCAATAAAGTTATCGAGATCTCCTTGC
CTGGTGGTGCCATAGGAAGCCCGCACCCCATCCACCTTCACGGACATAACTTTGATG
TCATCCGGAGTGCTGGGAGTTCTGTATACAATTTCGCCAATCCCGTCCGCAGGGATG
TCGTGAGCATCGGAGCTGCGGGCGACAATGTCACCTTCCGATTCACGACCAACAATG
CTGGTCCGTGGATAATGCATTGCCACATCGATTGGCATCTGAATCTCGGTCTTGCTG
TCGTCTTCGCCGAAGATGTTCCAGAGGTTACGACCTTCTCTCCTCCAGCCGATTGGG
AGCAAATTTGTCCGGACTTCGACAAGCT**TCCGCCACAAGTCTTCAACAACTGA**

⟵ lacC-R5 primer

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคสตั้งแต่ lacC-F1 primer ถึง stop codon มีขนาด 1,584 bp ทิศทางจากบนลงล่างแสดงจาก 5’ ⟶ 3’

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนแลกเคสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1

pelB coding sequence

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCG

*Nco*I

GCGATGGCC**ATGGGCCCTGCTGCGAACTTGTTCATCGCAAACAAATTCATCCACCCC**
GATGGGTTCAATCGATCGGCTGTTCTTGCGGGAGCCACCACCGATTCTGTGTCATTC
CCGGGACCTGTCATCACCGGGAAGAAGGGGGATACGTTCCGCATGAACGTCATCGAC
GCCTTGACCGACACGACCATGCTGGTCAGCACGTCCATCCACTGGCACGGTTTCTTC
CAACACGGGACCAACTGGGCTGACGGCCCTGTAGGAGTGAACCAATGTCCTCTCGCC
CCTGGACATGCCTTCCTCTACGAATTCTCCACTCCGGACCAAGCTGGAACCTTCTGG
TACCACTCTCATTATTCAACTCAATACTGTGATGGCCTCAGAGGAGCACTCGTGGTC
TACGACGACAATGACCCGCACGCGCACTTATACGACTTCGACGACGAGAGCACCATT
ATCACTCTGGCGGACTGGTACCATACGGTTGCTCCGTCTGCTGGGTTGGTACCTGGG
TCGGATGCGACTTTGATCAACGGCGTCGGCCGCTTTGCTGGCGGACCTGCCGTCGAC
CTGGCGGTTATCAACGTGTTGCCCAACAAGAGGTACCGGTTCCGCTTGATTTCCGTC
TCTTGCGACCCCAATTTCATTTTCTCTATCGATGGGCACAACATGACGATCATCGAG
GTCGACTCCGTCAACGTCGAACCCCTCACCGTCGATTCCATTCAGATCTTCGCCGCC
CAGCGGTACTCCTTCGTGCTGAACGCCAACCAGCCGATCGATAACTACTGGATTCGC
GCCCTCCCCAACGGCAACGCCACCGGCTTCGACGGTGGCGTTAACTCTGCCATATTA
AGGTACAGTGGCGCACCCGTCGCCGAGCCAAGCACGACTGCCGCTTCGAGTAACCCG
ATGCTCGAGACCAATCTGCATCCGCTCGAGAACCCCGGAGCGCCGGGCATCCCTGCC
CCCGGTGCCGCCGACGTCAATCTCAATCTCCAGATCGTGTTCAATCTGACGTCGTTG
CTGTTCACGGTCAACAACGCCACGTTCATCCCGCCTTCGGTCCCGGTCCTGCTTCAG
ATCATGAGCGGTTCGTTGACAGCACAGGAGCTGCTGCCCCCTGGGTCGGTCTATGTC
CTGCCGCCCAATAAAGTTATCGAGATCTCCTTGCCTGGTGGTGCCATAGGAAGCCCG
CACCCCATCCACCTTCACGGACATAACTTTGATGTCATCCGGAGTGCTGGGAGTTCT
GTATACAATTTCGCCAATCCCGTCCGCAGGGATGTCGTGAGCATCGGAGCTGCGGGC
GACAATGTCACCTTCCGATTCACGACCAACAATGCTGGTCCGTGGATAATGCATTGC
CACATCGATTGGCATCTGAATCTCGGTCTTGCTGTCGTCTTCGCCGAAGATGTTCCA
GAGGTTACGACCTTCTCTCCTCCAGCCGATTGGGAGCAAATTTGTCCGGACTTCGAC

*Bam*HI

AAGCTTCCGCCACAAGTCTTCAACAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTT
GCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
His Tag

หมายเหตุ ตัวหนาคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคส ทิศทางจากบนลงล่างแสดงจาก 5’ ⟶ 3’

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนแลกเคสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETSS_7

pelB coding sequence

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCG

*Nco*I

GCGATGGCC ***ATG GTT CTC CTC TTT GCT GGC TTC GTT TGC CTT TCC***

GTC ATT TCC AGC ACC TAT GCT GCC

ATAGGCCCTGCTGCGAACTTGTTCATCGCAAACAAATTCATCCACCCCGATGGGTTC
AATCGATCGGCTGTTCTTGCGGGAGCCACCACCGATTCTGTGTCATTCCCGGGACCT
GTCATCACCGGGAAGAAGGGGGATACGTTCCGCATGAACGTCATCGACGCCTTGACC
GACACGACCATGCTGGTCAGCACGTCCATCCACTGGCACGGTTTCTTCCAACACGGG
ACCAACTGGGCTGACGGCCCTGTAGGAGTGAACCAATGTCCTCTCGCCCCTGGACAT
GCCTTCCTCTACGAATTCTCCACTCCGGACCAAGCTGGAACCTTCTGGTACCACTCT
CATTATTCAACTCAATACTGTGATGGCCTCAGAGGAGCACTCGTGGTCTACGACGAC
AATGACCCGCACGCGCACTTATACGACTTCGACGACGAGAGCACCATTATCACTCTG
GCGGACTGGTACCATACGGTTGCTCCGTCTGCTGGGTTGGTACCTGGGTCGGATGCG
ACTTTGATCAACGGCGTCGGCCGCTTTGCTGGCGGACCTGCCGTCGACCTGGCGGTT
ATCAACGTGTTGCCCAACAAGAGGTACCGGTTCCGCTTGATTTCCGTCTCTTGCGAC
CCCAATTTCATTTTCTCTATCGATGGGCACAACATGACGATCATCGAGGTCGACTCC
GTCAACGTCGAACCCCTCACCGTCGATTCCATTCAGATCTTCGCCGCCCAGCGGTAC
TCCTTCGTGCTGAACGCCAACCAGCCGATCGATAACTACTGGATTCGCGCCCTCCCC
AACGGCAACGCCACCGGCTTCGACGGTGGCGTTAACTCTGCCATATTAAGGTACAGT
GGCGCACCCGTCGCCGAGCCAAGCACGACTGCCGCTTCGAGTAACCCGATGCTCGAG
ACCAATCTGCATCCGCTCGAGAACCCCGGAGCGCCGGGCATCCCTGCCCCCGGTGCC
GCCGACGTCAATCTCAATCTCCAGATCGTGTTCAATCTGACGTCGTTGCTGTTCACG
GTCAACAACGCCACGTTCATCCCGCCTTCGGTCCCGGTCCTGCTTCAGATCATGAGC
GGTTCGTTGACAGCACAGGAGCTGCTGCCCCCTGGGTCGGTCTATGTCCTGCCGCCC
AATAAAGTTATCGAGATCTCCTTGCCTGGTGGTGCCATAGGAAGCCCGCACCCCATC
CACCTTCACGGACATAACTTTGATGTCATCCGGAGTGCTGGGAGTTCTGTATACAAT
TTCGCCAATCCCGTCCGCAGGGATGTCGTGAGCATCGGAGCTGCGGGCGACAATGTC
ACCTTCCGATTCACGACCAACAATGCTGGTCCGTGGATAATGCATTGCCACATCGAT
TGGCATCTGAATCTCGGTCTTGCTGTCGTCTTCGCCGAAGATGTTCCAGAGGTTACG
ACCTTCTCTCCTCCAGCCGATTGGGAGCAAATTTGTCCGGACTTC

*Bam*HI

GACAAGCTTCCGCCACAAGTCTTCAACAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG
CTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

His Tag

หมายเหตุ ตัวเอียงหนาคือ signal sequence ของรา *Agrocybe* sp. CU43 ลูกศรชี้ลงคือตำแหน่ง cleavage site ตัวหนาคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลกเคส

7. ลำดับเพปไทด์ของแลกเคสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETNS_1

```
ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC
 M   K   Y   L   L   P   T   A   A   A   G   L   L   L

CTC GCT GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GGC CCT GCT GCG AAC
 L   A   A   Q   P   A   M   A   M   G   P   A   A   N

TTG TTC ATC GCA AAC AAA TTC ATC CAC CCC GAT GGG TTC AAT
 L   F   I   A   N   K   F   I   H   P   D   G   F   N

CGA TCG GCT GTT CTT GCG GGA GCC ACC ACC GAT TCT GTG TCA
 R   S   A   V   L   A   G   A   T   T   D   S   V   S

TTC CCG GGA CCT GTC ATC ACC GGG AAG AAG GGG GAT ACG TTC
 F   P   G   P   V   I   T   G   K   K   G   D   T   F

CGC ATG AAC GTC ATC GAC GCC TTG ACC GAC ACG ACC ATG CTG
 R   M   N   V   I   D   A   L   T   D   T   T   M   L

GTC AGC ACG TCC ATC CAC TGG CAC GGT TTC TTC CAA CAC GGG
 V   S   T   S   I   H   W   H   G   F   F   Q   H   G

ACC AAC TGG GCT GAC GGC CCT GTA GGA GTG AAC CAA TGT CCT
 T   N   W   A   D   G   P   V   G   V   N   Q   C   P

CTC GCC CCT GGA CAT GCC TTC CTC TAC GAA TTC TCC ACT CCG
 L   A   P   G   H   A   F   L   Y   E   F   S   T   P

GAC CAA GCT GGA ACC TTC TGG TAC CAC TCT CAT TAT TCA ACT
 D   Q   A   G   T   F   W   Y   H   S   H   Y   S   T

CAA TAC TGT GAT GGC CTC AGA GGA GCA CTC GTG GTC TAC GAC
 Q   Y   C   D   G   L   R   G   A   L   V   V   Y   D

GAC AAT GAC CCG CAC GCG CAC TTA TAC GAC TTC GAC GAC GAG
 D   N   D   P   H   A   H   L   Y   D   F   D   D   E

AGC ACC ATT ATC ACT CTG GCG GAC TGG TAC CAT ACG GTT GCT
 S   T   I   I   T   L   A   D   W   Y   H   T   V   A

CCG TCT GCT GGG TTG GTA CCT GGG TCG GAT GCG ACT TTG ATC
 P   S   A   G   L   V   P   G   S   D   A   T   L   I

AAC GGC GTC GGC CGC TTT GCT GGC GGA CCT GCC GTC GAC CTG
 N   G   V   G   R   F   A   G   G   P   A   V   D   L
```

GCG GTT ATC AAC GTG TTG CCC AAC AAG AGG TAC CGG TTC CGC
A V I N V L P N K R Y R F R

TTG ATT TCC GTC TCT TGC GAC CCC AAT TTC ATT TTC TCT ATC
L I S V S C D P N F I F S I

GAT GGG CAC AAC ATG ACG ATC ATC GAG GTC GAC TCC GTC AAC
D G H **N** **M** **T** I I E V D S V N

GTC GAA CCC CTC ACC GTC GAT TCC ATT CAG ATC TTC GCC GCC
V E P L T V D S I Q I F A A

CAG CGG TAC TCC TTC GTG CTG AAC GCC AAC CAG CCG ATC GAT
Q R Y S F V L N A N Q P I D

AAC TAC TGG ATT CGC GCC CTC CCC AAC GGC AAC GCC ACC GGC
N Y W I R A L P N G **N** **A** **T** G

TTC GAC GGT GGC GTT AAC TCT GCC ATA TTA AGG TAC AGT GGC
F D G G V N S A I L R Y S G

GCA CCC GTC GCC GAG CCA AGC ACG ACT GCC GCT TCG AGT AAC
A P V A E P S T T A A S S N

CCG ATG CTC GAG ACC AAT CTG CAT CCG CTC GAG AAC CCC GGA
P M L E T N L H P L E N P G

GCG CCG GGC ATC CCT GCC CCC GGT GCC GCC GAC GTC AAT CTC
A P G I P A P G A A D V N L

AAT CTC CAG ATC GTG TTC AAT CTG ACG TCG TTG CTG TTC ACG
N L Q I V F **N** **L** **T** S L L F T

GTC AAC AAC GCC ACG TTC ATC CCG CCT TCG GTC CCG GTC CTG
V N **N** **A** **T** F I P P S V P V L

CTT CAG ATC ATG AGC GGT TCG TTG ACA GCA CAG GAG CTG CTG
L Q I M S G S L T A Q E L L

CCC CCT GGG TCG GTC TAT GTC CTG CCG CCC AAT AAA GTT ATC
P P G S V Y V L P P N K V I

GAG ATC TCC TTG CCT GGT GGT GCC ATA GGA AGC CCG CAC CCC
E I S L P G G A I G S P H P

ATC CAC CTT CAC GGA CAT AAC TTT GAT GTC ATC CGG AGT GCT
I H L H G H N F D V I R S A

GGG AGT TCT GTA TAC AAT TTC GCC AAT CCC GTC CGC AGG GAT
G S S V Y N F A N P V R R D

GTC GTG AGC ATC GGA GCT GCG GGC GAC AAT GTC ACC TTC CGA
V V S I G A A G D **N** **V** **T** F R

TTC ACG ACC AAC AAT GCT GGT CCG TGG ATA ATG CAT TGC CAC
F T T N N A G P W I M H C H

ATC GAT TGG CAT CTG AAT CTC GGT CTT GCT GTC GTC TTC GCC
I D W H L N L G L A V V F A

GAA GAT GTT CCA GAG GTT ACG ACC TTC TCT CCT CCA GCC GAT
E D V P E V T T F S P P A D

TGG GAG CAA ATT TGT CCG GAC TTC GAC AAG CTT CCG CCA CAA
W E Q I C P D F D K L P P Q

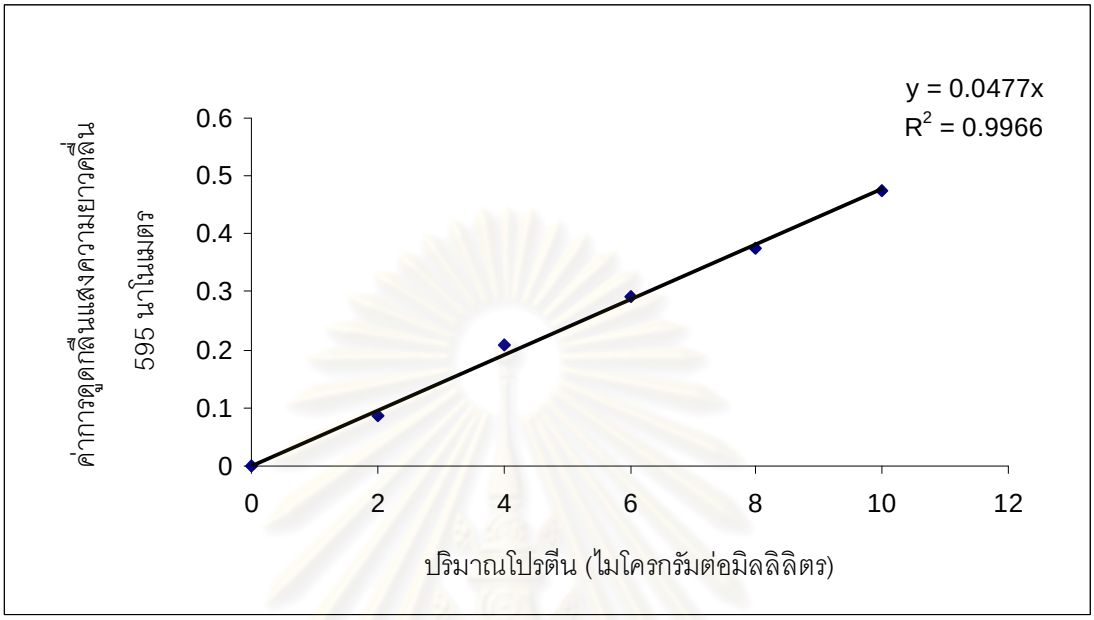
GTC TTC AAC AAG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT
V F N K D P N S S S V D K L

GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA
A A A L E H H H H H H Stop

หมายเหตุ ตัวหนาคือบริเวณไกลโคซิเลชั่นที่ได้จากการทำนาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. กราฟมาตรฐาน BSA



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดชุมพร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 418 หมู่ 3 ต. ปากน้ำ อ. เมือง จ. ชุมพร

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการ International Conference on Green and Sustainable Innovation: Sufficiency and Sustainability Life Cycle Thinking. เมื่อวันที่ 2 – 4 ธันวาคม 2552 ณ Le Meridien Chiang Rai Resort ภายใต้ชื่อเรื่อง Cloning of laccase gene from *Agrocybe* sp. CU43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย